



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

Aplicação de Métodos Quimiométricos em Análises de Formas Farmacêuticas  
Sólidas Lamivudina (3TC) + Zidovudina (AZT) Baseados na Espectrofotometria  
de absorção na região do Ultravioleta e do Infravermelho próximo

SEVERINO GRANGEIRO JÚNIOR

Recife-PE

2011



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

Aplicação de Métodos Quimiométricos em Análises de Formas  
Farmacêuticas Sólidas Lamivudina (3TC) + Zidovudina (AZT) Baseados na  
Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta e do Infravermelho  
próximo

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

**Profª Dra. Miracy Muniz de Albuquerque  
ORIENTADORA**

**Profª Dra. Maria Fernanda Pimentel  
CO-ORIENTADORA**

**Severino Grangeiro Júnior  
DOUTORANDO**

Recife-PE

2011

Grangeiro Júnior, Severino

Aplicação de métodos quimiométricos em análises de formas farmacêuticas sólidas lamivudina (3TC) + Zidovudina (AZT) baseados na espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta e do infravermelho próximo / Severino Grangeiro Júnior. – Recife: O Autor, 2011.

132 folhas: il., graf. Tab.; 30 cm

Orientador: Miracy Muniz de Albuquerque

Tese (tese) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Zidovudina. 2. Lamivudina. 3. *Calibração multivariada*. 4. Espectrofotometria no ultravioleta. 5. Espectrofotometria e infravermelho próximo. I. Severino Grangeiro Júnior. II. Título.

615.19

CDD (22.ed.)

UFPE  
CCS2011-  
041



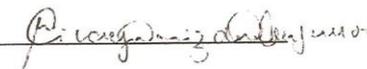
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Recife, 25 de fevereiro de 2011.

Defesa de Tese de Doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 25 de fevereiro de 2011 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

**PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr.ª Miracy Muniz de Albuquerque.**

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

Assinatura: 

**SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof.ª Dr.ª Beate Saegesser Santos.**

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

Assinatura: 

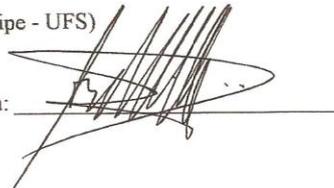
**TERCEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Fábio Santos de Souza.**

(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba - UFPB)

Assinatura: 

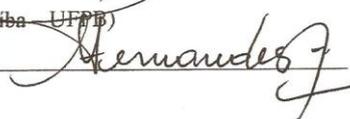
**PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo.**

(Deptº de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe - UFS)

Assinatura: 

**SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof.ª Dr.ª Claudete Fernandes Pereira.**

(Deptº de Química da Universidade Federal da Paraíba - UFPB)

Assinatura: 

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**REITOR**

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

**VICE-REITOR**

Prof. Dr. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

**VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Dr. Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Dalci José Brondani

**VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beate Saegesser Santos

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por tudo.

Aos meus pais Severino Grangeiro Sobrinho (*in memória*) e Neci Grangeiro que sempre investiram, apoiaram e acreditaram.

A Minha esposa (Ivana) e a meus familiares em especial a Silvânia Grangeiro e todos os irmãos e primarada que sempre tiveram ao meu lado dando apoio e incentivo para continuar vencendo cada etapa.

Ao NCQMC – UFPE em especial a Prof<sup>ª</sup>. Miracy, Ruth, Rosário, Ana Cristina, Aurenice, Reniere, Luis, Elda, Geilson, , Rosana, Júlia Aparecida.

Aos meus Orientadores Professora Dr<sup>ª</sup>. Miracy Albuquerque e Fernanda Pimentel pela orientação, apoio e amizade.

A todos do Controle de Qualidade do LAFEPE (Selma Vieira, Jovita Braga, Ana Elói, Roseane, Ironilda, Janaina, Newton, Jacilane, Reniere, Ironilda, Lucicleide, Valéria, Marta, Marcão, Cristiane, Fernanda, Emanuel, Emanuella, Graça Galdino, Paulo Pedrosa, André) e ao amigo e ex-estagiário Alan Parente que contribuiu nas realizações dos perfis.

A professora Dr<sup>ª</sup>. Simone Simões (pós-doutoranda) que contribuiu com os seus conhecimentos na área.

A todos da Coordenadoria de produção do LAFEPE (Leduar Guedes, Marco Aurélio, Márcia, Silva, Roseane, Osnir, Vandessa, Deborah, Marcos André, Rilda, João, Rubão). e a Coordenadoria de Boas Práticas de Fabricação (Amandinha, Elcir, Diógenes, Marcone, Fernanda veracruz)

Ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Gov. Miguel Arrais - LAFEPE e toda sua equipe em especial ao Ex-Diretor Técnico Dr. Davi Santana, Coordenadoria de Controle de Qualidade (Selma Vieira) e Coordenadoria de Pesquisa e Desenvolvimento (Flávia, Aline, Zênia, Bruno, Aíla e Jaffe) que contribuíram na manipulação dos lotes pilotos.

Ao LAC (Laboratório de Combustível) do Departamento de Engenharia Química da UFPE em especial a Professora Dr<sup>ª</sup> Fernanda Pimentel, Fernanda Honorato, Fernanda da hora, Liliana, Simone, Márcio e Claudete.

Aos laboratórios oficiais (FURP, Farmanguinhos, IQUEGO, LAFEPE, FUNED) que doaram os medicamentos para as realizações das análises.

“Há aqueles que lutam um dia; e por isso são bons;  
Há aqueles que lutam muitos dias; e por isso são muito bons;  
Há aqueles que lutam anos; e são melhores ainda;  
Porém há aqueles que lutam toda a vida;  
Esses são os imprescindíveis”

(Bertold Brecht)

# SUMÁRIO

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE TABELAS

## LISTA DE TABELAS

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>1.0 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2.0 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
2.1 FÁRMACOS ANTI-RETROVIRAIS .....	22
2.2 CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS .....	23
2.3 MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS.....	24
2.3.1 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.....	24
2.3.2 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho próximo .....	26
2.3.3 Aplicação da espectrofotometria no infravermelho próximo na indústria farmacêutica .....	30
2.4 QUIMIOMETRIA .....	32
2.4.1 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA .....	33
2.4.1.1. REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA (MLR) .....	35
2.4.1.2 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) .....	36
2.4.2 MÉTODOS DE SELEÇÃO DE VARIÁVEIS .....	37
2.4.3 Algoritmo das Projeções Sucessivas .....	37
2.4.4 SELEÇÃO DE AMOSTRAS .....	38
2.4.5 DETECÇÃO DE AMOSTRAS ANÔMALAS .....	39
2.4.6 SELEÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES .....	40
2.4.7 TRATAMENTO E PRÉ-PROCESSAMENTO DOS DADOS .....	41
2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....	43
2.5.1 Validação de Métodos que empregam calibração multivariada.....	44
2.5.1.1 Robustez.....	44
2.5.1.2 Exatidão.....	45
2.5.1.3 Precisão .....	45
2.5.1.4 Linearidade .....	46
2.5.1.5 Intervalo .....	46
2.5.1.6 Sensibilidade .....	47
2.5.1.7 Seletividade .....	47
2.5.1.8 Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) .....	47
2.5.2 PARÂMETROS QUE INDICAM A QUALIDADE DE UM MODELO MULTIVARIADO .....	48
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	51
<b>EXPERIMENTAL</b> .....	<b>52</b>
<b>PARTE I - ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA</b> .....	<b>52</b>
<b>4.0 EXPERIMENTAL - ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA</b> .....	<b>53</b>

4.1 PADRÕES E AMOSTRAS UTILIZADOS .....	53
4.2 REGISTRO DOS ESPECTROS .....	55
4.3 PERFIL DE DISSOLUÇÃO DOS COMPRIMIDOS REVESTIDOS DE AZT + 3TC .....	55
4.4 MÉTODOS DE REFERÊNCIA DO TEOR DE AZT + 3TC ( <i>MÉTODO CROMATOGRÁFICO</i> ).....	55
4.5 PROGRAMAS ESTATÍSTICOS .....	56
<b>EXPERIMENTAL .....</b>	<b>57</b>
<b>PARTE II - ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO.....</b>	<b>57</b>
<b>5. 0 EXPERIMENTAL - ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO.....</b>	<b>58</b>
5.1 AMOSTRAS.....	58
5.1.1 <i>Determinação da umidade</i> .....	58
5.1.2 <i>Dureza dos núcleos</i> .....	58
5.1.3 <i>Determinação dos teores dos granulados, núcleos e comprimidos revestidos de AZT + 3 TC</i> .....	59
5.2 MÉTODOS DE REFERÊNCIA .....	61
5.2.1 <i>Determinação da Umidade</i> .....	61
5.2.2 <i>Determinação da dureza</i> .....	61
5.2.3 <i>Determinação do teor de AZT + 3TC (método cromatográfico)</i> .....	61
5.3 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS.....	62
5.4 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA .....	63
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>PARTE III - ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA.....</b>	<b>64</b>
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO - ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA.....</b>	<b>65</b>
6.1 MÉTODO DE REFERÊNCIA (CLAE) .....	65
6.2 ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.....	66
6.2.1 <i>Espectrofotometria derivativa</i> .....	66
6.2.2 <i>Calibração multivariada usando o PLS</i> .....	72
6.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DO AZT + 3TC EM COMPRIMIDOS DOSE FIXA COMBINADA DE CINCO DIFERENTES LABORATÓRIOS PELOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS.....	76
6.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DOSE FIXA COMBINADA DOS COMPRIMIDOS DE DIFERENTES FABRICANTES DE AZT + 3TC PELOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS.....	79
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>PARTE III - ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO .....</b>	<b>86</b>
<b>7.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO - ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO .....</b>	<b>87</b>
7.1 PRÉ-PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS NIR DOS GRANULADOS, NÚCLEOS E COMPRIMIDOS REVESTIDOS DE AZT + 3TC .....	87
7.2 DETECÇÃO DAS AMOSTRA ANÔMALAS .....	92
7.3 CONSTRUÇÃO DOS MODELOS PLS-1 .....	93
7.4 MODELOS DE CALIBRAÇÃO POR REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA (MLR-APS) .....	99
7.5 VALIDAÇÃO DOS MODELOS PLS-1 E MLR-SPA PARA UMIDADE DE DUREZA .....	105
7.6 COMPARAÇÃO DOS TRÊS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA .....	109

7.7 VALIDAÇÃO DOS MODELOS PLS-1 E MLR-SPA PARA DETERMINAÇÃO DE AZT + 3TC NOS GRANULADOS, NÚCLEOS E COMPRIMIDOS REVESTIDOS .....	110
7.7.1 PLS.....	110
7.7.2 MLR.....	113
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>117</b>
<b>8.0 CONCLUSÃO.....</b>	<b>118</b>
<b>9.0 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>120</b>
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>122</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3TC	-	Lamivudina
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	-	<i>American Society for Testing and Material</i>
AZT	-	Zidovudina
BPF	-	Boas Práticas de Fabricação
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCB	-	Denominação comum brasileira
ED <sup>1</sup>	-	Espectrofotometria de primeira derivada
ED <sup>2</sup>	-	Espectrofotometria de segunda derivada
DPR	-	Desvio Padrão Relativo
EMEA	-	<i>The European Agency for the Evaluation of Medical Products</i>
FDA	-	<i>Food and Drug Administration</i>
ICH	-	<i>Internacional Conference on Harmonisation</i>
IUPAC	-	<i>Internacional Union of Pure and Applied chemistry</i>
LAFEPE	-	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
MIR	-	Infravermelho médio
MLR	-	Regressão linear múltipla
NIR	-	Infravermelho Próximo
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
PCR	-	Regressão por Componentes Principais
PLS	-	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais
USP	-	Farmacopéia Americana
RMSECV	-	Raiz do Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada ( <i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i> )
RMSEC	-	Raiz do Erro Médio Quadrático de Calibração ( <i>Root Mean Square Error of Calibration</i> )
RMSEP	-	Raiz do Erro Médio Quadrático de Previsão ( <i>Root Mean Square Error of Prediction</i> )
HIV	-	Vírus da Imunodeficiência Humana
PAT	-	Process Analytical Tecchnology
SIDA	-	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
UV/VIS	-	Ultravioleta/ Visível
VL	-	Variáveis Latentes
PRESS	-	Soma dos Quadrados do Erro de Previsão
MSC	-	Correção do sinal multiplicativo ( <i>Multiplicative Signal Correction</i> )

