



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Uso de imagens NIR para controle de qualidade de comprimidos comerciais

Leandro de Moura França

Recife
2015

Leandro de Moura França

**Uso de imagens NIR para controle de qualidade
de comprimidos comerciais**

Tese submetida ao curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Dra. Maria Fernanda Pimentel

Co-Orientador: Dra. Simone da Silva Simões

Recife

2015

Catálogo na fonte

Bibliotecário Elaine Cristina de Freitas CRB 1790

F814u França, Leandro de Moura.
 Uso de imagens NIR para controle de qualidade de comprimidos comerciais/ Leandro de Moura França . – 2015.
 114 f.: fig., tab.

 Orientadora: Maria Fernanda Pimentel.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, Recife, 2015.
 Inclui referências.

 1. Química Analítica. 2. Espectroscopia de infravermelho. 3. Análise variada. I. Pimentel, Maria Fernanda (Orientadora). II. Título.

 543 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2017-54

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Aprovada em: 27 de março de 2015

Profª Dra. Maria Fernanda Pimentel Avelar

(Orientadora)

Departamento de Engenharia Química
Universidade Federal de Pernambuco

Profº Dr. João Bosco Paraíso da Silva

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Profª Dra. Claudete Fernandes Pereira

(Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco)

Profª Dra. Mônica Felts de La Roca Soares

Departamento de Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Pernambuco

Profº Dr. José Germano Veras Neto

Departamento de Química
Universidade Estadual da Paraíba

*Dedico à Sara, quem me acompanhou
em toda minha jornada, sendo minha
incentivadora e musa inspiradora, além
de dar meu melhor presente (Pedro).*

AGRADECIMENTOS

À todas boas energias que vibram positivamente e elevam o espírito, permitindo alcançar os objetivos de uma forma mais harmoniosa.

À Sara, minha maravilhosa esposa, a qual foi grande motivadora e participante desta etapa em minha vida. Contribuindo para que chegasse ao fim desta etapa da melhor e tranquila forma possível. Sua compreensão e amizade foram muito importantes. Amo cada vez mais!! E além disto, deu-me o melhor presente.

Aos meus queridos Pai e Mãe, por permitirem chegar onde cheguei, fornecendo todo tipo de motivação que um filho pode ter. À minha Mãezinha, Edênia, que além de me dar irmãos foi aquela que também contribuiu na minha formação e desenvolvimento como ser humano. Ao meus irmãos (Pedro e Lu), sua existência me fez melhor e muito feliz. Aos meus novos familiares, Dai, Lica e Nelson, obrigado por todo o suporte e incentivo. E aos meus velhos familiares, de Moura, França, Carvalho e Santos, obrigado por tudo! E que nossa família cresça mais!!! Viva a 4ª geração.

À minha orientadora Fernanda Pimentel, pois foi quem contribuiu para até aqui, motivando e me fazendo crescer como indivíduo. Todo aprendizado fornecido e experiências proporcionadas nunca serão esquecidos. Obrigado mesmo! Além de ser um grande exemplo a ser seguido profissionalmente, tudo que aqui vivi/aprendi vai ser um legado, para que, na medida do possível, passe adiante, pois hoje sei que sou muito melhor, e estes 4 anos foram muito edificantes.

A minha co-orientadora Simone Simões, que auxiliou desde o início no mergulho do mundo à quimiometria, além de sua amizade e estímulo. Ao colaborador e parceiro Júnior Granjeiro.

Aos Profs Alberto Ferrer e José Manuel Prats, da Universidade Politécnica de Valência, pela grande contribuição em minha formação, e auxílio no desenvolvimento do trabalho com Captopril (MCR-ALS, MIA e IFE). Ao prof José Manuel Amigo, da Universidade de Copenhagen, pela amizade e contribuição no desenvolvimento do trabalho de homogeneidade. E aos colaboradores Carlos Cairós e Manel Bautista.

Aos meus grandes amigos de trabalho e atividades extra curriculares Nei e Josi; Carol e Danilo; Ali (minha irmã) e Edu; e Vitor Lvovinaldo; e a meu caros Manu e Elvis - e a todas suas famílias que também nos abraçaram. Não necessariamente nesta mesma ordem, por serem uma extensão da família, vocês deixaram Recife muito mais agradável.

À Super Carol Maia e a Fernandinha pela grande ajuda no desenvolvimento dos trabalhos.

Aos membros da banca Dra Mônica Feltz, Dr Germano Vêras e Dra Claudete Fernandes.

Por fim, e não menos importante, ao meu querido Pedro, que virá para me estimular a ser uma pessoa melhor a cada momento!!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Colegiado de Pós-Graduação em Química do DQF; ao Laboratório de Combustíveis (LAC) e seus integrantes, pela colaboração no desenvolvimento dos trabalhos.

Aos professores, colegas e colaboradores do GIA (Grupo de Instrumentação e Automação em Química Analítica) da UNICAMP, por cederem espaço para desenvolvimento de atividades, principalmente o uso da câmera hiperespectral.

Ao LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Miguel Arraes), pelas amostras e espaços abertos para análise e controle de qualidade.

Às Universidade Politécnica de Valência e Universidade de Copenhague, por aceitar-me em suas dependências para o desenvolvimento de atividades e colaboração.

Ao CNPq por todo o suporte concedido.

*“A educação é a arma mais poderosa
que você pode usar para mudar o
mundo.”*

Nelson Mandela

RESUMO

O controle de qualidade farmacêutico é importante para melhorar a eficácia, pureza e segurança das drogas, principalmente para que os medicamentos distribuídos cheguem ao seu destino sem modificações que causem danos aos usuários ou ineficácia terapêutica. Métodos analíticos baseados em imagens hiperespectrais na região do infravermelho próximo (HSI-NIR) e técnicas quimiométricas permitem a identificação e quantificação de compostos químicos em cada *pixel*, e, conseqüentemente, torna possível o estudo da distribuição espacial dos ativos e excipientes. Esses métodos são ferramentas importantes no contexto da Tecnologia Analítica de Processo (PAT) e qualidade no desenvolvimento (QbD), contribuindo para o entendimento do desenvolvimento, processo de produção de medicamentos para manutenção da qualidade do produto final. No presente trabalhos há três abordagens utilizando HSI-NIR e quimiometria. Na primeira, HSI-NIR foram úteis para identificação das estruturas químicas internas e avaliação do comportamento dos excipientes da formulação em comprimido de dose-fixa combinada de antirretrovirais (lamivudina e zidovudina). Para isso foi utilizada análise de componentes principais (PCA) após aquisição dos mapas de concentração via resolução multivariada de curvas por mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS). Em sequência é apresentado um estudo utilizando comprimidos de captopril com diferentes datas de validade para avaliar o comportamento da degradação do insumo ativo, o captopril, formando o dissulfeto de captopril. As estruturas químicas internas também foram avaliadas, e um modelo de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) foi construído relacionando os vetores características com o tempo de fabricação para identificação de um padrão de degradação. Como resultados, observou-se que processo de degradação ocorre em torno da distribuição do ativo, e é evidenciado claramente em comprimidos mais antigos. DWT (“*discrete wavelet transform*”) apresentou os melhores resultados para os conjuntos de calibração e validação externa, com erro quadrático de previsão (RMSEP) do modelo de 6,5 meses. A última abordagem está relacionada ao desenvolvimento de um método para determinação de um índice de homogeneidade (%H), atingido por meio de simulações de imagens e desenvolvimento de um modelo matemático. Testes também foram realizados em amostras reais. As simulações demonstraram-se adequadas para verificar e avaliar teorias relacionadas ao processo de mistura e amostragem, sendo possível verificar o índice de homogeneidade de compostos em imagens binarizadas e de amostras reais de iogurte.

Palavras chave: Química Analítica. Quimiometria. Infravermelho Próximo. Imagem. Comprimido. Produto de degradação. Homogeneidade.

ABSTRACT

Pharmaceutical quality control is important to improve the effectiveness, purity and safety of drugs, mainly so that commercial drugs can reach their destination without modifications, causing damage to users or therapeutic failure. Analytical methods based on Near infrared hyperspectral images (HSI-NIR) and chemometric techniques enable the identification and quantification of the chemical compounds at each *pixel*, and consequently make possible the study of the spatial distribution of the active and excipient components. These methods are important tools for Process Analytical Technology framework and quality by Design (QbD), contributing to understanding the manufacturing process, drug development and quality assurance. Thus they are an attractive tool for the pharmaceutical industry. In this work there are three approaches using HSI-NIR and chemometrics. In the first approach, HSI-NIR was useful to identify the internal chemical structures and the behavior of the excipient formulation in fixed dose combination tablets of zidovudine (AZT) and lamivudine. Principal component analysis (PCA) was performed after the acquisition of concentration distribution maps, using multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS). In sequence, there is a study using captopril tablets with different manufacturing dates, to evaluate the behavior of the degradation process of the active ingredient, into captopril disulfide. The internal chemical structures were also evaluated, and a partial least squares model (PLS) was built relating characteristics vectors with time of manufacturing, to identify a pattern of degradation. As a result, the degradation process was seen to occur around the distribution of the active ingredient, and was more clearly visualized in older tablets. DWT (discrete wavelet transform) showed the best results for the calibration sets and external validation, with root mean squared error of prediction values of (RMSEP) 6.5 months. The last approach is related to the development of a method to determine a homogeneity index (%H) using simulated images and a mathematical model. Real samples were also tested. Simulated images were suitable to verify and assess theories related to mixing and sampling processes, making it possible to verify the homogeneity of compounds in binarized images and real yoghurt samples.

Keywords: Analytical Chemistry. Chemometrics. Near Infrared. Image. Tablets. Degradation Product. Homogeneity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Esquema para realizar a MIA de textura-cor, inserindo informação sobre os <i>pixels</i> vizinhos (a) escala de cinza e (b) desdobramento do cubro em cor-textura (adaptado de PRATS-MONTALBÁN et al., 2011).	25
Figura 2.2 – Esquema de análise utilizando MCR-ALS	28
Figura 2.3 – Passos do processo de construção das subimagens LL, LH, HL e HH (adaptado de PRATS-MONTALBÁN et al., 2009).	34
Figura 2.4 – Análise SVD em imagem e construção do vetor SVD.	35
Figura 4.1 - Estruturas químicas da (a) lamivudina e (b) zidovudina	44
Figura 4.2 – (a) Dados Bruto e (b) dados pré-processados com MSC.	48
Figura 4.3 – Estimativas iniciais (sp) dos espectros de cada constituinte da formulação	49
Figura 4.4 – Espectros utilizados como estimativas iniciais e otimizados (opt) de amido e CMC.	49
Figura 4.5 – Mapas de distribuição dos de AZT+3TC para o núcleo 248.	50
Figura 4.6 – Mapa de distribuição de AZT+3TC para o comprimido 251 (revestido).	51
Figura 4.7 – Imagens dos escores e pesos para o núcleo 249(1- AZT; 2 - 3TC; 3 - amido; 4 - CMC; 5 – PVP; 6 – Mg Est).	51
Figura 4.8 – Imagens dos escores e pesos para o núcleo 253 (1- AZT; 2 - 3TC; 3 - amido; 4 - CMC; 5 – PVP; 6 – Mg Est).	52
Figura 5.1 – Reação de degradação do captopril (LAMIM, 2006).	56
Figura 5.2 – Fluxograma das etapas do tratamento quimiométrico das imagens.	60
Figura 5.3 – Matriz de dados para os dados brutos (a) e pré-processados com MSC (b) e SNV associado a 1ª derivada (c).	61
Figura 5.4 – Espectros puros (sp).	62
Figura 5.5 – CDM de comprimidos (topo) de amostras de 2007 e 2012. (b) Histogramas dos CDM para as amostras de 2007 e 2012.	63
Figura 5.6 –CDM (topo e fundo) e histograma correspondente do mesmo comprimido (com 1 ano de produzido) para IFA e DC: a) IFA topo; b) DC topo; c) IFA fundo e d) DC fundo.	64
Figura 5.7 – Estudo de profundidade para amostras produzidas em 2013 (com 2 meses de fabricação): (a) mapas de distribuição de IFA e CD para o topo do comprimido, (b) depois de remover uma camada de 305 μm , e (c) após a remoção de uma camada de 1340 μm .	64
Figura 5.8 – Estudo de profundidade para amostras produzidas em 2007 (com 6 anos de fabricação): (a) mapas de distribuição de IFA e CD para o topo do comprimido, (b) depois de remover uma camada de 239 μm , e (c) após a remoção de uma camada de 1204 μm .	65
Figura 5.9 – Imagens dos escores e gráfico dos pesos da análise PCA. 1: IFA; 2- CD; 3 – Cel; 4 – SteAc; 5 – Cros; 6 – Lac.	67
Figura 5.10 – Imagens relacionadas à amostra de 2007: a) IFA CDM; b) imagem dos escores da PC3; c) gráfico dos pesos da PC3 – 1: IFA; and 2- CD; 3 – Cel; 4 – EstAc; 5 – Cros; 6 – Lac.	67

Figura 6.1 – Mistura ordenada e perfeitamente aleatória (adaptado de POUX et al., 1991).....	71
Figura 6.2 – Diminuição das escala e intensidade de segregação (adaptado de DANCKWERTS, 1952).....	73
Figure 6.3 – Diferentes etapas e argumentos numa mistura: a) mistura inicial (tamanho de partícula 10 pixel ²); b) em processo de mistura (tamanho de partícula 5 pixel ²); c) situação ideal de mistura (tamanho de partícula 1 pixel ²).	74
Figura 6.4 – Representação gráfica da média de cada <i>macropixel</i> : a) o comprimido de acetaminofeno é dividido em arranjo de tamanho 12x12 <i>macropixels</i> ; b) o valor médio de cada <i>macropixel</i> (adaptado de HAMAD et al., 2007).	77
Figura 6.5 – Esquema demonstrando o passo-a-passo do desenvolvimento da análise CLMB (adaptado de HAMAD et al., 2007).	79
Figura 6.6 – Demonstração do cálculo de obtenção do número total de sub-janelas, com tamanhos de 2x2 (a) e 3x3 (b) pixels, em imagem 10x10 pixels. E os valores correspondentes de $\bar{s}_w \times r$ (c).	80
Figura 6.7 – Simulação de um caso em que as concentrações dos <i>pixels</i> brancos são as mesmas nos três casos (A, B e C), porém com diferentes distribuições. E, respectivas, curvas de homogeneidade.	84
Figura 6.8 – Figura da distribuição homogênea mas não aleatória (tábua de xadrez) e respectiva curva de homogeneidade.	85
Figura 6.9 – Exemplos de imagens aleatórias para diferentes concentrações (a) 1%, (b) 25%, (c) 50% e (d) 90%.	87
Figura 6.10 – Curvas de homogeneidade para as 20 concentrações de amostras simuladas homogêneas.....	87
Figura 6.11 – Curva média de homogeneidade (—) e estimativa do modelo (•) para amostras homogêneas	88
Figura 6.12 – Parâmetros ajustado do modelo desenvolvido com a Equação 6.5, para amostras homogêneas.	89
Figura 6.13 – Imagens simuladas para avaliação da não homogeneidade nas concentrações de 5 e 95%, no caso do grumo crescendo na diagonal.....	90
Figura 6.14 – Imagens representativas para avaliação da não homogeneidade nas concentrações de 10 e 50%, em caso de linha crescente.	90
Figura 6.15 – (a) curvas de homogeneidade para as diferentes concentrações de amostras simuladas não homogêneas e (b) curva de homogeneidade média e o modelo proposto.....	91
Figura 6.16 – Parâmetros ajustados do modelo desenvolvido com a Equação 6.6, para amostras não-homogêneas.	92
Figura 6.17 – Imagens para a concentração de 20 com diferentes tamanhos de partícula.	93
Figura 6.18 – Curvas de homogeneidade para diferentes tamanhos de agrupamentos.	94
Figura 6.19 – Curvas de regressão entre concentração real usada na simulação versus concentração final para os diferentes tamanhos de agrupamentos.	95

Figura 6.21 – Imagens binárias e CDM para sucralose na concentração de 1%, para as amostras (a), (b), (c), (d), (e) e (f), referentes à etapa de mistura 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente.	98
Figura 6.22 – Curvas de homogeneidade (HC) e não homogeneidade (NC) e para imagens (a) binárias e (b) CDM de sucralose na concentração de 1%.	99
Figura 6.23 – Imagens binárias e CDM para sucralose na concentração de 50%, para as amostras (a), (b), (c), (d), (e) e (f), referentes à etapa de mistura 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente.	100
Figura 6.24 – Curvas de homogeneidade (HC) e não homogeneidade (NC) e para imagens (a) binárias e (b) CDM de sucralose na concentração de 50%.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Resumo das publicações envolvendo Análise de Medicamentos por HSI-NIR.....	42
Tabela 4.1 – Resultados da regressão PLS para previsão das datas de produção dos comprimidos de captopril utilizando IFE-MIA.....	68
Tabela 6.1 – Resultados de %H para as imagens binárias de sucralose.....	97
Tabela 6.2 – Resultados de %H para os mapas de concentração de sucralose.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

- IFA – Ingrediente farmacêutico ativo (*active pharmaceutical ingredient*);
- CDM – Mapas de distribuição da concentração (*concentration distribution maps*);
- CLS – Mínimos quadrados clássicos (*classical least squares*);
- CLMB – Bloco móvel em níveis contínuos (*continuous levels moving block*);
- DoE – Planejamento de experimentos (*design of experiments*);
- DWT – Transformada discreta por wavelet (*discrete wavelet transform*);
- HSI – Imagem hiperespectral (*hyperspectral image*);
- HC – Curva de homogeneidade (*homogeneity curve*);
- IFE – Extração de características de imagem (*image feature extraction*);
- IEC – Imagem em escala de cinza (*gray scale image*);
- MCR-ALS – Resolução de curva multivariada por mínimos quadrados alternantes (*multivariate curve resolution by alternating least squares*);
- MIA - Análise multivariada de imagem (*multivariate image analysis*);
- MSC – Correção multiplicativa de sinal (*multiplicative signal correction*);
- NIR – Espectroscopia na região do infravermelho próximo (*near infrared spectroscopy*);
- PAT – Tecnologia analítica de processo (*process analysis technology*);
- PCA – Análise de componentes principais (*principal component analysis*);
- PLS – Mínimos quadrados parciais (*partial least squares*);
- QbD – Qualidade pelo desenvolvimento (*quality by design*);
- RMSEP – Raiz do erro médio quadrático de previsão (*root mean square error of prediction*);
- SCTD - Descritores de textura por cores suaves (*soft color texture descriptors*);
- SI- Imagem dos escores (*score image*);
- so – Espectros otimizados (*spectra optimized*);
- sp – Espectros puros (*pure spectra*);
- SNV – Transformação padrão normal de variação (*standard normal variate*);
- SVD – Decomposição de valores singulares (*singular value decomposition*).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	HSI-NIR E QUIMIOMETRIA	20
2.1.1	Qualidade pelo Desenvolvimento e Tecnologia Analítica de Processos	20
2.1.2	Imagens Hiperespectrais	21
2.1.3	Análise Multivariada de Imagem (MIA)	24
2.1.3.1	Análise de Componentes Principais	26
2.1.3.2	Análise Multivariada de Curva – Mínimos Quadrados Alternantes	27
2.1.3.3	Mínimos Quadrados Parciais	30
2.1.4	Extração de Características de Imagem (Image Feature Extraction, IFE)	32
3	MIA NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA	36
4	AVALIAÇÃO DE COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA (AZT+3TC)	44
4.1	OBJETIVOS	46
4.1.1	Objetivo Geral	46
4.1.2	Objetivos Específicos	46
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.4	CONCLUSÃO	53
5	AVALIAÇÃO DE PRODUTO DE DEGRADAÇÃO DO CAPTOPRIL	54
5.1	CAPTOPRIL E DISSULFETO DE CAPTOPRIL	55
5.2	OBJETIVOS	57
5.2.1	Objetivo Geral	57
5.2.2	Objetivos Específicos	57
5.3	MATERIAIS E MÉTODOS	58
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.4.1	Mapas de Distribuição Química	61
5.4.2	Estruturas Internas de Correlação	66
5.4.3	Construindo os dados de regressão	67
5.5	CONCLUSÃO	70
6	ÍNDICE DE HOMOGENEIDADE	71
6.1	TEORIA: ANÁLISE <i>MACROPIXEL</i>	77
6.2	OBJETIVOS	81
6.3	MATERIAIS E MÉTODOS	82
6.3.1	Simulação	82
6.3.2	Amostras reais	82

6.3.2.1	Análise de mistura de pós	82
6.3.3	Softwares	83
6.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
6.4.1	Compreendendo a Curva	84
6.4.2	Distribuição homogênea, mas não aleatória	85
6.4.3	Distribuição aleatória (variando a concentração)	86
6.4.4	Avaliando a distribuição não-homogênea (variando a concentração)	89
6.4.5	Avaliando distribuições aleatórias (variando tamanho dos agrupamentos e concentrações)	92
6.4.6	Análise de Homogeneidade	96
6.4.5.1	Análise de Mistura de Pós.....	96
6.4.7	Considerações Finais	101
6.5	CONCLUSÃO	103
	REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas tecnologias permitiu um maior controle e identificação de insumos relacionados, principalmente, à produção de medicamentos, melhorias direcionadas às análises que contribuam para a manufatura de produtos mais puros (com menos interferentes) e mais estáveis, durante o prazo de validade. A qualidade pelo desenvolvimento (*quality by design*, QbD) aborda sistematicamente as etapas do processo de idealização à aquisição do produto final, predefinindo objetivos os quais venham a estabelecer uma melhor controle na cadeia de produção, focando no produto adequado para o consumo (ICH, 2009).

A Tecnologia Analítica de Processos (*process analysis technology*, PAT), por meio do guia publicado em 2004 pela *U. S. Food and Drug Administration* (FDA), foi introduzida formalmente na indústria farmacêutica, visando a implementação de novas tecnologias para controle em processo em tempo real. Contribuindo com melhor entendimento das relações entre os processos críticos e/ou variáveis dos produtos, por meio de controle e observação de variáveis do processo produtivo e de qualidade, dos produtos/insumos, melhorando o produto final, aprimorando a eficiência de produção e o seu desenvolvimento (EL-HAGRASY et al., 2001).

PAT baseia-se em princípios bem estabelecidos em outras áreas científicas (química analítica de processo, quimiometria, controle estatístico multivariado de processos, sistemas de gestão da qualidade, etc.), que podem ser utilizados de forma integrada ao longo do ciclo de vida de um produto (FDA, 2004). Essas ferramentas vem auxiliar na QbD, pré-estabelecendo metas direcionadas ao processo de manufatura, concentrando-se no produto em processo de criação, auxiliando na compreensão das etapas da cadeia produtiva (RILEY; LI, 2011).

Os métodos convencionais rotineiramente utilizados na indústria farmacêutica são em sua maioria destrutivos e morosos (cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, por exemplo), o que não permite uma maior frequência de amostragem para análises dos atributos de qualidade, reduzindo a quantidade de amostras representativas por lote produzido. Todos estes aspectos motivam

a busca pela implementação de iniciativas de PAT, as quais permitem análises mais rápidas e que possam ser realizadas em todas as amostras dos lotes produzidos, através do desenvolvimento de métodos analíticos para controle do processo em tempo real (GOWEN et al., 2008).

Os métodos espectrométricos, particularmente os métodos envolvendo a espectroscopia na região do infravermelho próximo ("*Near infrared spectroscopy*", NIR), associados às técnicas quimiométricas para tratamento dos dados, podem atender a muitos dos requisitos exigidos nas estratégias de PAT, substituindo os métodos convencionais (CHEW; SHARRATT, 2010). A quimiometria, uma subárea química, utiliza métodos matemáticos e estatísticos para definir/selecionar as condições experimentais ótimas, como também, obter informação a partir dos dados químicos (BRUNS; FAIGLE, 1984).

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando a espectroscopia NIR na indústria farmacêutica, tais como: análise de ponto final do revestimento de comprimidos (GENDRE et al., 2011); estudos do processo de dissolução de comprimidos (HATTORI; OTSUKA, 2011); avaliação "*in-line*" do teor de granulados (CHABLANI et al., 2011) e dos componentes durante liofilização (ROSAS et al., 2014); quantificação de composto ativo em suspensões (SILVA et al., 2012); identificação de medicamentos falsificados (SCAFI; PASQUINI, 2001); monitoramento "*on-line*" de formação de co-cristais de furosemida por evaporação de solvente (SARRAGUÇA et al., 2014), dentre outros.

Mais recentemente, o desenvolvimento de novas tecnologias empregadas para a construção de detectores para espectroscopia no infravermelho permitiu que a informação espectral fosse adquirida simultaneamente com a informação espacial, resultando em imagens espectroscópicas tridimensionais, chamadas de imagens hiperespectrais (BURGER, 2006).

Imagens hiperespectrais na região do infravermelho próximo (*near infrared hyperspectral images*, HSI-NIR) vem sendo amplamente utilizadas para diversas aplicações na área farmacêutica, como: monitoramento de processo e controle de qualidade (GOWEN et al., 2008); análise da uniformidade de conteúdo (RAVN; SKIBSTED; BRO, 2008), avaliação da homogeneidade e

separação de comprimidos falsificados (RODIONOVA et al., 2005); quantificação de compostos minoritários e majoritários (AMIGO; RAVN, 2009); distribuição das concentrações do ingrediente farmacêutico ativo (IFA; do inglês *active pharmaceutical ingredient*, API) em comprimidos (CRUZ et al., 2009a); análise de filmes poliméricos (ALEXANDRINO; POPPI, 2014); análise da distribuição do IFA em dispersão sólida (ZIDAN; HABIB; KHAN, 2008); cristalinidade do IFA (ZIDAN et al., 2012); avaliação da estrutura química interna em formulações (PRATS-MONTALBÁN et al., 2012) e quantificação de cristais polimorfos (SCHÖNBICHLER et al., 2013).

A presente tese tem como objetivo utilizar imagens hiperespectrais na região NIR para fornecer informações que venham a auxiliar na identificação de parâmetros, os quais contribuam na melhoria da qualidade de produtos farmacêuticos. Estudos foram realizados buscando a compreensão das informações fornecidas pelas HSI-NIR por meio do uso de técnicas quimiométricas, visando o entendimento da relação dos componentes das formulações. Foram abordadas questões relacionadas ao comportamento de formulações de comprimidos de dose fixa combinada de lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT); do produto de degradação do captopril; bem como a determinação de um índice de homogeneidade em imagens simuladas e reais de misturas de pós.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HSI-NIR E QUIMIOMETRIA

2.1.1 Qualidade pelo Desenvolvimento e Tecnologia Analítica de Processos

A qualidade pelo desenvolvimento (QbD) é uma abordagem sistemática do desenvolvimento de um produto que se inicia com a predefinição de objetivos, enfatizando o produto destinado ao consumo. O conhecimento prévio, uso do planejamento de experimentos (*design of experiments*, DoE), gerenciamento de risco à qualidade e conhecimento do produto durante sua vida útil, são fatores importantes para o desenvolvimento de produtos (ICH, 2009). O conhecimento das etapas do processo produtivo e de quando e como os eventos acontecem, é a chave para o controle e identificação de etapas do risco, assegurando que o produto alcance suas especificações, o que está diretamente ligado à qualidade, eficácia e segurança. No tocante a indústria farmacêutica, QbD deve alcançar em profundidade a compreensão do processo produtivo, minimizando e mitigando os riscos de entregar produtos farmacêuticos com baixa qualidade ou abaixo do padrão exigido para os usuários (SPRING, 2010).

Como mencionado, o termo PAT é visto de forma ampla por incluir análises químicas, físicas, microbiológicas, matemáticas e de risco, conduzidas de maneira integrada durante todo o processo produtivo. Esta visão é consistente com a afirmação de que a qualidade não pode ser testada nos produtos; e sim construída juntamente com o processo ou planejada (FDA, 2004). PAT integra diversas áreas do conhecimento, unindo os domínios científicos da química analítica e da tecnologia farmacêutica. Para atingir os objetivos de PAT, portanto, é necessária uma combinação de ferramentas como quimiometria, analisadores de processo, monitoração dos pontos críticos na cadeia produtiva e gerenciamento do conhecimento (DE BEER et al., 2008).

Com novos instrumentos analíticos, houve um incremento no número de análises em relação ao tempo, o que ocasiona uma grande quantidade de dados gerados, durante os processos de produção na indústria farmacêutica. Para o tratamento desses dados, é necessária a extração de informações importantes

que venham a contribuir com a tomada de decisões pelo controle de qualidade. A quimiometria surge para contribuir com ferramentas para obtenção de melhores resultados utilizando a informação química de um modo multivariado (BRUNS; FAIGLE, 1984). Permite verificar os pontos de controle estabelecidos por meio dos métodos estatísticos de análise, que são influenciados por sua natureza e pelos níveis das variáveis de processos (SPRING, 2007).

Focando na qualidade do produto final, o conhecimento acerca da formulação e como seus excipientes se comportam em determinadas etapas críticas da fabricação, permite a identificação e análise dos riscos associados ao processo. O uso de técnicas analíticas rápidas (espectroscopia NIR) de forma contínua e o tratamento de dados de forma multivariada (quimiometria) auxiliam no fornecimento de informações para garantir produtos que atinjam os indicadores de segurança e eficácia preconizados pelos compêndios farmacêuticos oficiais.

2.1.2 Imagens Hiperespectrais

Imagens consistem na distribuição espacial de uma informação. Nas imagens digitais cada pequena porção está determinada por coordenadas espaciais (x e y), e estas coordenadas possuem o menor elemento formador que carrega a informação, denominado *pixel*. A informação pode consistir em único valor relacionado ao *pixel* (escala de cinza – imagem univariada), em valores múltiplos, os quais podem estar relacionados aos canais de cores (vermelho, verde e azul, do inglês *red, green and blue*, RGB), como também ser composta por poucos ou muitos canais espectrais (imagens multiespectrais ou hiperespectrais, respectivamente) (MANLEY, 2014).

Nas primeiras análises de imagem em escala de cinza, devido ao fato de não haver cor, a textura tornou-se uma questão muito importante para reconhecer e descrever objetos na imagem. A textura da imagem pode ser definida como a função da variação espacial das intensidades dos *pixels* (valores de cinza), e, basicamente, refere-se às propriedades da superfície ou estrutura do objeto (BHARATI; MACGREGOR, 2000). As imagens RGB contribuem com o uso das informações de cor e textura de forma integrada, possibilitando melhoria na caracterização da imagem. Nesta direção, a informação relacionada a cada *pixel*

cresceu no sentido das imagens multi- e hiperespectrais (PRATS-MONTALBAN; FERRER, 2007).

Imagem hiperespectral (*hyperspectral image*, HSI) consiste em um tipo particular de imagem, em que um espectro completo é registrado para cada *pixel*, combinando espectroscopia com imagem digital (MANLEY, 2014), aumentando a informação relacionada a cada canal. O uso de HSI tem como foco a informação relacionada à composição química da amostra representada na forma e intensidade dos espectros obtidos, ao invés das propriedades físicas como textura da superfície ou volume amostrado (PRATS-MONTALBÁN; DE JUAN; FERRER, 2011).

A espectroscopia na região do infravermelho próximo é um tipo de espectroscopia vibracional que aplica fótons de energia ($h\nu$) na faixa de $2,65 \times 10^{-19}$ a $7,96 \times 10^{-20}$ J, que corresponde à faixa de comprimentos de onda de 750 – 2500 nm (com número de onda correspondente a 13300 a 4000 cm^{-1}). As absorções na região do NIR correspondem às transições vibracionais entre o nível de energia fundamental ($v = 0$) e os níveis de energia de ordem superior ($v = 2, 3, 4, \dots$), e/ou bandas de combinação, sendo, geralmente, vibrações envolvendo átomos leves (CH_n , $n = 1, 2, 3$ e XH , $\text{X} = \text{N}, \text{S}$ ou O) (CANEVAROLO JR., 2004; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; PASQUINI, 2003; WORKMAN JR.; WEYER, 2012).

As câmeras de imagens na região NIR são capazes de adquirir imagens digitais de alta resolução. A imagem hiperespectral no infravermelho próximo consiste em uma coleção de espectros NIR com a informação armazenada em duas dimensões espaciais (BURGER; GELADI, 2005). A HSI-NIR é um arranjo cúbico tridimensional (x , y , e comprimento de onda), em que x e y são as direções espaciais e z a direção espectral. O advento da quimiometria revolucionou a espectroscopia NIR e em seguida HSI-NIR, possibilitando extrair informação química confiável de um enorme conjunto de dados. Para isso, os algoritmos tradicionais para análises exploratórias, classificação e calibração na direção espectral foram expandidos aproveitando-se da riqueza da informação fornecida pela imagem (BURGER; GOWEN, 2011).

Embora a espectroscopia NIR tenha sido descoberta antes do MID, a mesma passou muito tempo sem ser utilizada para fins analíticos, o que pode ser atribuído à falta de instrumentos adequados e principalmente à complexidade dos espectros obtidos, que apresentam bandas largas resultantes da sobreposição de picos individuais, dificultando sua interpretação por métodos univariados. Sendo assim, somente com a ajuda de métodos quimiométricos foi possível obter informações quali/quantitativas destes espectros. De fato, com o desenvolvimento das técnicas matemáticas, a disponibilidade de *softwares* e o desenvolvimento de novas tecnologias instrumentais. A espectroscopia NIR emergiu como uma ferramenta para análises rápidas e não destrutivas, aplicadas a uma variedade de amostras, não sendo somente uma técnica de rotina como também uma potente técnica para uso em pesquisa. Os espectrômetros NIR podem utilizar sistemas ópticos semelhantes àqueles usados em equipamentos que operam na região do UV-Vis, o que se apresenta como uma vantagem em relação aos instrumentos que operam na região do infravermelho médio (MID). Os espectrômetros NIR são, em geral, mais robustos, por sua óptica não ser afetada pela umidade do ar, e podem ser facilmente adaptáveis para monitoramento *on-line* de produtos e processos, empregando fibras ópticas para transmissão da radiação (PASQUINI, 2003; SIESLER, 2002).

Por se tratar de uma medida espectroscópica, problemas relacionados à tomada de medidas como alto nível de ruído, variações de linha de base ou a existência de *pixels* com espectros anômalos (*pixel* morto ou *outlier*) podem influenciar no resultado das imagens analisadas (DE JUAN et al., 2009). Para corrigir ou minimizar estes problemas são utilizadas técnicas de pré-processamento, que tem como alvo a correção de perturbações decorrentes das análises realizadas ou minimizar o efeito de fenômenos não desejados. Dentre estas se podem citar a correção de picos (*spikes*) e *pixels* mortos, remoção de ruídos e correção de linha de base (SACRÉ et al., 2014a).

Inicialmente, a análise de imagens era parte de um amplo campo conhecido como processamento de imagem, em que a ideia principal era lidar com a informação de uma imagem para melhorar a qualidade visual ou extrair informação útil. O processamento de imagem pode ser agrupado em sub-áreas

como: (a) Pré-processamento: que consiste em melhorar a qualidade da imagem por redução de ruído, facilitando a detecção e tornando a etapa de análise mais confiável; (b) Compressão: reduz a necessidade de memória computacional por remoção da redundância presente na imagem; (c) Análise: que usualmente retorna valores numéricos e/ou diferentes gráficos relacionados às características da imagem que é usada para classificação, detecção de defeitos ou para prever alguma propriedade de qualidade de uma parte fotografada ou produto (PRATS-MONTALBÁN; DE JUAN; FERRER, 2011).

É possível utilizar as HSI para propósitos quantitativos. As metodologias utilizadas neste campo têm sido frequentemente referidas como resolução de imagem multivariada (*multivariate image resolution*), que inclui métodos de calibração multivariada utilizados em conjuntos de dados multiespectrais adaptados para utilização em imagens. A principal diferença entre utilizar métodos de calibração para dados espectrométricos e para imagens, é que, no primeiro caso há valores de referência para a concentração global (*bulk concentration*), enquanto que para as imagens, pode haver variações de concentração em cada *pixel*, para um composto particular. Deste modo, podem-se usar os modelos de calibração usuais, como regressão por mínimos quadrados parciais (*partial least square*, PLS) para prever a concentração global da imagem e para determinar a concentração em cada *pixel* da imagem (DE JUAN et al., 2009).

2.1.3 Análise Multivariada de Imagem (MIA)

Análise Multivariada de Imagens (*multivariate image analysis*, MIA) foi proposta para lidar com análise de imagens em escalas de cinza, visando à exploração interativa para classificação, segmentação e previsão de características presentes nas imagens multivariadas. Os métodos de análises multivariadas são ferramentas necessárias para viabilizar a identificação das estruturas nos *pixels* presentes (ESBENSEN; GELADI, 1989).

Para aplicação da MIA, há necessidade de desdobramento da imagem. Para uma imagem típica RGB, o processo de desdobramento implica em uma matriz **X** com $x \times y$ linhas (*pixels*) e 3 colunas (intensidade de cor RGB), como ilustrado

na Figura 1. Ao desdobrar um cubo de três dimensões em uma matriz X , a estrutura espacial da imagem é perdida. De forma a capturar a informação de textura em imagens na escala de cinza, foi proposto que, ao desmontar a imagem, cada *pixel* deveria ser representado por um arranjo de números, os quais contêm as intensidades nominais do *pixel* relacionado e dos *pixels* vizinhos (informação de textura) a este, em todas as direções possíveis da imagem (Figura 1a) (BHARATI; MACGREGOR, 2000). O procedimento deve ocorrer da mesma forma para integrar informações de cor e textura em imagens RGB (Figura 1b) (PRATS-MONTALBAN; FERRER, 2007).

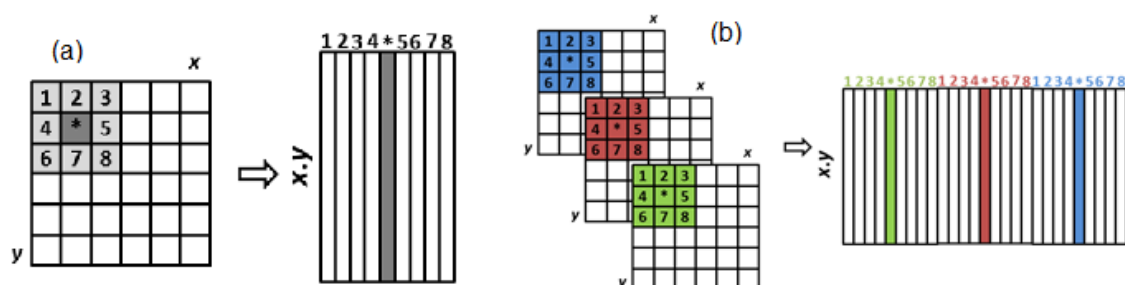


Figura 2.1 – Esquema para realizar a MIA de textura-cor, inserindo informação sobre os *pixels* vizinhos (a) escala de cinza e (b) desdobramento do cubo em cor-textura (adaptado de PRATS-MONTALBÁN et al., 2011).

Com o intuito de analisar a informação presente no cubo hiperespectral, da mesma forma como as imagens em escala de cinza e RGB, o hipercubo também deve ser desdobrado em uma matriz 2D. O desdobramento da matriz 3D em 2D faz com que cada *pixel* seja arranjado em linhas, e, como já comentado, o número de linhas é relativo à quantidade de *pixels* ($x \times y$). A informação espectral será alocada nas colunas, resultando em uma matriz xyz . Aplicando filtros espaciais, a informação dos *pixels* vizinhos também pode ser incorporada ao vetor, mantendo assim a informação espacial (LIU; MACGREGOR, 2007).

Como já mencionado, o pré-processamento é utilizado para corrigir perturbações inerentes ao processo de aquisição dos dados (ex.: picos, *pixel* mortos) ou limitação dos fenômenos indesejados (ex.: efeito de espalhamento), para facilitar o acesso às informações desejadas. O conhecimento dos objetivos e dos

fenômenos ajuda a selecionar os pré-processamentos a serem utilizados (SACRÉ et al., 2014a).

Os pré-processamentos são utilizados para corrigir efeitos de espalhamento aditivos e multiplicativos na absorbância, sendo os mais utilizados: correção multiplicativa do sinal (*multivariate signal correction*, MSC), transformação padrão de variação (*standard normal variate*, SNV), e as transformações derivativas.

A técnica MSC realiza uma regressão do espectro da amostra *versus* o espectro ideal, em cada comprimento de onda. O espectro “ideal”, para a correção MSC, pode ser o espectro de uma das amostras do conjunto de dados, ou, simplesmente, o espectro médio. Enquanto que o SNV corresponde a autoescalonar cada linha da matriz de dados, por meio dos valores médios das intensidade e desvio padrão, não necessitando de sinal de referência, como ocorre no MSC (FERREIRA, 2015; RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009).

Transformações derivativas são também utilizadas para correção espectral, sendo que as primeiras derivadas são utilizadas para remoção de efeitos constantes sobre a linha de base, enquanto que a segunda derivada remove, além dos efeitos constantes, tendências lineares (inclinação de linha de base). A derivação por Savitzky-Golay foi popularizada por também incluir uma etapa de suavização (BURGER; GELADI, 2006; RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009).

2.1.3.1 Análise de Componentes Principais

Modelos PCA podem ser utilizados para redução de dados, detecção de amostras anômalas, seleção de variáveis, classificação e previsão (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987). PCA é um método indicado para a análise de imagens, pois tem como aspecto importante a determinação de subespaços, ou seja, condensa a informação permitindo a visualização dos resultados mais significativos. Com as imagens dos escores podem ser estudados os contrastes entre os *pixels*. Os pesos indicam quais componentes estão relacionadas ao contraste identificado (valores positivos e negativos), estejam estes correlacionados ou não (GELADI et al., 1989).

Modelos PCA (PRATS-MONTALBAN; FERRER, 2007) foram aplicados a dados com arranjo em 3 vias, $\mathbf{X}$ ($i \times j \times k$). Os dados foram desdobrados, reorganizados bidimensionalmente, para avaliação da informação presente na imagem. i está relacionado com as dimensões espaciais da imagem (eixos x e y) e k é o número de canais da imagem (informação contida no pixel, canal z). j é o tamanho da janela utilizada para manutenção da informação dos pixels vizinhos (adição da informação de textura), podendo assumir o valor 1 em casos de avaliação da informação de cada canal em único *pixel*. PCA pode ser expresso como:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^T + \mathbf{E}; \quad (\text{Equação 2})$$

em que, $\mathbf{T}$ ($i \times c$) são os escores e $\mathbf{P}$ ($k \times c$) os pesos para c componentes principais ($c \leq \text{posto}(\mathbf{X})$), sendo $\mathbf{E}$ os resíduos. As imagens dos escores (*score images*, SI) podem ser remontadas, para observação da informação resultante da análise. A relevância das variáveis originais no espaço das componentes principais e suas estruturas de correlação interna são mantidas na matriz dos pesos.

2.1.3.2 Análise Multivariada de Curva – Mínimos Quadrados Alternantes

Uma outra etapa importante no tratamento de imagem é a resolução. Resolução confere a separação da informação de diferentes constituintes em uma imagem. Algumas ferramentas exploratórias podem ser utilizadas para encontrar a informação mais pura na imagem ou para detectar *pixels* com informações seletivas. Os *pixels* mais puros darão uma boa informação sobre o espectro puro procurado, enquanto que canais do espectro puro, e quando remontadas as imagens, permitirão construir mapas de distribuição aproximados dos constituintes puros. Métodos de resolução não necessitam de conhecimento prévio para realizar a decomposição bilinear da imagem, porém, quando a informação está disponível pode ser incluída para obter resultados mais precisos e quimicamente significativos (DE JUAN et al., 2009).

O método de resolução multivariada de curvas (*multivariate curve resolution*, MCR) é um método quimiométrico desenvolvido para resolução de múltiplos componentes em uma mistura. O método procura a resposta otimizada para amostras com misturas em sua composição, que obedecem ao modelo bilinear

(relativo à lei de Beer). Os cubos hiperespectrais são desdobrados em uma matriz bidimensional, D ($I \times z$), onde a “ I ” (linha) são os *pixels*, com dimensão $x \times y$, e “ z ” (coluna) os comprimentos de onda. Logo, mapas de distribuição significantes, que fornecem informações sobre distribuição dos compostos individuais e suas concentrações relativas são obtidos usando MCR:

$$\mathbf{X} = \mathbf{C} \cdot \mathbf{S}^T + \mathbf{E} \text{ (Equação 2).}$$

em que, $\mathbf{C}$ (I') é a matriz desdobrada dos perfis de concentração para cada *pixel*, $\mathbf{S}^T$ ($m \times z$) é o “ m ” (espectro puro) da matriz constituinte da imagem e $\mathbf{E}$ ($I \times z$) representa o erro experimental. As estimativas iniciais de $\mathbf{S}$ são otimizadas iterativamente pelo método dos mínimos quadrados alternantes (*alternating least squares*, ALS), até que as matrizes $\mathbf{C}$ e $\mathbf{S}^T$ sejam ajustadas à matriz experimental, $\mathbf{X}$ (TAULER, 1995) com menor valor de $\mathbf{E}$. Os perfis de concentração são então usados para obter o mapa de distribuição de concentração (*concentration distribution map*, CDM) de cada composto. Figura 2 apresenta um esquema dos procedimentos para análise por MCR-ALS.

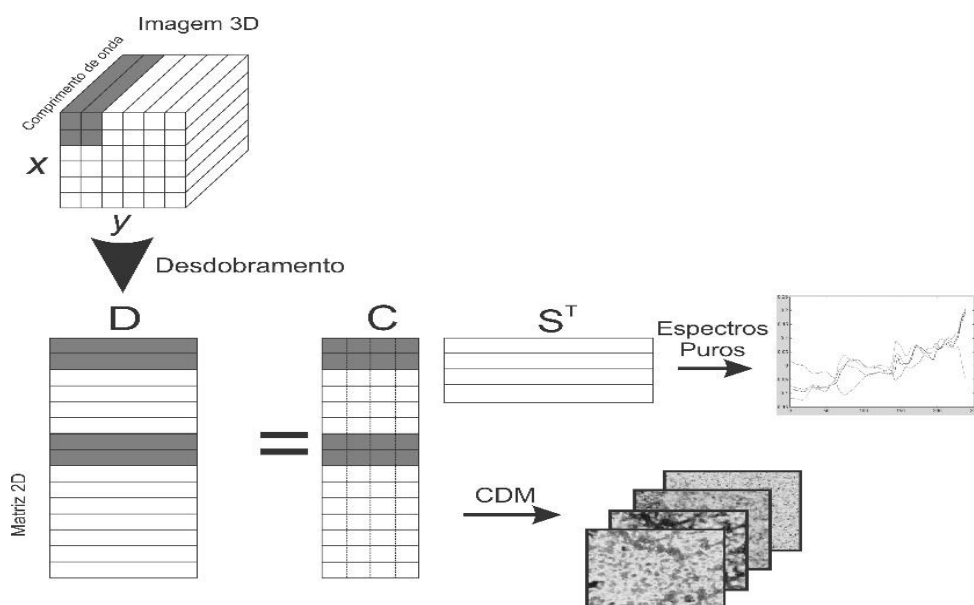


Figura 2.2 – Esquema de análise utilizando MCR-ALS.

O número de espécies químicas presentes no sistema é obtido diretamente pelo composto puro ou por um número de valores singulares associados à matriz de

dados. Contudo, parte da variância na matriz de dados experimental não é causada por mudanças nas concentrações e/ou espécies químicas, mas ocasionadas por outros fatores como erros experimentais inevitáveis, fazendo que os valores sejam superestimados. A otimização ALS minimiza este incremento procurando por soluções que melhor se ajustem aos dados, fornecendo formas realistas para os perfis de concentração e espectros individuais recuperados (TAULER; SMILDE; KOWALSKI, 1995). A convergência é encontrada quando, entre dois ciclos iterativos consecutivos do ALS, verificam-se diferenças relativas no desvio padrão dos resíduos menores que valores pré-estabelecidos (usualmente utiliza-se 0.1%) (JAUMOT, 2005).

Ambiguidades podem prejudicar a aquisição de perfis de concentração e espectros puros corretos. Há duas classes de ambiguidades associadas aos métodos de resolução de curva. A ambiguidade de intensidade faz com que as concentrações estimadas e espectros sejam escalonados por fatores desconhecidos, não sendo um problema para identificação qualitativa, porém um erro grave para as análises quantitativas. A outra é a ambiguidade rotacional, que ocorre quando existem duas ou mais componentes linearmente dependentes, fazendo com que os espectros ou perfis de concentração estimados para alguma das componentes seja uma combinação linear desconhecida em relação aos parâmetros verdadeiros (TAULER; SMILDE; KOWALSKI, 1995).

As ambiguidades inerentes aos métodos de resolução de curvas podem ser parcialmente superadas utilizando restrições. A seletividade é um aspecto fundamental para recuperação dos espectros puros. Esta restrição subdivide a matriz original de dados em porções menores, permitindo a identificação do posto local (*local rank*) com valores próximos à unidade (canais espectrais mais puros), reduzindo a complexidade da mistura, minimizando as ambiguidades relacionadas ao fator de análise de decomposição, favorecendo a resolução (TAULER; SMILDE; KOWALSKI, 1995). Outras restrições gerais são: não-negatividade, unimodalidade, encerramento (*closure*), trilinearidade e/ou outra restrição de perfil ou modelagem que pode ser inserida através do conhecimento prévio sobre o comportamento do sistema *hard-modelling* (BURGER, 2006; DE JUAN et al., 2009).

Quando se pretende dar uma melhor representatividade ao conjunto de dados, a resolução multicamada e multi-imagem é uma alternativa para imagens de amostras independentes que possuem constituintes em comum, por exemplo, diferentes comprimidos de uma linha de produção. Neste procedimento, a matriz é aumentada na direção das colunas (*column-wise*), sendo assim formada por vários espectros de diferentes imagens HSI-NIR, uma sobre a outra. Consequentemente, os espectros dos *pixels* de todas as imagens são organizados na matriz de dados **D**, e os perfis de cada submatriz pode ser remontado para recuperar os mapas de distribuição relacionados a cada imagem. A grande quantidade de *pixels* e sua diversidade em composição (particularmente em amostras heterogêneas), muito frequentemente garantem a exclusividade nos resultados finais. Outros tipos de informação, como presença/ausência de alguns constituintes de determinados compostos em algumas imagens, podem ser inseridas como restrição adicional (PIQUERAS et al., 2012).

Um método alternativo ao MCR-ALS para a resolução de componentes em misturas é método dos mínimos quadrados clássico (*classical least squares*, CLS). Este tipo de modelagem também assume o conceito relativo a lei de Beer, em que a absorbância em cada frequência é proporcional à concentração, e o erro do modelo pode ser associado a um erro na absorbância espectral (HAALAND; THOMAS, 1988). O CLS é indicado para extração de informação qualitativa e realização de análise quantitativa (HAALAND; MELGAARD, 2002), quando há o conhecimento dos componentes puros presentes na amostra. Neste caso qualquer mistura espectral pode ser descrita numa combinação linear (AMIGO et al., 2009), mas os resultados podem ser afetados com perda de informação caso haja altos valores de correlação entre os componentes da amostra (AMIGO; RAVN, 2009).

2.1.3.3 Mínimos Quadrados Parciais

Outro tipo de modelagem para análise de imagens é o método de regressão em mínimos quadrados parciais (*partial least squares*, PLS). O PLS permite que blocos de características sejam representados por variáveis não observáveis, ou latentes (*latent variables*, LV), indiretamente observadas. As variáveis latentes

são encontradas por um processo iterativo o qual envolve análises de regressão simples ou múltipla, para que, simultaneamente e de forma ideal, representarem as melhores características e ajuste para o modelo (GERLACH; KOWALSKI; WOLD, 1979). A regressão PLS possibilita utilizar dados correlacionados, ruidosos e com numerosas variáveis (GELADI; KOWALSKI, 1986), podendo ser aplicada às matrizes de características fornecendo informações sobre parâmetros de qualidade ou processo.

O PLS utiliza dois blocos preditivos para estabelecer a relação entre duas matrizes, $\mathbf{X}$ ($\mathbf{X}=\mathbf{TP}^T+\mathbf{E}$) e $\mathbf{Y}$ ($\mathbf{Y}=\mathbf{UC}^T+\mathbf{F}$). $\mathbf{X}$ é a matriz de dados de onde serão extraídas as LV (escores de $\mathbf{X}$), que serão utilizadas para linearizar os valores de $\mathbf{Y}$ (respostas encontradas para o modelo) (WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001). Modelos PLS buscam maximizar a covariância entre os dados da estrutura latent de $\mathbf{X}$ e as respostas $\mathbf{Y}$, seguindo pela expressão:

$$\mathbf{U}=\mathbf{TB}+\mathbf{G} \text{ (Equação 3)}$$

em que, $\mathbf{B}$ matém as relações interiores entre $\mathbf{U}$ e $\mathbf{T}$. Em seguida, é possível computer o $\mathbf{Y}$ previsto pelo modelo, para a propriedade de qualidade, para um novo vetor, $\mathbf{x}_{\text{new}}$, calculando:

$$\mathbf{Y}_{\text{new}}=\mathbf{X}_{\text{new}}\mathbf{B}_{\text{PLS}} \text{ (Equação 4)}$$

Para avaliação da adequação dos resultados PLS são utilizadas algumas figuras de mérito. O coeficiente de regressão r^2 indica quão bem os dados se ajustam ao modelo estatístico, dado pela equação: $r^2 = 1 - (SS_{\text{res}} / SS_{\text{tot}})$. SS são as somas quadráticas (*sum of squares*) dos resíduos (res) e total (tot). O valor de r^2 deve ser próximo a 1, e o valor de Q^2 , que também é determinado da mesma forma r^2 , porém é o resultado para a validação cruzada do modelo, dado pela equação: $r^2 = 1 - (PSS_{\text{res}} / SS_{\text{tot}})$, em que PSS_{res} são os resíduos do modelo preditivo. O erro entre os valores preditos e reais é dado pela raiz do erro médio quadrático de previsão (*root mean square error of prediction - RMSEP*) (BRERETON, 2003; MILLER; MILLER, 2010; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001).

2.1.4 Extração de Características de Imagem (Image Feature Extraction, IFE)

Uma imagem possui suas características expressas como propriedade distintiva primitiva ou um atributo natural, no sentido em que estas características são definidas pela aparência visual da imagem (ex.: luminosidade), ou artificial que são resultados da manipulação da imagem (ex.: histogramas de amplitude da imagem, frequência espacial do espectro) (PRATT, 2001).

Alguns métodos podem ser utilizados para extração de características de uma imagem, objetivando tanto a redução da dimensionalidade dos dados, como também, garantindo independência e normalidade das características extraídas, possibilitando uma posterior classificação (PRATS-MONTALBÁN et al., 2007). Estes métodos utilizam processos tradicionais para extração de características de imagem, baseados em MIA (*image feature extraction*, IFE-MIA), transformando a imagem em um vetor de característica, que pode conter informações como: forma, suavidade, textura e cor. Deste modo, tanto PCA quanto PLS podem ser utilizados para relacionar as características extraídas com parâmetros de qualidade e/ou com as condições de processo (PRATS-MONTALBÁN et al., 2009, 2012).

Apesar de intuitivamente se associar algumas propriedades da imagem como: suavidade, espessura, profundidade e regularidade, com a textura não há uma definição completa ou formal para a mesma. Assim, textura pode ser livremente definida como um descritor de variação do brilho local de *pixel* para *pixel* em uma pequena vizinhança na imagem; ou como um atributo representativo do arranjo espacial dos níveis de cinza no *pixel*, numa região da imagem digital. As abordagens para análise de textura são diversificadas e diferem entre si, principalmente em relação ao método para extração de características de textura (BHARATI; LIU; MACGREGOR, 2004).

A extração de característica de textura pode ser classificada em quatro categorias: (a) Análise estatística da textura: descreve, primeiramente, a textura de regiões de uma imagem, por meio de momentos de alta ordem em seus histogramas – escala de cinza (como SVD e SCTD, descritas em seguida); (b)

Análise estrutural da textura: descreve a textura como a composição de elementos de texturas bem definidos, como regularidade espacial por linhas paralelas; (c) Análise de textura baseada em modelo: gera um modelo empírico de cada *pixel* na imagem, baseando-se na média ponderada das intensidades dos *pixels* e sua vizinhança; (d) Análise da textura baseada na transformação: converte a imagem em nova forma, utilizando as propriedades das frequências espaciais, relacionadas às diferentes intensidades dos *pixels*, como a transformada wavelet discreta (*discrete wavelet transform*, DWT) (BHARATI; LIU; MACGREGOR, 2004).

A DWT é utilizada para reduzir o tamanho das estruturas dos dados, mas aplicada a imagens digitais torna-se uma ferramenta de análise de textura em imagens em diferentes escalas. A DWT transforma as imagens em uma série de coeficientes de detalhes “*wavelet*”, criando três sub-imagens de detalhes horizontal, vertical e diagonal, que constitui uma representação multi-escala da imagem (PRATS-MONTALBÁN et al., 2009; PRATS-MONTALBAN; FERRER, 2007).

A compressão da imagem se dá em dois passos, primeiramente pelas linhas, em seguida pelas colunas e é feita pela média de dois filtros: L (passa-baixa, *low pass*) e H (passa-alta, *high pass*), que divide a imagem original em diversas matrizes: LL (suavizada A), HL (horizontal H), LH (vertical V) e HH (diagonal D) que são subimagens detalhadas (Figura 3), de dimensão $n_1/2 \times n_2/2$, em que n_1 e n_2 são as dimensões da imagem (PRATS-MONTALBÁN et al., 2009; PRATS-MONTALBAN; FERRER, 2007).

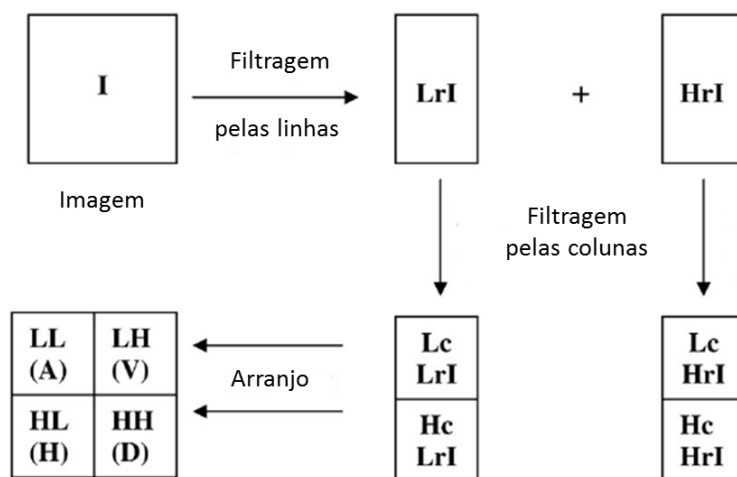


Figura 2.3 – Passos do processo de construção das subimagens LL, LH, HL e HH (adaptado de PRATS-MONTALBÁN et al., 2009).

A decomposição em valores singulares (*singular value decomposition*, SVD) é uma técnica intimamente relacionada com o método das componentes principais, para elucidar o problema da colinearidade. Considerando a imagem, na escala de cinza, como uma matriz, a aplicação do SVD resulta em um vetor de características sucinto (única linha) da textura da imagem, representada pelos valores singulares. O vetor de características resultante é então utilizado para classificação da imagem (BHARATI; LIU; MACGREGOR, 2004; MANDEL, 1982). Uma imagem na escala de cinza $N \times N$ é tratada como uma matriz $\mathbf{X}$ ($N \times N$) e um conjunto ordenado dos valores singulares $s(n)$ para $n=1,2,\dots,N$ é calculado, resultando num vetor SVD. Caso existam várias imagens do mesmo tamanho, os valores são adicionados em sequência na mesma linha (Figura 4). Se os elementos de $\mathbf{X}$ não forem relacionados espacialmente a outro, os valores singulares tendem a ser uniformemente distribuídos na amplitude. Por outro lado, se o elemento de $\mathbf{X}$ for altamente estruturado a distribuição dos valores singulares tendem a desviar de modo que os valores de baixa ordem são muito maiores que os de ordem superior (PRATT, 2001).

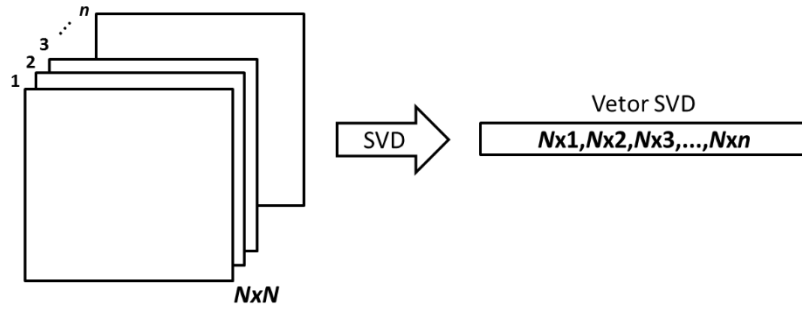


Figura 2.4 – Análise SVD em imagem e construção do vetor SVD.

Uma forma simples de se coletar características que descrevem propriedades de cor e textura de uma imagem são os métodos descritores de textura por cores suaves (*soft color texture descriptor*, SCTD). O SCTD, devido à sua simplicidade e baixa demanda computacional, é adequado para observação em tempo real, em comparação com outras abordagens clássicas para descritores (PRATS-MONTALBÁN et al., 2008). Neste método, para cada canal de cor são selecionadas a média e o desvio padrão, e computado o histograma de cada canal de cor, permitindo calcular os momentos matemáticos do histograma. O n -ésimo momento de z em relação à média é definido como:

$$\mu_n(Z) = \sum_{i=1}^L (Z_i - m)^n p(z_i)$$

Em que, Z é uma variável aleatória, $p(z_i)$, do histograma $i=1,2,\dots,L$; sendo L o número de variáveis distintas, e m o valor da média de z ; sendo escolhidos os 2º e 5º momentos, que são relacionados às informações de textura (LÓPEZ et al., 2008).

3 MIA NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Nas últimas décadas o uso de HSI-NIR tem se difundido na indústria farmacêutica, principalmente com o guia do FDA sobre Tecnologia Analítica de processo, lançado em 2004. Diversos trabalhos científicos têm sido desenvolvidos abordando o uso de imagens químicas para controle de qualidade e desenvolvimento de novos medicamentos. Um dos primeiros trabalhos que mostrou a viabilidade do uso de HSI-NIR para detecção de medicamentos falsificados, focou na identificação de regiões não homogêneas das drogas, utilizando MIA e PCA (RODIONOVA et al., 2005).