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fórmulas molecular planas da AZT (a) e 3TC (b).	22
<b>Figura 2 a-b:</b> Representação da técnica de reflectância especular e difusa <sup>[58]</sup> .	28
<b>Figura 3:</b> Organização dos dados para calibração multivariada.	34
<b>Figura 4:</b> Distribuição das concentrações das misturas de calibração e previsão empregando a espectrofotometria no UV.	54
<b>Figura 5:</b> Distribuição das concentrações das misturas de calibração no modelo de calibração PLS.	54
<b>Figura 6:</b> Distribuição das misturas de AZT+3TC no espaço amostral para compor o conjunto de calibração (○) amostra do planejamento fatorial (○) amostras adicionadas ao planejamento.	59
<b>Figura 7:</b> Espectrofotômetro NIR, modelo ABB BOMEM + Acessórios <i>Powder Samplir</i> .	62
<b>Figura 8:</b> Acessórios <i>Powder Samplir</i> + acessório adaptado.	63
<b>Figura 9:</b> Cromatograma de 3TC+AZT condição: coluna RP-18 (125x4nm, 5µm); fase móvel: metanol:tampão acetato amônio (35:65) pH 5,4; fluxo: 1,0 mL/min; detector: UV 270nm.	65
<b>Figura 10:</b> Espectros na região UV do AZT (15 mg.L <sup>-1</sup> ), 3TC (7,5 mg.L <sup>-1</sup> ), mistura dos dois fármacos (AZT -15 mg.L <sup>-1</sup> e 3TC -7,5 mg.L <sup>-1</sup> ), comprimido (AZT -15 mg.L <sup>-1</sup> e 3TC -7,5 mg.L <sup>-1</sup> ) e do placebo em solução aquosa.	67
<b>Figura 11:</b> Espectros de absorção na região UV do AZT (15 e 20 mg.L <sup>-1</sup> ) e 3TC (7,5 e 10 mg.L <sup>-1</sup> ).	68
<b>Figura 12:</b> Espectros de primeira derivada do 3TC nas concentrações (1) 7,5 mg.L <sup>-1</sup> e (2) 10 mg.L <sup>-1</sup> (____) AZT nas concentrações (3) 15 mg.L <sup>-1</sup> e (4) 20 mg.L <sup>-1</sup> (____).	68
<b>Figura 13:</b> Espectros da segunda derivada do 3TC nas concentrações (1) 7,5 mg.L <sup>-1</sup> e (2) 10 mg.L <sup>-1</sup> (____) AZT nas concentrações (3) 15 mg.L <sup>-1</sup> e (4) 20 mg.L <sup>-1</sup> (____).	69
<b>Figura 14:</b> Curvas analíticas do (a) AZT na faixa de 1-100 mg.L <sup>-1</sup> e (b) 3TC na faixa de 1-50 mg.L <sup>-1</sup> .	69
<b>Figura 15:</b> Varredura individual dos excipientes e do placebo.	73
<b>Figura 16:</b> Curvas do valor medido <i>versus</i> o valor previsto para os modelos de calibração multivariada (PLS) para AZT (a) e 3TC (b).	75
<b>Figura 17-</b> Gráfico do percentual dissolvido versus tempo para as amostra do laboratório-A empregando os métodos CLAE, PLS, ED <sup>1</sup> e ED <sup>2</sup> .	80
<b>Figura 18-</b> Gráfico do percentual dissolvido versus tempo para as amostras do laboratório-B empregando os métodos CLAE, PLS, ED <sup>1</sup> e ED <sup>2</sup> .	81
<b>Figura 19-</b> Gráfico do percentual dissolvido versus tempo para as amostras do laboratório-C empregando os métodos CLAE, PLS, ED <sup>1</sup> e ED <sup>2</sup> .	82
<b>Figura 20-</b> Gráfico do percentual dissolvido versus tempo para as amostras do laboratório-D empregando os métodos CLAE, PLS, ED <sup>1</sup> e ED <sup>2</sup> .	83
<b>Figura 21-</b> Gráfico do percentual dissolvido versus tempo para as amostras do laboratório-E empregando os métodos CLAE, PLS, ED <sup>1</sup> e ED <sup>2</sup> .	84
<b>Figura 22:</b> Espectro típico do granulado AZT + 3 TC na faixa de 3.800 – 14.000 cm <sup>-1</sup> .	87
<b>Figura 23:</b> espectro do granulado AZT + 3 TC na faixa de 3.840 – 8.900 cm <sup>-1</sup> .	88

<b>Figura 24:</b> Espectros NIR sem pré-processamento das amostras do granulado AZT+3TC empregadas na umidade .....	89
<b>Figura 25:</b> Espectros NIR com pré-processamento ( algoritmo Savitzky-Golay janela de 21 pontos + MSC) das amostras do granulado AZT+3TC empregadas na umidade .....	89
<b>Figura 26:</b> Espectros NIR sem pré-processamento dos comprimidos (núcleos) de AZT+3TC com diferentes durezas .....	90
<b>Figura 27:</b> Espectros NIR com pré-processamento o algoritmo Savitzky-Golay janela de 21 pontos + MSC dos comprimidos (núcleos) de AZT+3TC com diferentes durezas .....	90
<b>Figura 28:</b> Espectros NIR sem pré-processamento dos granulado de AZT+3TC.....	91
<b>Figura 29:</b> Espectros NIR com pré-processamento o algoritmo Savitzky-Golay janela de 41 pontos + MSC dos granulados de AZT+3TC.....	91
<b>Figura 30:</b> Espectros NIR sem pré-processamento dos núcleo de AZT+3TC.....	91
<b>Figura 31:</b> Espectros NIR com pré-processamento o algoritmo Savitzky-Golay janela de 41 pontos +MSC dos núcleos AZT+3TC.....	91
<b>Figura 32:</b> Espectros NIR sem pré-processamento dos comprimidos revestidos de AZT+3TC.....	92
<b>Figura 33:</b> Espectros NIR com pré-processamento o algoritmo Savitzky-Golay janela de 41 pontos +MSC dos comprimidos revestidos de AZT+3TC.....	92
<b>Figura 34:</b> Press <i>versus</i> número de variáveis latentes na construção do modelo PLS para determinação de umidade .....	93
<b>Figura 35:</b> Press <i>versus</i> número de variáveis latentes na construção do modelo PLS para determinação da dureza.....	93
<b>Figura 36:</b> Press <i>versus</i> número de variáveis latentes na construção dos modelos PLS para determinação teor de AZT do granulado.....	94
<b>Figura 37:</b> Press <i>versus</i> número de variáveis latentes na construção dos modelos PLS para determinação do teor de 3TC do granulado .....	94
<b>Figura 38:</b> Press <i>versus</i> número de variáveis latentes na construção dos modelos PLS para determinação teor do núcleo de AZT .....	94
<b>Figura 39:</b> Press <i>versus</i> número de variáveis latentes na construção dos modelos PLS para determinação teor do núcleo de 3 TC.....	94
<b>Figura 40:</b> Press <i>versus</i> número de variáveis latentes na construção dos modelos PLS para determinação do teor de AZT no comprimido revestido.....	94
<b>Figura 41 :</b> Press <i>versus</i> número de variáveis latentes na construção dos modelos PLS para determinação do teor de 3 TC no comprimido revestido.....	94
<b>Figura 42:</b> Resíduos <i>versus</i> valores experimentais (do conjunto de calibração) obtidos pelo modelo de calibração PLS para umidade. ....	95
<b>Figura 43:</b> Resíduos <i>versus</i> valores experimentais (do conjunto de calibração) obtidos pelo modelo de calibração PLS para dureza. ....	95
<b>Figura 44 :</b> Resíduos <i>versus</i> valores experimentais (do conjunto de calibração) obtidos pelo modelo de calibração PLS para determinação de AZT no granulado.....	96
<b>Figura 45:</b> Resíduos <i>versus</i> valores experimentais (do conjunto de calibração) obtidos pelo modelo de calibração PLS para determinação de 3TC no granulado.....	96
<b>Figura 46:</b> Resíduos <i>versus</i> valores experimentais (do conjunto de calibração) obtidos pelo modelo de calibração PLS para determinação de AZT no núcleo .....	96

<b>Figura 47:</b> Resíduos <i>versus</i> valores experimentais (do conjunto de calibração) obtidos pelo modelo de calibração PLS para determinação de 3TC no núcleo .....	96
<b>Figura 48:</b> Resíduos <i>versus</i> valores experimentais (do conjunto de calibração) obtidos pelo modelo de calibração PLS para determinação de AZT nos comprimidos revestidos .....	96
<b>Figura 49:</b> Resíduos <i>versus</i> valores experimentais (do conjunto de calibração) obtidos pelo modelo de calibração PLS para determinação de 3TC nos comprimidos revestidos .....	96
<b>Figura 50:</b> Valor de referência <i>versus</i> valor previsto pelo modelo PLS para determinação de umidade no material granulado.....	97
<b>Figura 51:</b> Valor de referência <i>versus</i> valor previsto pelo modelo PLS para determinação da dureza do núcleo.....	97
<b>Figura 52:</b> Valor de referência <i>versus</i> valor previsto pelo modelo PLS para determinação do teor de AZT no granulado.....	97
<b>Figura 53:</b> Valor de referência <i>versus</i> valor previsto pelo modelo PLS para determinação do teor de 3TC no granulado.....	97
<b>Figura 54:</b> Valor de referência <i>versus</i> valor previsto pelo modelo PLS para determinação do teor de AZT no núcleo .....	98
<b>Figura 55:</b> Valor de referência <i>versus</i> valor previsto pelo modelo PLS para determinação teor de 3TC no núcleo.....	98
<b>Figura 56:</b> Valor de referência <i>versus</i> valor previsto pelo modelo PLS para determinação do teor de AZT no comprimido revestido .....	98
<b>Figura 57:</b> Valor de referência <i>versus</i> valor previsto pelo modelo PLS para determinação do teor de 3TC no comprimido revestido.....	98
<b>Figura 58:</b> Posição das variáveis selecionadas durante a construção do modelo MLR-APS para determinação de umidade.....	99
<b>Figura 59:</b> Posição das variáveis selecionadas durante a construção do modelo MLR-APS para determinação de dureza.....	99
<b>Figura 60:</b> Posição das variáveis selecionadas durante a construção do modelo MLR-APS para 3 TC nos granulados.....	100
<b>Figura 61:</b> Posição das variáveis selecionadas durante a construção do modelo MLR-APS para AZT nos granulados.....	100
<b>Figura 62:</b> Posição das variáveis selecionadas durante a construção do modelo MLR-APS para determinação de 3TC nos núcleos.....	100
<b>Figura 63-</b> Posição das variáveis selecionadas durante a construção do modelo MLR-APS para determinação de AZT nos núcleos.....	100
<b>Figura 64 :</b> Posição das variáveis selecionadas durante a construção do modelo MLR-APS para determinação de 3 TC nos comprimidos revestidos.....	101
<b>Figura 65 :</b> Posição das variáveis selecionadas durante a construção do modelo MLR-APS para determinação de AZT nos comprimidos revestidos.....	101
<b>Figura 66:</b> Resíduos <i>versus</i> valores experimentais obtidos (conjunto de calibração) pelo modelo MLR-APS na determinação de umidade.....	102
<b>Figura 67:</b> Resíduos <i>versus</i> valores experimentais obtidos (conjunto de calibração) pelo modelo MLR-APS na determinação da dureza.....	102
<b>Figura 68:</b> Resíduos <i>versus</i> valores experimentais obtidos (conjunto de calibração) pelo modelo MLR-APS na determinação de AZT no granulado .....	102
<b>Figura 69 :</b> Resíduos <i>versus</i> valores experimentais obtidos (conjunto de calibração) pelo modelo MLR-APS na determinação de 3TC no granulado.....	102