Apresentando diferentes aplicações, foram desenvolvidos trabalhos identificando medicamentos falsificados; estudos da composição química local, cristalinidade, grau de orientação, morfologia, ou a distribuição espacial de polímeros em blendas (KOENIG; WANG; BHARGAVA, 2001). Em outro estudo, abordando a identificação de comprimidos anti-hipertensivos falsificados, amostras genuínas foram utilizadas como referência, e os espectros puros do ativo e dos três excipientes majoritários foram obtidos. Inicialmente, foi realizada uma PCA dos espectros adquiridos por NIR e imagens hiperespectrais. Entretanto, ambos os modelos não foram capazes de distinguir os comprimidos genuínos dos falsificados e os modelos construídos foram capazes apenas de distinguir os comprimidos genuínos dos genéricos. Deste modo, foi desenvolvida uma biblioteca de referência e um modelo de calibração PLS com as amostras dos pós (ativo e excipientes). O modelo PLS possibilitou a verificação da distribuição espacial dos compostos e a observação de que o IFA apresentava melhor distribuição no comprimido genuíno. Utilizando os histogramas (oriundos da distribuição espacial) e padrões estatísticos (obliquidade e curtose – segundo QbD) os escores da classificação e a distribuição dos *pixels* por toda imagem foi verificada. Essa nova abordagem, unindo a informação espacial da NIR-CI com informação da variabilidade do produto, possibilitou a distinção entre os comprimidos genuínos e os falsificados (PUCHERT et al., 2010).

Considerando a implementação da doutrina *PAT* nas indústrias farmacêuticas, trabalhos têm sido desenvolvidos empregando HSI-NIR, para avaliação da

distribuição e quantificação de constituintes minoritários e majoritários em comprimidos. Amigo e Ravn (2009), utilizando CLS, não obtiveram sucesso ao tentar quantificar compostos minoritários em comprimidos, devido aos altos valores de correlação dos espectros puros. Com MCR-ALS os resultados foram os mesmos, sendo justificados pela mesma falta de seletividade. Já o MCR-ALS aumentado (*augmented* MCR-ALS) demonstrou ser um método capaz de fornecer informação confiável e semi-quantitativa sobre a concentração dos compostos minoritários no comprimido. Além do mais, é bastante preciso na quantificação dos componentes majoritários, além de fornecer os melhores resultados para os mapas de distribuição adquiridos (AMIGO; RAVN, 2009).

Um estudo de viabilidade do uso de HSI-NIR para avaliação de uniformidade de conteúdo de formas farmacêuticas sólidas foi realizado, empregando amostras controladas (IFA e celulose) e de produção (formulação com 7 componentes). Os resultados demonstraram que o método PLS apresentou melhores resultados que o CLS, porém o ruído prejudicou a previsão do modelo PLS quando se utilizaram espectros derivados. Em contrapartida, o pré-processamento por derivadas melhorou a precisão do modelo CLS (GENDRIN; ROGGO; COLLET, 2007).

Trabalho semelhante foi realizado utilizando comprimido convencional com 5 compostos. Amostras variando a concentração de IFA foram empregadas para calibração, e além disto, foi enfatizada a necessidade do pré-processamento. As previsões das concentrações foram calculadas para os compostos majoritários (IFA, celulose e lactose) para cada um dos três métodos: (i) único comprimento de onda, (ii) CLS e (iii) PLS. Os resultados demonstraram que as três abordagens de calibração são aplicáveis para análise hiperespectral, no entanto o método PLS provou ser mais preciso. O estudo também mostrou que a análise em um único comprimento de onda pode ser utilizada para análise exploratória inicial, mas requer bandas distintas de absorção NIR para gerar resultados mais confiáveis. O CLS é uma alternativa ao PLS, no entanto fornece previsões de concentração um pouco menos precisas (RAVN; SKIBSTED; BRO, 2008). Gowen e colaboradores desenvolveram um trabalho de revisão, mostrando aplicações de HSI-NIR para monitoramento do processo de fabricação e controle de qualidade na indústria farmacêutica (GOWEN et al., 2008).

Um método quantitativo baseado em HSI-NIR foi utilizado para análise de comprimidos comerciais de ácido acetilsalicílico (AAS), cujas concentrações nominais, nos comprimidos utilizados, encontravam-se na faixa de 12 – 82% (m/m), considerando informações contidas nas embalagens dos medicamentos. A composição das formulações era desconhecida, sendo utilizadas informações do guia Vademecum (celulose microcristalina ou manitol como majoritários); exceto para os comprimidos efervescentes que possuíam excipientes conhecidos. Apesar de se observarem diferenças em relação aos espectros médios para cada comprimido (distintas formulações), a banda espectral relacionada ao AAS (em torno de 1680 nm) pôde ser observada em todos os espectros. MCR-ALS não apresentou resultados satisfatórios devido aos baixos valores de correlação entre os espectros puros e preditos (espectros otimizados, so). Em contrapartida, o MCR-ALS aumentado forneceu resultados adequados para análise quantitativa, com valores de correlação espectrais próximos a 1. Comprimidos que possuem manitol como componente majoritário não apresentaram resultados confiáveis para determinação do conteúdo de AAS, e os comprimidos com baixas concentrações de AAS demonstraram resultados preditivos não satisfatórios. A observação dos histogramas das concentrações locais possibilitou a correta visualização dos comprimidos com melhor distribuição, e os valores obtidos para as concentrações de AAS na superfície dos comprimidos foram semelhantes aos valores calculados. A metodologia desenvolvida no trabalho conseguiu extrair informações sobre a qualidade de 10 comprimidos comerciais. (CRUZ et al., 2009).

Em trabalho desenvolvido por Prats-Montalbán e colaboradores (2012), imagens hiperespectrais de um produto farmacêutico foram avaliadas por uma método desenvolvido em três passos. Primeiro, modelos orientados quimicamente (MCR e CLS) foram construídos para obtenção dos mapas de distribuição de concentração. Em seguida, os mapas foram avaliados por MIA, e, por fim, características dos “canais” e textura foram extraídas dos escores das imagens, relacionando-as com características qualitativas. A aplicação foi adequada para verificar a homogeneidade e presença de agrupamentos do ativo em uma nova formulação desenvolvida para melhorar a dissolução de drogas pouco solúveis,

contribuindo para o entendimento do processo e planejamento de novas formulações (PRATS-MONTALBÁN et al., 2012).

O uso de IH-NIR também pode ser observado na análise de homogeneidade em sistemas de liberação transdérmicos de drogas, como para o caso do antiepiléptico tulobuterol. Para esta análise, o ativo foi depositado em dois tipos de fitas desenvolvidas, a de borracha e a acrílica. As HSI-NIR adquiridas permitiram verificar a presença de aglomerados dos cristais de tulobuterol nas fitas, o que evidenciou uma heterogeneidade na distribuição e conteúdo. Caso isto venha a ocorrer nos modelos comerciais, os efeitos farmacológicos podem diferir entre os produtos. HSI-NIR mostrou-se importante para avaliar a homogeneidade durante o desenvolvimento da formulação, pois as técnicas de mapeamento macroscópico demonstrou-se vantajoso para análise rápida da distribuição do tulobuterol cristalino (SAKAMOTO et al., 2013).

No Brasil são relatados trabalhos com HSI-NIR para análise qualitativa de compostos polimorfos em misturas piroxicam (ROCHA et al., 2011); análise de paracetamol e excipientes com a construção dos mapas de concentração (BAPTISTAO; ROCHA; POPPI, 2011); estudo de similaridade de mapas de distribuição das concentrações obtidos com diferentes calibrações (SABIN; ROCHA; POPPI, 2011); avaliação da distribuição de ativos e excipientes em comprimidos de espirolactona (CARNEIRO; POPPI, 2012a); estudos de homogeneidade de ativos em pomadas (CARNEIRO; POPPI, 2012b); quantificação de compostos em filme polimérico fino carregado com paracetamol (ALEXANDRINO; POPPI, 2013); e mapeamento das formas polimórficas de fexifenadina (BRONDI et al., 2014).

No trabalho desenvolvido por Sabin e colaboradores a HSI-NIR foi utilizada para a verificação de homogeneidade de revestimento de “pellets”. O processo de revestimento foi realizado em duas etapas, porque o ativo (alcalino) reagia desprotonando o polímero de revestimento entérico ácido. Com isto outro revestimento de proteção do ativo era necessário. Os “pellets” foram seccionados para aquisição da HSI-NIR, e o método CLS foi aplicado para aquisição dos mapas de distribuição, os quais conseguiram apresentar as duas camadas separadas, e ambas apresentaram-se uniformes, resultado este

confirmado pela análise de dissolução. Os resultados foram adequados para a produção industrial, principalmente em relação ao desenvolvimento (QbD), correlacionando a espessura das camadas e distribuição dos excipientes no núcleo com as propriedades de liberação do ativo (SABIN et al., 2011).

Um trabalho aliando o planejamento Split-plot (*Split-plot design*, SPD) e HSI-NIR foi realizado para avaliação da homogeneidade do paracetamol carregado em filme polimérico (mistura de polímeros biocompatíveis). O planejamento experimental SPD foi desenvolvido para estudar a influência da composição polimérica do filme e duas condições de processo relacionadas ao preparo (concentração da droga e temperatura do tratamento) na homogeneidade da droga dispersa na matriz polimérica. A HSI-NIR dos filmes poliméricos apresentaram evidências da composição química e das condições externas do preparo, porém a homogeneidade somente pôde ser observada após inspeção visual. Contudo, quando as informações qualitativas acerca da homogeneidade foram convertidas em informação quantitativa, por meio da análise de *macropixels*, um planejamento experimental SPD mostrou-se adequado para o planejamento experimental de misturas. Os modelos PLS representaram com sucesso a abordagem do planejamento de experimentos SPD (ALEXANDRINO; POPPI, 2014).

A HSI-NIR tem sido utilizada com sucesso em conjunto com outras técnicas espectroscópicas. As espectroscopias Raman e NIR foram utilizadas para verificar e quantificar traços de cristalinização em dispersão sólida amorfa usando tacrolimus, pois a presença do sólido amorfo resulta numa melhor dissolução do ativo. Após a verificação por NIR dos espectros relacionados às diferentes concentrações do amorfo, as HSI-NIR foram utilizadas, por meio de regressão PLS, para verificar a distribuição espacial da cristalinidade na superfície em diferentes concentrações, além de estimar quantitativamente a percentagem de cristalinidade (ZIDAN et al., 2012). Em um trabalho desenvolvido por Shönbichler e colaboradores, diferentes técnicas espectroscópicas (Raman, NIR, ATR-IR e HSI-NIR) foram utilizadas para análise quantitativa simultânea de uma mistura ternária de polimorfos da furosemida. Para os modelos de calibração com HSI-NIR foram realizadas regressões PLS. A escolha dos espectros utilizados foi crucial para que fossem fornecidos

resultados confiáveis em relação aos parâmetros de qualidade. As técnicas Raman, NIR e HSI-NIR em conjunto, com regressão PLS, foram adequadas para quantificação das formas polimórficas mais importantes da furosemida (formas I, II e III). Entretanto, a técnica ATR-IR não foi indicada para este medicamento, pois a pressão exercida durante a tomada das medidas espectrais propiciava a conversão da forma II em I. Os melhores resultados para o modelo foram obtidos utilizando NIR. Contudo a HSI-NIR demonstrou ser um método poderoso, com acurácia nas previsões similares, apresentando resultados semelhantes, tornando-se adequada para o uso em controle de qualidade (SCHÖNBICHLER et al., 2013).

HI-NIR e quimiometria foram utilizadas para o estudo do comportamento da hidratação de comprimidos de liberação prolongada contendo drogas de alta solubilidade em alta concentração num polímero hidrofílico. Para isto, os comprimidos preparados foram mergulhados em gel hidratado. Foi possível observar as fronteiras entre o gel e a superfície de dilatação/difusão do comprimido. Com modelos PCA e regressão PLS, a faixa de penetração da água e a região de transição do polímero puderam ser verificadas. Apresentaram resultados similares, como também verificaram que a dissolução do ativo ocorre na fase de transição do polímero. A introdução desses métodos facilitam a compreensão do mecanismo de liberação das drogas, em comprimidos de matriz dilatável, o que resulta em um melhor desenvolvimento de formulações com liberações prolongadas (LI et al., 2010). Um trabalho subsequente foi realizado utilizando imagens NIR, com formulações de liberação rápida e lenta, porém com um suporte para aquisição das HSI-NIR, sem seccionar os comprimidos (AVALLE et al., 2011). Um outro trabalho foi desenvolvido utilizando o mesmo suporte, porém com uma droga de baixa solubilidade (AVALLE et al., 2013). Esses estudos complementam o conhecimento sobre a difusão dos ativos em comprimidos de liberação modificada, compreendendo a dissolução visualmente.

A tabela 1 apresenta um resumo de trabalhos utilizando IH-NIR para análise de medicamentos.

Tabela 3.1 – Resumo das publicações envolvendo Análise de Medicamentos por HSI-NIR

Trabalho	Form. Farmacêutica	Ativo	Objetivo	Referência
1	Comprimidos R ¹ , NR ²	Não informado	Regiões de não-homogeneidade de falsificados	(RODIONOVA et al., 2005)
2	Comprimido	Não informado	Viabilidade de quantificação de ativos e excipientes	(GENDRIN; ROGGO; COLLET, 2007)
3	Comprimido	Acetaminofeno	Composição quantitativa e distribuição	(HAMAD et al., 2007)
4	Comprimido	Não informado	Avaliação da habilidade de predizer a concentração	(RAVN; SKIBSTED; BRO, 2008)
5	Mistura de pós	Acetaminofeno	Descrição qualitativa da mistura	(MA; ANDERSON, 2008)
6	Comprimido	Placebo (lactose)	Avaliação da distribuição da densidade e força de compressão	(ELLISON et al., 2008)
7	Comprimido	Ácido tartárico	Distribuição em função da granulometria	(HILDEN et al., 2008)
8	Mistura de pós	Ibuprofeno	Homogeneidade frente a distintos algoritmos	(AMIGO et al., 2008)
9	Comprimido	Ibuprofeno	Construção de mapas de correlação	(CAIRÓS et al., 2009)
10	Comprimido	Não informado	Quantificação direta e avaliação da distribuição	(AMIGO; RAVN, 2009)
11	Comprimido	Ácido acetilsalicílico	Quantificação do ativo	(CRUZ, J et al., 2009)
12	Comprimido LP ³	Não informado	Comportamento de hidratação e perfil de concentração IFA	(LI et al., 2010)
13	Comprimido	Bisoprolol-hemifumarato	Identificação de falsificados por meio da homogeneidade	(PUCHERT et al., 2010)
14	Comprimido	Não informado	Quantificação em formulações não homogêneas	(LOPES et al., 2010)
15	Comprimido	Polímero	Dispersão espacial	(SHI; ANDERSON, 2010)
16	Comprimido	Risperidona	Homogeneidade e quantificação	(RAHMAN; ZIDAN; KHAN, 2010)
17	Comprimido	Lorazepam	Uniformidade de conteúdo (ativo e excipientes)	(FRANCH-LAGE et al., 2011)
18	Filme polimérico	Griseofulvina	Distribuição das partículas	(ZAROW et al., 2011)
19	Comprimido	Piroxicam	Quantificação de polimorfos	(ROCHA et al., 2011)
20	Pellet	Diclofenaco sódico	Distribuição dos ativos e excipientes	(SABIN et al., 2011)
21	Comprimido	Excipientes	Entendimento do processo de produção	(HATTORI; OTSUKA, 2011)
22	Comprimido	Ácido acetilsalicílico	Composição quantitativa e distribuição	(CRUZ; BLANCO, 2011)
23	Comprimido	Carbamazepina	Homogeneidade frente diferentes calibrações multivariadas	(SABIN et al., 2011)
24	Mistura de pós	Não informado	Homogeneidade	(PUCHERT et al., 2011)
25	Comprimido	Tolmetim	Escala de segregação	(ELY; CARVAJAL, 2011)

26	Pós/Gran./Fitas	Não informado	Monitoramento da partícula do IFA	(ŠAŠIĆ; YU; ZHANG, 2011)
27	Comprimido	Não informado	Distribuição do IFA/ Comparação com imagem RAMAN	(ŠAŠIĆ, 2011)
28	Comprimido	Ibuprofeno	Distribuição espacial (micro-imagem)	(WANG et al., 2011)
29	Comprimido	Não informado	Hidratação de comprimidos de rápida e lenta liberação	(AVALLE et al., 2011)
30	Mistura de pós	Ác. acetilsalicílico	Análise quantitativa e estudo de heterogeneidade	(PIQUERAS et al., 2012)
31	Comp./Mist. de pós	Ác. acetilsalicílico	Homogeneidade	(ROSAS; BLANCO, 2012a)
32	Mistura de pós	Cafeína	Resolução espacial	(OFFROY; ROGGO; DUPONCHEL, 2012)
33	Mistura de pós	Ervas chinesas	Homogeneidade	(WU et al., 2012b)
34	Comprimido	Imidacloprid	Heterogeneidade do falsificado	(HUANG et al., 2012)
35	Comprimido	Alcaçuz	Composição e homogeneidade	(WU et al., 2012a)
36	Comprimido	Espiro lactona	Uniformidade de conteúdo	(CARNEIRO; POPPI, 2012a)
37	Pomada	Tacrolimus	Identificar fases da pomada	(CARNEIRO; POPPI, 2012b)
38	Grânulos	Etenzamida	Deteção da segregação de componentes	(KOIDE et al., 2013)
39	Comprimido	Não informado	Hidratação de comprimido de liberação controlada com ativo de baixa solubilidade	(AVALLE et al., 2013)
40	Comprimido	Ácido ascórbico	Monitorar o processo de dissolução	(ISHIKAWA et al., 2013)
41	Grânulo	Etenzamida	Verificar qualidade do processo de granulação	(KOIDE et al., 2013)
42	Filme polimérico	Paracetamol	Quantificação dos constituintes	(ALEXANDRINO; POPPI, 2014)
43	Comprimido de desintegração oral	Lamotrigina	Distribuição dos compostos	(RAHMAN; SIDDIQUI; KHAN, 2013)
44	Adesivo transdérmico	Tulobuterol	Distribuição dos cristais do IFA	(SAKAMOTO et al., 2013)
45	Mistura de pós	Não informado	Uniformidade de conteúdo	(ŠAŠIĆ; KONG; KAUL, 2013)
46	Dispersão sólida	Tacrolimus	Uniformidade de conteúdo	(RAHMAN et al., 2014)
47	Pomada	Clobetasona	Distribuição do IFA	(YAMAMOTO et al., 2014)
48	Comprimido	Clorfeniramina	Uniformidade de conteúdo	(ZHOU et al., 2014)
49	Comprimido	Fenoxifenadina	Mapeamento de polimorfos	(BRONDI et al., 2014)
50	Pós compactados e comprimidos	Paracetamol	Monitorar distribuição espacial e propriedades físicas	(SOUHI et al., 2015)

4 AVALIAÇÃO DE COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA (AZT+3TC)

O processo de mistura é uma das etapas chave na fabricação de comprimidos. Uma boa uniformidade de mistura é crucial para garantir uniformidade na dosagem e produtos de alta qualidade. Anteriormente, procedimentos de boa fabricação (BRASIL, 2010) e numerosas verificações de qualidade foram introduzidas para garantir a qualidade dos produtos. Porém com o guia de *PAT*, novos métodos de monitoramento e controle em processo foram introduzidos. O maior objetivo deste guia foi implementar iniciativas que permitissem uma profunda compreensão nos processos de produção de medicamentos, substituindo abordagens empíricas, e compreendendo os parâmetros chave do processo e seu impacto na qualidade do produto permitindo às indústrias “construírem a qualidade” (QbD), ao invés de “testarem no produto final” (KOLLER et al., 2011).

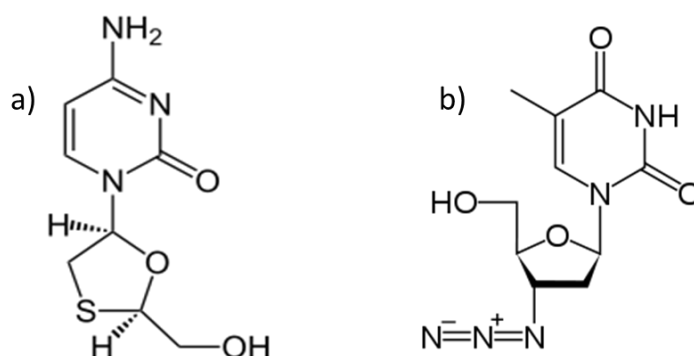


Figura 4.1 - Estruturas químicas da (a) lamivudina e (b) zidovudina

Zidovudina (AZT) e lamivudina (3TC) (Figura 4.1) são nucleosídeos sintéticos análogos com atividade contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Ambos os ativos são fosforilados intracelularmente para ativos metabólitos trifosfatados, sendo potenciais inibidores da transcriptase reversa viral e fracos inibidores da DNA polimerase (KENNEY et al., 2000). O uso da dose combinada reduz a quantidade do HIV-1 no plasma sanguíneo, além de reduzir a carga viral no plasma seminal (PEREIRA et al., 2000). A introdução de regimes de combinação de fármacos efetivos leva a melhoras substanciais na morbidade e

mortalidade, e uma formulação bem desenvolvida permitirá melhor ação fármaco- cinética e dinâmica da droga (SINGH, 2012).

Em trabalho realizado para o desenvolvimento e implementação de métodos analíticos, de acordo com os preceitos do *PAT*, para monitoramento do processo de fabricação no LAFEPE do comprimido de dose-fixa combinada de AZT+3TC, desenvolveram métodos baseados na espectroscopia NIR e calibração multivariada. Foram determinados os conteúdos dos ativos em etapas significantes da produção: no granulado, comprimido não revestido (núcleo) e no produto acabado (comprimido revestido). Além disto, métodos validados para monitoramento de dureza do núcleo antes do revestimento apresentaram-se adequados (GRANGEIRO JUNIOR et al., 2015). Os resultados aqui apresentados estão relacionados às análises das imagens hiperespectrais no NIR, para avaliação dos CDM e suas estruturas químicas internas.

4.1 OBJETIVOS

4.1.1 Objetivo Geral

- Avaliar a distribuição dos componentes da formulação na superfície do comprimido de AZT+3TC.

4.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a distribuição espacial dos compostos da formulação nos mapas de distribuição de concentração;
- Verificar as estruturas químicas internas de correlação dos mapas de distribuição;
- Identificar as relações internas e quais suas contribuições no processo de produção do medicamento.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os comprimidos de dose-fixa combinada de AZT+3TC foram produzidas pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE, Recife, Pernambuco, Brasil) e possuem concentrações nominais de 300 e 150 mg, respectivamente. A formulação é constituída por seis insumos: 1) zidovudina (AZT); 2) lamivudina (3TC); 3) amido; 4) carboximetilcelulose (CMC); 5) polivinilpirrolidona (PVP) e 6) estearato de magnésio, 7) glicolato sódico de amido e 8) *opadry*. HSI-NIR foram adquiridas de cinco comprimidos não revestidos (núcleo), de diferentes lotes comerciais, e também dos compostos puros da formulação (ativos e excipientes). A identificação das amostras são os três últimos dígitos dos lotes comerciais. Para a construção da matriz dos espectros puros (*sp*), utilizou-se os espectros médios para cada HSI-NIR dos componentes da formulação. Essa média foi estimada após a realização do pré-processamento. Considerando o conhecimento da formulação (*sp*), o método MCR-ALS foi realizado nas imagens para obtenção dos CDM, os quais carregam a informação das concentrações relativas dos *sp* em cada *pixel*, ou seja, a distribuição espacial.

Usando a metodologia proposta por Prats-Montalbán e colaboradores (2012), PCA foi aplicada aos CDM para análise das estruturas de correlação na mistura, o que pode revelar diferentes comportamentos em cada PC. A PCA pode auxiliar a encontrar informação significativa e complementar melhoradas das imagens isoladas, considerando cada composto e suas correlações internas (PRATS-MONTALBÁN et al., 2012).

As imagens hiperespectrais foram coletadas utilizando a SPECTRAL CAMERA^{SWIR}, modelo SisuCHEMA (Specim – FIN), instalada na UNICAMP, que permite a aquisição de imagens com alta velocidade e sem grandes limitações quanto ao formato da amostra. O equipamento possui faixa espectral 1000-2500 nm e resolução 10 nm. Para aquisição dos dados foram utilizadas macro lentes com tamanho do *pixel* 30x30 µm com 10 mm de campo de visão

Para tratamento quimiométrico dos dados foi utilizado o software MATLAB®R2010a versão 7.10.0.499.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as análises, as HSI-NIR foram cortadas para ser analisado um hipercubo com tamanho de 100x100 *pixels* e 237 comprimentos de onda, para cada comprimido. Foram avaliados dois pré-processamentos: SNV e MSC (Figura 4.2). MSC, no geral, apresentou melhores resultados, pois possibilita o uso de restrição *fnpls* (do inglês, *fast non negative least squares*) para os espectros favorecendo a otimização, e esta restrição não pode ser utilizada quando o pré-processamento é SNV pois parte dos espectros possuem valores negativos. Logo os resultados apresentados serão os obtidos com MSC, como pré-processamento.

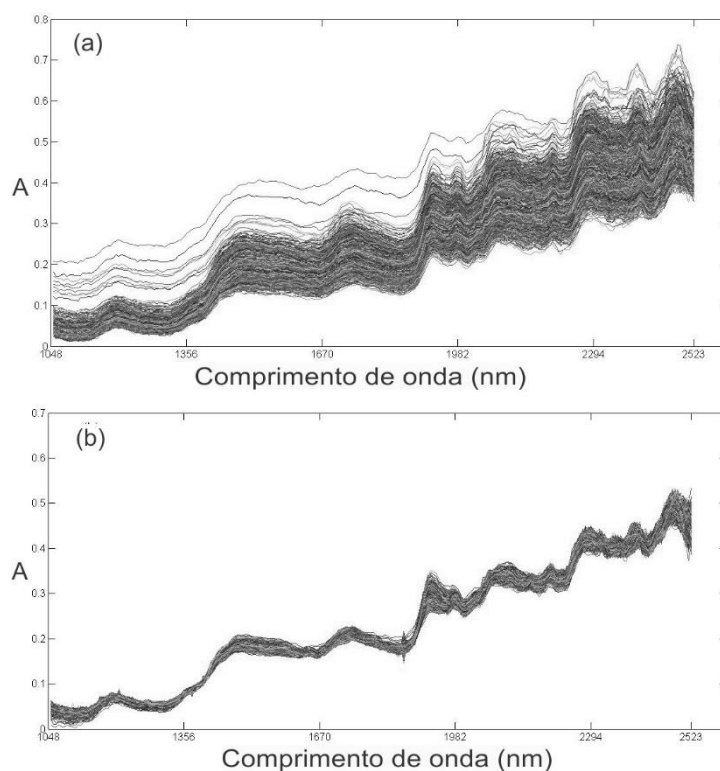


Figura 4.2 – (a) Dados Bruto e (b) dados pré-processados com MSC.

Para montagem da matriz de estimativas iniciais (sp – Figura 4.3), foram utilizados os espectros de todos os compostos da formulação na sequência: 1) AZT; 2) 3TC; 3) amido; 4) CMC; 5) PVP e 6) estearato de magnésio. Observou-se, entretanto, uma alta correlação (0.99) entre o amido e o glicolato sódico de amido. Sendo o glicolato um composto minoritário na formulação, o seu espectro seria mascarado pelo espectro do amido, com isto, um espectro médio foi

utilizado para representar ambos espectros (amido e glicolato de sódio), nomeado como amido, para implementação na matriz como estimativa inicial.

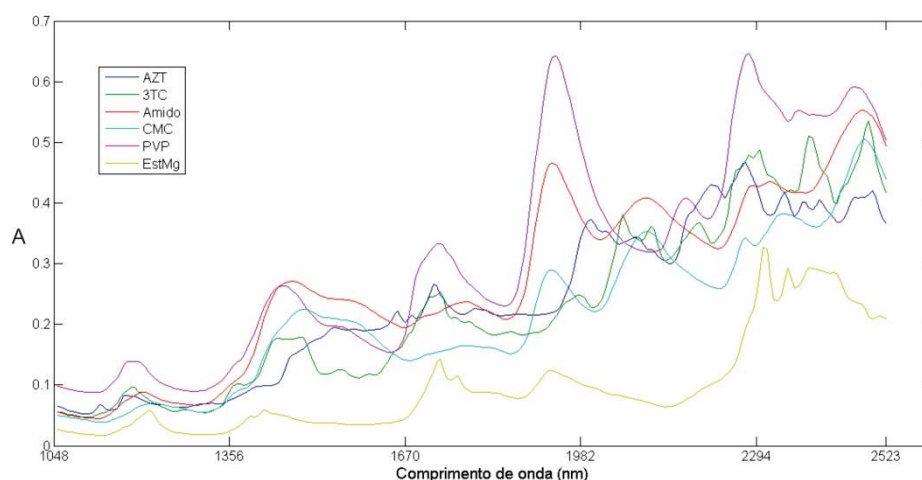


Figura 4.3 – Estimativas iniciais (*sp*) dos espectros de cada constituinte da formulação

O método MCR-ALS foi aplicado em cada amostra, utilizando *sp* como as estimativas iniciais. A restrição *fnnls* foi imposta para espectro e concentração. Além disto, a seletividade espectral foi imposta para os compostos minoritários (EstMg e PVP) devido às suas baixas concentrações na formulação. Amido e CMC possuem coeficiente de correlação entre os espectros de 0.97, um valor relativamente alto, porém como ambos são compostos majoritários foram adicionados na matriz de estimativas iniciais para otimização. Após a otimização ocorreu uma diferenciação entre os espectros, e a correlação entre os espectros de amido e CMC otimizados foi de 0.92. Os espectros usados como estimativas iniciais e otimizados estão evidenciados na Figura 4.4.

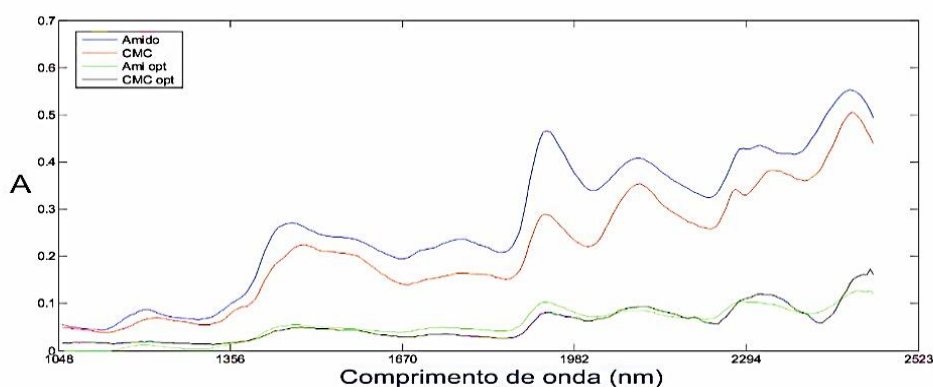


Figura 4.4 – Espectros utilizados como estimativas iniciais e otimizados (opt) de amido e CMC.

A Figura 4.5 apresenta os CDM obtidos para o núcleo 248 (comprimido sem revestimento). Observam-se diferentes distribuições para os ativos AZT e 3TC, porém uma leve aproximação entre ambos compostos. Em contrapartida, o amido aparece em baixa concentração e o CMC em alta, pois, como ambos são os diluentes majoritários, a presença de um indica a ausência de outro. E o PVP está mais distribuído na superfície do que o estearato de magnésio, comparando os CDM dos minoritários.

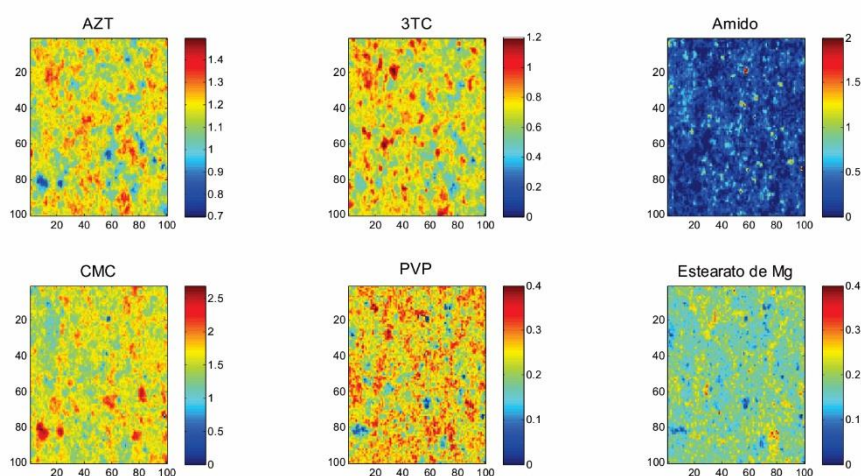


Figura 4.5 – Mapas de distribuição dos de AZT+3TC para o núcleo 248.

A Figura 4.6 apresenta os mapas de distribuição para o comprimido 251, o qual é um comprimido revestido. Os ativos e demais excipientes comportam-se de forma semelhante à descrição acima para o núcleo 248. O revestimento de comprimidos emerge como uma técnica que favorece a proteção do princípio ativo contra agentes externos (ar, umidade e luz), promovendo uma maior estabilidade das formulações (BAZZO; SILVA, 2005). Contudo, o *opadry*, material de revestimento, não se apresenta uniformemente distribuído na superfície, e, além disto, onde está presente em grandes concentrações, prejudica a visualização dos compostos da formulação.

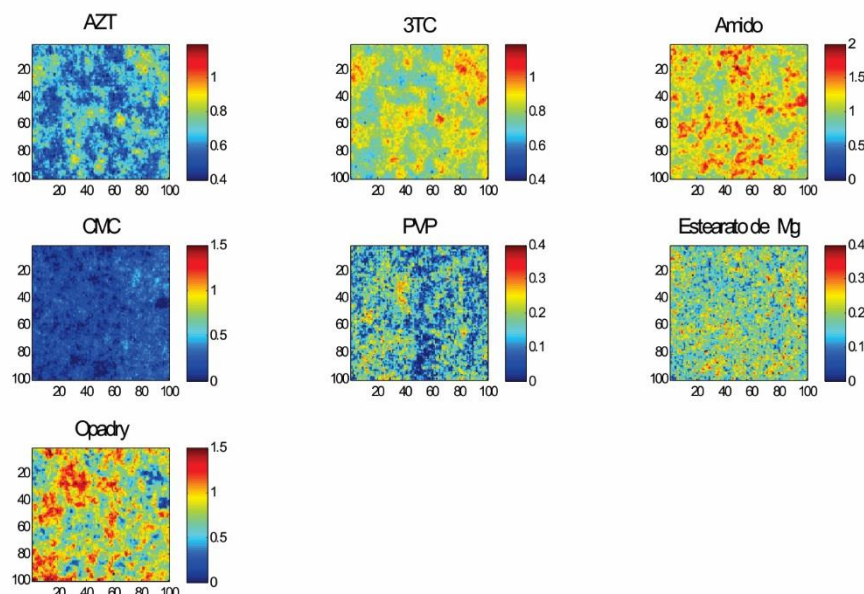


Figura 4.6 – Mapa de distribuição de AZT+3TC para o comprimido 251 (revestido).

Os CDM das amostras do núcleo (248, 249 e 253) foram centrados na média, para dar a mesma importância a todos os compostos da formulação. Em seguida, uma imagem cúbica de 100x100 *pixel* e 6 compostos foi remontada para realizar PCA. Como resultado obteve-se imagens dos escores e os valores dos pesos para cada componente principal (PC). Os resultados são apresentados nas Figuras 4.7 e 4.8, para os núcleos 249 e 253, os quais mesmo sendo de lotes diferentes apresentaram resultados semelhantes.

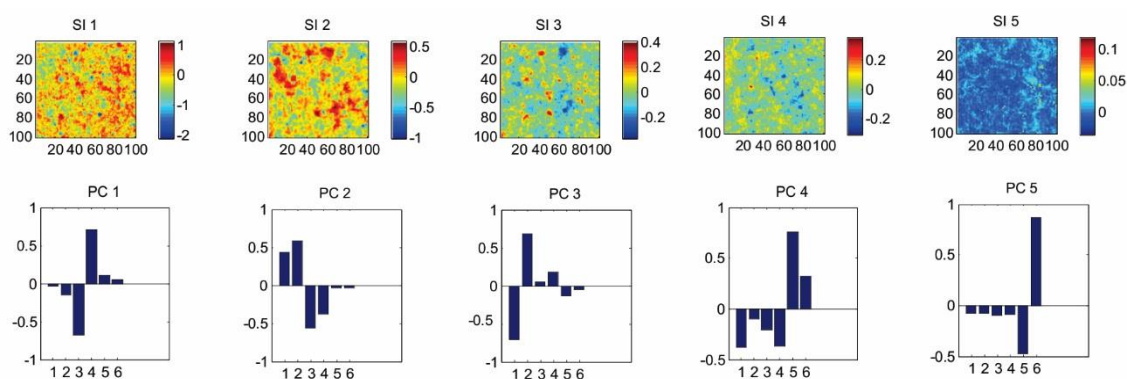


Figura 4.7 – Imagens dos escores e pesos para o núcleo 249(1- AZT; 2 - 3TC; 3 - amido; 4 - CMC; 5 – PVP; 6 – Mg Est).

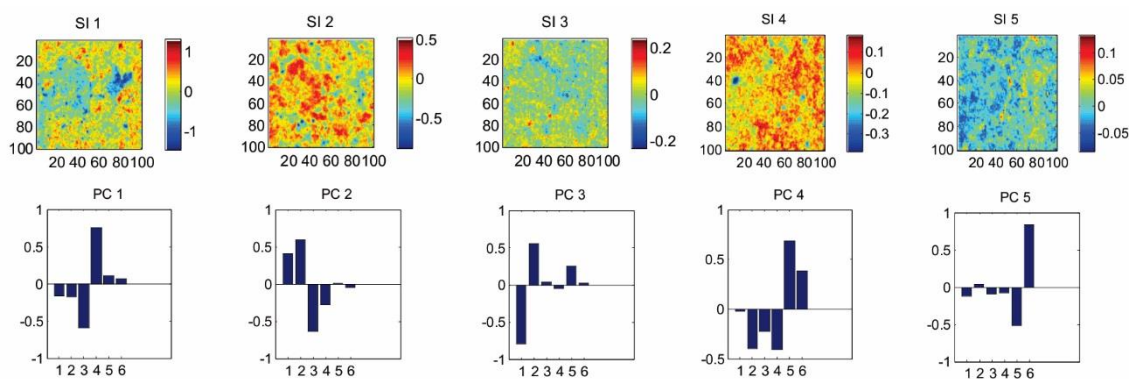


Figura 4.8 – Imagens dos escores e pesos para o núcleo 253 (1- AZT; 2 - 3TC; 3 - amido; 4 - CMC; 5 – PVP; 6 – Mg Est).

Avaliando as imagens dos escores (*scores images*, SI) e os valores dos pesos, observa-se que a PC1 possui informação relacionada aos diluentes majoritários (amido e carboximetil celulose – CMC). Os *pixels* com altos níveis de CMC e baixos de amido possuem altos valores positivos na PC1, sendo verificada na cor vermelha na imagem SI1; enquanto que os *pixels* com altos níveis de amido e baixo de CMC apresentam-se da maneira inversa, possuindo os altos valores negativos na PC1, sendo visualizado na cor azul na imagem SI1.

De acordo com os valores dos pesos, verifica-se que a PC2 possui informações dos IFA (altos valores positivos) e dos diluentes da formulação (altos valores negativos). Um aumento na diferença na densidade dos pós leva a uma alta taxa de segregação, causados pela geração de forças verticalmente dirigidas nas partículas dependentes do processo de mistura dos pós (MUSHA et al., 2013). Isto pode ser uma das possíveis causas para a segregação entre IFA e excipientes diluentes. A similaridade entre as densidades batidas da lamivudina e zidovudina, 0.776 g/cm^3 e 0.703 g/cm^3 , respectivamente, pode causar um comportamento semelhante durante a migração das partículas no processo de mistura. Entretanto, os resultados de segregação não estão somente relacionados a variações de propriedades como diferenças de densidades, distintos tamanhos de partículas, formato e capacidade de coesão entre os pós, mas também especificidades no manuseio e uso dos equipamentos (HE et al., 2013). Outros fatores continuam sendo investigados para melhor entendimento do processo de mistura. A PC3 mostra o contraste entre os ativos, lamivudina e zidovudina, enquanto que a PC5 é relacionada aos componentes minoritários da

formulação. Esta estrutura de correlação da estrutura química interna foi mantida para todos os comprimidos.

4.4 CONCLUSÃO

As HSI-NIR permitem o entendimento acerca da distribuição dos ativos e excipientes presentes na formulação, em respeito a compostos individuais (ativos, compostos majoritários ou minoritários) como de aglomerados (ativos contra diluentes), sendo assim adequadas para entender o comportamento do processo de mistura levando a melhorias na produção e desenvolvimento de medicamentos.

5 AVALIAÇÃO DE PRODUTO DE DEGRADAÇÃO DO CAPTOPRIL

A segurança no uso de medicamentos é determinada pelos perfis farmacológicos e toxicológicos, como também pelo conteúdo de impurezas nas formulações farmacêuticas (JAIN; BASNIWAL, 2013). O guia da Conferência Internacional em Harmonização (*The International Conference on Harmonization*, ICH) (2003) sugere estudos em drogas para avaliar suas características de estabilidade, inerentes ao composto, não somente identificando os produtos de degradação como também entendendo a estabilidade da molécula estudada (RAO et al., 2014).

Produtos de degradação são impurezas resultantes de modificações químicas nas substâncias utilizadas para medicamentos, ocorridas durante a manufatura e/ou armazenamento do medicamento. O guia do Comitê Internacional de Harmonização (*International Harmonization Committee*, ICH) Q3B (R2) estabelece que o requerente deve apresentar um resumo sobre os produtos de degradação observados na fabricação e/ou estudo de estabilidade do novo produto (ICH, 2006). No guia ICH Q1A (R2), testes de estabilidade são requisitados para fornecer evidências relacionadas às variações nas drogas ou em seus produtos, o que pode modificar com o tempo, devido à influência de fatores ambientais, como temperatura, umidade e exposição à luz. Há também a necessidade de estabelecimento do período de re-teste ou prazo de validade das drogas e medicamentos, como medida de estabelecer melhores condições de armazenamento (FOTI et al., 2013; ICH, 2003).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), órgão regulador brasileiro, possui a resolução vigente RDC No. 45 (BRASIL, 2012), que requisita testes de estabilidade em insumos farmacêuticos e produtos, para prever, determinar e monitorar os períodos de re-teste e prazo de validade, com acompanhamento temporal para períodos curtos e longos, degradação forçada e fotoestabilidade.

5.1 CAPTOPRIL E DISSULFETO DE CAPTOPRIL

Na década de 1960, ao analisar o veneno da *Bothrops jararaca*, foi encontrado um IFA capaz de intensificar a resposta à bradicinina, sendo esta uma substância capaz de inibir os agentes naturais do organismo que elevam a pressão arterial (angiotensina 1 e 2), prolongando o efeito de uma molécula que mantém a pressão baixa, a bradicinina (PEIXOTO et al., 2005). Captopril (1-[(2S)-3-mercapto-2-metilpropionil]-L-prolina – $C_9H_{15}NO_3S$) foi o agente pioneiro desenvolvido para atividade anti-hipertensiva, tendo a habilidade de reduzir níveis da Angiotensina II com inibição oral efetiva da enzima angiotensina conversora, representando um importante avanço no tratamento da enfermidade (JACKSON, 2011). O captopril contém um único grupamento sulfidril (-SH) livre que pode aprisionar radicais livres citotóxicos e ser convertido em dissulfeto.

A degradação do captopril é danosa ao tratamento terapêutico, pois uma elevada concentração de dissulfeto de captopril implica na diminuição do teor do ativo (PEIXOTO et al., 2005), o que poderá causar o aparecimento de efeitos indesejáveis no organismo quando estiver acima do valor máximo permitido (MARCOLINO JÚNIOR, 2007; NÓBREGA, 2006). A prematura conversão em dissulfeto prejudica a interação do IFA com proteínas e enzimas celulares. Esta última interação causaria o efeito benéfico no tratamento da morbidade cardiovascular. A literatura descreve que o captopril deve ligar-se à albumina sérica humana por ligações não covalentes ou covalentes, o que facilitaria o transporte no organismo (LI; LIN, 2005). Este medicamento faz parte da RENAME (Relação nacional de medicamentos essenciais) de 2012, confeccionada pela ANVISA, indicado como droga para prevenção de doenças cardíacas, e é produzido por laboratórios oficiais.

A degradação do captopril segue uma cinética de ordem zero, levando à formação do dissulfeto de captopril (DC) a partir da oxidação do grupamento sulfidril (-SH), a reação está ilustrada na Figura 5.1. Alguns estudos demonstraram que o DC pode contribuir na ação anti-hipertensiva tendo uma fraca, porém significativa, atividade inibidora na enzima conversora da angiotensina (MAHMOUD; KÜMMERER, 2012; STULZER; SILVA, 2006).

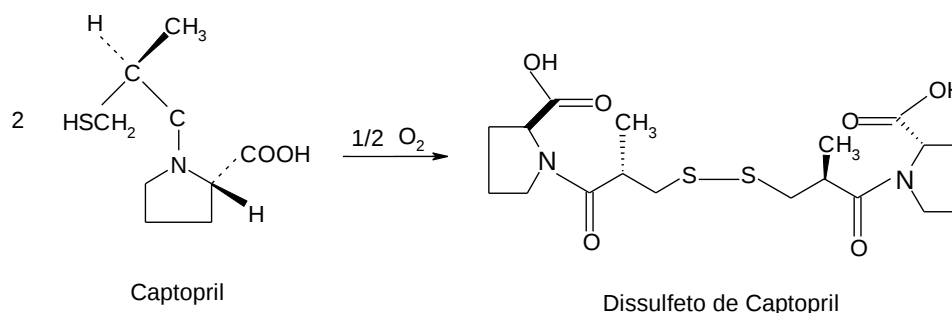


Figura 5.1 – Reação de degradação do captopril (LAMIM, 2006).

Em trabalho recente desenvolvido pelo grupo (SOUZA et al., 2012) foi proposto um método para determinar o conteúdo do produto de degradação (DC) em comprimidos de captopril por meio da espectroscopia NIR e calibração multivariada, em substituição ao método de referência (Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE). Comprimidos recém produzidos e degradados (submetidos a degradação acelerada ou amostras de retenção) foram utilizados. Modelos PLS foram construídos utilizando espectros NIR, adquiridos por reflectância difusa, e o conteúdo de DC foi analisado por CLAE. O RMSEP obtido foi de 14.2%, que está entre os limites aceitáveis para detecção de impurezas utilizando espectroscopia NIR.

O uso de HSI-NIR no controle de qualidade farmacêutico contribui para um melhor conhecimento do aparecimento dos produto de degradação, a partir do momento que permite avaliar a distribuição parcial do ativo e seu produto de degradação, além dos compostos vizinhos (excipientes) presentes na formulação.

5.2 OBJETIVOS

5.2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o comportamento da degradação dos comprimidos de captopril utilizando imagens hiperespectrais NIR.

5.2.2 Objetivos Específicos

- Observar os mapas de distribuição do ativo (captopril), produto de degradação (dissulfeto de captopril) e insumos da formulação farmacêutica considerando diferentes datas de fabricação.
- Verificar estruturas químicas internas dos comprimidos ao longo do tempo.
- Desenvolver modelos quimiométricos para verificação das datas de fabricação, após extração de características.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Comprimidos de captopril foram fornecidos pelo LAFEPE, laboratório oficial do Brasil para produção e fornecimento de medicamentos para o sistema de saúde. Os comprimidos foram produzidos de acordo com a sua formulação específica registrada na ANVISA (MS: 1.01830110.001-0) (BRASIL, 2005). Foram coletadas amostras de diferentes lotes ao longo de 5 anos, para avaliar o produto de degradação DC, resultando em 30 amostras válidas ou expiradas. Também foram obtidos no LAFEPE os compostos puros: captopril, celulose, lactose, ácido esteárico, croscarmellose. O padrão do produto de degradação do DC foi produzido pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

As imagens de cada comprimido foram coletadas utilizando a SPECTRAL CAMERA SWIR, modelo SisuCHEMA (Specim – FIN), instalada na UNICAMP. O equipamento possui faixa espectral 1000-2500 nm e resolução 10 nm. Para aquisição dos dados foram utilizadas macro lentes com tamanho do *pixel* 30x30 µm com 10 mm de campo de visão. As HSI-NIR foram adquiridas em ambos os lados dos comprimidos, sendo nomeadas como topo e fundo. A face relacionada ao topo é a que está com contato com o PVC do “blister”, e mais exposta a luz; enquanto que a face relativa ao fundo é a que fica em contato com o alumínio. Estudos adicionais para avaliar a degradação em diferentes profundidades no comprimido foram realizados removendo finas camadas dos comprimidos, com uma lâmina afiada, e verificando a espessura com um micrômetro. A cada camada removida uma HSI-NIR era adquirida.

Após a aquisição dos dados, inicialmente foram avaliadas diferentes estratégias de pré-processamento espectral, como normalização, SNV, MSC, derivadas e suavização, com o objetivo de minimizar ruídos, eliminar efeitos de variação de linha de base e espalhamento (fenômenos físicos).

No caso dos componentes puros foram utilizadas as médias dos espectros de cada composto em suas respectivas imagens, após o pré-processamento. Utilizando os espectros médios, montou-se a matriz dos espectros puros (sp). Considerando o conhecimento da formulação, métodos de resolução

multivariados (CLS e MCR-ALS) foram aplicados para segregar a informação da imagem hiperespectral, obtendo assim os mapas de distribuição de concentração que apresentam as concentrações relativas dos compostos químicos puros, em cada *pixel*. As restrições de não negatividade foram impostas para concentração (e espectro quando MSC foi utilizado), e seletividade espectral (ssel) foram impostas para os excipientes.

A PCA foi aplicada nos CDM para análise das estruturas de correlação da mistura, obtendo as imagens dos escores e pesos, identificando diferentes comportamentos nas componentes principais. Em seguida, imagens dos 30 comprimidos, com diferentes datas de validade, foram avaliadas por regressão PLS. O vetor característico foi extraído por técnicas de IFE-MIA. SVD, DWT e SCTD, aplicadas nos CDMs e imagens dos escores. Além disto, a correlação entre as estimativas iniciais dos espectros de Captopril e DC, assim como os pesos da PCA de cada imagem foram utilizadas como outras características adicionais dos vetores, a fim de caracterizar cada imagem, tanto quanto possível. Nove comprimidos foram empregados como conjunto de validação externa. Modelos PLS foram construídos para cada técnica IFE-MIA utilizando como valores de referência (y de PLS) o período entre a fabricação do lote e a obtenção da imagem. Para melhoria dos modelos PLS, seleção de variáveis foi desenvolvida utilizando algoritmos genéticos (*genetic algorithm*, GA) (LEARDI; LUPIÁÑEZ GONZÁLEZ, 1998) e importância de variável na projeção (*variable importance in projection*, VIP) (WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001) values. As etapas do tratamento quimiométrico das imagens realizados são mostrados na Figura 6. Os softwares utilizados foram Matlab (The MathWorks, Inc.) e SIMCA (Umetrics).

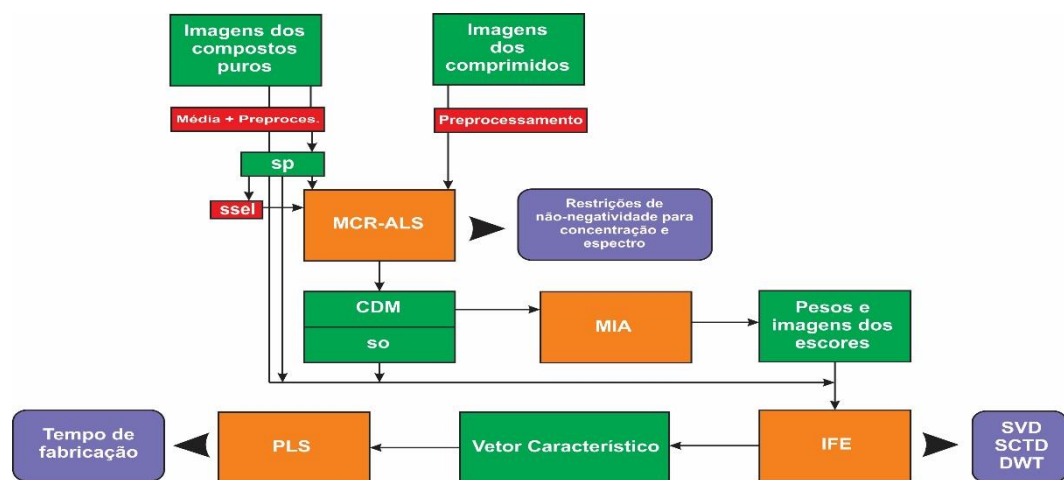


Figura 5.2 – Fluxograma das etapas do tratamento quimiométrico das imagens.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Mapas de Distribuição Química

As imagens dos comprimidos foram cortadas para a construção de um hipercubo com tamanho de 100x100 *pixels* e 237 números de onda. Diversos pré-processamentos foram testados (derivadas, SNV, MSC e associações entre os citados). A Figura 5.3 mostra os espectros brutos, com SNV e segunda derivada e MSC. Os resultados descritos serão os relacionados ao MSC, pois esse pré-processamento apresentou melhores resultados para o modelo PLS final. MCR-ALS foi utilizado como método de resolução devido a altos valores de correlação entre os excipientes. Considerando o alto valor de correlação (0.99) entre o amido e o glicolato sódico de amido, um espectro médio foi utilizado para ambos os compostos como estimativa inicial. A Figura 5.4 apresenta os espectros puros (*sp*) das estimativas iniciais.

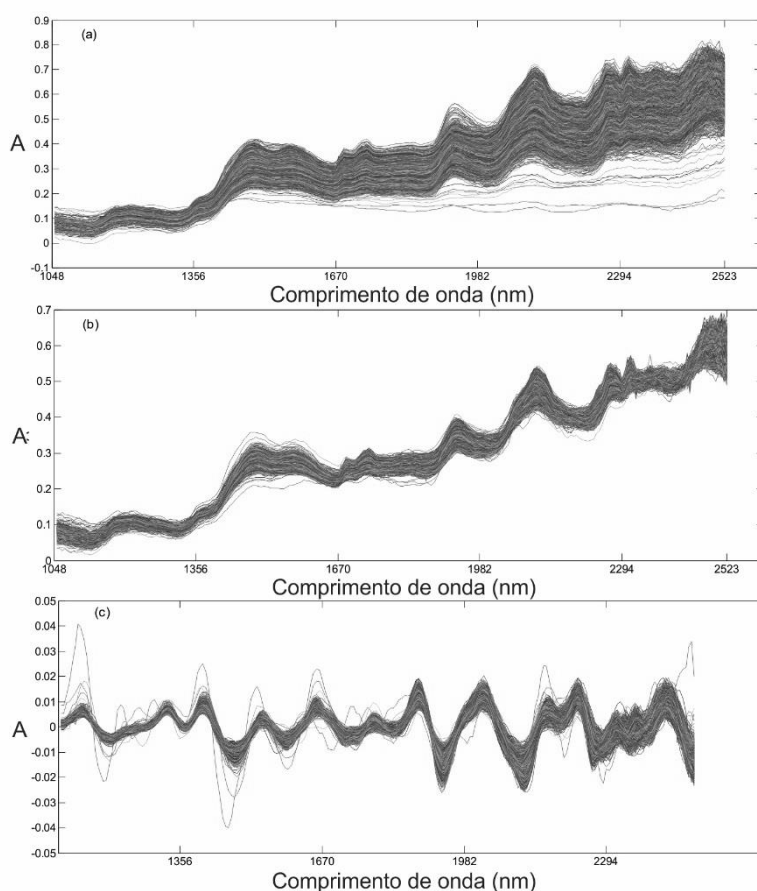


Figura 5.3 – Matriz de dados para os dados brutos (a) e pré-processados com MSC (b) e SNV associado a 1ª derivada (c).

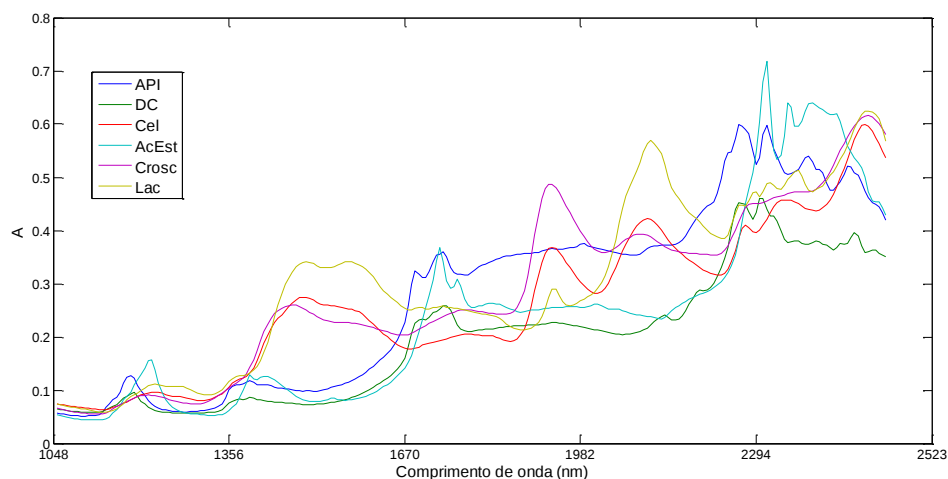


Figura 5.4 – Espectros puros (sp).

Os métodos MCR-ALS individual e aumentado foram utilizados para análise das imagens utilizando a matriz *sp* como estimativas iniciais, porém os resultados obtidos com o MCR-ALS aumentado não apresentou resultados satisfatórios para o modelo PLS. Seletividade espectral foi imposta para os excipientes uma vez que se assumiu que seus espectros não se alteram com o tempo, devido a estabilidade. Porém o IFA é convertido em DC com o avanço do tempo. Restrições de não negatividade foram aplicadas para concentração para ambos os pré-processamentos e, adicionalmente, para MSC foi aplicada não negatividade para os espectros. A Figura 5.5 apresenta os CDM para amostras expiradas, com data de fabricação 2007 (6 anos de produzida na data de obtenção das imagens – topo) e válidas, com data de fabricação de 2012 (menos de 1 ano de produzida na data de obtenção das imagens – topo), tomadas como exemplo. Os comprimidos comerciais possuem 2 anos de validade. A concentração relativa do DC é maior no comprimido com mais tempo de produzido, como esperado. Os histogramas dos CDM, apresentados na Figura 5.5, evidenciam o deslocamento do pico do IFA para a esquerda, reduzindo a concentração; e o deslocamento do histograma do DC para a direita, aumentando a concentração do produto de degradação durante o tempo.

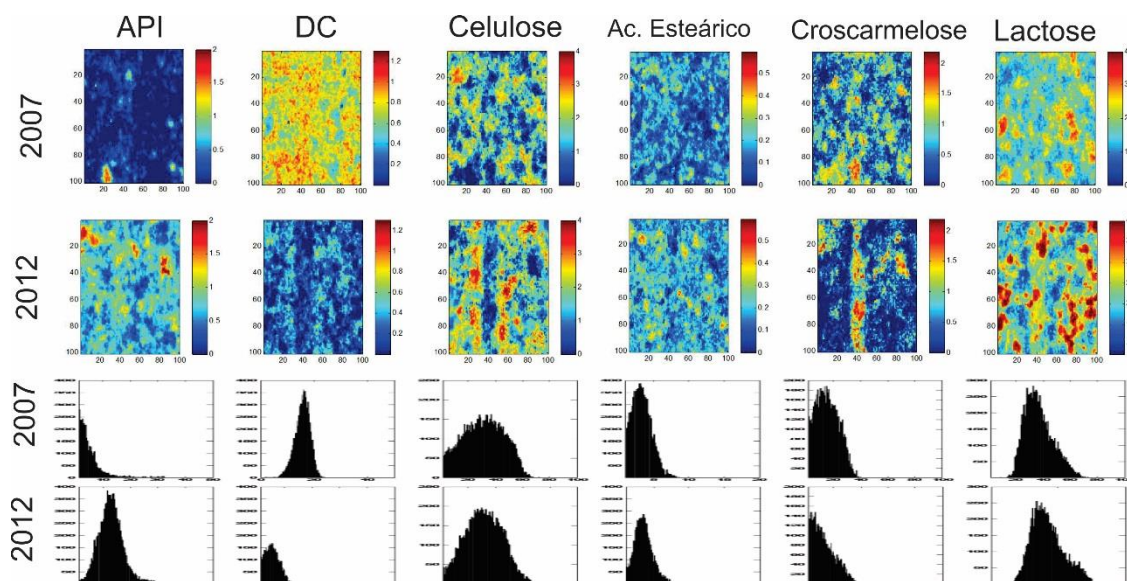


Figura 5.5 – CDM de comprimidos (topo) de amostras de 2007 e 2012. (b) Histogramas dos CDM para as amostras de 2007 e 2012.

O processo de degradação do captopril em dissulfeto de captopril ocorre naturalmente com o tempo e pode ser acelerado pela luz, presença de oxigênio e umidade (BAZZO; ANTONIO; SILVA, 2005; GARCÍA; DURÁN; DURÁN, 2005). Comparando os CDM e histogramas correspondentes das imagens de topo e fundo (Figura 5.6) do mesmo comprimido com data de fabricação de 2011 (com 1 ano de produzida na data de obtenção da imagem), tomado como exemplo, é possível verificar a diferença nas concentrações do IFA e DC. As imagens do topo apresentam maiores concentrações de DC em relação ao fundo, pois a degradação no topo parece ser acelerada pela exposição à luz.

Este comportamento pode ser verificado apenas em amostras intermediárias, isto é, nem muito novas ou muito antigas (em torno de um ano após produção). Em amostras muito antigas, o processo de degradação praticamente já ocorreu em ambos os lados do comprimido, em que a verificação da presença do IFA é prejudicada em ambas as superfícies.

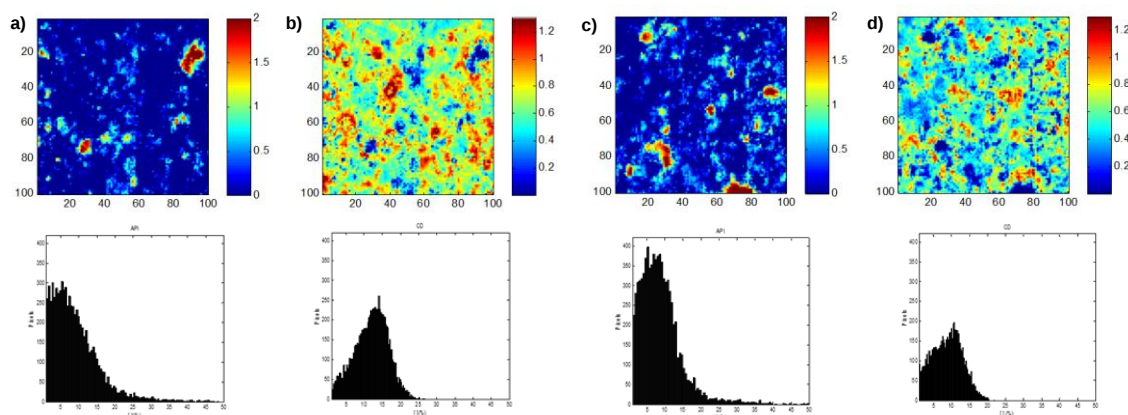


Figura 5.6 –CDM (topo e fundo) e histograma correspondente do mesmo comprimido (com 1 ano de produzido) para IFA e DC: a) IFA topo; b) DC topo; c) IFA fundo e d) DC fundo.