<b>Figura 70:</b> Resíduos <i>versus</i> valores experimentais obtidos (conjunto de calibração) pelo modelo MLR-APS na determinação de AZT no núcleo .....	103
<b>Figura 71:</b> Resíduos <i>versus</i> valores experimentais obtidos (conjunto de calibração) pelo modelo MLR-APS na determinação de 3TC no núcleo .....	103
<b>Figura 72:</b> Resíduos <i>versus</i> valores experimentais obtidos (conjunto de calibração) pelo modelo MLR-APS na determinação de AZT nos comprimidos revestido. ...	103
<b>Figura 73 :</b> Resíduos <i>versus</i> valores experimentais obtidos (conjunto de calibração) pelo modelo MLR-APS na determinação de 3TC nos comprimidos revestidos.. .....	103
<b>Figura 74:</b> Valor de referência <i>versus</i> valor previsto pelo modelo MLR-APS para determinação de umidade no material granulado.....	104
<b>Figura 75:</b> Valor de referência <i>versus</i> valor previsto pelo modelo MLR-APS para determinação da dureza.....	104
<b>Figura 76:</b> Valor de referência <i>versus</i> valor previsto pelo modelo MLR-APS para determinação do teor de AZT no granulado.....	104
<b>Figura 77:</b> Valor de referência <i>versus</i> valor previsto pelo modelo MLR-APS para determinação do teor de 3TC no granula. ....	104
<b>Figura 78:</b> Valor de referência <i>versus</i> valor previsto pelo modelo MLR-APS para determinação do teor de AZT no núcleo .....	105
<b>Figura 79:</b> Valor de referência <i>versus</i> valor previsto pelo modelo MLR-APS para determinação do teor de 3TC no núcleo.....	105
<b>Figura 80:</b> Valor de referência <i>versus</i> valor previsto pelo modelo MLR-APS para determinação do teor de AZT no comprimido revestido .....	105
<b>Figura 81 :</b> Valor de referência <i>versus</i> valor previsto pelo modelo MLR-APS para determinação do teor de 3TC no comprimido revestido.....	105

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Resultados da validação do método (CLAE). .....	66
<b>Tabela 2:</b> Resultados da validação dos métodos baseados em espectrofotometria derivativa para o AZT + 3TC. ....	71
<b>Tabela 3:</b> Parâmetros avaliados na robustez para o UV/derivadas. $t=2.77$ e $n=3$ . ....	72
<b>Tabela 4:</b> Resultados da validação do método calibração multivariada (PLS). ....	74
<b>Tabela 5:</b> Parâmetros avaliados na robustez para a UV/PLS. $t=2.77$ e $n=3$ . ....	76
<b>Tabela 6:</b> Resultados dos teores dos diferentes fabricantes e métodos. ( $n=8$ ).....	78
<b>Tabela 7:</b> Resultados obtidos do percentual dissolvido do comprimido dose fixa combinada AZT + 3TC nas amostras do laboratório -A empregando os métodos CLAE, PLS, $ED^1$ e $ED^2$ . ....	80
<b>Tabela 8:</b> Resultados obtidos do percentual dissolvido do comprimido dose fixa combinada AZT + 3TC nas amostras do laboratório -B empregando os métodos CLAE, PLS, $ED^1$ e $ED^2$ . ....	81
<b>Tabela 9:</b> Resultados obtidos do percentual dissolvido do comprimido dose fixa combinada AZT + 3TC nas amostras do laboratório -C empregando os métodos CLAE, PLS, $ED^1$ e $ED^2$ . ....	82
<b>Tabela 10:</b> Resultados obtidos do percentual dissolvido do comprimido dose fixa combinada AZT + 3TC nas amostras do laboratório -D empregando os métodos CLAE, PLS, $ED^1$ e $ED^2$ . ....	83
<b>Tabela 11:</b> Resultados obtidos do percentual dissolvido do comprimido dose fixa combinada AZT + 3TC nas amostras do laboratório -E empregando os métodos CLAE, PLS, $ED^1$ e $ED^2$ . ....	84
<b>Tabela 12:</b> Parâmetros dos modelos PLS e MLR desenvolvidos para umidade do granulado e dureza. ....	106
<b>Tabela 13:</b> Validação dos modelos PLS e MLR para determinar o teor de umidade no granulado e dureza do núcleo. ....	108
<b>Tabela 14:</b> Determinação de umidade pelo método de K.F, NIR e Balança. ....	109
<b>Tabela 15:</b> Parâmetros de desempenho dos modelos PLS desenvolvidos para quantificação do AZT + 3TC nos materiais granulados, núcleos e comprimidos revestidos. ....	111
<b>Tabela 16:</b> Validação dos modelos PLS desenvolvidos para quantificação do AZT+3TC nos materiais granulados, núcleos e comprimidos revestidos. ....	112

**Tabela 17:** Figuras de méritos obtidos para os modelos desenvolvidos para quantificação do AZT + 3TC nos materiais granulados, núcleos e comprimidos revestidos para os modelos MLR..... 113

**Tabela 18:** Parâmetro da Validação do método desenvolvidos para quantificação do AZT+3TC nos materiais granulados, núcleos e comprimidos revestidos para os modelos MLR..... 115

## RESUMO

A lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) são análogos de nucleosídeos e potentes inibidores seletivos para os vírus da imunodeficiência humana 1 e 2 (HIV-1 e HIV-2). O emprego da combinação dose fixa, na terapêutica contra a *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS), é de primeira escolha para tratamento de pacientes com infecções por HIV. A única metodologia encontrada em compêndios oficiais para determinação do teor dessa associação em comprimidos é por cromatografia líquida de alta eficiência que foi recentemente publicada na Farmacopéia Americana. O objetivo deste trabalho é desenvolver métodos analíticos utilizando a espectrofotometria derivativa e calibração multivariada para determinação da zidovudina e lamivudina combinados em dose fixa em preparações farmacêuticas, utilizando as regiões espectrais do ultravioleta (UV) e do infravermelho próximo (NIR), além de verificar outras propriedades como dureza do núcleo e umidade no granulado. Os métodos espectrofotométricos derivativas e multivariados usando UV foram aplicados com sucesso às amostras dos granulados, núcleos e comprimidos revestidos de AZT+3TC em dose fixa combinada, nas diferentes apresentações. Os métodos espectrofotométricos derivativos e regressão por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares Regression*–PLS) propostos utilizando a espectrofotometria na região UV foram desenvolvidos, validados e apresentaram uma boa correlação e RMSEP para o AZT e 3 TC respectivamente (0,99 e 0,34; 0,98 e 0,41) segundo a *Internacional Conference on Harmonisation* (ICH) e O *Internacional Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e aplicados com sucesso às amostras dos comprimidos, AZT+3TC, dose fixa combinada, de diferentes fabricantes. O perfil de dissolução destes comprimidos também foi possível prever de forma confiável empregando estes métodos. Os métodos espectrofotométricos utilizando a região do infravermelho próximo e calibração multivariada, tanto por PLS quanto empregando regressão linear múltipla (*Multiple Linear Regression* – MLR), foram validados e aplicados na determinação de dureza, determinação de água nos granulados e teores do AZT e 3 TC nos granulados, núcleos e comprimidos revestidos, fornecendo resultados confiáveis de RMSEP para o modelo PLS e os testes realizados respectivamente (0,21; 0,98; 7,11; 8,15; 9,41; 5,86; 5,99; 5,07) e para o modelo MLR (0,27; 1,12; 8,86; 8,20; 11,72; 5,77; 10,92; 9,96). Esses métodos atendem aos requisitos de tecnologia analítica de processo (*Process Analytical Technology*–PAT) que requer metodologias que possam ser facilmente adaptadas ao processo industrial existente; permitam monitoramento de diferentes etapas do processo e forneçam resultados confiáveis de forma simples, rápida e pouco onerosa.

Palavras chaves: zidovudina, lamivudina, calibração multivariada, espectrofotometria no ultravioleta, espectrofotometria e infravermelho próximo.

## ABSTRACT

Lamivudine (3TC) and zidovudine (AZT) are analogues of nucleosides and potent selective inhibitors for the human immunodeficiency viruses 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2). Use of a fixed dose combination therapy against the *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS), is the first choice for treating patients with HIV infections. The only methodology found in official pharmaceutical compendia for determining the respective amounts of each in tablets is by high performance liquid chromatography, as recently published in the American pharmacopoeia. The purpose of this work is to develop analytical methods using derivative spectrophotometry and multivariate calibration to determine the amounts of zidovudine and lamivudine fixed-dose combinations in pharmaceutical preparations using spectral regions of ultraviolet (UV) and near infrared (NIR), in addition to checking other properties such as core hardness and grain moisture. Spectrophotometric derivatives and multivariate UV methods proposed were applied successfully to grain samples and tablets cores and coated tablets with AZT + 3TC fixed-dose combination in different percentages. Spectrophotometric derivatives and methods employing partial least squares regression (Partial Least Squares Regression – PLS) using UV spectral region were developed and validated and showed a good correlation and RMSE for AZT and 3 TC respectively (0.99 and 0.34; 0.98 and 0.41) according to the *International Conference on Harmonisation* (ICH) and the *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) and successfully applied to samples of AZT + 3TC, fixed-dose combination tablets from different manufacturers. The dissolution profile of these tablets was also possible to predict reliably using these methods. The spectrophotometric methods using near-infrared region and multivariate calibration, either with PLS or by employing multiple linear regression (Multiple Linear Regression-MLR), were validated and then applied to analyze hardness in cores, moisture in the grain and AZT / 3TC content in grains, cores and coated tablets, providing reliable results RMSEP for the PLS model and the tests respectively (0.21, 0.98, 7.11, 8.15, 9.41, 5.86, 5.99, 5.07) and the MLR model (0.27, 1.12, 8.86, 8.20, 11.72, 5.77, 10.92, 9.96). These methods meet the requirements of *Process Analytical Technology* –PAT which requires methodologies that can be easily adapted to existing industrial processes, enable monitoring of different stages of the process, and provide reliable results simply, quickly and inexpensively.

Keywords: zidovudine, lamivudine, multivariate calibration, ultraviolet spectrophotometry, infrared spectrophotometry.