Para melhor avaliar o processo de degradação nas superfícies expostas, a Figura 5.7 apresenta os CDM (IFA e DC) do topo de uma amostra nova (2013, recém fabricada na data de obtenção das imagens) e depois da remoção de camadas com profundidades de 305 μm e 1340 μm . A Figura 5.8 apresenta os CDM (IFA e DC) de um comprimido expirado, com 6 anos de produzido (ano de 2007), do topo e após remoção das camadas com profundidades de 239 μm e 1204 μm .

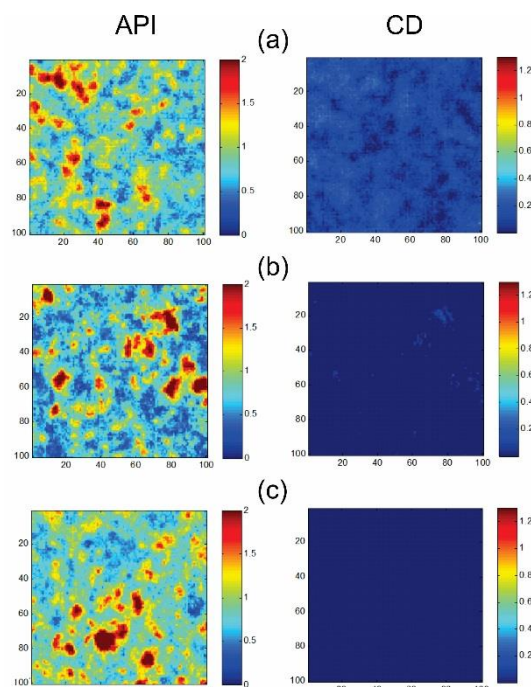


Figura 5.7 – Estudo de profundidade para amostras produzidas em 2013 (com 2 meses de fabricação): (a) mapas de distribuição de IFA e CD para o topo do comprimido, (b) depois de remover uma camada de 305 μm , e (c) após a remoção de uma camada de 1340 μm .

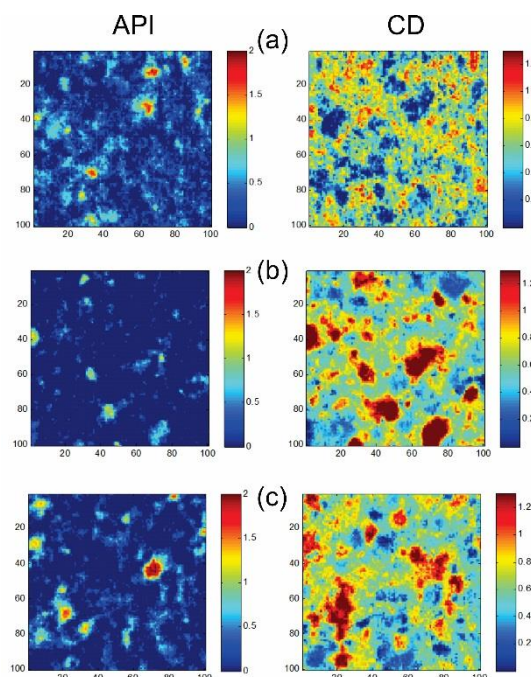


Figura 5.8 – Estudo de profundidade para amostras produzidas em 2007 (com 6 anos de fabricação): (a) mapas de distribuição de IFA e CD para o topo do comprimido, (b) depois de remover uma camada de 239 μm , e (c) após a remoção de uma camada de 1204 μm .

Na amostra recente (Figura 5.7), as concentrações relativas de DC são maiores na superfície do que nas camadas mais internas do comprimido. A superfície (topo) está mais exposta aos fatores que aceleram a degradação do que o núcleo do comprimido, pois mesmo sendo manipulado em ambiente controlado, oxigênio e uma pequena quantidade de umidade são inseridos na bolha do blister durante o processo de emblistamento. Além disso, o PVC transparente de proteção de uma das faces, não protege o comprimido de toda a exposição à luz. Todos os fatores mencionados permitem que o processo de degradação seja mais evidenciado na superfície do comprimido do que nas camadas mais internas.

Contudo, os CDM de diferentes camadas do comprimido expirado (Figura 5.8), demonstram altas concentrações relativas de DC nas camadas mais internas, fator ocasionado pelo processo natural de degradação do captopril durante o tempo. A avaliação das camadas internas permite verificar IFA e DC de uma forma estratificada, o que não pode ser verificado em análises normais de controle de qualidade, uma vez que o comprimido inteiro é pulverizado para análise de quantificação do IFA e seu produto de degradação. Mudanças nos

materiais de embalagem, como um blister completamente aluminizado, poderiam auxiliar na prevenção da aceleração da degradação por minimizar a exposição à luz em sua superfície.

5.4.2 Estruturas Internas de Correlação

A partir dos CDM, uma imagem cúbica de 100x100 *pixels* com 6 compostos foi construída para realizar uma PCA com 5 PC's, após centrar na média. A Figura 5.9 apresenta as imagens dos escores adquiridas para cada PC, e seus valores correspondentes dos pesos, os quais contêm informação importante das variáveis originais (canais) para cada dimensão (ESBENSEN; GELADI; GRAHN, 1992). A figura fornece informação relacionada à estrutura química interna, isto é, o modo como os compostos se comportam dentro da formulação.

A PC1 é associada aos excipientes diluentes majoritários celulose e lactose, sendo que a lactose está correlacionada com o excipiente minoritário, a croscarmelose, e o IFA. Os *pixels* com altos níveis de celulose e baixos de IFA/lactose/croscarmelose possuem altos valores positivos (cor vermelha na SI), e, de maneira oposta, *pixels* com maiores níveis de IFA/lactose/croscarmalose e baixos níveis de celulose, possuem altos valores negativos na PC1 (cor azul na SI). Estes resultados obtidos permitem afirmar que há similaridades entre a SI1 e o CDM da celulose. Seguindo o mesmo raciocínio descrito, a PC3 carrega informação contrastante entre IFA e DC/croscarmelose, e neste caso, o IFA está relacionado aos altos valores positivos, o que leva às similaridades entre SI3 e o CDM do captopril (Figura 5.9). A PC2 separa bem a croscarmelose e lactose. A componente principal 4 possui informações sobre todos os compostos da formulação, já a PC5 está relacionada ao minoritário ácido esteárico.

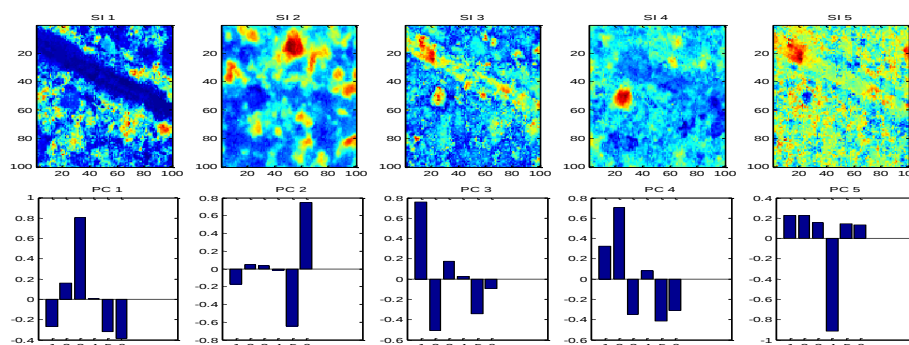


Figura 5.9 – Imagens dos escores e gráfico dos pesos da análise PCA. 1: IFA; 2- CD; 3 – Cel; 4 – SteAc; 5 – Cros; 6 – Lac.

Com o intuito de manter as características extraídas na mesma orientação na coluna, durante o empilhamento das informações para a formação do vetor característica, os pesos e escores foram rotacionados de acordo com uma referência para manutenção da mesma ordem em todas as amostras – importante organização para posterior realização da regressão PLS. As PC's foram verificadas por análise de correlação usando uma amostra de 2007 como referência (Figura 5.10). Baseado nestes resultados, as PC's foram rotacionadas e/ou mudadas de posição para manutenção de um padrão de posicionamento e “spin”, para evitar introdução de diferenças nas análises subsequentes. Para os pesos, o mesmo processo foi realizado para as imagens dos escores.

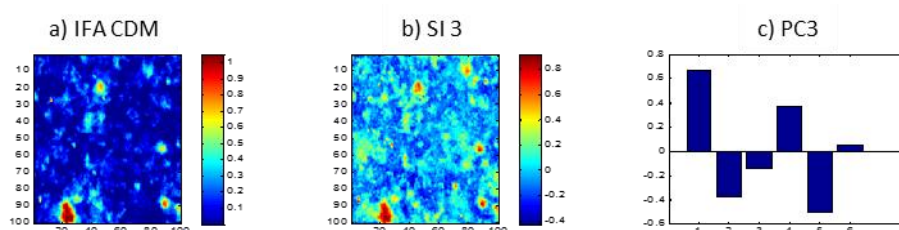


Figura 5.10 – Imagens relacionadas à amostra de 2007: a) IFA CDM; b) imagem dos escores da PC3; c) gráfico dos pesos da PC3 – 1: IFA; and 2- CD; 3 – Cel; 4 – EstAc; 5 – Cros; 6 – Lac.

5.4.3 Construindo os dados de regressão

Os conjuntos de calibração e validação externa são compostos de 21 e 12 imagens, respectivamente, porém 3 foram removidas por se apresentarem como *outliers*. O vetor y contém a informação do período de tempo entre a data manufatura do lote e a data da análise (em dias).

Três modelos foram construídos para cada técnica de extração de características (DWT e SCTD): usando o topo e o fundo das imagens, e, no terceiro, identificado como todos, usando ambas imagens, de topo e fundo. Considerando desempenhos semelhantes no uso do MCR-ALS e MCR-ALS aumentado, somente os resultados obtidos com MCR-ALS individual foram apresentados na Tabela 4.1. A seleção de variáveis utilizando GA não melhorou os modelos, porém seleção de VIP forneceu melhoria nos modelos SCTD e DWT. Em relação aos conjuntos de calibração e validação externa, utilizando o método SCTD com as imagens do topo, resultados mais adequados foram obtidos, com RMSEP de 120 dias, 4 meses aproximadamente.

Tabela 4.1 – Resultados da regressão PLS para previsão das datas de produção dos comprimidos de captopril utilizando IFE-MIA

Método	Imagem do comp.	Conjunto de calibração				Conjunto de previsão		
		VL	R ² X(%)	R ² Y(%)	Q ² Y(%)	a	R ² Y(%) _{pred}	RMSEP (dias)
DWT	Todos	4	35.9	98.1	77.8	0.80*	79.1*	267.9*
	Topo	3	36.2	98.2	73.0	0.68	74.3	344.1
	Fundo	2	28.5	92.6	62.5	0.99*	85.8*	233.1*
SCTD	Todos	3	30.0*	86.4*	68.4*	0.78*	95.1*	244.1*
	Topo	2	41.7	92.0	75.4	0.92*	95.7*	120.0*
	Fundo	3	30.0*	87.3*	49.1*	0.83*	92.6*	265.3*

R² – soma quadrática explicada pelo modelo; Q² – fração total da variação de X's que pode ser predita pela componente (estimada pela validação cruzada); a – coeficiente angular; RMSEP (dias); *resultados melhorados com seleção de VIP.

Modelo linear univariado também foi construído utilizando a razão das concentrações médias relativas de IFA e CD ($[API]_{rel}/[DC]_{rel}$), estimadas utilizando MCR-ALS, contra o período de tempo da data de produção e data de análise (em dias). Com as imagens do topo dos comprimidos uma relação linear foi observada, mas o erro quadrático médio de calibração e previsão foram 678 e 927 dias, respectivamente. Os modelos utilizando os dados das imagens do fundo e global não foram satisfatórios.

Outro modelo PLS, utilizando os espectros médios de cada comprimido, também foi construído. Neste caso, o conjunto de validação apresentou resultados menores que 20% para a qualidade do ajuste (R²). Isto pode ser explicado pela perda de informação quando o espectro médio é obtido da superfície do comprimido, pois a informação relacionada ao IFA e, especialmente, o DC são diluídos quando o espectro médio é estimado. Portanto, estas duas abordagens

(univariada e PLS com espectro médio), embora simples, não fornecem resultados satisfatórios.

Por outro lado, a abordagem SCTD fornece informação satisfatória sobre a taxa natural de degradação e demonstrou-se útil para demonstrar quando uma amostra apresenta um padrão de degradação coerente com a data de produção, como prever a data de validade. Utilizando este modelo, algumas amostras com somente três meses de produzida foram previstas como possuísem mais de um ano de manufaturadas, de acordo com o respectivo padrão de degradação. Análises adicionais revelaram que o lote passou mais tempo estocado em barris, em sala controlada, ao invés de serem diretamente acondicionados nos blísteres, o que permitiu um aceleração no processo de envelhecimento. Estes resultados demonstraram que o modelo está adequado para avaliar comportamentos anormais em amostras que sofrem processo natural de degradação.

Quando o modelo SCTD construído com amostras do topo é utilizado para prever amostras do fundo, os valores preditos para as datas de fabricação são sempre menores que os valores de referência. Como já mencionado, este fenômeno pode ser explicado pela proteção que o alumínio confere à superfície do comprimido, reduzindo o processo de degradação. Como mencionado, outro material de embalagem pode ser desenvolvido para prevenir a degradação da luz, aumentando o tempo de prateleira do produto. É importante notificar que a HSI-NIR é uma técnica não destrutiva e muito rápida, além disto, os valores de referência do conteúdo de captopril e seu produto de degradação não foram necessários para construção dos modelos do presente trabalho. Somente os comprimidos e respectivas datas de fabricação foram necessárias.

5.5 CONCLUSÃO

As estratégias utilizadas no tratamento das imagens permitiram avaliar a degradação em amostras em relação às suas datas de fabricação. Os resultados contêm informações de acordo com a concentração e distribuição dos compostos puros como também as correlações de suas estruturas internas.

A análise dos mapas de distribuição dos comprimidos, fabricados em distintas datas, revela o processo de degradação do captopril. Foi evidenciado o decaimento da concentração do IFA e aumento da concentração do DC ao longo do tempo, em relação às datas de fabricação. Este comportamento é bastante pronunciado nas faces mais expostas aos agentes que aceleram a degradação (como exposição à luz e umidade).

HI-NIR contribuiu com a visualização do processo de degradação nas diferentes camadas dos comprimidos, além das superfícies do topo e fundo dos comprimidos, fornecendo mais informações para o entendimento do comportamento da formulação, não evidenciado quanto somente análises globais são realizadas. As informações são importantes para o desenvolvimento do processo de produção e desenvolvimento (QbD), por permitir observações dentro da formulação, compreendendo relações estruturais internas, bem como avaliar os comportamentos dos ativos e insumos durante o tempo de validade do produto. O melhor modelo PLS desenvolvido (empregando SCTD para extração de características, MSC como pré-processamento e as imagens do topo) apresentaram valores de RMSEP de 4 meses (120 dias).

6 ÍNDICE DE HOMOGENEIDADE

O processo de mistura de pós é um requerimento básico no processo de fabricação de formulações sólidas, para uma distribuição homogênea dos compostos, visando os processos finais de compressão ou encapsulamentos, no caso da indústria farmacêutica. A importância da distribuição uniforme do composto ativo é um requisito básico que deve ser atendido para conformidades em relação aos compêndios oficiais, que solicitam uniformidade de conteúdo como um parâmetro crítico para a verificação do processo de mistura. Variações nas dosagens pode ser um problema muito crítico, principalmente para compostos com ativos presentes em baixa concentração (CHOI, 1982).

A mistura é considerada um fenômeno estocástico na natureza, para um sistema completamente aleatório de compostos com densidade e tamanho de partículas semelhantes (CHOI, 1982). A operação de mistura serve para obter uma distribuição em que cada partícula de um determinado composto fica próxima de outra partícula do outro composto, ou seja, homogeneidade ocorre quando as partículas estão distribuídas igualmente por toda a superfície. Entretanto, a probabilidade de obtenção de uma mistura idealmente ordenada, como exemplificado na Figura 6.1, é praticamente zero em misturadores industriais (POUX et al., 1991).

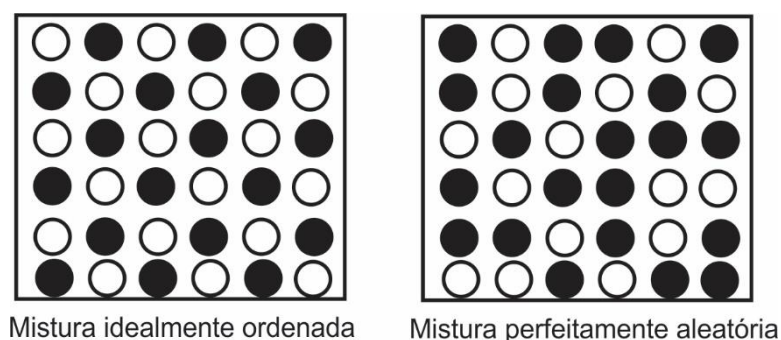


Figura 6.1 – Mistura ordenada e perfeitamente aleatória (adaptado de POUX et al., 1991)

Os termos de mistura aleatória ou ordenada são utilizados para descrever a realidade comercial e considerar as características das partículas. Misturas aleatórias requerem que as partículas possuam pesos e tamanhos semelhantes, como mencionado anteriormente, com pouco ou nenhum efeito de superfície. A

mistura ordenada é considerada diferente por não necessitar de tamanhos ou pesos semelhantes porém requer bastante interações entre as partículas, as quais permitam a adesão (POUX et al., 1991).

Os equipamentos utilizados para as misturas de materiais particulados possuem, principalmente, três mecanismos: (i) convecção, que consiste na transferência de grupos de partículas adjacentes de um local para outro na massa global do sistema; (ii) difusão, em que há distribuição das partículas sobre uma superfície recém formada; e (iii) cisalhamento, onde há quebra de grupos de partículas diferentes chocando-se uns contra os outros na massa, ocorrendo uma interpenetração dos grupos (LACEY, 1954).

A homogeneidade deve se aproximar, o quanto possível, das propriedades almejadas em relação ao processo de mistura, e a análise dos pós para uniformidade de conteúdo é determinada pelo tamanho da amostra. O tamanho de amostragem é conhecido como escala de escrutínio, e deve ser baseado na finalidade do produto misturado. Como exemplo, pode-se citar as formulações de comprimidos ou cápsulas em que o tamanho apropriado da amostra é o mesmo formato da dosagem (GENNARO, 2004).

A segregação de uma mistura é a separação dos compostos do estado de mistura em um modo não aleatório, e poderá ocorrer em casos onde os compostos presentes diferem em relação às características físicas. O processo de homogeneização acontece em competição com a segregação, o que vem a não permitir a mistura perfeita. A segregação pode ocorrer por dois fatores: processo de separação dos compostos por diferenças nos tamanhos das partículas, formato, densidade e/ou resiliência; ou pela aglomeração das partículas, que pode ser induzida pela umidade ou carga eletrostática (POUX et al., 1991). Quando há partículas de tamanhos diferentes, uma distribuição aleatória não pode ser obtida, pela tendência das partículas menores serem empacotadas nos locais vazios proporcionados pelas partículas de tamanhos maiores (LACEY, 1954). Assumindo que as zonas de mistura possuem uniformidade mas que diferentes composições ocorrem no leito dos pós, a escala de segregação torna-se uma função das zonas (descreve o estado de subdivisão dos agrupamentos), e a intensidade de segregação é uma função da diferença

da composição entre as zonas, ou seja, entre diferentes misturas (Figura 6.2) (DANCKWERTS, 1952). A qualidade das misturas está relacionada a estes fatores. Quanto menor a intensidade de segregação, melhor o processo de mistura.



Figura 6.2 – Diminuição das escala e intensidade de segregação (adaptado de DANCKWERTS, 1952)

Uma larga escala de segregação ocorre quando um pequeno tamanho de amostra é selecionado e a variação da composição dentro da amostra é menor do que a variação obtida entre as amostras. Há, portanto, um maior desvio entre as diferentes amostras. Enquanto que em uma pequena escala de segregação, para tamanhos de amostras muito grandes, a variação da composição entre as amostras é menor quando comparada a variação dentro das mesmas. Assim, um maior desvio dentro da amostra é observado (MISSIAEN; THOMAS, 1995).

Análises de rotina da uniformidade de mistura são consideradas sem garantia, considerando as limitações e dificuldades das técnicas de amostragem, devendo haver adequados processos de validação e de boas práticas de fabricação (BPF) vigentes. Isto é baseado na segregação local que ocorre entre misturas farmacêuticas e os resultados errôneos que podem ser gerados utilizando a sonda de amostragem. As sondas de amostragem podem não fornecer amostras consistentes e representativas da mistura, além disto, as amostras podem sofrer segregação nas seguidas manipulações (EL-HAGRASY; DELGADO-LOPEZ; DRENNEN, 2006).

Os comprimidos podem ser visualizados como uma mistura binária do API e os excipientes. Para estudos mais detalhados sobre homogeneidade em superfície,

utilizando-se imagens, deve-se considerar que para definir a mistura final “ideal”, o tamanho das partículas deve possuir tamanho máximo equivalente ao do pixel da amostragem e o API deve ser igual- e aleatoriamente distribuído na superfície (LACEY, 1954).

Um exemplo é a figura 6.3 que simula o processo de mistura do ativo, representado pelos pontos brancos (5,7%), desde o início do processo em que agrupamentos de pó são misturados (figura 6.3.a) até a situação ideal (Figura 6.3.c) (LACEY, 1954). A mesma concentração do API pode ser distribuída de diferentes formas, portanto, algumas abordagens estatísticas são necessárias para estabelecer a relação entre a distribuição e a homogeneidade.

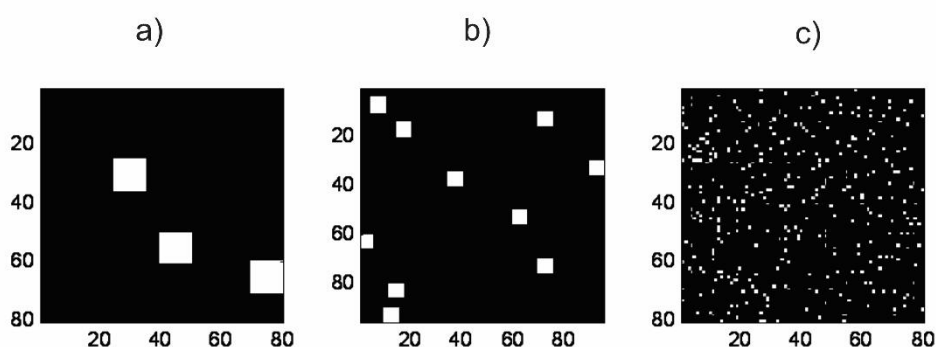


Figure 6.3 – Diferentes etapas e argumentos numa mistura: a) mistura inicial (tamanho de partícula 10 pixel²); b) em processo de mistura (tamanho de partícula 5 pixel²); c) situação ideal de mistura (tamanho de partícula 1 pixel²).

Como já mencionado, para a comercialização de produtos, principalmente medicamentos, a manutenção da homogeneidade durante o processo produtivo até o produto final é importante para garantir a uniformidade do conteúdo e, conseqüente, eficácia terapêutica. Com isto, a busca por métodos práticos e rápidos que verifiquem a homogeneidade dos pós é uma vertente atual de pesquisa, e trabalhos veem sendo desenvolvidos com este objetivo, com ajuda do advento das imagens digitais/químicas.

Alguns trabalhos foram desenvolvidos para acessar a homogeneidade por meio de análises estatísticas. Para verificar a homogeneidade dos pós em fluxo contínuo, foi desenvolvido um método utilizando autocorrelação para definir e

caracterizar a homogeneidade em imagens binárias. Os resultados, entretanto, não foram satisfatórios, sendo necessários mais estudos (MUERZA et al., 2002).

A técnica de *Gray level co-occurrence matrix* (GLCoM) foi utilizada por Matts e colaboradores (2007) para determinar a relação entre a percepção visual das condições da pele e a homogeneidade da distribuição das cores/cromóforos. As condições da pele humana normal são verificadas pela absorção da melanina e dos cromóforos da hemoglobina, além disso a sub-superfície promove o espalhamento da luz por meio do colágeno. GLCoM foi utilizado como operador de verificação da homogeneidade pela textura. A melanina apresentou o melhor modelo para explicar a idade da pele nas imagens RGB, biologicamente e por meio da percepção visual (MATTS et al., 2007).

O algoritmo de Mapas de *land use/cover* (LUC), derivados de dados obtidos por sensores remotos com imagem RGB, foram utilizados para monitoramento espaço-temporal de uma paisagem mista contendo trechos urbanos e trechos florestais. O GLCoM identificou oito texturas no LUC, porém somente a homogeneidade foi utilizada para melhorar a classificação dos componentes da paisagem (PANEQUE-GÁLVEZ et al., 2013).

A mistura de asfalto é um material complexo por ser não homogêneo (presença de três fases e em vários níveis). A análise fractal foi empregada para quantificar a homogeneidade de pavimentos asfálticos, e o método pôde determinar o grau de segregação em imagens 3D de tomografia computadorizada de raio-X de misturas asfálticas (LIU et al., 2014).

Com imagens de ressonância magnética de joelhos, a homogeneidade foi verificada por meio de histogramas e análise de entropia, tendo se mostrado efetiva para detectar alterações bioquímicas nas cartilagens (QAZI et al., 2007). Mistura de pós coloridos foram avaliadas utilizando PCA para verificar a taxa de correlação entre diferentes amostras. Essas taxas em seguida foram comparadas utilizando um índice de similaridade (MUERZA et al., 2002). Os resultados, entretanto, não foram conclusivos com relação à determinação da homogeneidade.

Carneiro e Poppi (2012), baseados na análise dos escores da PCA aplicada aos mapas de distribuição construídos a partir de imagens NIR, avaliaram a homogeneidade da distribuição dos ativos em pomadas. (CARNEIRO; POPPI, 2012b).

A maioria dos métodos mencionados é baseada na comparação entre os resultados para diferentes amostras/condições, posteriormente pela análise para extração de informações. Alguns índices de similaridades foram utilizados para agrupar amostras consideradas homogêneas, mas poucos recorreram a materiais de referência para confirmar a suposição de homogeneidade.

Um trabalho foi desenvolvido com imagens binárias e ternárias, expressando a homogeneidade relativa de imagens. O método de verificação do índice de homogeneidade fornece um critério objetivo independente do conteúdo do componente chave e tamanho de partícula, comparando as imagens reais com as aleatorizadas. Os indicadores verificados para determinação do índice de homogeneidade foram obtidos por análise macropixel, em imagens binárias e, nestas mesmas imagens, redistribuídas aleatoriamente (ROSAS; BLANCO, 2012b). Em estudo subsequente, os mesmos passos foram aplicados a amostras reais. Problemas foram identificados com amostras com histogramas com distribuições não normais e também com a construção de imagens binárias para amostras em baixa concentração. (ROSAS; BLANCO, 2012a). Na última abordagem, foi proposto um critério para estimar o tamanho do macropixel, identificando o tamanho representativo para a amostra. O tamanho da partícula foi identificado como variável importante para verificação do índice de homogeneidade, sendo incluída na fórmula adaptada de Poole (ROSAS et al., 2013).

Métodos mais diretos foram desenvolvidos com o objetivo de acessar diretamente a homogeneidade como o estabelecimento de um índice de homogeneidade distributiva (*"distributional homogeneity index"*, DHI), que relaciona a área sob a curva de homogeneidade bruta com a randomizada (SACRÉ et al., 2014b). Porém os métodos não foram conclusivos em relação à verificação de variáveis críticas para determinação do índice de homogeneidade.

E a análise de *macropixels* apresentou-se como um método promissor para acessar a homogeneidade de uma imagem.

6.1 TEORIA: ANÁLISE MACROPIXEL

Análise de *Macropixel* (*macropixel analysis*, MA) foi um método introduzido como medida de heterogeneidade da imagem hiperespectral na região NIR. A análise é baseada em *macropixels*, que são definidos como aglomerados quadrados de um *pixel*, com valores de intensidade igual ao valor médio dos *pixels* incluídos no agrupamento. Por exemplo, caso o agrupamento possua 4 *pixels*, o valor será a média dos valores individuais destes *pixels* utilizados para análise (HAMAD et al., 2007).

Dois métodos foram desenvolvidos para análise de *macropixels*: DLT (Figura 6.4), que utiliza ladrilhos não sobreponíveis; e o método CLMB que utiliza todos os *macropixels* possíveis na imagem. Ambos os métodos minimizam a variância entre as intensidades dos *macropixels*, variando seus tamanhos, e o tamanho de um ponto (1 *pixel* quadrado, p^2) é selecionado como o tamanho mínimo do *macropixel* em que suas intensidades se enquadram numa faixa de critério aceitável (HAMAD et al., 2007).

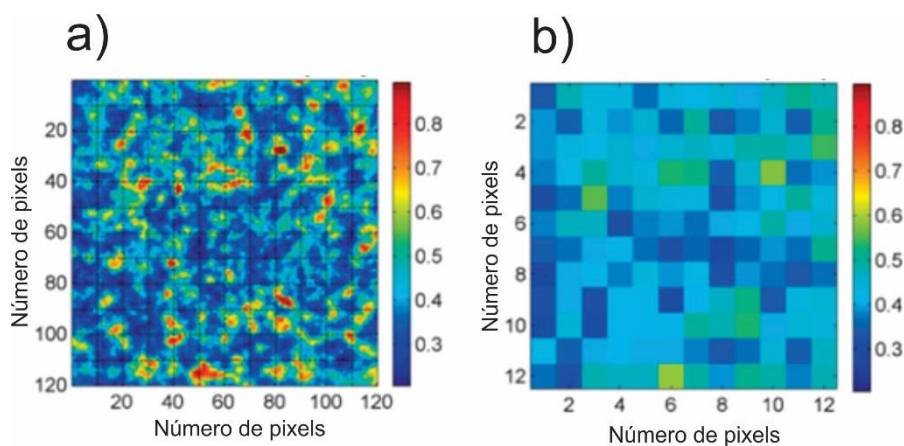


Figura 6.4 – Representação gráfica da média de cada *macropixel*: a) o comprimido de acetaminofeno é dividido em arranjo de tamanho 12x12 *macropixels*; b) o valor médio de cada *macropixel* (adaptado de HAMAD et al., 2007).

O método CLMB avalia sistematicamente todas as possíveis subamostras (*macropixels*) da imagem, e o valor médio das intensidades de cada *macropixel* é comparado com o valor médio global (intensidade média de toda a imagem).

O algoritmo é iniciado calculando todos os valores possíveis de desvio, s_w , para um determinado tamanho de *macropixel*. Subsequentemente, calcula-se todos os valores de desvio padrão para *macropixels* com tamanhos maiores, e continua até o momento final quando o tamanho do *macropixel* corresponde ao tamanho da imagem (HAMAD et al., 2007).

Uma imagem X , de dimensões $(I \times J)$, pode ser dividida em subamostras $X_{I',J'}$, de dimensões $(I' \times J')$, em que $I' = J'$ a todo tempo (para simplificação, somente subamostras quadradas foram consideradas). Assim sendo, o número total de subamostras (ou *macropixel* ou sub-janela) $X_{I',J'}$ para cada tamanho é calculado por Equação 6.1.

$$T_{X_{I',J'}} = [I - (I' - 1)] * [J - (J' - 1)] \quad (\text{Equação 6.1})$$

Enquanto a imagem for dividida, é possível calcular o valor médio de cada subamostra:

$$M_{X_{I',J'}} = \frac{\sum_{i'=1}^{I'} \sum_{j'=1}^{J'} X_{I',J'}}{I' \times J'} \quad (\text{Equação 6.2})$$

Por conseguinte, o valor médio combinado para todas as sub-amostras de tamanho específico é:

$$\bar{M}_{X_{I',J'}} = \frac{\sum_{i'=1}^{I'} \sum_{j'=1}^{J'} M_{X_{I',J'}}}{T_{X_{I',J'}}} \quad (\text{Equação 6.3})$$

Assim, o desvio padrão combinado para cada tamanho de sub-amostra é demonstrado na Equação 6.4.

$$S_{w_{I',J'}} = \sqrt{\frac{\sum_{i'=1}^{I'} \sum_{j'=1}^{J'} (M_{X_{I',J'}} - \bar{M}_{X_{I',J'}})^2}{T_{I',J'} - 1}} \quad (\text{Equação 6.4})$$

A Figura 6.5 detalha os passos da CLMB: em (a) o valor médio para a primeira janela de tamanho 9 p^2 localizado no canto esquerdo da imagem (quadrado cinza) é calculado; (b) a janela é deslocada uma linha de *pixel* para baixo, ainda na esquerda da imagem, e o valor médio é também calculado para a segunda sub-amostra; (c) a janela continua movendo-se para baixo e os valores médios são consecutivamente calculados, para as subseqüentes sub-amostras de mesmo tamanho, até o momento em que é atingido o limite inferior da imagem; (d) a janela é então deslocada uma linha de *pixel* para a direita, na parte superior da imagem, e todo o processo é repetido; (e) a janela continua deslocando-se para baixo e para a direita até completar a varredura da imagem, estimando-se os valores médios para todas as sub-amostras possíveis, considerando a janela de 9 p^2 . Por fim, o valor do desvio padrão global (S_w) (Equação 6.4) é calculado e registrado na curva de homogeneidade. Todo o procedimento é repetido para diferentes tamanhos de sub-amostras.

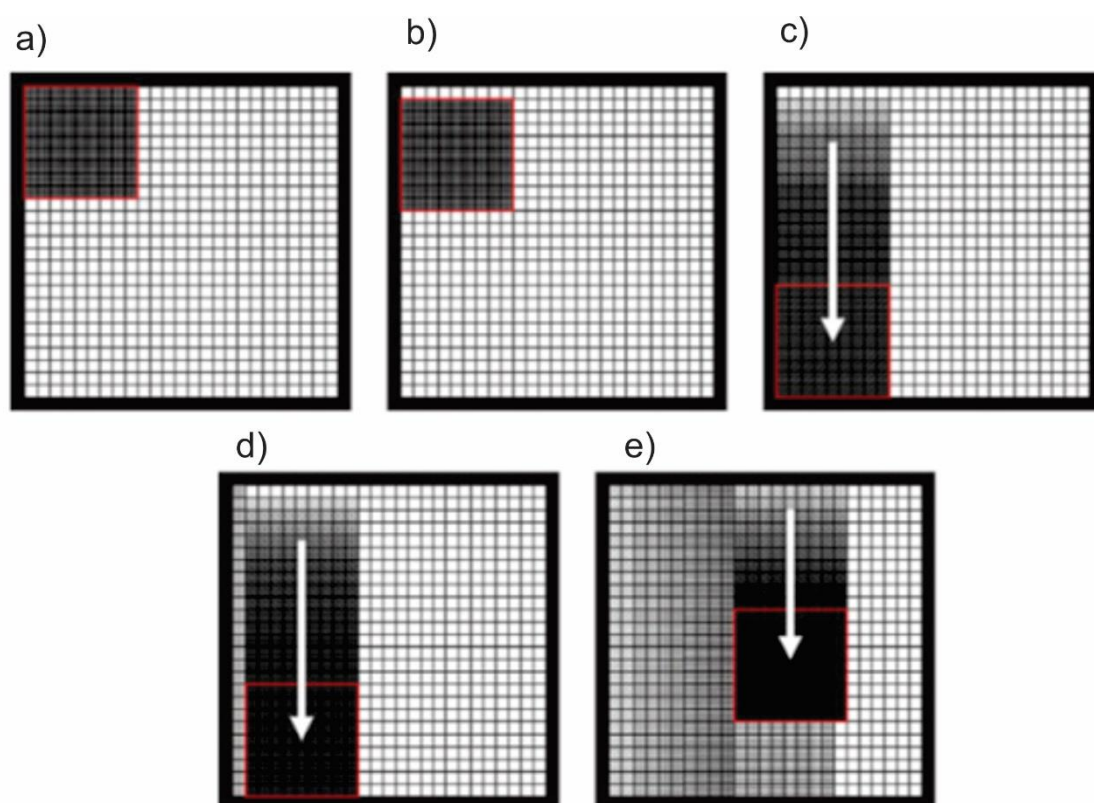


Figura 6.5 – Esquema demonstrando o passo-a-passo da análise CLMB (adaptado de HAMAD et al., 2007).

Para melhor entendimento do método, a Figura 6.6 apresenta dois exemplos de fácil elucidação, tendo uma imagem de $10 \times 10 \text{ pixels}$ ($I \times J$). No exemplo em

vermelho (Figura 6.6a), a imagem é dividida em sub-amostras de 2×2 ($I' \times J'$), e o número possível total de sub-amostras que podem ser formados, $T_{2,2}$, é 81. O mesmo pode ser calculado para a sub-amostra em verde (Figura 6.6b) de tamanho de sub-janela 3×3 ($I' \times J'$), contando 64 amostras ($T_{3,3}$).

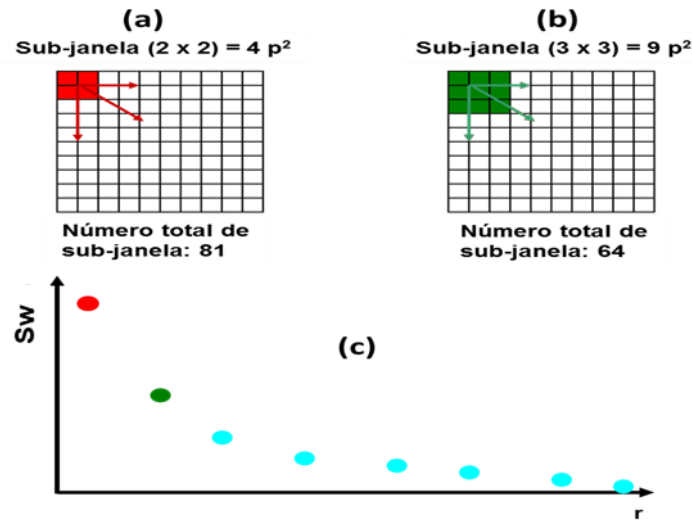


Figura 6.6 – Demonstração do cálculo de obtenção do número total de sub-janelas, com tamanhos de 2×2 (a) e 3×3 (b) pixels, em imagem 10×10 pixels. E os valores correspondentes de $\bar{S}_w \times r$ (c).

O valor de $\mathbf{Sw}_{I',J'}$ é calculado para todos possíveis tamanhos de *macropixels* (sub-amostras) e projetada em seguida contra o valor de r , definido como:

$$r = I' / (\max[IJ]) \quad (\text{Equação 6.5})$$

em que $\max[IJ]$ denota a dimensão máxima da imagem $\mathbf{X}$. Como veremos a seguir, o tamanho da imagem apresenta uma função relevante. Assim sendo, é importante que os valores obtidos entre imagens de diferentes tamanhos sejam igualmente comparáveis. O parâmetro r permite essa comparação, desde que $\mathbf{Sw}_{I',J'}$ seja apresentado em gráfico contra o tamanho relativo do *macropixel* em relação ao tamanho da imagem. Neste caso, na Figura 6.6a, quando o *macropixel* possui tamanho 2, o valor de r será 0,2; porém, quando o *macropixel* possuir tamanho igual a 10, o valor de r será 1, desde que $\mathbf{X}$ seja uma imagem quadrada.

6.2 OBJETIVOS

6.1.1 Objetivo Geral

- Desenvolver um índice de homogeneidade (%H) empregando imagens.

6.1.2 Objetivos Específicos

- Observar o comportamento da curva de homogeneidade para distribuições aleatórias variando-se o tamanho de amostras (para único *pixel* e agrupamentos) e concentrações;
- Verificar o comportamento da curva de homogeneidade para distribuições não homogêneas em diferentes concentrações;
- Desenvolver modelos matemáticos que avaliem as curvas de segregação;
- Propor um índice de homogeneidade e aplicar em amostras reais.

6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

6.3.1 Simulação

A primeira parte da avaliação da homogeneidade foi realizada por meio de imagens binárias simuladas, com os *pixels* informativos da amostra (partículas simulando o princípio ativo) possuindo o valor de 1 p^2 . No primeiro estudo, imagens com tamanho de 100x100 *pixel* foram simuladas nas concentrações de 1 a 95%. Para cada concentração foram simuladas 1000 imagens aleatórias, e para cada imagem o cálculo da curva de homogeneidade foi realizado por meio do algoritmo CLMB. Porém, para avaliação do modelo geral, somente foi plotada a curva média de cada concentração. Com os resultados obtidos, um modelo matemático geral foi proposto para observar o comportamento de três parâmetros: dois contrastes e uma constante.

Em um segundo estudo foi avaliado a não homogeneidade, a qual foi observada por meio de um único agrupamento, caracterizado por um quadrado. O grumo constitui-se de uma única partícula aglomerada com tamanhos maiores que 1 p^2 , devido a diferentes concentrações (de 1 a 95%). Quanto maior a concentração, maior o tamanho do grumo. Foi simulada uma única imagem para cada concentração. Na terceira avaliação, considerando as concentrações de 1 a 50%, foram verificados diferentes tamanhos de agrupamentos. Agrupamentos são constituídos de partículas de amostra com tamanhos de 2, 3, 4, 5, 7 e 10 p^2 . Foram simuladas 1000 imagens para cada concentração. Após a simulação das imagens, nos estudos da não homogeneidade e aglomerados, a curva de homogeneidade também foi gerada por meio do método CLMB. Os parâmetros do modelo matemático geral, pré-estabelecido, foram utilizados para avaliar as curvas resultantes das imagens simuladas para os estudos de não-homogeneidade e agrupamentos.

6.3.2 Amostras reais

6.3.2.1 Análise de mistura de pós

Para simular uma amostra real, misturas de amido como diluente e sacarose como ativo, presente nas concentrações 1, 5, 10, 25 e 50% (m/m) foram

manipuladas no laboratório de pesquisa do Departamento de Ciência de Alimentos na Faculdade de Ciências da Universidade de Copenhague. A massa total foi de aproximadamente 2.0 g em todos os casos. Para cada concentração foram realizadas 6 etapas de mistura manual (cinco etapas brandas e a sexta, última, mais intensa) em recipiente adequado. É importante ressaltar que o processo utilizado de mistura manual não tem a pretensão de simular um processo real industrial. Essas amostras foram utilizadas apenas para avaliar a possibilidade de se estimar um índice de homogeneidade em amostras reais. Após cada etapa foi adquirida uma HI-NIR com tamanho de pixel de 50 μm . Com a HI-NIR da amostra contendo sacarose 25% (m/m), referente à 5ª etapa de mistura, realizou-se a análise MCR-ALS pelo “toolbox” HYPERTOOL, que utiliza o SIMPLISMA como algoritmo padrão para determinação das estimativas iniciais do método MCR-ALS. A partir dos resultados obtidos com a otimização do algoritmo, os espectros puros resultantes foram identificados e extraídos. Com os espectros puros, o método CLS foi empregado para aquisição dos mapas de distribuição de concentração (CDM) das imagens restantes. O CDM referente à sacarose foi isolado para análises de homogeneidade.

Os CDMs da sacarose foram avaliados visualmente e, em seguida, foram realizados os cálculos para verificação da porcentagem de homogeneidade (%H). Os cálculos foram realizados nas imagens binarizadas, que foram construídas estabelecendo um limiar para a presença do ativo, em cada imagem. Valores iguais a 1 foram atribuídos para a presença da sacarose e 0 para ausência. Cálculos também foram realizados com as escalas dos CDM sem manipulação (em concentração relativa de sacarose). Os resultados obtidos foram então comparados.

6.3.3 Softwares

As rotinas em ambiente Matlab para simulações e cálculos envolvendo o método CLMB foram desenvolvidas pelo Prof. J., Manuel Amigo, da Universidade de Copenhague. Para os cálculos quimiométricos (MCR-ALS e CLS) foi utilizado o HYPERTOOL “toolbox” (www.models.klv.dk/HYPERTools).

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.4.1 Compreendendo a Curva

Como mencionado, a curva de homogeneidade é o resultado da aplicação da análise CLMB, em que são obtidos valores globais de desvio padrão (**Sw**) para cada tamanho de *macropixel* analisado na imagem. Para entender a complexidade da CH, um exemplo é apresentado na Figura 6.7, em que três imagens demonstram a mesma concentração, em branco (3% dos *pixels*), porém possuindo elementos de diferentes tamanhos e distribuídos aleatoriamente. Representando um caso em que 3% de um composto, por exemplo, sendo misturado (caso 1). Este elemento, assumindo que o tamanho mínimo de partícula é 1 p^2 , será melhor distribuído quando o processo de mistura ocorrer até a “idealidade” da distribuição. Verificando a CH nos diferentes estágios do processo de mistura (A, B e C) pode-se observar que a curva muda drasticamente. Logicamente, os valores de **Sw** quando r possui valor mínimo é o mesmo para as três imagens, desde que as concentrações dos elementos permaneçam constante. Mesmo assim, o perfil da CH varia com maiores valores de r no sentido de 1.

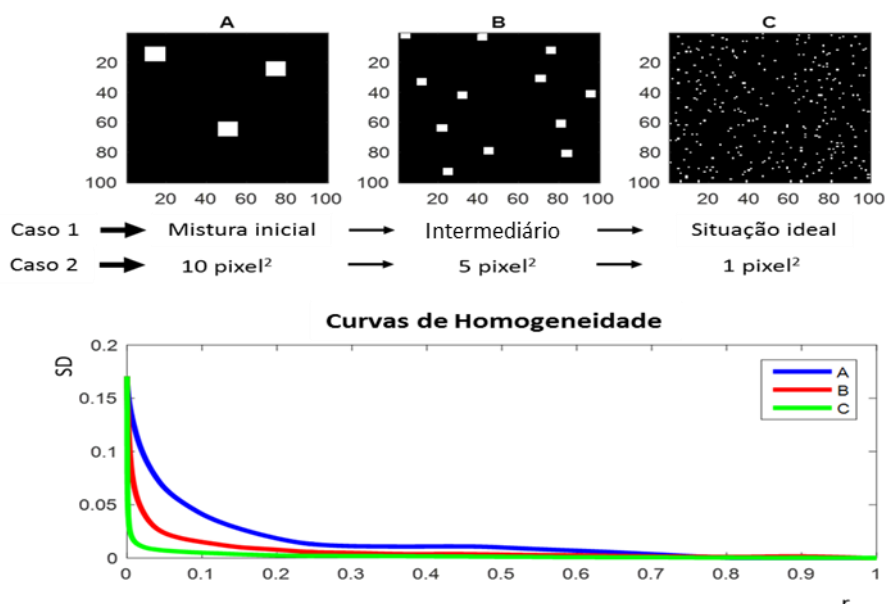


Figura 6.7 – Simulação de um caso em que as concentrações dos *pixels* brancos são as mesmas nos três casos (A, B e C), porém com diferentes distribuições. E, respectivas, curvas de homogeneidade.

A mudança nas CH é usualmente atribuída à mudança de homogeneidade, porém pode ser associada aos diferentes tamanhos dos objetos dos elementos em cada imagem, enquanto as concentrações permanecem constantes. Portanto, para um estudo compreensivo da curva de homogeneidade e seu comportamento, três fatores devem ser considerados:

- 1) A concentração global dos objetos;
- 2) A razão dos tamanhos de partícula/imagem;
- 3) A distribuição dos elementos.

6.4.2 Distribuição homogênea, mas não aleatória.

A forma mais direta de iniciar a análise de homogeneidade, é estudar o comportamento da curva de homogeneidade em uma distribuição dos elementos “perfeita” e não estocástica, tendo como exemplo a distribuição numa tábua de xadrez, em que a concentração dos elementos é de 50% (Figura 6.8)

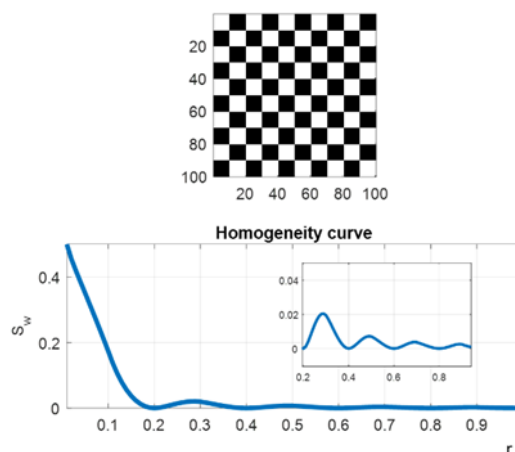


Figura 6.8 – Figura da distribuição homogênea mas não aleatória (tábua de xadrez) e respectiva curva de homogeneidade.

A curva de homogeneidade apresentada possui diferentes pontos característicos, que fornecem informações valiosas. A curva possui valor decrescente até alcançar o primeiro valor mínimo, ponto ao qual pertence a tamanho de janela com valor de r igual a 0,2. Este valor de janela cobre 2 blocos pretos e 2 blocos brancos, tendo desvio padrão agrupado igual a zero (verificar

esquações 6.3 e 6.4). Portanto, este ponto indica o tamanho mínimo da sub-janela em que a imagem pode ser dividida, assegurando a razão perfeita entre os elementos preto e branco em todas as sub-janelas.

Entretanto, há outro ponto em que a curva atinge o valor local máximo, o de sub-janela com r de 0,3. Este ponto indica que há um desbalanço no desvio padrão. Este padrão de zeros e máximos locais é repetido em diferentes escalas de escrutínio, mostrando que não é estritamente necessário que a curva de homogeneidade decaia monotonamente quando o valor das sub-janelas aumenta. Por outro lado, a curva depende da geometria da distribuição.

6.4.3 Distribuição aleatória (variando a concentração)

Para avaliação da curva de homogeneidade com distribuições aleatórias, diferentes concentrações foram testadas para observar o comportamento da curva, como também do ajuste do modelo. Para isto foram consideradas 3 hipóteses: (i) uso de imagens simuladas com distribuição mais homogênea; (ii) um composto com diferentes concentrações e (iii) o tamanho da partícula do composto seria de um único *pixel* (1 p^2).

Imagens binárias foram simuladas, 1000 vezes para cada uma das 20 concentrações (de 1 a 95%), (Figura 6.9) e a curva de homogeneidade foi calculada para cada uma delas com tamanhos de *macropixels* de 1 a 90 *pixels*². Conforme mencionado, o tamanho de partícula de 1 *pixels*² foi utilizado para evitar interferências, como agrupamentos ou sobreposições, nestes testes iniciais.

Para avaliar as 20 concentrações (Figura 6.10), foram usadas somente as curvas médias de homogeneidade, para as 1000 simulações, obtendo os valores de $\bar{S}_w$ para cada concentração. Nota-se o mesmo padrão de comportamento das curvas mesmo em concentrações diferentes, o que evidencia que a distribuição aleatória é importante para o estabelecimento de uma superfície homogênea. Os valores de $\bar{S}_w$ iniciais possuem valores superiores a 0.2, e são reduzidos a valores próximos a zero, mediante o aumento do tamanho da janela, pois os maiores tamanhos aproximam-se ao tamanho original da imagem, além de

reduzir o número de sub-amostras, ocasionando o desaparecimento de diferenças quando $r = 1$, que representa uma única sub-amostra.

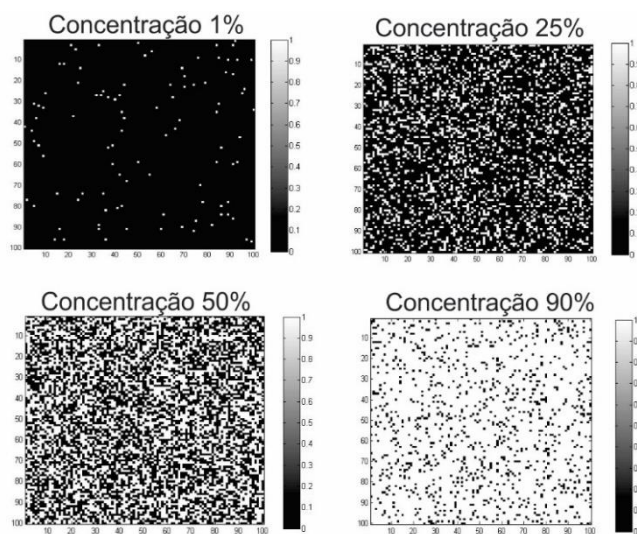


Figura 6.9 – Exemplos de imagens aleatórias para diferentes concentrações (a) 1%, (b) 25%, (c) 50% e (d) 90%.

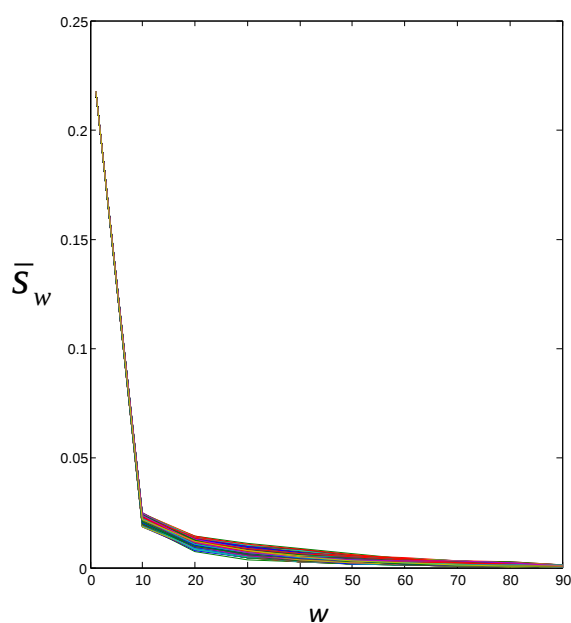


Figura 6.10 – Curvas de homogeneidade para as 20 concentrações de amostras simuladas homogêneas

Lacey avaliou as teorias da mistura de partículas verificadas nas teorias de Brothman, que consiste, principalmente, na interação por meio de uma área de interface de dois materiais. Esta área aumenta com o tempo, durante o processo de mistura, até atingir um valor limite alcançando, relativo a um material

completamente misturado (LACEY, 1954). A Figura 6.10 apresenta o perfil da curva de homogeneidade, em que são diferenciadas principalmente pelos valores de desvio padrão relativos às menores escalas de escrutínio. Quando a razão de 0,2 é atingida, o valor de $\bar{S}_w$ reduz quase ao mesmo alcance, que pode ser relacionado à obtenção da área de interface correspondente ao alcance da distribuição aleatória. Sendo assim, portanto, plausível propor um modelo (Equação 6.6) para melhor compreensão da obtenção das curvas de homogeneidade em distribuições estocásticas:

$$\lim_{w \rightarrow \infty} = \frac{P_1 \cdot s_w + P_2}{s_w + q_1} \quad (\text{Equação 6.6})$$

em que P_1 e P_2 são os dois parâmetros principais, s_w o valor do desvio padrão relacionado a um tamanho de *macropixel* e q_1 uma constante.

Na Figura 6.11 a linha azul representa o modelo médio para todas as concentrações, e os pontos vermelhos o ajuste do modelo desenvolvido. A equação 6.6 proposta, demonstrou-se adequada para o estabelecimento de um modelo, considerando os resultados obtidos, para prever a curva de homogeneidade ideal. A curva média obtida foi bem ajustada ao modelo proposto, demonstrando que as variações foram mínimas, considerando todas as concentrações utilizadas na avaliação das imagens aleatórias simuladas.

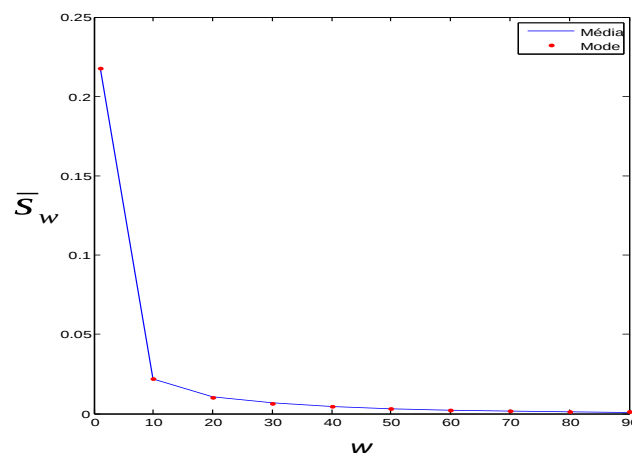


Figura 6.11 – Curva média de homogeneidade (—) e estimativa do modelo (•) para amostras homogêneas

Avaliando-se o comportamento dos parâmetros da equação 6.6 (Figura 6.12), observa-se que os principais parâmetros, P_1 e P_2 , possuem formato parabólico, considerando uma equação de segundo grau. P_1 possui coeficiente negativo ($a < 0$) e, de maneira oposta, P_2 possui valor positivo ($a > 0$), enquanto que q_1 é uma constante. Os valores do desvio padrão utilizados pelos modelos possuem baixa amplitude (no eixo y) de variação: P_1 varia numa faixa de -1.7×10^{-3} a -4.0×10^{-3} , P_2 de 0.25 a 0.55 e q_1 dentro da faixa de 0.086 a 0.102, aproximadamente.

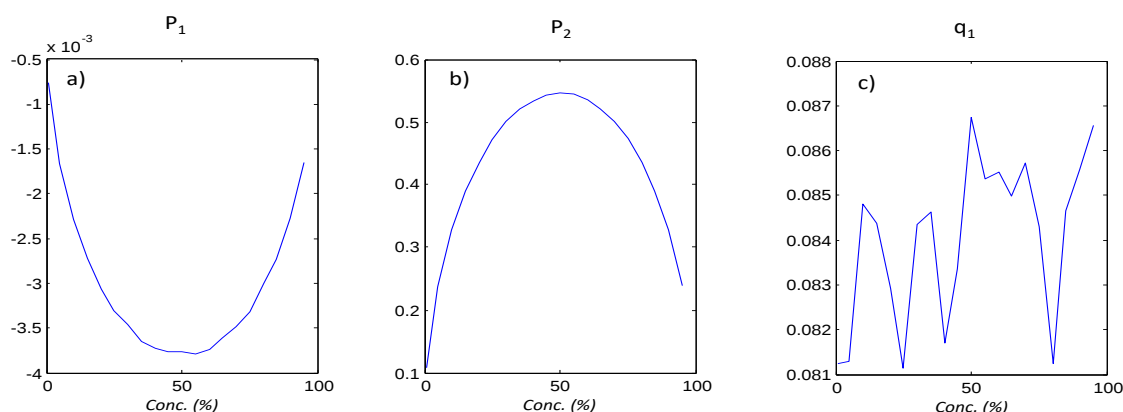


Figura 6.12 – Parâmetros ajustado do modelo desenvolvido com a Equação 6.5, para amostras homogêneas.

6.4.4 Avaliando a distribuição não-homogênea (variando a concentração)

Para avaliação de imagens não homogêneas, foram utilizadas as mesmas 20 concentrações e tamanhos de *macropixels* para análise CLMB. Imagens binárias foram simuladas com diferentes concentrações, e para cada uma a partícula foi considerada um único agrupamento, sendo as imagens compostas por somente uma única partícula com uma superfície quadrada. A Figura 6.13 mostra imagens simuladas não-homogêneas com concentração de 5 e 95%. Um grande grumo era selecionado com crescimento (em função da concentração) sempre na diagonal. Se fosse adotado o crescimento do grumo (devido a elevação da concentração) através do acréscimo de linhas (ou colunas), poderia alcançar homogeneidade em torno dos 50% de concentração (Figura 6.14), em que metade da imagem possuiria a partícula agrupada.

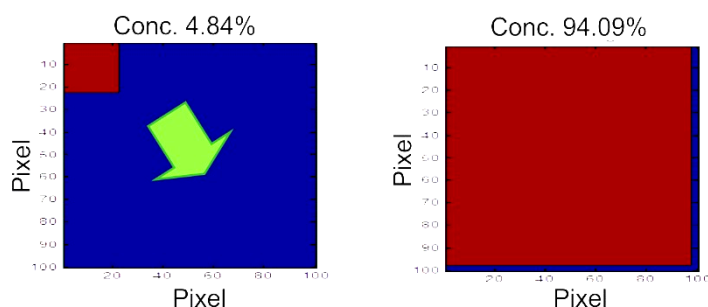


Figura 6.13 – Imagens simuladas para avaliação da não homogeneidade nas concentrações de 5 e 95%, no caso do grumo crescendo na diagonal.

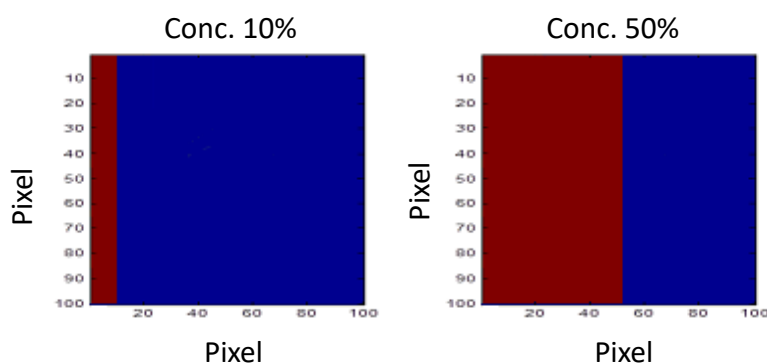


Figura 6.14 – Imagens representativas para avaliação da não homogeneidade nas concentrações de 10 e 50%, em caso de linha crescente.

Observando a Figura 6.15a, verifica-se um grande desvio nas curvas de homogeneidade, considerando resultados de $\bar{S}_w$ para diferentes janelas, principalmente as menores, nas diferentes concentrações. Fica evidenciando uma quebra no padrão da curva de homogeneidade ideal, o qual foi encontrado no teste com as imagens com distribuições aleatórias, mostrados no item 6.4.3. Nas concentrações mais baixas há um maior desvio da idealidade das curvas de homogeneidade, devido aos altos valores de $\bar{S}_w$ no intervalo de tamanho de janelas utilizados. Porém em altas concentrações a curva ajusta-se melhor ao padrão ideal das curvas de homogeneidade, pelo fato da imagem ser constituída de praticamente uma única partícula, o que permitiu uma redução nos valores de $\bar{S}_w$.

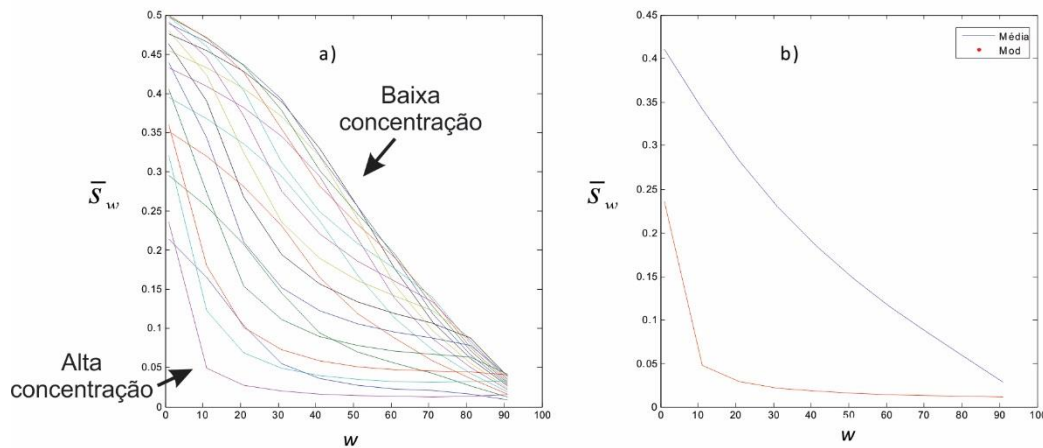


Figura 6.15 – (a) curvas de homogeneidade para as diferentes concentrações de amostras simuladas não homogêneas e (b) curva de homogeneidade média e o modelo proposto.