# **INTRODUÇÃO**

## 1.0 INTRODUÇÃO

A lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) são análogos de nucleosídeos e potentes inibidores seletivos para os Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1 e HIV-2). A lamivudina tem se mostrado altamente sinérgica à zidovudina, inibindo a replicação do HIV em culturas celulares<sup>[1,2]</sup>.

A combinação de fármacos anti-retrovirais tem demonstrado maior eficácia que a monoterapia, como primeira escolha para o tratamento de pacientes com infecção por HIV<sup>[3]</sup>. A 3TC induz a resistência viral a ela própria, restituindo a sensibilidade ao AZT na transcriptase reversa em muitos pacientes que apresentam processo de resistência associada ao AZT por meio de mutação, enfraquecendo a virulência e a capacidade de replicação viral do HIV-1 e diminuindo a diversificação genética desta enzima<sup>[4]</sup>.

O emprego da dose fixa combinação, na terapêutica frente a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), é cada dia mais presente. Sua comercialização requer que os laboratórios farmacêuticos produtores tenham metodologias capazes de acompanhar as etapas da produção, garantido um produto de qualidade para a população.

A cromatografia, muito utilizada nos compêndios oficiais quando se trata de dose fixa combinada, é considerada a técnica de primeira escolha para análises deste tipo de associação, já que promove a separação física dos compostos e permite a quantificação dos mesmos através de uma única resposta do detector. Atualmente os avanços instrumentais na área da cromatografia líquida permitem análises mais eficientes e robustas. Entretanto, tal método envolve o uso de reagentes tóxicos ao homem e meio ambiente, necessitam de grandes quantidades de reagentes e consumíveis e tempo relativamente longo, tornando muitas vezes a etapa de controle de processo de produção demorada e de alto custo para o setor produtivo.

A implementação de tecnologias analíticas de processo (*Process Analytical Technology - PAT*) na indústria requer o desenvolvimento de novas metodologias que possam ser facilmente adaptadas ao processo industrial existente; que permitam monitoramento de diferentes etapas do processo, visualizando a evolução e caracterização do mesmo, de forma a rapidamente corrigir desvios observados nas especificações de qualidade medidas em tempo real; e que forneçam resultados confiáveis de forma simples e pouco onerosa<sup>[5]</sup>.

Métodos alternativos que atendam a estes requisitos são importantes. A espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta é uma das técnicas instrumentais mais freqüentemente utilizados no laboratório. Sua principal vantagem é ser simples, relativo baixo custo e instrumental de fácil operação. A principal desvantagem é sua baixa seletividade além da necessidade de dissolução da amostra. A baixa seletividade está relacionada ao fato de que certos compostos podem apresentar absorção na mesma região no espectro eletromagnético, o que conseqüentemente, causa interferências espectrais. A melhora na sensibilidade e seletividade pode ser conseguida pelo uso de reagentes seletivos, reações com agentes mascarantes ou pela separação do analito a partir da matriz. Contudo, a introdução de operações adicionais aumenta os riscos de contaminação e perda do espécie química de interesse<sup>[6]</sup>.

A utilização dos métodos empregando a espectrofotometria derivativa e a calibração multivariada, em especial da técnica de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares Regression* -PLS), tem permitido bons resultados sem prévia separação, principalmente em análises de produtos alimentícios, como corantes<sup>[7]</sup>, e em análises de fármacos quando se trata de dose fixa combinada<sup>[8,9]</sup>.

A espectrofotometria de absorção na região do infravermelho próximo (NIR) constitui uma das técnicas de monitorização e controle de qualidade em processo com maior potencial na indústria farmacêutica<sup>[10]</sup>. A espectrofotometria NIR, assim como a ultravioleta apresentam desvantagens, como bandas largas, falta de seletividade e sobreposição. Para eliminar esses problemas de seletividade e sobreposição, pode-se recorrer aos métodos de análises e calibração multivariada. A associação da espectrofotometria NIR e a calibração multivariada permitem análises de forma rápida, não destrutiva, de baixo custo, e com excelente confiabilidade<sup>[11]</sup>.

Sendo assim, o presente estudo consiste em desenvolver e validar métodos alternativos aos cromatográficos utilizando a calibração multivariada espectrofotometria derivativa no ultravioleta e espectrofotometria no infravermelho próximo para determinação de AZT+3TC dose fixa combinada em preparação farmacêutica sólida de vários fabricantes. Também foram desenvolvidos métodos para verificar outras propriedades como a dureza do núcleo e umidade presente no granulado. Nesta perspectiva os resultados permitiram ainda a redução dos custos de análises e de impacto ambiental.

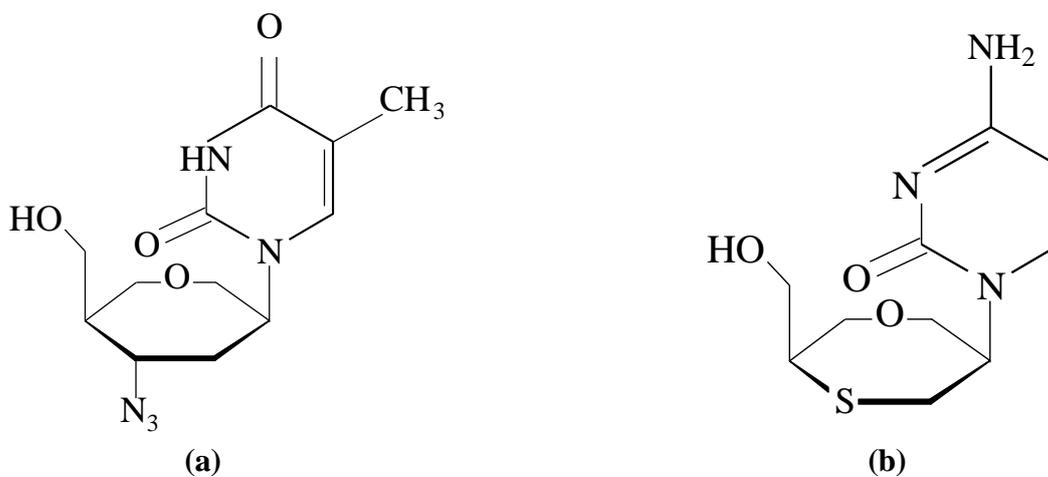
# **REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.0 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Fármacos anti-retrovirais

As fórmulas moleculares planas de AZT e 3TC, estão apresentadas na Figura 1 e descritos na denominação comum brasileira (DCB) nº 30516-87-1 e 134678-17-4. Nos compêndios oficiais estes fármacos são descritos como 1-(3-azido-2,3-didesoxi-β-D-ribofuranosil)-5-metilpirimidino-2,4(1H,3H)-diona e (2R-cis)-4-amino-1-[2(hidroximetil)-1,3-oxatolona-5-il]-2(1H)-pirimididona, respectivamente.

A AZT (Figura 1a) se apresenta como pó branco ou acastanhado e tem fórmula química  $C_{10}H_{13}N_5O_4$ , com massa molar de 267,2 g/mol. Apresenta solubilidade em etanol, água e um ponto de fusão de aproximadamente 124 °C. Já a 3TC (Figura 1b) se apresenta sob a forma de pó cristalino de cor branca ou branco-amarelada, possui fórmula molecular  $C_8H_{11}N_3O_3S$ , massa molar de 229,26 g/mol e ponto de fusão na faixa de 176 a 178 °C, sendo solúvel em etanol e água.



**Figura 1:** Estruturas moleculares planas da AZT (a) e 3TC (b).

A AZT foi o primeiro anti-retroviral aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1987. Contudo, seu uso prolongado promoveu o aparecimento de efeitos tóxicos, resistência viral e falha terapêutica. A monoterapia com AZT em casos avançados da doença promoveu resistência ao fármaco em seis meses. O mesmo ocorreu com a 3TC em menor intervalo de tempo. Deste modo, combinações de fármacos foram urgentemente requisitadas para conter a resistência e a replicação viral<sup>[12]</sup>. A 3TC foi sintetizada, modificando-se a estrutura da molécula 2'3'-didesoxicidina (análogo sintético da citidina) com a substituição do

metileno por um átomo de enxofre no carbono 3` do anel da ribos<sup>[13]</sup>, com a finalidade de aumentar a segurança durante o longo prazo da terapia.

A terapia combinada tem se demonstrado mais eficaz que a monoterapia com AZT<sup>[14]</sup>. A associação de 3TC e AZT mostrou sinergismo *in vitro*. A 3TC induz a resistência viral a ele próprio, restituindo a sensibilidade ao AZT na transcriptase reversa em muitos pacientes que apresentam processo de resistência associada ao AZT por meio de mutação, enfraquecendo a virulência e a capacidade de replicação viral do HIV-1 e diminuindo a diversificação genética da enzima deste<sup>[15]</sup>.

O termo dose fixa combinada (DFC) refere-se à associação de classes variadas de fármacos de diversas combinações, e é o regime terapêutico indicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Dentre as vantagens dessa associação podem-se citar: o baixo custo, a eficácia e a tolerabilidade semelhante a outros esquemas terapêuticos, melhor adesão ao tratamento e menor número de comprimidos/cápsulas ingeridas. Essa última é uma das mais importantes características, visto ser um dos pré-requisitos da ineficácia de grande parte dos tratamentos<sup>[16]</sup>.

## 2.2 Controle de qualidade de produtos farmacêuticos

O controle de qualidade na indústria farmacêutica faz parte de um conjunto de ações denominadas de Boas Práticas de Fabricação (BPF), dirigida no sentido de diminuir os riscos inerentes a cada fase do processo, e que podem ser divididas em duas etapas bem definidas: o controle de qualidade da formulação durante o processo de produção e o controle de qualidade do produto final. Para as duas etapas, há exigência, por parte dos órgãos reguladores, de métodos de análises confiáveis e robustos e que possam ser utilizados na rotina para assegurar a qualidade do produto final<sup>[17]</sup>.

A associação entre dois ou mais fármacos é um recurso terapêutico bastante comum, utilizado na maioria das vezes com o objetivo de potencializar a ação esperada do medicamento. Vários exemplos de associações de fármacos, hormônios, vitaminas, antibióticos, anti-hipertensivo entre outros estão descritos na literatura<sup>[18]</sup>.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais empregada pela indústria farmacêutica no controle de qualidade em processo e do produto final, sobretudo quando se trata de associação, devido principalmente à capacidade de separação dos analitos, permitindo a análise de misturas complexas. No entanto, estes métodos são dispendiosos,

trabalhosos, consomem grandes quantidades de reagentes, necessitam de muitas manipulações analíticas e, além disso, geram resíduos químicos prejudiciais ao homem e ao meio ambiente. Esses métodos ainda possuem a característica de serem destrutivos, consumirem tempo na linha de produção, além de necessitar de equipamentos e mão-de-obra especializados.

Um problema analítico clássico é a determinação simultânea de dois ou mais componentes ativos em uma mesma amostra em diversas formas farmacêuticas, sem prévia separação química<sup>[19]</sup>. As monografias oficiais, como a Farmacopéia Brasileira<sup>[20]</sup> e Farmacopéia Americana<sup>[21]</sup>, descrevem o doseamento de AZT e 3TC isoladamente na matéria-prima ou em diferentes formas farmacêuticas, não tendo sido encontradas também em outros compêndios oficiais<sup>[22-25]</sup>, monografias que determinassem o teor dessa associação em comprimidos. Recentemente a Farmacopéia Americana (USP-33, 2010) disponibilizou a metodologia para o doseamento da associação de AZT + 3TC em comprimido. Na literatura encontram-se descritas metodologias analíticas usadas para determinar as associações desses fármacos incluindo outros princípios ativos<sup>[26]</sup>. Um método utilizando a cromatografia líquida com detector UV foi descrito para análises dessas duas substâncias associadas em comprimidos<sup>[27]</sup>. Em fluidos biológicos também são descritos métodos que utilizam a cromatografia líquida com detector de UV, ou ainda associados à espectrofotometria de massas<sup>[28-31]</sup>.