A análise de não homogeneidade apresentou uma grande diferença entre a curva média de homogeneidade, considerando todas as concentrações, e o modelo ideal previsto (Figura 6.15b).

Os valores dos parâmetros (Figura 6.16) apresentaram uma grandeza escalar grande, quando comparado aos valores obtidos na avaliação de amostras com imagens aleatórias (Figura 6.12). Além disto, o parâmetro q_1 passou a ter formato parabólico ao invés de constante. O modelo construído para amostras não homogêneas tem formato semelhante a curva de homogeneidade “ideal”, mesmo diante de resultados com grandes flutuações individuais (concentrações diferentes). Os coeficientes servem para indicar a confiabilidade, pois mesmo que o ajuste seja adequado, as grandezas dos parâmetros devem ser pequenas, com valores próximos a zero. Este comportamento não é observado no modelo para amostras não homogêneas.

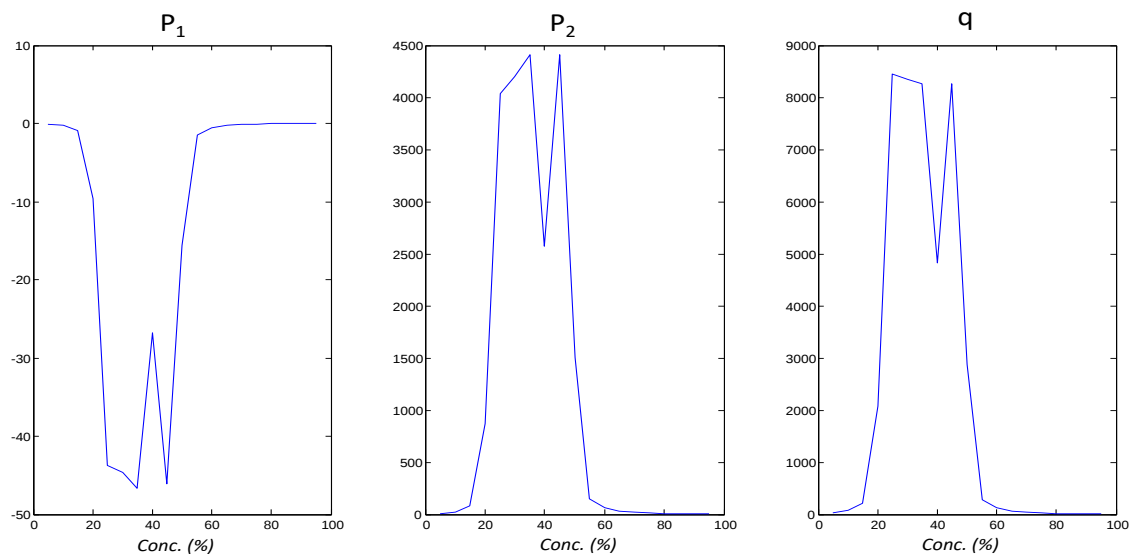


Figura 6.16 – Parâmetros ajustados do modelo desenvolvido com a Equação 6.6, para amostras não-homogêneas.

6.4.5 Avaliando distribuições aleatórias (variando tamanho dos agrupamentos e concentrações)

Com o intuito de verificar mais um parâmetro crítico, diferentes tamanhos de partículas (agrupamentos) e concentrações foram avaliados em imagens aleatórias (Figura 6.17). Sobreposições entre as amostras não foram evitadas, na tentativa de simular amostras reais. Os agrupamentos possuíam tamanhos de 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 10 $pixels^2$ para as 11 concentrações, de 1 a 50%. 1000 imagens foram simuladas para cada concentração. Para cálculo do desvio padrão, foram utilizados os mesmos tamanhos de janelas, de 1 a 90 $pixels^2$.

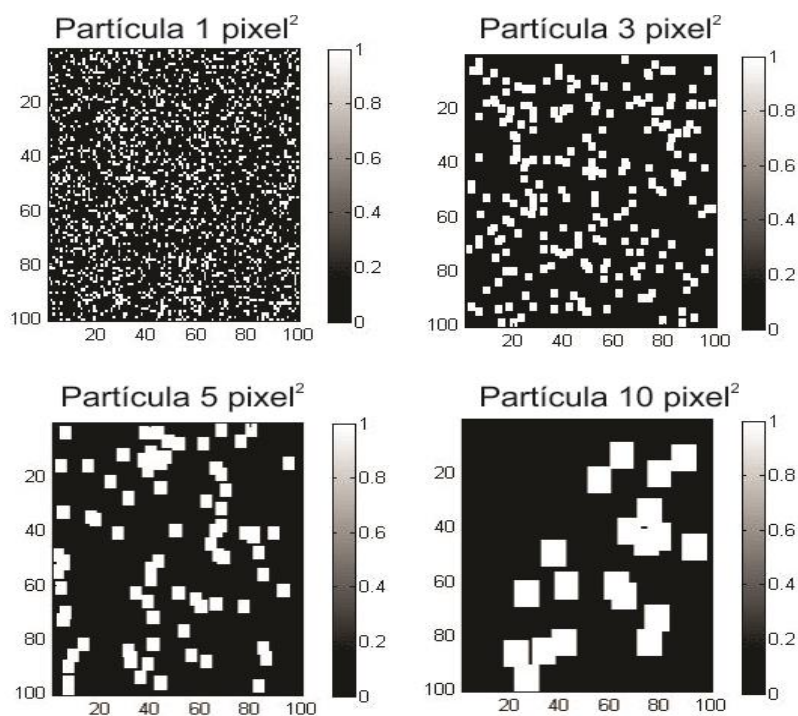


Figura 6.17 – Imagens para a concentração de 20 com diferentes tamanhos de partícula.

A Figura 6.18 mostra os resultados das curvas de homogeneidade para os diferentes tamanhos de agrupamentos. Considerando os resultados obtidos, o aumento do agrupamento propicia maiores valores de $\bar{S}_w$, ocasionando maiores desvio da idealidade nas curvas de homogeneidade. Isto se deve ao fato de que maiores agrupamentos ocasionam maior quantidade de sobreposições. Como a imagem é binária, nuances (variações nos valores de intensidade) nas concentrações não puderam ser avaliadas, pois as sobreposições ocasionariam uma soma nas concentrações da partícula. A variação do tamanho do agrupamento promove dificuldades para determinar as partículas, pois as bordas tornam-se difusas (DANCKWERTS, 1952). Não se sabe, portanto, se um determinado *pixel* tem informação de uma ou mais partículas. Contudo os valores da regressão das concentrações reais das imagens usadas nas simulações e concentrações finais, obtidas com o valor médio da imagem (considerando sobreposições), foram adequadas (Figura 6.19), atingindo valores maiores que 0.99.

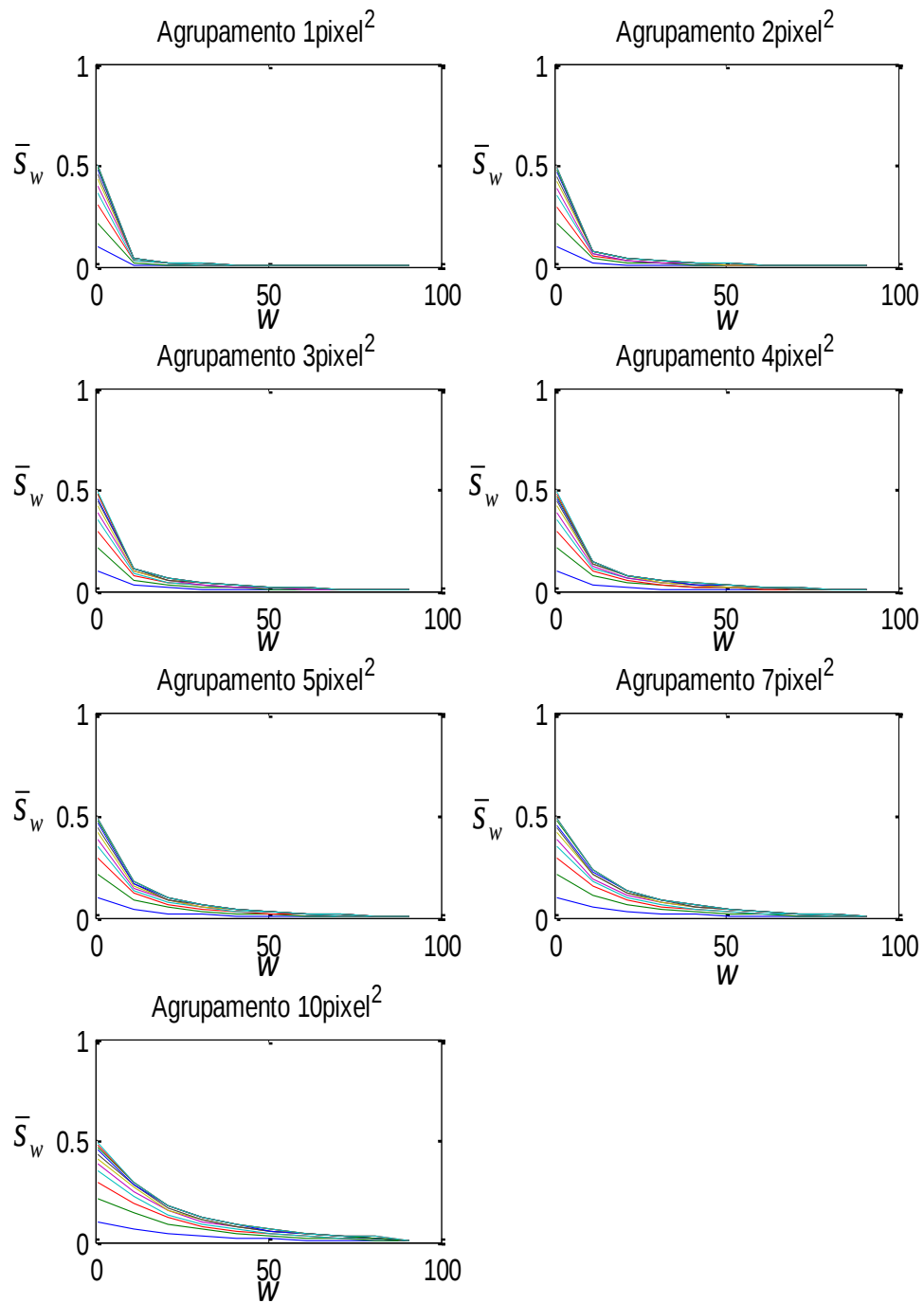


Figura 6.18 – Curvas de homogeneidade para diferentes tamanhos de agrupamentos.

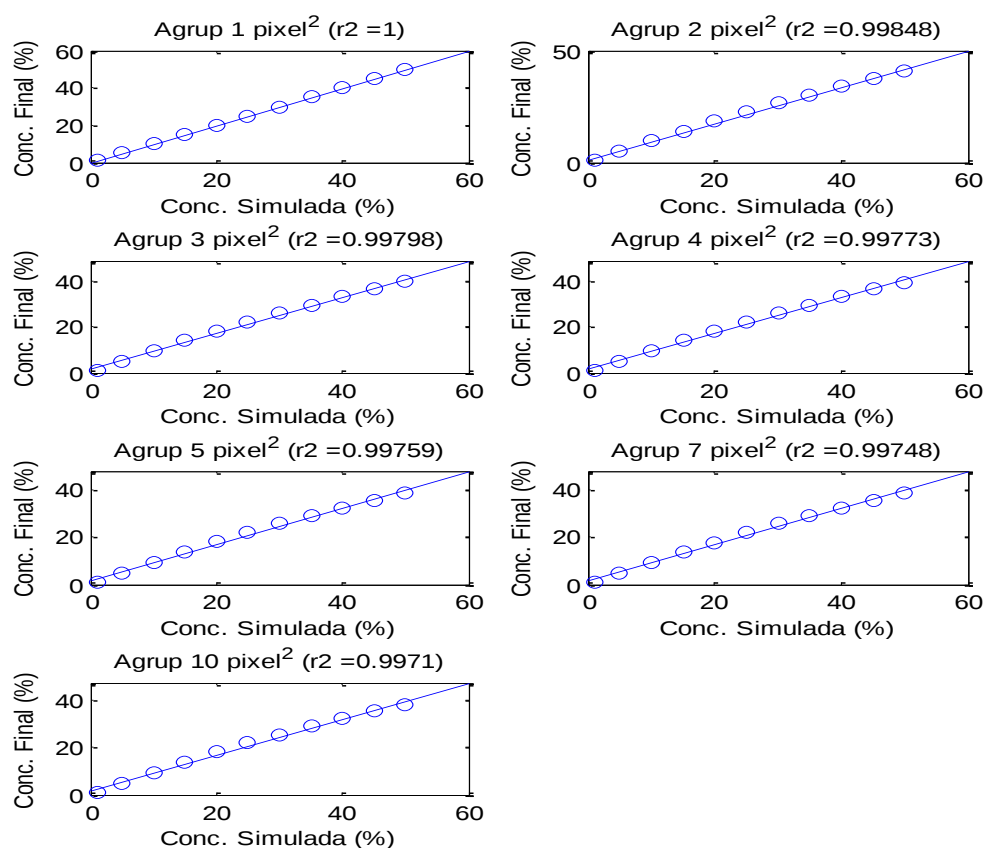


Figura 6.19 – Curvas de regressão entre concentração real usada na simulação versus concentração final para os diferentes tamanhos de agrupamentos.

O modelo construído para amostras aleatórias, mas com diferentes tamanhos de partículas, tem formato semelhante a curva de homogeneidade “ideal”, para os menores tamanhos de agrupamento. Podem se considerar o uso de partículas com tamanhos de 1 *pixels*², de acordo com as grandezas dos valores obtidos para os parâmetros. Assim, para o tamanho de 1 *pixel*², os valores dos parâmetros P_1 , P_2 e q_1 são próximos a zero (Figura 6.20). O aumento do tamanho dos agrupamentos causa distanciamento dos valores ao zero. Além disso, há variações no formato da curva do parâmetro q_1 , que deixa de ser constante em agrupamentos maiores que 2 *pixel*² (para 1 *pixel*², varia na faixa de 0.01, elevando para 0.2 quando o tamanho é de 2 *pixel*²). Para melhor visualização de valores muito próximos a zero, detalhes são mostrados na Figura 6.20.

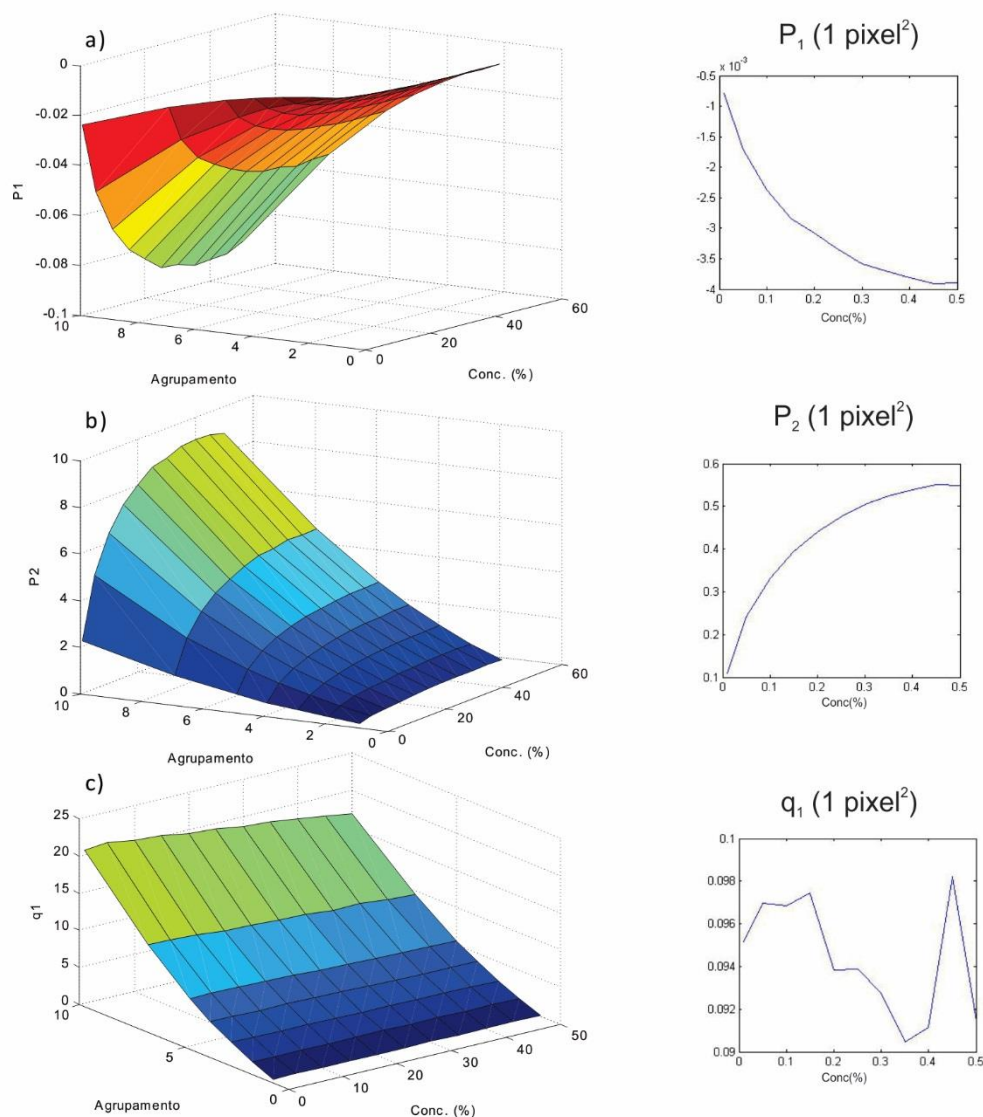


Figura 6.20 – Superfície dos valores dos parâmetros do modelo em função da concentração e do agrupamento); (a) P_1 , (b) P_2 e (c) q_1 .

6.4.6 Análise de Homogeneidade

6.4.5.1 Análise de Mistura de Pós

Com o objetivo de avaliar a porcentagem de homogeneidade (%H), as informações sobre distribuições homogêneas e não homogêneas são importantes para verificação das amostras reais. As curvas estudadas mostram-se adequadas para atribuir a qualificação de “homogênea” e “não homogênea” nas amostras, com a equação:

$$\%H = \left(1 - \frac{|AUC_H - AUC_S|}{|AUC_H - AUC_N|} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 6.7})$$

Em que AUC é a área sob a curva (“area under curve”) na qual o índice H está relacionado a curva homogênea, e N para a curva não homogênea (heterogeneidade). O índice S está indicando o resultado obtido com a amostra. Considerando a equação 6.7, valores de AUC_S próximos de AUC_H , a homogeneidade tende a ser 100%, porém valores de AUC_S tendendo a AUC_N os valores de $\%H$ serão reduzidos.

As curvas de homogeneidade, para aquisição dos limites superiores e inferiores da estimativa de $\%H$ (AUC_H e AUC_N), foram adquiridas por simulações descritas nas sessões 6.4.3 e 6.4.4, respectivamente, com o número de 400 simulações para cada concentração.

O processo de binarização das amostras ocorreu pela identificação de um valor de limiar para as imagens obtidas. O valor foi determinado considerando os valores de escala obtidos nos CDM, valores correspondentes ao objeto de análise, sucralose neste caso. Sendo estipulado o valor um a presença da sucralose, e zero a ausência, na imagem binarizada. O processo de binarização é uma etapa crítica, pois erros podem ocasionar perda ou incremento da informação relacionada ao objeto de estudo, levando a uma super- ou sub-estimativa da distribuição do objeto. Com as imagens binárias das amostras reais, calculou-se a $\%H$ (Equação 6.7) e os resultados são apresentados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1 – Resultados de $\%H$ para as imagens binárias de sucralose.

Concentração	%H em cada etapa de Mistura					
	1	2	3	4	5	6
1%	90.3%	9.6%	26.1%	-	56.7%	-
5%	69.3%	64.7%	68.0%	-	42.5%	83.0%
10%	73.2%	89.4%	93.9%	93.9%	69.1%	64.4%
25%	33.4%	56.3%	78.0%	84.6%	44.6%	78.0%
50%	78.0%	41.5%	51.6%	64.4%	40.6%	50.6%

Tabela 6.2 – Resultados de $\%H$ para os mapas de concentração de sucralose.

Concentração	H% em cada etapa da mistura
--------------	-----------------------------

	1	2	3	4	5	6
1%	0.09%	0.02%	0.08%	-	-	-
5%	86.94%	64.97%	81.63%	95.51%	70.40%	71.39%
10%	93.65%	87.42%	97.80%	80.48%	82.99%	67.58%
25%	84.99%	75.16%	99.07%	97.54%	83.56%	98.60%
50%	99.84%	93.67%	95.19%	99.26%	93.30%	92.63%

Extrapolando a aplicação do modelo, a Equação 6.6 foi aplicada aos CDM da sucralose sem binarização, e o resultado é apresentado na Tabela 6.2.

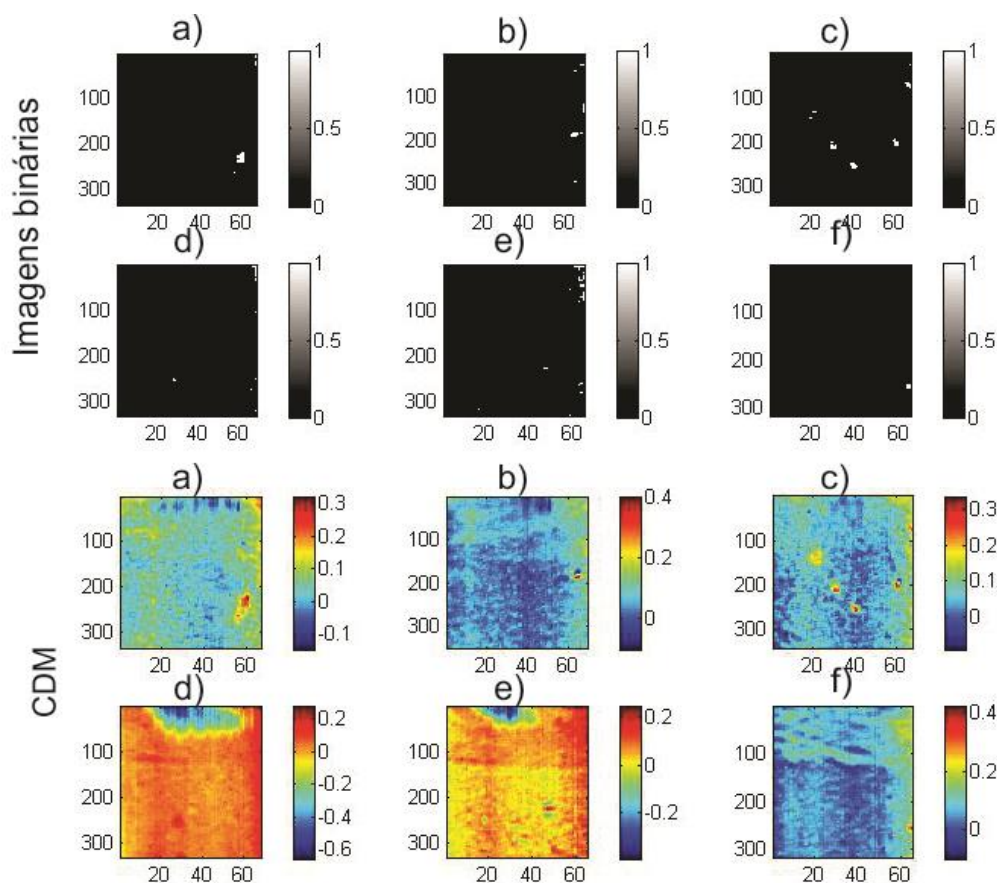


Figura 6.21 – Imagens binárias e CDM para sucralose na concentração de 1%, para as amostras (a), (b), (c), (d), (e) e (f), referentes à etapa de mistura 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente.

Os resultados encontrados para as amostras binarizadas e pelos CDMs apresentaram uma grande flutuação, considerando os valores de %H obtidos, porém os desvios não puderam ser elucidados de forma conclusiva pois a segregação entre as partículas de amido e sucralose durante o processo de mistura não foi avaliada. A utilização de imagens binárias permitiu a estimativa do %H de forma mais apropriada do que utilizando os CDMs. Analisando-se visualmente as imagens da Figura 6.21, verifica-se que as amostras binárias apresentam uma distribuição mais condizente com a concentração de 1%. Os

CDM, por outro lado, apresentam intensidades muito altas nos locais dos ativos, e indicam a presença relativa em outras áreas, principalmente nas imagens (d) e (e), que correspondem as etapas de mistura 4 e 5, respectivamente.

A menor quantidade de partículas relacionadas aos ativos, nas amostras binárias em baixas concentrações, fez com que os valores de Sw fossem mais adequados aos limites estabelecidos para o cálculo. Os limites são determinados pela curva de homogeneidade (CH), para o limite inferior, e pela curva de não homogeneidade (NC), para o limite superior (Figura 6.15). Na concentração de 1%, o limite superior não possui valores de Sw muito distintos ao limite inferior, fazendo com que o espaço de flutuação da amostra seja diminuto. Os formatos das curvas de homogeneidade das imagens binárias (Figura 6.22a) apresentaram melhor comportamento do que as curvas geradas pelos CDM (Figura 6.22b). As curvas obtidas para os CDM não condizem com o padrão encontrado nos estudos desenvolvidos. Estes fatores não permitiram a avaliação da %H para a maioria das curvas dos CDMs na concentração de 1% (Tabela 6.2).

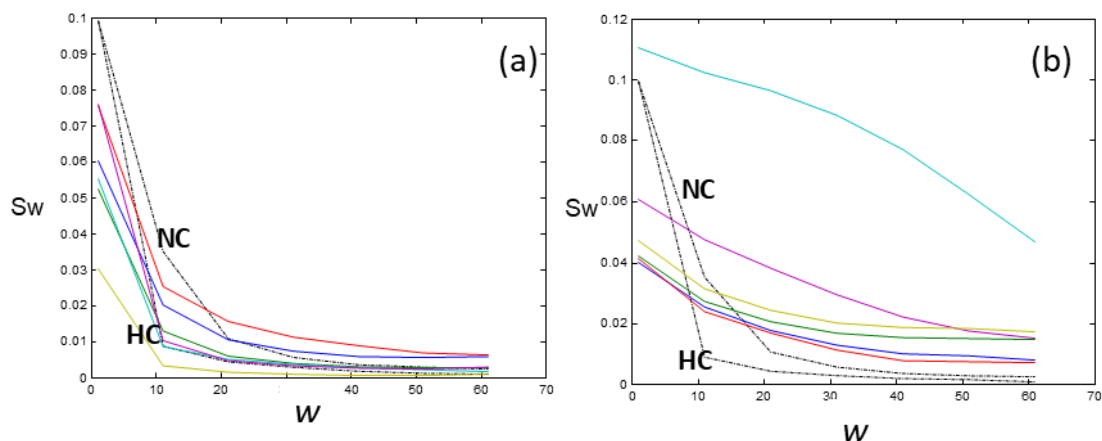


Figura 6.22 – Curvas de homogeneidade (HC) e não homogeneidade (NC) e para imagens (a) binárias e (b) CDM de sucralose na concentração de 1%.

Nas amostras de altas concentrações (50%), a presença de grumos é evidenciada nas amostras binárias (Figura 6.32), fator que reduz os valores de %H. Analisando-se visualmente as imagens relacionadas à concentração de 50%, o CDM parece apresentar uma melhor distribuição da sucralose, pois desta vez o contraste favorece a visualização de uma distribuição mais homogênea,

indicando que a sucralose está distribuída em toda a superfície, embora em menores concentrações.

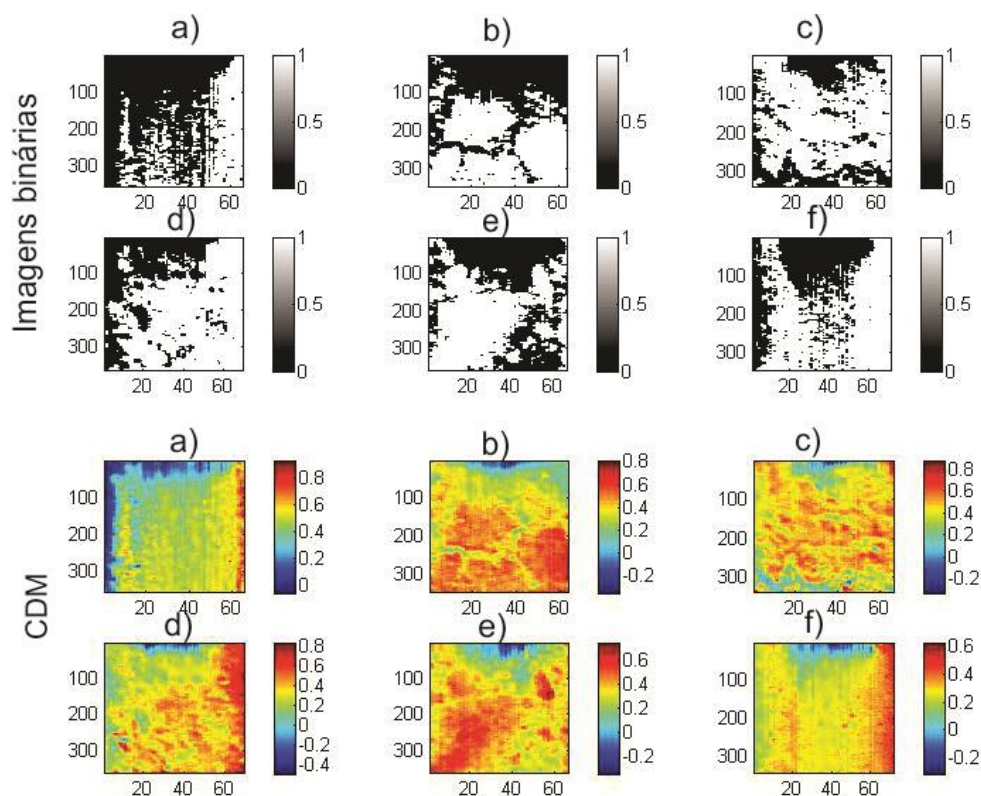


Figura 6.23 – Imagens binárias e CDM para sucralose na concentração de 50%, para as amostras (a), (b), (c), (d), (e) e (f), referentes à etapa de mistura 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente.

Em altas concentrações, as diferenças nas curvas de homogeneidade e não homogeneidade são relativamente grandes (Figura 6.24), o que permite uma maior flutuação dos valores das curvas de homogeneidade para as amostras. Foi possível, portanto, estimar os valores de %H tanto para as amostras binárias como para os CDM. As curvas de homogeneidade das amostras binárias (Figura 6.24a) apresentaram formatos mais condizentes do que os adquiridos para o CDM (Figura 6.24b). Os valores ótimos de %H adquiridos para os CDM, podem estar sendo mascarados, devido aos baixos valores de intensidade, enquanto que, os valores obtidos para as imagens binárias são mais harmônicos com os agrupamentos aparentes.