## **2.3 Métodos espectrofotométricos para análise de fármacos**

### ***2.3.1 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta***

A espectrofotometria na região ultravioleta e visível (UV/VIS) apresenta um conjunto de características favoráveis, as quais deveriam garantir a sua condição de ferramenta analítica de primeira escolha. Trata-se de uma técnica consolidada, de fácil implementação, baixo custo e sensibilidade compatível com muitas das necessidades que surgem no controle de qualidade de produtos farmacêuticos. No entanto, a baixa seletividade desta técnica faz com que sua aplicabilidade fique seriamente comprometida, principalmente, quando há necessidade de se analisar matrizes complexas multielemento, devido à sobreposição espectral<sup>[32]</sup>.

A espectrofotometria derivativa consiste na representação da razão da variação da absorvância em função do comprimento de onda. Nesta técnica, os espectros são registrados a partir dos valores da primeira ou segunda derivada do espectro de ordem zero em função do comprimento de onda ( $\lambda$ ). A diferenciação da lei de Lambert Beer ( $d^n A/d\lambda^n = cb(d^n \epsilon/d\lambda^n)$ ) mostra que as derivadas são sempre proporcionais às concentrações do analito, sendo as aplicações analíticas baseadas nesta relação<sup>[33]</sup>.

A espectrofotometria derivativa é atualmente uma ferramenta matemática adicional a espectrofotometria UV-VIS, que auxilia na resolução de diversos problemas analíticos, pois oferece maior seletividade, possibilita a separação do sinal sobreposto, elimina o sinal de fundo causado pela presença de outros compostos e permite a quantificação de um ou mais analitos sem prévia separação e/ou purificação. O uso desta técnica pode tornar desnecessária a etapa preliminar de separação das espécies a serem determinadas, simplificando o procedimento analítico e, conseqüentemente, aumentando a velocidade analítica<sup>[34-37]</sup>. Os métodos baseados no uso desta técnica têm apresentado resultados satisfatórios na determinação de misturas de vários princípios ativos nas formulações farmacêuticas. A desvantagem desse método reside na necessidade do uso de equipamentos mais caros, digitais controlados por microprocessador.

Foram encontradas aplicações dessa ferramenta em muitos campos da ciência, principalmente no campo farmacêutico<sup>[38-44]</sup>. Trabalhos utilizando essa técnica aplicada a determinação de dose fixa combinada de anti-retrovirais também foram encontrados. Uslu e colaboradores<sup>[45]</sup> desenvolveram e validaram a metodologia para determinação simultânea do AZT e 3TC, por espectrofotometria derivativa utilizando o metanol como solvente. Aplicaram o método a misturas sintéticas de único fabricante com sucesso. Kapoor e colaboradores<sup>[46]</sup> utilizaram com sucesso o método da derivada espectrométrica para determinar simultaneamente os fármacos estavudina (d4T) e lamivudina (3TC) em dose fixa combinada de anti-retroviral obtendo bons resultados.

Além da espectrofotometria derivativa, vários métodos estatísticos e matemáticos vêm sendo utilizados para resolver problemas analíticos. Esses métodos permitem explorar toda a informação fornecida por técnicas instrumentais, como as espectrofotometrias na região ultravioleta e no infravermelho próximo, o que favorece o desenvolvimento de modelos de calibração confiáveis mesmo em situações de sobreposição espectral ou complexidade do sinal.

A literatura é farta em descrever aplicações da espectrofotometria no UV/VIS associada a métodos de calibração multivariada para análises em preparações farmacêuticas, entre esses

métodos o PLS (Regressão por Mínimo Quadrados Parciais) tem se mostrado uma ferramenta importante quando aplicada a problemas analíticos na área farmacêutica<sup>[47-52]</sup>.

### ***2.3.2 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho próximo***

A espectrofotometria no infravermelho teve início no século dezenove com o trabalho pioneiro do músico e astrônomo alemão Frederick William Herschel. O interesse pela astronomia despertou a curiosidade de Herschel com relação às propriedades físicas da radiação eletromagnética na região do visível. Ele observou que uma das cores decompostas pelo prisma apresentava quantidade de energia distinta e, para monitorar a quantidade de energia associada a cada cor, utilizou um termômetro, verificando que abaixo do vermelho, onde não havia mais luz visível, havia uma pequena variação de temperatura. Esta região foi denominada de infravermelho (IR). O experimento realizado por Herschel foi importante, não somente pela descoberta da radiação infravermelha, mas também, por demonstrar que existem formas de luz que não podem ser observadas pelo olho humano. A partir de seus estudos, outros trabalhos foram desenvolvidos utilizando faixas espectrais como o infravermelho próximo, médio e distante e também a região do ultravioleta<sup>[53]</sup>. A espectrofotometria na região do infravermelho médio alcançou grande desenvolvimento devido à potencialidade que a técnica apresentou na caracterização e quantificação de diferentes espécies químicas.

A radiação infravermelha não é suficientemente energética para causar transições eletrônicas e a absorção dessa radiação está muito restrita a espécies moleculares que possuem pequenas diferenças de energia entre vários estados vibracionais e rotacionais. O espectro de absorção no infravermelho tem origem quando a radiação eletromagnética incidente tem energia correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais. Para que ocorra absorção da radiação no infravermelho é necessário que ocorra variação no momento de dipolo elétrico da molécula como consequência do seu movimento vibracional ou rotacional. O momento de dipolo é determinado pela magnitude das diferenças de carga e distância entre dois centros de cargas<sup>[11,54]</sup>.

As vibrações moleculares podem ser estiramentos, deformações ou torsões. As vibrações de estiramento envolvem uma mudança contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos; as vibrações de deformação envolvem mudanças nos ângulos planos entre duas ligações e as torsões envolvem mudanças no ângulo diédrico entre dois planos<sup>[55]</sup>.

Na faixa de radiação do infravermelho distinguem-se três regiões: o infravermelho próximo (12800 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ), médio (4000 a 200  $\text{cm}^{-1}$ ) e distante (200 a 10  $\text{cm}^{-1}$ ). No infravermelho médio encontram-se as bandas correspondentes a transições fundamentais. As absorções moleculares de sobretons correspondentes a vibrações de ligações C-H, N-H, O-H, ocorrem com números de ondas de 12000 a 9000  $\text{cm}^{-1}$  e as bandas de combinação ocorrem de 5500 a 3500  $\text{cm}^{-1}$ <sup>[11]</sup>, isto é, na região do infravermelho próximo (NIR).

A mecânica quântica, assumindo o modelo do oscilador harmônico, prevê separações iguais entre os níveis vibracionais e impõe a regra de seleção  $\Delta v = \pm 1$ . Para oscilações anarmônicas, a separação entre os níveis já não é igualmente espaçada e diminui para energias mais altas. Assim, a regra de seleção  $\Delta v = \pm 1$  é relaxada e transições com  $\Delta v = \pm 2$  ou  $\Delta v = \pm 3$  dão origem aos sobretons, que são as transições observadas no NIR. As bandas de combinação são resultantes de interferências construtivas de frequências, isto é, suas frequências são a soma dos múltiplos da cada frequência de interação<sup>[11]</sup>.

Inicialmente o uso da espectrofotometria no infravermelho em química restringiu-se basicamente a identificação e quantificação de algumas poucas espécies químicas em casos bem específicos devido às limitações instrumentais, superadas posteriormente com o desenvolvimento de equipamentos mecânicos e ópticos mais precisos<sup>[54, 55]</sup>.

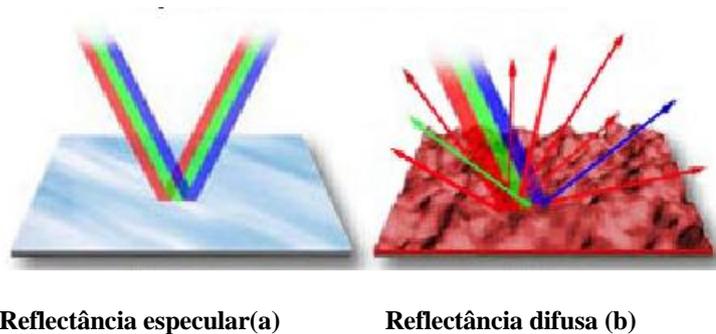
A partir da década de 70, com o desenvolvimento dos espectrofotômetros com transformada de Fourier, da informática, do interfaceamento de instrumentos eletrônicos com computadores e a introdução de recursos matemáticos mais sofisticados, teve início uma nova fase nas aplicações da espectrofotometria no infravermelho para fins analíticos. Nesta etapa as análises quantitativas expandiram-se para as regiões espectrais do infravermelho médio (MIR) e próximo (NIR). A partir daí houve um surpreendente interesse de vários grupos de pesquisas acadêmicas, governamentais e industriais, na tentativa de desenvolver metodologias de análises utilizando esta faixa espectral eletromagnético. Como consequência, houve um impacto direto na produtividade, redução de gastos e minimização de resíduos<sup>[11, 54]</sup>. Deste modo, as espectrofotometrias vibracionais como infravermelho próximo e infravermelho médio, utilizando instrumentos dispersivos ou interferométricos, têm sido extensivamente utilizadas nas duas últimas décadas em diferentes tipos de aplicações analíticas.

Um grande número de metodologias analíticas desenvolvidas com base em espectros NIR demonstra a capacidade desta técnica. A área agrícola foi a primeira a utilizá-la, sendo um

de seus usos mais recentes o apoio à agricultura de precisão onde dados coletados em tempo real são correlacionados com a composição do solo<sup>[56]</sup>. Atualmente, o grande número de metodologias desenvolvidas com base em espectros NIR demonstra a habilidade dessa técnica em lidar com problemas tão diversos<sup>[57]</sup>. Esse grande avanço na aplicação do NIR só foi possível devido a associação com métodos quimiométricos de análise e calibração multivariada.

Os espectros no infravermelho podem ser obtidos a partir de amostras de diferentes naturezas: sólidas, líquidas e gasosas. A qualidade de seus espectros depende do método de preparo da amostra e do tipo de acessórios utilizado para a sua obtenção. Os métodos mais empregados para amostras sólidas envolvem reflectância e transmitância.

A reflectância difusa ocorre em superfícies não totalmente planas, podendo o substrato ser contínuo ou fragmentado. A energia radiante os modos vibracionais penetra na camada superficial das partículas (Figura 2), excitando os modos vibracionais da molécula a ser analisada e então, tem-se um espalhamento em todas as direções. A energia refletida emerge aleatoriamente da amostra em todas as direções. Esta energia refletida difusamente carrega informação suficiente para obtenção do espectro na região do infravermelho próximo<sup>[56]</sup>.



**Figura 2 a-b:** Representação da técnica de reflectância especular e difusa<sup>[58]</sup>.

A concentração dos compostos em estudo não é completamente proporcional à intensidade espectral, sendo necessário utilizar funções e fórmulas complexas para este fim, como é o caso da função de Kubelka-Munk<sup>[59]</sup> conforme equação 1

$$f(C) = \frac{(1-R)^2}{2R} = \frac{k}{s} \quad \text{onde,} \quad R = \frac{I_R}{I_{RO}} \quad (1)$$

onde:  $R$  é a reflectância difusa;  $k$  é o coeficiente de absorção da amostra;  $s$  é o coeficiente de espalhamento da amostra;  $I_R$  é a intensidade da radiação refletida pela amostra;  $I_{R0}$  é a intensidade da radiação refletida por um padrão.

A equação de Kubelka-Munk, assim como a lei de Lambert Beer, é limitada e só pode ser aplicada para bandas de absorção de baixa intensidade. Esta limitação ocorre quando se utiliza a espectrofotometria NIR, pois não é possível separar a absorção do analito da absorção da matriz, ocorrendo desvios de linearidade. A equação de Kubelka-Munk (**equação 1**) é raramente empregada, sendo substituída pela **equação 2**. Os resultados são semelhantes àqueles obtidos pela equação de Kubelka-Munk para pequenos valores de refletância, que constituem a grande maioria dos casos, na qual pode ser assumido um comportamento linear entre a concentração e  $\log 1/R$ <sup>[59,60]</sup>.

$$f(C) = \log \frac{1}{R} \quad \text{onde,} \quad R = \frac{I_R}{I_{R0}} \quad (2)$$

### ***2.3.3 Aplicação da espectrofotometria no infravermelho próximo na indústria farmacêutica***

A espectrofotometria no infravermelho médio possui a tradição de ser uma técnica que apresenta a impressão digital de milhares de substâncias orgânicas. A absorvância em uma frequência particular é característica de um grupo funcional presente no composto químico. A espectrofotometria no infravermelho oferece oportunidades analíticas quase que ilimitadas para muitas áreas de produção e controle de qualidade. Desta forma, vem ganhando muito espaço nos laboratórios analíticos e em análises de controle de qualidade em processos industriais, como indústrias farmacêuticas, alimentos, têxteis, petroquímicos, polímeros<sup>[5,57]</sup> etc. Isso ocorre devido ao relativo baixo custo da instrumentação, análise simultânea de vários parâmetros, técnica não destrutiva e não invasiva, permitir alta velocidade de processamento das informações e rápido obtenção de resultados quantitativos, não utilizando reagentes químicos nocivos ao meio ambiente, são menos laboriosas e de baixo custo. Além do mais, abrange uma ampla faixa de aplicações químicas e pode ser usada para determinações qualitativas e quantitativas.

O infravermelho próximo não foi considerado inicialmente como uma técnica analítica com algum valor prático, sendo originalmente, uma extensão da região do visível que não foi explorada até 1970. Os primeiros trabalhos que proporcionaram interesse pelo estudo da espectrofotometria no infravermelho próximo como ferramenta de análise na indústria, foram desenvolvidas na década de setenta pelo professor Karl Norris, quando este era responsável por grupo de pesquisa do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Entretanto, as limitações tecnológicas da época não permitiram o uso mais abrangente do infravermelho próximo como atualmente é observado em diversos setores industriais<sup>[56,61]</sup>.

Para a região do NIR, os sinais observados, como já comentado, são devidos essencialmente aos sobretons e bandas de combinação de estiramentos e deformações angulares de transições fundamentais de ligações X-H, em que representa átomos de oxigênios, nitrogênio, carbono, grupos aromáticos e também grupos funcionais importantes como os C-O, grupos carbonila, C-N, C-C, entre outros que sofrem estiramento. Diferente da espectrofotometria do infravermelho médio, os espectros NIR são menos úteis para identificação de grupos funcionais e mais úteis para análises quantitativas, sendo que a maior desvantagem da técnica, é provavelmente, a baixa sensibilidade a constituintes em menor concentração<sup>[11,54]</sup>.

Em particular as indústrias farmacêuticas também são exemplos do emprego com sucesso dessa técnica. Seja para a identificação de matéria-prima de partida quanto no monitoramento individual de diferentes fármacos, de modo que já é reconhecida nos métodos gerais de algumas farmacopéias<sup>[21,22]</sup>. A identificação de insumos é uma aplicação padrão da espectrofotometria NIR, e em geral, a principal motivadora para a aquisição de um instrumento. O procedimento usual é a comparação dos espectros dos insumos com os espectros arquivados em uma biblioteca utilizando técnicas quimiométricas de reconhecimento de padrões<sup>[62]</sup>.

Vários artigos vêm enfocando a aplicação da técnica NIR na indústria farmacêutica. Como ressaltado em dois artigos de revisão<sup>[5,57]</sup> a literatura é farta ao descrever propostas de aplicação da espectrofotometria NIR em várias etapas do processo produtivo na indústria farmacêutica. Exemplos podem ser visto na caracterização e monitoramento de pseudo-polimorfos e polimorfos no processo de fabricação<sup>[63,64]</sup>; determinação do princípio ativo de baixa concentração em preservativo<sup>[65]</sup>; estudo das propriedades físicas dos pós nos produtos farmacêuticos<sup>[66]</sup>; controle de processo na quantificação de um ou mais princípios ativos nas formas farmacêuticas sólidas<sup>[67,68,69]</sup>; além de outras aplicações como determinação de dureza em comprimidos e acompanhamento do perfil de dissolução<sup>[70,71]</sup>.

A espectrofotometria no ultravioleta e no NIR, como já ressaltado, tem as suas desvantagens, entre elas apresentam falta de seletividade, bandas largas e sobrepostas. Para resolver esses problemas recorre-se à quimiometria, em especial à calibração multivariada, no caso de análises quantitativas.

## 2.4 Quimiometria

A quimiometria é definida como uma disciplina da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados químicos, de forma a extrair maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos. Desde o seu surgimento no final dos anos 60 até os dias de hoje, foram desenvolvidos muitos métodos que tem tornado possível o processamento e interpretação de dados que antes seriam impossíveis de serem analisados. Um exemplo importante do sucesso da utilização da quimiometria são as análises realizadas na região do infravermelho próximo, as quais, sem a utilização de modelos de calibração multivariada não apresentam possibilidades para determinações quantitativas<sup>[72,73]</sup>.

A aplicação de métodos quimiométricos tem se difundido nas mais diversas áreas da química e ciências afins. O desenvolvimento de novos instrumentos aplicados aos laboratórios de pesquisas, passaram a fornecer uma grande quantidade de informações, o que criou a necessidade do desenvolvimento de uma ferramenta estatística sofisticada que pudesse ser aplicada a análise desses dados. Esse grande número de informações e tal necessidade, aliados a uma facilidade crescente de acesso a microcomputadores, possibilitou o crescimento da quimiometria. Ela divide-se em algumas áreas principais como: processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento e classificação de padrões, calibração multivariada, monitoramento e modelagem de processos multivariados e métodos de inteligência artificial<sup>[72]</sup>. Dentro dessa divisão, a principal linha de pesquisa da quimiometria aplicada à química analítica tem sido a construção de modelos de regressão a partir de dados de primeira ordem, ou seja, dados que podem ser representados através de um vetor para cada amostra, sendo a construção desses modelos denominada de calibração multivariada<sup>[74]</sup>.

Devido à sofisticação das técnicas analíticas, novos métodos quimiométricos são pesquisadas amplamente com o objetivo de resolver problemas de análises de dados multivariados<sup>[72,75]</sup>.

### 2.4.1 Calibração Multivariada

A calibração multivariada pode ser definida como a construção de modelos matemáticos para relacionar dados de saída de um instrumento (medidas instrumentais multivariadas) às concentrações dos analitos ou a outras propriedades das amostras<sup>[76]</sup>.

Os métodos multivariados são adequados para solução de problemas analíticos porque permitem estudos com várias espécies presentes ao mesmo tempo, não importando a existência ou ausência de diferenças espectrais marcantes entre elas nem a existência de alta correlação nos dados. É possível, também, a correção de problemas eventuais com linha base ou interferentes nas amostras usadas na calibração e nas novas amostras de previsão<sup>[74]</sup>.

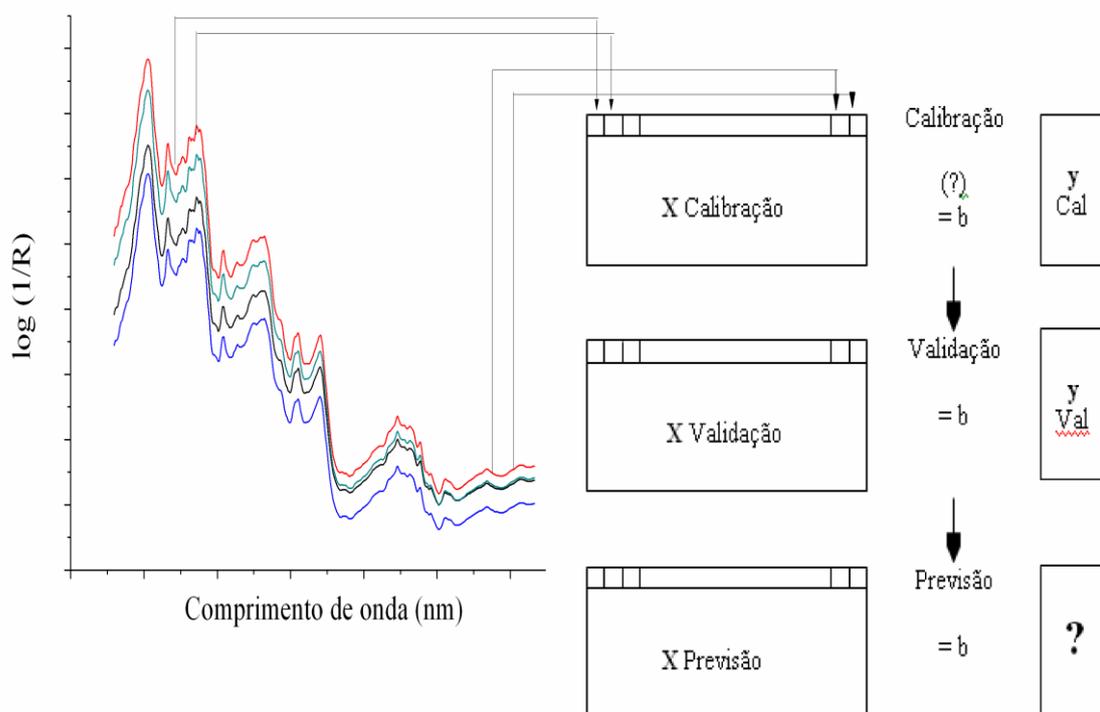
O processo de calibração multivariada é constituído basicamente de três fases: *a calibração, a validação e a previsão*. Na fase de calibração são construídos os modelos matemáticos e na fase de validação esses modelos são avaliados usando ferramentas estatísticas de diagnóstico. Na fase de previsão, os modelos matemáticos validados são aplicados para prever as concentrações ou propriedades de amostras desconhecidas<sup>[77]</sup>.

Um modelo de calibração, na verdade, é uma função matemática ( $f$ ) que relaciona dois grupos de variáveis, uma delas denominada dependente, aqui representada por um vetor  $\mathbf{y}$  e o outro grupo das variáveis independentes (a matriz  $\mathbf{X}$ ):

$$\mathbf{y} = f(\mathbf{X}) = \mathbf{X} \mathbf{b} \quad (3)$$

Esta etapa representa a calibração e por isso o conjunto de dados empregados para esta finalidade é chamado de conjunto de calibração. Os parâmetros do modelo são denominados de coeficientes de regressão ( $\mathbf{b}$ ) determinados matematicamente a partir dos dados experimentais<sup>[78-79]</sup>. Após a construção do modelo de regressão, deve-se utilizar uma série de amostras externas para verificar a capacidade do mesmo em realizar previsões confiáveis, denominada conjunto de previsão. Neste conjunto são incluídas amostras, de composição diferente das amostras que faziam parte do conjunto de calibração, mais representativas da população<sup>[78]</sup>.