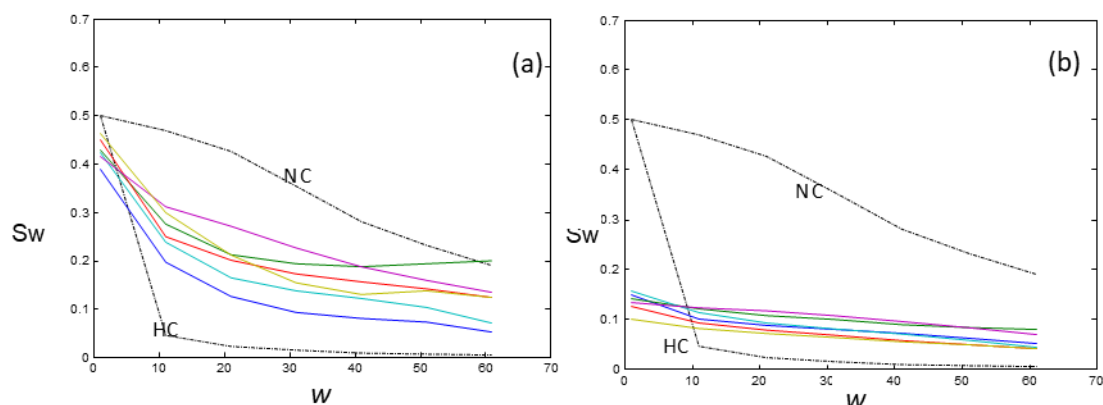


Figura 6.24 – Curvas de homogeneidade (HC) e não homogeneidade (NC) e para imagens (a) binárias e (b) CDM de sucralose na concentração de 50%.

Mesmo o procedimento experimental adotado na produção das misturas ser condizente com um processo de mistura industrial, a Equação 6.7 permitiu a avaliação dos percentuais de homogeneidade para imagens binárias. Os valores das intensidades das imagens binárias, zero ou 1, refletem no formato e valores de Sw das curvas de homogeneidade permitindo inferir que o método é adequado para avaliação. Porém, os CDM possuem uma faixa estreita de valores de concentração relativa, fazendo com que seja necessário reavaliar a implementação de CDM para determinação de %H pela equação 6.7.

6.4.7 Considerações Finais

Considerando os resultados obtidos para as simulações, as seguintes observações podem ser feitas em relação às hipóteses previamente assumidas.

- (i) a distribuição aleatória está associada à distribuição mais homogênea, logo, a etapa de mistura deve permitir um processo estocástico para todos os compostos;
- (ii) em amostras reais, o tamanho da partícula amostrada não deve exceder o tamanho de um 1 *pixel*, com o intuito de evitar agrupamentos. Por exemplo, se o tamanho da partícula é de 30 μm , o tamanho do *pixel* a ser selecionado no equipamento deve ser de no mínimo 30 μm .
- (iii) a análise de homogeneidade, como descrito neste trabalho, deve ser realizada em sistema binário;

(iv) o modelo matemático proposto é adequado para prever a curva ideal da mistura homogênea, considerando os resultados obtidos com CLMB, e os parâmetros devem ser avaliados individualmente para observar a manutenção das suas características.

6.5 CONCLUSÃO

As simulações foram adequadas para observar e confirmar teorias relacionadas ao processo de mistura e homogeneidade, indicados pela observação de resultados satisfatórios para determinação de imagens homogêneas e não homogêneas, utilizando as curvas de homogeneidade. Além disto, a verificação da interferência causada pela diferença no tamanho das partículas e do *pixel* amostrado e sobreposições foi um ponto avaliado e sem muita interferência no caso de pequenos agrupamentos.

O índice de homogeneidade proposto mostra-se, portanto, promissor para avaliação da distribuição de compostos em superfícies de imagens binárias.

Porém mais estudos devem ser realizados para permitir que CDM possam ser analisados sem normalização dos valores de sua escala (obtidos com modelos de resolução), já que as variações de concentrações ocasionadas pelas sobreposições de partículas são um ponto importante na avaliação da homogeneidade.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRINO, G. L.; POPPI, R. J. NIR imaging spectroscopy for quantification of constituents in polymers thin films loaded with paracetamol. **Analytica Chimica Acta**, v. 765, n. June 2012, p. 37–44, 2013.

ALEXANDRINO, G. L.; POPPI, R. J. Study of the homogeneity of drug loaded in polymeric films using near-infrared chemical imaging and split-plot design. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 103, n. 8, p. 2356–65, ago. 2014.

AMIGO, J. M. et al. Study of pharmaceutical samples by NIR chemical-image and multivariate analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 696–713, set. 2008.

AMIGO, J. M. et al. A comparison of a common approach to partial least squares-discriminant analysis and classical least squares in hyperspectral imaging. **International journal of pharmaceutics**, v. 373, n. 1–2, p. 179–82, 21 maio 2009.

AMIGO, J. M.; RAVN, C. Direct quantification and distribution assessment of major and minor components in pharmaceutical tablets by NIR-chemical imaging. **European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 2, p. 76–82, 12 maio 2009.

AVALLE, P. et al. The use of in situ near infrared spectroscopy to provide mechanistic insights into gel layer development in HPMC hydrophilic matrices. **European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 5, p. 400–8, 17 ago. 2011.

AVALLE, P. et al. Interrogating erosion-based drug liberation phenomena from hydrophilic matrices using near infrared (NIR) spectroscopy. **European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1–2, p. 72–9, 23 jan. 2013.

BAPTISTAO, M.; ROCHA, W. F. D. C.; POPPI, R. J. Quality control of the paracetamol drug by chemometrics and imaging spectroscopy in the near infrared region. **Journal of Molecular Structure**, v. 1002, n. 1–3, p. 167–171, set. 2011.

BAZZO, G. C.; SILVA, M. A. S. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 315–322, set. 2005.

BHARATI, M. H.; LIU, J. J.; MACGREGOR, J. F. Image texture analysis: methods and comparisons. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 72, n. 1, p. 57–71, jun. 2004.

BHARATI, M. H.; MACGREGOR, J. F. **Texture analysis of images using Principal Component Analysis**. Boston: SPIE/Photonics Conference on Process Imaging for Automatical Control, 2000

BRASIL. **RE nº 1 - Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade**. 1. ed. Brasília, BR: ANVISA, 2005.

BRASIL. **RDC Nº 17, DE 16 DE ABRIL DE 2010**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. **RDC Nº 45 , Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos**. 2012

BRERETON, R. G. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. 1. ed. West Sussex, ENG: John Wile y & Sons Ltd, 2003.

BRONDI, A. et al. Mapping the polymorphic forms of fexofenadine in pharmaceutical tablets using near infrared chemical imaging. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 22, n. April, p. 211, 2014.

BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. **Química Nova**, v. Abril/1985, p. 84–99, 1984.

BURGER, J. E. **Hyperspectral NIR Image Analysis: data exploration, correction, and regression**. [s.l.] Swedish University of Agricultural Science, 2006.

BURGER, J. E.; GOWEN, A. A. THE INTERPLAY OF CHEMOMETRICS AND HYPERSPECTRAL CHEMICAL IMAGING. p. 3–6, 2011.

BURGER, J.; GELADI, P. Hyperspectral NIR image regression part I: calibration and correction. **Journal of Chemometrics**, v. 19, n. 5–7, p. 355–363, maio 2005.

BURGER, J.; GELADI, P. Hyperspectral NIR image regression part II : Dataset preprocessing diagnostics. **Journal of Chemometrics**, v. 20, n. February, p. 106–119, 2006.

CAIRÓS, C. et al. Implementation of enhanced correlation maps in near infrared chemical images: application in pharmaceutical research. **Talanta**, v. 79, n. 3, p. 657–64, 15 ago. 2009.

CANEVAROLO JR., S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. 1. ed. São Paulo, SP: Artliber Editora, 2004.

CARNEIRO, R. L.; POPPI, R. J. A Quantitative Method using Near Infrared Imaging Spectroscopy for Determination of Surface Composition of Tablet Dosage Forms: an Example of Spirolactone Tablets. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 8, p. 1570–1576, 2012a.

CARNEIRO, R. L.; POPPI, R. J. Homogeneity study of ointment dosage forms by infrared imaging spectroscopy. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 58, p. 42–8, 25 jan. 2012b.

CHABLANI, L. et al. Inline real-time near-infrared granule moisture measurements of a continuous granulation-drying-milling process. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 4, p. 1050–5, dez. 2011.

CHEW, W.; SHARRATT, P. Trends in process analytical technology. **Analytical Methods**, v. 2, n. 10, p. 1412, 2010.

CHOI, W. S. Studies on mixing of pharmaceutical powders. **Archives of Pharmacal Research**, v. 5, n. 2, p. 53–60, 1982.

CRUZ, J. et al. Nir-chemical imaging study of acetylsalicylic acid in commercial tablets. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 473–8, 15 dez. 2009a.

CRUZ, J. et al. Nir-chemical imaging study of acetylsalicylic acid in commercial tablets. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 473–8, 15 dez. 2009b.

CRUZ, J.; BLANCO, M. Content uniformity studies in tablets by NIR-CI. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 56, n. 2, p. 408–12, 10 set. 2011.

DANCKWERTS, P. V. The definition and measurement of some characteristics of mixture. **Applied Science Research**, v. 3, p. 279–296, 1952.

DE BEER, T. R. M. et al. Raman spectroscopy as a process analytical technology (PAT) tool for the in-line monitoring and understanding of a powder blending process. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 48, n. 3, p. 772–9, 4 nov. 2008.

DE JUAN, A. et al. Chemometric Tools for Image Analysis. In: SALZER, R.; SIESLER, H. W. (Eds.). . **Infrared and Raman Spectroscopic Imaging**. 1. ed. Weinheim, GER: WILEY-VHC, 2009. p. 65–106.

EL-HAGRASY, A. S.; DELGADO-LOPEZ, M.; DRENNEN, J. K. A Process Analytical Technology approach to near-infrared process control of pharmaceutical powder blending: Part II: Qualitative near-infrared models for prediction of blend homogeneity. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 95, n. 2, p. 407–21, fev. 2006.

EL-HAGRASY, A. S. et al. Near-infrared spectroscopy and imaging for the monitoring of powder blend homogeneity. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 90, n. 9, p. 1298–307, set. 2001.

ELLISON, C. D. et al. Measuring the distribution of density and tableting force in pharmaceutical tablets by chemical imaging. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 48, n. 1, p. 1–7, 10 set. 2008.

ELY, D. R.; CARVAJAL, M. T. Determination of the scale of segregation of low dose tablets using hyperspectral imaging. **International journal of pharmaceuticals**, v. 414, n. 1–2, p. 157–60, 29 jul. 2011.

ESBENSEN, K.; GELADI, P. Strategy of multivariate image analysis (MIA). **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 7, n. 1–2, p. 67–86, dez. 1989.

ESBENSEN, K. H.; GELADI, P. L.; GRAHN, H. F. Strategies for multivariate image regression. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 14, n. 1–3, p. 357–374, abr. 1992.

FDA. **Guidance for Industry Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical**. [s.l: s.n.].

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - Conceitos, métodos e aplicações**. 1 ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2015.

FOTI, C. et al. Tools and workflow for structure elucidation of drug degradation products. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 49, p. 89–99, set. 2013.

FRANCH-LAGE, F. et al. Fast assessment of the surface distribution of API and

excipients in tablets using NIR-hyperspectral imaging. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, n. 1–2, p. 27–35, 2011.

GARCÍA, M. J. E.; DURÁN, S. T.; DURÁN, J. J. T. Estudio de estabilidad de soluciones acuosas de captopril en concentración de 1 mg / ml. **Farmacia Hospitalaria**, v. 29, n. 1, p. 30–36, 2005.

GELADI, P. et al. Principal component analysis of multivariate images. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 5, n. 3, p. 209–220, mar. 1989.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1–17, jan. 1986.

GENDRE, C. et al. Real-time predictions of drug release and end point detection of a coating operation by in-line near infrared measurements. **International journal of pharmaceutics**, v. 421, n. 2, p. 237–43, 15 dez. 2011.

GENDRIN, C.; ROGGO, Y.; COLLET, C. Content uniformity of pharmaceutical solid dosage forms by near infrared hyperspectral imaging: A feasibility study. **Talanta**, v. 73, n. 4, p. 733–41, 15 out. 2007.

GENNARO, A. R. Fabricação Farmacêutica. In: **Remington: a ciência e a prática da Farmácia**. 20 ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GERLACH, R. W.; KOWALSKI, B. R.; WOLD, H. O. A. Partial Least-Squares path modelling with latent variables. **Analytica Chimica Acta**, v. 112, p. 417–421, 1979.

GOWEN, A. A. et al. Recent applications of Chemical Imaging to pharmaceutical process monitoring and quality control. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 69, n. 1, p. 10–22, maio 2008.

GRANGEIRO JUNIOR, S. et al. A process analytical technology approach for the production of fixed-dose combination tablets of zidovudine and lamivudine using near infrared spectroscopy and chemical images. **Microchemical Journal**, v. 118, p. 252–258, jan. 2015.

HAALAND, D. M.; MELGAARD, D. K. New augmented classical least squares methods for improved quantitative spectral analyses. **Vibrational Spectroscopy**, v. 29, n. 1–2, p. 171–175, jul. 2002.

HAALAND, D. M.; THOMAS, E. V. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 11, p. 1193–1202, jun. 1988.

HAMAD, M. L. et al. Drug Product Characterization by Macropixel Analysis of Chemical Images. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 96, n. 12, p. 3390–3401, 2007.

HATTORI, Y.; OTSUKA, M. NIR spectroscopic study of the dissolution process in pharmaceutical tablets. **Vibrational Spectroscopy**, v. 57, n. 2, p. 275–281, nov. 2011.

HE, X. et al. Assessing powder segregation potential by near infrared (NIR)

spectroscopy and correlating segregation tendency to tableting performance. **Powder Technology**, v. 236, p. 85–99, fev. 2013.

HILDEN, L. R. et al. NIR chemical imaging to guide/support BMS-561389 tablet formulation development. **International journal of pharmaceutics**, v. 353, n. 1–2, p. 283–90, 2 abr. 2008.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **No Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre, RS: Bookman, 2009.

HUANG, Y. et al. Near-infrared spectral imaging for quantitative analysis of active component in counterfeit imidacloprid using PLS regression. **Optik - International Journal for Light and Electron Optics**, out. 2012.

ICH. **Stability Testing of New Drug Substances and Products**. Guidance for Industry. **Anais...**2003

ICH. **Impurities in new drugs products Q3B (R2)**. CH Harmonised Tripartite Guideline. **Anais...**2006

ICH. Guidance for Industry Q8(R2) Pharmaceutical Development. v. 8, n. November, 2009.

ISHIKAWA, D. et al. Application of a newly developed portable NIR imaging device to monitor the dissolution process of tablets. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, n. 29, p. 9401–9, nov. 2013.

JACKSON, E. K. Renin and Angiotensin. In: BRUNTON, L. L.; BLUMENTHAL, D. K.; MURRI, N.; DANDAN, R. H.; KNOLLMANN, B. C. (Ed.). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12. ed. New York, USA: McGraw-Hill, 2011.

JAIN, D.; BASNIWAL, P. K. Forced degradation and impurity profiling: recent trends in analytical perspectives. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 86, p. 11–35, dez. 2013.

KENNEY, K. B. et al. Simultaneous determination of zidovudine and lamivudine in human serum using HPLC with tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, n. 6, p. 967–983, jul. 2000.

KOENIG, J. L.; WANG, S. Q.; BHARGAVA, R. No TitleFTIR Images: A picture is worth a thousand spectra. **Analytical Chemistry**, n. 73, p. 351A–391A, 2001.

KOIDE, T. et al. Detection of component segregation in granules manufactured by high shear granulation with over-granulation conditions using near-infrared chemical imaging. **International journal of pharmaceutics**, v. 441, n. 1–2, p. 135–45, 30 jan. 2013.

KOLLER, D. M. et al. Continuous quantitative monitoring of powder mixing dynamics by near-infrared spectroscopy. **Powder Technology**, v. 205, n. 1–3, p. 87–96, jan. 2011.

LACEY, P. M. C. Developments in the theory of particle mixing. **Journal of Applied Chemistry**, v. 4, p. 257–268, 1954.

LAMIM, R. **Quitosana e n-carboximetilquitosana: desenvolvimento e biofilmes para aplicações farmacêuticas**. [s.l.] Universidade do Vale do Itajaí, 2006.

LEARDI, R.; LUPIÁÑEZ GONZÁLEZ, A. Genetic algorithms applied to feature selection in PLS regression: how and when to use them. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 41, n. 2, p. 195–207, jul. 1998.

LI, M.; LIN, S. Vibrational Spectroscopic Studies on the Disulfide Formation and Secondary Conformational Changes of Captopril-HSA Mixture after UV-B Irradiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, p. 1404–1410, 2005.

LI, W. et al. Determination of Water Penetration and Drug Concentration Profiles in HPMC-Based Matrix Tablets by Near Infrared Chemical Imaging. v. 99, n. 7, p. 3081–3088, 2010.

LIU, J. J.; MACGREGOR, J. F. On the extraction of spectral and spatial information from images. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 85, n. 1, p. 119–130, jan. 2007.

LIU, T. et al. Research on the homogeneity of asphalt pavement quality using X-ray computed tomography (CT) and fractal theory. **Construction and Building Materials**, v. 68, p. 587–598, 2014.

LOPES, M. et al. Quantification of components in non-homogenous pharmaceutical tablets using near infrared reflectance imaging. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 18, n. 1, p. 333, 2010.

LÓPEZ, F. et al. Performance evaluation of soft color texture descriptors for surface grading using experimental design and logistic regression. **Pattern Recognition**, v. 41, n. 5, p. 1744–1755, maio 2008.

MA, H. U. A.; ANDERSON, C. A. Characterization of Pharmaceutical Powder Blends by NIR Chemical Imaging. v. 97, n. 8, p. 3305–3320, 2008.

MAHMOUD, W. M. M.; KÜMMERER, K. Captopril and its dimer captopril disulfide: Photodegradation , aerobic biodegradation and identification of transformation products by HPLC – UV and LC – ion trap-MS n. **Chemosphere**, v. 88, n. 10, p. 1170–1177, 2012.

MANDEL, J. Use of the Singular Value Decomposition in Regression Analysis. **The American Statistician**, v. 36, n. 1, p. 15–24, 1982.

MANLEY, M. Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: non-destructive analysis of biological materials. **Chemical Society reviews**, v. 43, n. 24, p. 8200–14, 21 dez. 2014.

MARCOLINO JÚNIOR, L. H. **Eletrodos voltamétricos e amperométricos para a determinação de espécies de interesse farmacêutico**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

MATTS, P. J. et al. Color homogeneity and visual perception of age, health, and attractiveness of female facial skin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 57, p. 977–984, 2007.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6 ed ed. Gosport, UK: Ashford Colour Press Ltd., 2010.

MISSIAEN, J.-M.; THOMAS, G. Homogeneity characterization of binary grain mixtures using a variance analysis of two-dimensional numerical fractions. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 7, p. 2937–2948, 1995.

MUERZA, S. et al. A dynamic study of static mixing using on-line image analysis. **Powder Technology**, v. 128, p. 195–204, 2002.

MUSHA, H. et al. **Effects of size and density differences on mixing of binary mixtures of particles**. AIP Conference Proceedings. **Anais...**AIP Publishing LLC, 18 jun. 2013Disponível em: <<http://link.aip.org/link/?APCPCS/1542/739/1>>. Acesso em: 24 set. 2013

NÓBREGA, I. M. F. **Desenvolvimento farmacotécnico e estudo de estabilidade de comprimidos à base de captopril**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2006.

OFFROY, M.; ROGGO, Y.; DUPONCHEL, L. Increasing the spatial resolution of near infrared chemical images (NIR-CI): The super-resolution paradigm applied to pharmaceutical products. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 117, p. 183–188, ago. 2012.

PANEQUE-GÁLVEZ, J. et al. Enhanced land use/cover classification of heterogeneous tropical landscapes using support vector machines and textural homogeneity. **International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation**, v. 23, p. 372–383, 2013.

PASQUINI, C. Review Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals , Practical Aspects and Analytical Applications. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198–219, 2003.

PEIXOTO, M. M. et al. Avaliação da qualidade de comprimidos de captopril dispensados em Feira de Santana – BA. **Revista Pharmacia Brasileira**, n. 47, p. 69–73, 2005.

PEREIRA, A. S. et al. Simultaneous determination of lamivudine and zidovudine concentrations in human seminal plasma using high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 742, n. 1, p. 173–183, maio 2000.

PIQUERAS, S. et al. Relevant aspects of quantification and sample heterogeneity in hyperspectral image resolution. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 117, p. 169–182, ago. 2012.

POUX, M. et al. Powder mixing: Some practical rules applied to agitated systems. **Powder Technology**, v. 68, p. 213–234, 1991.

PRATS-MONTALBÁN, J. M. et al. **Feature Extraction and Classification in Surface Grading Application Using Multivariate Statistical Projection Models**. (D. Fofi, F. Meriaudeau, Eds.)Eighth International Conference on Quality Control by Artificial Vision. **Anais...**1 jan. 2007Disponível em: <<http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.736919>>. Acesso em: 30 jan. 2013

PRATS-MONTALBÁN, J. M. et al. Multivariate statistical projection methods to perform robust feature extraction and classification in surface grading. **Journal of Electronic Imaging**, v. 17, n. 3, p. 31106, 2008.

PRATS-MONTALBÁN, J. M. et al. Prediction of skin quality properties by different Multivariate Image Analysis methodologies. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 96, n. 1, p. 6–13, mar. 2009.

PRATS-MONTALBÁN, J. M. et al. MIA and NIR Chemical Imaging for pharmaceutical product characterization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 117, n. null, p. 240–249, ago. 2012.

PRATS-MONTALBAN, J. M. .; FERRER, A. Integration of colour and textural information in multivariate image analysis: defect detection and classification issues. **Journal of Chemometrics**, v. 21, n. May, p. 10–23, 2007.

PRATS-MONTALBÁN, J. M.; DE JUAN, A.; FERRER, A. Multivariate image analysis: A review with applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 107, n. 1, p. 1–23, maio 2011.

PRATT, W. K. Image Feature Extraction. In: PRATT, W. K. (Ed.). . **Digital Image Processing: PIKS Inside**. 3rd. ed. New York, USA: John Wiley and Sons, Inc., 2001. p. 509–550.

PUCHERT, T. et al. Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) for counterfeit drug identification--a four-stage concept with a novel approach of data processing (Linear Image Signature). **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 51, n. 1, p. 138–45, 5 jan. 2010.

PUCHERT, T. et al. A new PAT/QbD approach for the determination of blend homogeneity: combination of on-line NIRS analysis with PC Scores Distance Analysis (PC-SDA). **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 78, n. 1, p. 173–82, maio 2011.

QAZI, A. A. et al. Separation of healthy and early osteoarthritis by automatic quantification of cartilage homogeneity. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, p. 1199–1206, 2007.

RAHMAN, Z. et al. Near-infrared and fourier transform infrared chemometric methods for the quantification of crystalline tacrolimus from sustained-release amorphous solid dispersion. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 103, n. 8, p. 2376–85, ago. 2014.

RAHMAN, Z.; SIDDIQUI, A.; KHAN, M. A. Orally disintegrating tablet of novel salt of antiepileptic drug: formulation strategy and evaluation. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 85, n. 3 Pt B, p. 1300–9, nov. 2013.

RAHMAN, Z.; ZIDAN, A. S.; KHAN, M. A. Risperidone solid dispersion for orally disintegrating tablet: its formulation design and non-destructive methods of evaluation. **International journal of pharmaceutics**, v. 400, n. 1–2, p. 49–58, 15 nov. 2010.

RAO, R. N. et al. LC-MS/MS structural characterization of stress degradation products including the development of a stability indicating assay of Darunavir: An anti-HIV drug. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 89, p. 28–33, 15 fev. 2014.

RAVN, C.; SKIBSTED, E.; BRO, R. Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) on pharmaceutical solid dosage forms-comparing common calibration approaches. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 48, n. 3, p. 554–61, 4 nov. 2008.

RILEY, B. S.; LI, X. Quality by design and process analytical technology for sterile products--where are we now? **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 114–8, mar. 2011.

RINNAN, Å.; BERG, F. VAN DEN; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201–1222, nov. 2009.

ROCHA, W. F. DE C. et al. Quantitative analysis of piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 106, n. 2, p. 198–204, abr. 2011.

RODIONOVA, O. et al. NIR spectrometry for counterfeit drug detectionA feasibility study. **Analytica Chimica Acta**, v. 549, n. 1–2, p. 151–158, 6 set. 2005.

ROSAS, J. G. et al. A new approach to determine the homogeneity in hyperspectral imaging considering the particle size. **Analytica Chimica Acta**, v. 787, p. 173–180, 2013.

ROSAS, J. G. et al. NIR spectroscopy for the in-line monitoring of a multicomponent formulation during the entire freeze-drying process. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 97, p. 39–46, 2014.

ROSAS, J. G.; BLANCO, M. A criterion for assessing homogeneity distribution in hyperspectral images. Part 2: Application of homogeneity indices to solid pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 691–699, nov. 2012a.

ROSAS, J. G.; BLANCO, M. A criterion for assessing homogeneity distribution in hyperspectral images. Part 1: Homogeneity index bases and blending processes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 680–690, nov. 2012b.

SABIN, G. P. et al. Analysis of pharmaceutical pellets: an approach using near-infrared chemical imaging. **Analytica chimica acta**, v. 706, n. 1, p. 113–9, 7 nov. 2011.

SABIN, G. P.; ROCHA, W. F. DE C.; POPPI, R. P. Study of the similarity between distribution maps of concentration in near-infrared spectroscopy chemical imaging obtained by different multivariate calibration approaches. **Microchemical Journal**, v. 99, n. 2, p. 542–547, nov. 2011.

SACRÉ, P.-Y. et al. Data processing of vibrational chemical imaging for pharmaceutical applications. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 101C, p. 123–140, dez. 2014a.

SACRÉ, P. Y. et al. A new criterion to assess distributional homogeneity in hyperspectral images of solid pharmaceutical dosage forms. **Analytica Chimica Acta**, v. 818, p. 7–14, 2014b.

SAKAMOTO, T. et al. Non-destructive analysis of tulobuterol crystal reservoir-type transdermal tapes using near infrared spectroscopy and imaging. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 74, p. 14–21, 23 fev. 2013.

SARRAGUÇA, M. C. et al. A PAT approach for the on-line monitoring of

pharmaceutical co-crystals formation with near infrared spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, p. 478–484, 2014.

ŠAŠIĆ, S. Parallel imaging of active pharmaceutical ingredients in some tablets and blends on Raman and near-infrared mapping and imaging platforms. **Analytical Methods**, v. 3, n. 4, p. 806, 2011.

ŠAŠIĆ, S.; KONG, A.; KAUL, G. Determining API domain sizes in pharmaceutical tablets and blends upon varying milling conditions by near-infrared chemical imaging. **Analytical Methods**, v. 5, n. 9, p. 2360, 2013.

ŠAŠIĆ, S.; YU, W.; ZHANG, L. Monitoring of API particle size during solid dosage form manufacturing process by chemical imaging and particle sizing. **Analytical Methods**, v. 3, n. 3, p. 568, 2011.

SCAFI, S. H. F.; PASQUINI, C. Identification of counterfeit drugs using near-infrared spectroscopy. **The Analyst**, v. 126, n. 12, p. 2218–2224, 4 dez. 2001.

SCHÖNBICHLER, S. A. et al. Comparison of NIR chemical imaging with conventional NIR, Raman and ATR-IR spectroscopy for quantification of furosemide crystal polymorphs in ternary powder mixtures. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, v. 84, n. 3, p. 616–25, ago. 2013.

SHI, Z.; ANDERSON, C. A. 2-D Image Localization in Hyperspectral Image Analysis of Pharmaceutical Materials. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 6, n. 1, p. 2–9, 23 dez. 2010.

SIESLER, H. W. Introduction. In: SIESLER, H. Q.; OZAKI, Y.; KAWATA, S.; HEISE, H. M. (Ed.). **Near-Infrared Spectroscopy**. Weiheim (GER): WILEY-VCH Verlag GmbH, 2002. p. 1–10.

SILVA, M. A M. et al. Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of amoxicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 89, p. 342–51, 30 jan. 2012.

SINGH, V. Development, Evaluation and Stability Studies of Zidovudine and Lamivudine (ZILA) Tablet Dosage Form. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 9, p. 149–154, 28 set. 2012.

SOUHLI, N. et al. Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) on roll compacted ribbons and tablets – multivariate mapping of physical and chemical properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 200–211, 2015.

SOUZA, J. A. L. et al. Quantification of captopril disulphide as a degradation product in captopril tablets using near infrared spectroscopy and chemometrics. **Vibrational Spectroscopy**, v. 62, p. 35–41, set. 2012.

SPRING, S. Process Analytical Technology : Chemometric Analysis of Raman and Near Infra-red Spectroscopic Data for Predicting Physical Properties of Extended Release Matrix Tablets. v. 96, n. 5, p. 1356–1365, 2007.

SPRING, S. Quality-by-Design (QbD): An Integrated Process Analytical Technology (PAT) Approach for Real-Time Monitoring and Mapping the State of a Pharmaceutical Coprecipitation Process. v. 99, n. 3, p. 1516–1534, 2010.

STULZER, H. K.; SILVA, M. A. S. Estudo de estabilidade de grânulos revestidos e comprimidos contendo captopril. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, n. 25, p. 497–504, 2006.

TAULER, R. Multivariate curve resolution applied to second order data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 30, n. 1, p. 133–146, nov. 1995.

TAULER, R.; SMILDE, A.; KOWALSKI, A. Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. **Journal of Chemometrics**, v. 9, p. 31–58, 1995.

WANG, D. et al. Study of spatial distribution for the active ingredient in ibuprofen tablet based on near-infrared micro-imaging technology. **Chinese Chemical Letters**, v. 22, n. 11, p. 1335–1338, nov. 2011.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, n. 1–3, p. 37–52, ago. 1987.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, n. 2, p. 109–130, out. 2001.

WORKMAN JR., J.; WEYER, L. Introduction to near-infrared spectra. In: **Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy**. 2ed. ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 2012. p. 1–18.

WU, Z. et al. Visualizing excipient composition and homogeneity of Compound Liquorice Tablets by near-infrared chemical imaging. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 86, p. 631–6, fev. 2012a.

WU, Z. et al. Monitoring of a pharmaceutical blending process using near infrared chemical imaging. **Vibrational Spectroscopy**, v. 63, p. 371–379, nov. 2012b.

YAMAMOTO, Y. et al. Comparative pharmaceutical evaluation of brand and generic clobetasone butyrate ointments. **International journal of pharmaceutics**, v. 463, n. 1, p. 62–7, 10 mar. 2014.

ZAROW, A. et al. Complementary Near-Infrared and Raman Chemical Imaging. v. 100, n. 11, p. 4888–4895, 2011.

ZHOU, L. et al. Rapid Discrimination of Chlorpheniramine Maleate and Assessment of Its Surface Content Uniformity in a Pharmaceutical Formulation by NIR-CI Coupled with Statistical Measurement. **Journal of Spectroscopy**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

ZIDAN, A. S. et al. Crystallinity evaluation of tacrolimus solid dispersions by chemometric analysis. **International journal of pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 341–50, 28 fev. 2012.

ZIDAN, A. S.; HABIB, M. J.; KHAN, M. A. Process analytical technology: Nondestructive evaluation of cyclosporine A and phospholipid solid dispersions by near infrared spectroscopy and imaging. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 3388–3399, ago. 2008.