Os dados para a calibração multivariada podem ser organizados conforme ilustra a Figura 3. Os valores de absorvância dos espectros, a cada número de onda, correspondem às variáveis independentes (Matrix  $\mathbf{X}$ ), e as concentrações das amostras, definida pelo método de referência, indicam as variáveis dependentes (vetor  $\mathbf{y}$ )



**Figura 3:** Organização dos dados para calibração multivariada.

A cada momento vem aumentando a diversidade de métodos de regressão em química analítica para a construção de modelos de calibração multivariada, dentre esses os mais empregados tem sido a regressão linear múltipla (MLR), regressão por componentes principais (PCR) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), que são métodos para ajuste linear entre as variáveis. A utilização do ajuste linear entre as variáveis é bastante freqüente na maioria dos métodos de calibração multivariada, por ser um modelo de fácil elaboração e interpretação.

### 2.4.1.1. Regressão linear múltipla (MLR)

A Regressão Linear Múltipla (MLR)<sup>[62,80]</sup> é considerada a mais simples e de fácil interpretação entre as técnicas de calibração multivariada. As informações disponíveis contidas nas variáveis independentes (matriz  $\mathbf{X}$ ) são aplicadas diretamente na modelagem para prever o parâmetro de interesse, ou seja, as variáveis originais são utilizadas. Na construção dos modelos MLR, além das informações relevantes, os ruídos também são incluídos. Além disso, em MLR assume-se que o parâmetro a ser determinado ( $\mathbf{y}$ ) é função linear (**equação 4**) das respostas instrumentais (matriz  $\mathbf{X}$ ), o que pode ser escrita na forma de matriz, conforme **equação 4**, onde  $\mathbf{b}$  é o vetor dos coeficientes lineares de regressão e “ $\mathbf{e}$ ” é o vetor dos resíduos.

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X}\mathbf{b} + \mathbf{e} \quad (4)$$

O modelo MLR utiliza o princípio dos mínimos quadrados, para estimar o vetor  $\mathbf{b}$  (coeficientes de regressão). Conforme **equação 5**.

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{y} \quad (5)$$

A regressão linear múltipla apresenta alguns problemas que limitam sua aplicação. Um desses problemas é que o número de amostras deve ser igual ou superior ao número de variáveis, uma vez que o modelo consiste na resolução de um sistema de equações lineares simultâneas. Essa condição necessita ser satisfeita, caso contrário, o sistema torna-se indeterminado. O outro problema do MLR é que a matriz  $(\mathbf{X}^T \mathbf{X})$  pode não apresentar inversa devido à alta correlação entre as variáveis<sup>[81]</sup>. Este problema pode ser solucionado utilizando um algoritmo de seleção de variáveis.

### 2.4.1.2 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

A regressão por mínimos quadrados parciais (*partial least squares regression-PLS*) ou simplesmente PLS é considerado o método de regressão mais utilizado para a construção de modelos de calibração multivariada a partir de dados de primeira ordem. Este método de calibração não requer um conhecimento exato de todos os componentes presentes nas amostras podendo realizar a previsão das amostras mesmo na presença de interferentes, desde que esses também estejam presentes por ocasião da construção do modelo<sup>[80]</sup>.

A regressão dos mínimos quadrados parciais, para construção do modelo, utiliza informações do conjunto de dados da matriz espectral (matriz **X**) para correlacioná-las com as informações presentes do conjunto de dados de referência (vetor **y**). Por meio de combinações lineares dos dados espectroscópicos (**X**) e dos dados de referência (**y**), se obtém o número de variáveis latentes necessários para correlacionar os espectros e as concentrações<sup>[82]</sup>.

De uma forma geral, o PLS decompõe as matrizes de variáveis independentes **X** (**equação 6**) e a matriz de variáveis dependentes **Y**, no caso do PLS 2 ou o vetor **y**, no caso do PLS 1, (**equação 7**) em um novo sistema de eixos (variáveis latentes ou fatores), representando os dados das amostras em menor número de dimensões, sem que haja perda de informação analítica relevante.

As novas coordenadas da amostra são denominadas “scores” (T ou U) e o peso com que cada variável original contribui para formar as componentes principais é chamada de “loadings” (P ou Q). Posteriormente, realiza-se uma regressão entre as duas matrizes de “scores” (**equação 8**), das variáveis dependentes e independentes, através de um modelo linear<sup>[83]</sup>.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \tag{6}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}' + \mathbf{E} \tag{7}$$

$$\mathbf{U} = \mathbf{b.T} \tag{8}$$

### 2.4.2 Métodos de Seleção de variáveis

Devido à complexidade dos espectros para a realização de uma análise quantitativa de mais de um componente, é necessária a utilização de muitas variáveis (comprimentos de onda), exigindo o emprego de ferramentas matemáticas específicas para este fim. Para simplificar tanto os modelos MLR quanto os modelos PLS de calibração multivariada, grande destaque tem sido dado à aplicação de técnicas de seleção de variáveis<sup>[84-85]</sup>, que mantêm as variáveis que contém informações relevantes, eliminando aquelas que carregam apenas ruído ou redundância. Com isso torna-se muitas vezes possível a utilização de MLR que é um método de calibração mais simples que os baseados em componentes principais (PCR e PLS), tanto no que diz respeito à calibração propriamente dita, quanto à interpretação dos resultados. Selecionar a combinação de variáveis que leve à otimização do modelo é uma das maiores dificuldades da calibração multivariada. Um dos problemas práticos é saber quantos e quais comprimentos de onda devem ser escolhidos, principalmente quando ocorre alta sobreposição espectral. Para contornar esses problemas, diversos algoritmos matemáticos têm sido desenvolvidos como: o algoritmo genético (GA)<sup>[86]</sup>, o stepwise (SW)<sup>[87]</sup>, o algoritmo Jack Knifing (JK)<sup>[62]</sup>, o algoritmo das projeções sucessivas (APS)<sup>[88]</sup> e a regressão por mínimos quadrados parciais por intervalo (*i*PLS)<sup>[89]</sup>. Neste trabalho foi utilizado o algoritmo APS para a escolha das melhores variáveis no MLR.

### 2.4.3 Algoritmo das Projeções Sucessivas

O Algoritmo das Projeções Sucessivas – APS (*Successive Projections Algorithm*) foi apresentado em 2001 à comunidade acadêmica por Araújo *et al*<sup>[88]</sup>. Essa técnica de seleção de variáveis utiliza operações simples num espaço vetorial para minimizar problemas de colinearidade. O APS mostrou ser um método eficiente para seleção de variáveis espectrais no contexto da calibração multivariada, especificamente quando aplicado à regressão linear múltipla (MLR). O objetivo do APS consiste em buscar um subconjunto representativo pequeno de variáveis espectrais com ênfase na minimização da colinearidade. Com isso, torna-se possível utilizar modelos MLR que, embora simples e de fácil interpretação, podem ser severamente afetados por problemas de colinearidade<sup>[78]</sup>.

O princípio do APS está em realizar operações de projeção na matriz de calibração  $\mathbf{X}$  ( $n \times m$ ), cujas linhas e colunas correspondem a  $n$  amostras de calibração e  $m$  variáveis espectrais, respectivamente<sup>[88]</sup>. Com essas variáveis disponíveis, o APS constrói uma cadeia de  $m$  variáveis

onde cada elemento é selecionado de modo que exiba a menor colinearidade com o anterior<sup>[90]</sup>. Então,  $n \times m$  subconjuntos de variáveis podem ser formados. O melhor subconjunto escolhido é aquele que, após a construção do modelo MLR, apresentar menor valor do erro médio quadrático de validação (RMSECV), conforme descrito na **equação 9**.

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{val}} (y_{prev} - y_{ref})^2}{n_{val}}} \quad (9)$$

onde  $y_{prev}$  e  $y_{ref}$  são, respectivamente, valor previsto e o valor de referência para o conjunto de teste e  $n_{val}$  é o número de amostras do conjunto de validação.

Recentemente uma modificação foi realizada no APS. Trata-se da utilização de um método que elimina variáveis que não afetam significativamente os resultados, de forma a aumentar a simplicidade do modelo (eliminação de artefatos)<sup>[91]</sup>. Outro avanço foi a implementação da validação cruzada, eliminando a necessidade de se ter um conjunto adicional de dados para validação interna<sup>[92]</sup>.

#### 2.4.4 Seleção de amostras

Um assunto que também tem atraído a atenção de muitos pesquisadores é a busca de métodos quimiométricos de seleção de amostras em calibração multivariada. Quando se trabalha com matrizes complexas como: biodiesel, gasolina, óleos vegetais, entre outras, torna-se difícil obter um conjunto representativo de amostras através de planejamentos experimentais. Assim, uma escolha adequada de subconjuntos de calibração e validação para a construção de modelos de calibração multivariada torna-se de grande importância<sup>[93]</sup>.

A divisão de um conjunto entre amostras de calibração e validação deve ser realizada, de tal maneira, que as amostras de validação sejam bem representadas pelas amostras de calibração. Um algoritmo clássico é o Kennard-Stone<sup>[94]</sup> que inicialmente consiste em selecionar as duas amostras com a maior distância Euclidiana entre si no espaço  $\mathbf{X}$ . Para cada uma das amostras restantes, calcula-se a distância mínima com respeito às amostras já

selecionadas. Feito isso, a amostra com a maior distância mínima é retida, e o procedimento é repetido até que um determinado número de amostras seja selecionado<sup>[95]</sup>.

Recentemente um método alternativo foi proposto por Galvão et al<sup>[96]</sup> para divisão de conjuntos de calibração e validação, o método denominado SPX<sub>Y</sub> (do inglês: *Sample set Partitioning based on joint X-y distances*). Esse algoritmo considera ambas as dimensões **X** e **y**, enquanto o KS, apenas **X**. O método é baseado em conjuntos que consideram a distância **X-y** e é, na verdade, uma extensão do algoritmo KS, pois engloba no cálculo das distâncias inter-amostra, as diferenças de **X** e **y**.

#### 2.4.5 Detecção de amostras anômalas

Amostras anômalas, também denominadas de *outliers*, são aquelas que possuem comportamento diferente das demais que compõem o conjunto de calibração e/ou previsão. A presença desse tipo de amostra no conjunto de calibração pode conduzir a modelos com baixa capacidade de previsão<sup>[80]</sup>. Quando presentes no conjunto de validação, podem influenciar os resultados, geralmente, levando a resultados que indicam que o modelo não é adequado ou que a sua capacidade é inferior à que poderia ser apresentada na ausência dessas amostras anômalas. Dessa forma identificar as amostras anômalas é uma etapa importante para a otimização dos conjuntos de calibração e validação e a sua eliminação do conjunto de calibração e previsão permite a construção de modelos mais eficientes e precisos e com melhor capacidade de previsão<sup>[78]</sup>.

Existem diversas técnicas para a identificação de amostras anômalas defendidas por diversos autores<sup>[97-100]</sup>. Segundo as recomendações da norma D1655-05 da *American Society for Testing and Materials (ASTM)*<sup>[101]</sup>, para a detecção de amostras anômalas, devem ser utilizadas duas grandezas complementares: *leverage* e resíduos de Student. *Leverage* é uma medida da influência de uma amostra no modelo de regressão. É um escalar ( $h$ ) cujo valor está relacionado à distância da amostra em relação a média do conjunto de calibração. Uma análise cuidadosa das amostras com altos valores de *leverage* deve então ser realizada para decidir se esta deve ou não ser eliminada. Nos modelos de regressão, como o PLS, *leverage* ( $h_i$ ) pode ser obtida através da **equação 10**<sup>[80]</sup> a seguir:

$$h = \frac{1}{i} + u_i^T (U^T U) u_i \quad (10)$$

onde  $i$  é o número de amostras do conjunto de calibração,  $u_i$  é o vetor de escores da amostra  $i$ , e  $U$  é a matriz de escores do conjunto de calibração truncado para o número apropriado de fatores ou variáveis latentes.

A avaliação dos resíduos constituem uma outra forma de se detectar anomalias. Esses correspondem a desvios entre os dados de referência e os estimados pelo modelo. Valores de resíduos em  $y$  altos significam que o modelo não está conseguindo modelar os dados de forma adequada. O resíduo de spectral de *Student* ( $rxSi$ ) de uma amostra é o resíduo spectral ( $x_i - \hat{x}_i$ ) convertido em unidades de desvio padrão pela **equação 11**:

$$rxS_i = \frac{x_i - \hat{x}_i}{s \sqrt{1 - h_i}} \quad (11)$$

onde,  $x_i$  e  $\hat{x}_i$  são, respectivamente, os espectros conhecidos e previstos pelo modelo construído para a  $i$ -ésima amostra;  $h_i$  é a influência (*leverage*), e  $s$  é o desvio padrão dos resíduos espectrais das amostras do conjunto de calibração.

#### 2.4.6 Seleção do número de variáveis latentes

O número ótimo de variáveis latentes que deve ser usado no modelo PLS é um parâmetro importante para alcançar o melhor desempenho nas previsões. Isto permite modelar o sistema com a quantidade ótima de informação, evitando sub ou superestimar o modelo. Um número excessivo de variáveis latentes no modelo pode adicionar informações irrelevantes como ruídos e interferências além de apresentar baixa capacidade de previsão. Por outro lado, a inclusão de um número muito baixo de variáveis latentes pode deixar de modelar muitas informações importantes ocasionando ajustamento inferior.

O número ótimo de variáveis latentes (VL) para o modelo pode ser escolhido com base na análise da soma dos quadrados do erro de previsão (PRESS), utilizando-se a validação cruzada.<sup>[78]</sup> que consiste em deixar de fora uma das amostras do conjunto de calibração por vez, prevendo a propriedade de interesse dessa amostra com o modelo então construído sem ela. Isso é repetido para cada uma das amostras até que cada amostra tenha sido excluída uma vez da calibração. O erro de previsão é obtido comparando-se a concentração prevista de cada amostra com seu valor verdadeiro indicado no vetor  $\mathbf{y}$ . A somatória dos quadrados do erro de previsão PRESS é definida como:

$$\mathbf{PRESS} = \sum (\mathbf{y}_{\text{prev}} - \mathbf{y}_{\text{ref}})^2 \quad (14)$$

onde  $\mathbf{y}_{\text{prev}}$  é o valor calculado e  $\mathbf{y}_{\text{ref}}$  é o valor conhecido.

Geralmente, os valores de PRESS atingem um mínimo correspondente ao número ideal de VL ( $k^*$ ). Para evitar sobre ajuste, em geral utiliza-se o critério de Haaland e Thomas<sup>[102]</sup> para selecionar o número de VL, no qual se compara, através de um teste F ( $\alpha=0,25$ ), o valor do PRESS de um modelo com  $k^*$  variáveis latentes com os modelos com menor número de VL. O modelo selecionado é aquele com o menor número de VL cujo PRESS não difere estatisticamente daquele com  $k^*$  fatores.

#### 2.4.7 Tratamento e pré-processamento dos dados

Uma etapa anterior à utilização dos dados para construção de modelos de calibração refere-se à transformação prévia dos mesmos, com o objetivo de minimizar problemas como: espalhamento de luz, desvios da linha de base, profundidade de penetração da luz, ruído etc. Operações matemáticas podem ser utilizadas antes da construção do modelo de calibração multivariada, no intuito de reduzir, eliminar ou padronizar os impactos sobre os espectros<sup>[103]</sup>.

Dentre os pré-processamentos mais utilizados para espectro de reflectância, podem-se destacar a correção de sinal multiplicativa (MSC), onde se faz uma regressão de cada espectro contra um espectro de referência, que normalmente é o espectro médio do conjunto de calibração. Assim os espectros são corrigidos subtraindo-se dos valores originais o coeficiente linear da reta de regressão e em seguida dividindo-se pela inclinação dessa mesma regressão<sup>[104]</sup>.

Derivar os espectros é também um pré-processamento bastante utilizado. A primeira derivada remove deslocamentos constantes (*offsets*) da linha de base e a segunda derivada elimina uma variação linear da linha de base, normalmente devida a efeitos de espalhamento. Com o cálculo das derivadas a relação sinal/ruído torna-se menos adequadas. Por isto é comum aplicar-se simultaneamente aos dados algum tipo de suavização. O algoritmo mais utilizado para este fim é o de Savitzky-Golay-SG<sup>[104]</sup>. Outro pré-tratamento comum para dados espectrais é centrar os dados na média, que corresponde a subtrair o valor de cada elemento do vetor coluna (variável) pelo valor médio dos elementos dessa coluna<sup>[104]</sup>.

## 2.5 Validação de métodos analíticos

O assunto validação tornou-se mais conhecido nas indústrias farmacêuticas por Ted Byers e Bud Loftus do FDA em meados dos anos 70, com origem nos Estados Unidos e atingindo a Europa anos mais tarde. Sua implantação, porém, não foi gerada por uma percepção real da necessidade, mas por uma série de incidentes ocorridos na produção de medicamentos, como a catástrofe da talidomida, a infecção de pacientes durante a hemodiálise, os contraceptivos que não exerciam efeitos, entre outras ocorrências<sup>[105]</sup>.

Os métodos de ensaio para avaliar a conformidade dos produtos farmacêuticos com especificações estabelecidas devem atingir padrões adequados de exatidão, precisão e confiabilidade. A validação de metodologias analíticas é um aspecto importante da garantia da qualidade e se constitui uma das exigências das normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) vigentes<sup>[106]</sup>.

A validação de metodologias analíticas univariadas é regulamentada através da Resolução RE- n° 899 de 29 de maio de 2003<sup>[107]</sup>, que determina que a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações assegurando a confiabilidade dos resultados. A validação de metodologias analíticas para determinação de fármacos isolados ou presentes em formas farmacêuticas e definido por órgãos internacionais como *Internacional Conference on Harmonisation* (ICH)<sup>[108]</sup> e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>[107]</sup> que estabelecem os itens que devem ser avaliados, como especificidade, linearidade, precisão, exatidão, intervalo e robustez.

As figuras de mérito aplicadas à validação de métodos de calibração univariada estão bem estabelecidas perante os órgãos oficiais, porém para as calibrações multivariadas ainda não há uma harmonização. A literatura<sup>[109-112]</sup> ainda discute e orienta várias estratégias diferentes.

A *Internacional Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC)<sup>[113]</sup>, o *The European Agency for the Medicinal Products* (EMA)<sup>[114]</sup> e a *American Society for Testing and Materials* (ASTM)<sup>[101]</sup> estabelecem, guias que definem as características dos procedimentos de calibração multivariada e os parâmetros mínimos para avaliação do método proposto. Na norma ASTM E1655-05<sup>[101]</sup>, são definidos os procedimentos para análises quantitativas por espectrofotometria no infravermelho e os parâmetros para validação de um modelo multivariado.

Para a IUPAC, as figuras de mérito sensibilidade, seletividade e razão sinal/ruído. podem ser estimadas através do conceito do Sinal Analítico Líquido (NAS), que corresponde a parte do sinal instrumental que é ortogonal às contribuições de outros possíveis constituintes presentes na amostra

No guia seguindo pela indústria farmacêutica, estão descritos os principais itens para validação de métodos qualitativos e quantitativos para espectrofotometria no infravermelho médio e próximo. Recentemente a Farmacopéia Americana USP- 30<sup>[115]</sup>, 2007 órgão oficial do setor farmacêutico reconhecida pela ANVISA no seu capítulo de informações gerais sobre espectrofotometria no infravermelho próximo <1119> reconhece e determina os parâmetros para validação de métodos multivariados utilizando a espectrofotometria no infravermelho.

### **2.5.1 Validação de Métodos que empregam calibração multivariada**

O modelo construído deve ter capacidade de realizar determinações confiáveis. Duas estratégias básicas de validação do modelo são a *validação externa*, em que novos dados são introduzidos para avaliar a capacidade preditiva do modelo, e a *validação interna*, em que o conjunto original de calibração serve também como conjunto de validação. A validação externa é recomendada por utilizar amostras não utilizadas na construção do modelo de calibração. Caso estas amostras não estejam disponíveis, a metodologia de *validação cruzada* pode ser utilizada como estratégia de validação interna.

#### **2.5.1.1 Robustez**

A robustez avalia a confiabilidade do método analítico sob a influência das mudanças das condições habituais de análises. Existem diversas variáveis<sup>[114, 115]</sup>, instrumentais ou ambientais, que não são possíveis de se controlar. Podem-se citar alguns exemplos no processo industrial: a umidade, temperatura do ambiente, pequenas variações na quantidade dos componentes para a formação do produto, posição diferente da amostra na janela óptica, compactação, espessura, temperatura da amostra, trocas de lâmpadas, entre outros.

A robustez em calibração multivariada consiste em testar o desempenho do modelo de calibração multivariada frente a alguns tipos de variações e averiguar se essas são ou não significativas <sup>[116]</sup>. A robustez pode ser realizada, segundo Blanco e Acalá <sup>[117]</sup>, empregando amostras de vários lotes analisadas em um período de tempo obtido na linha de produção.

### **2.5.1.2 Exatidão**

Expressa o grau de concordância entre o valor estimado pelo modelo multivariado e o valor tido como verdadeiro ou de referência. A exatidão de métodos multivariados é geralmente avaliada de maneira semelhante à descrita para métodos univariados. Amostras de lotes diferentes são avaliadas pelo método multivariado e pelo método de referência. Calculam-se as diferenças entre os resultados obtidos para cada amostra e realiza-se um teste-t pareado considerando a média dessas diferenças <sup>[115]</sup>.

### **2.5.1.3 Precisão**

Expressa o grau de concordância entre os resultados de uma série de medidas realizadas para uma mesma amostra homogênea em condições determinadas. Em geral a precisão pode obtida em diferentes níveis, tais como: repetibilidade, precisão intermediária, reprodutibilidade <sup>[114,115]</sup>.

**Repetitividade:** É realizado em um curto intervalo de tempo, podendo ser realizado de duas maneiras: no mínimo de três amostras em concentrações diferentes cobrindo a faixa útil do modelo de calibração ou em seis replicatas para nível de 100% da concentração <sup>[114]</sup>. A estatística envolvida na repetitividade é o DPR (desvio padrão relativo) que não pode ser maior que 5%.

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

**Reprodutibilidade:** É realizado por meio de ensaios interlaboratoriais <sup>[114, 115]</sup>.

#### 2.5.1.4 Linearidade

Demonstrar a linearidade do método consiste na obtenção, em toda faixa de concentração estudada, de uma resposta proporcional entre a concentração e a quantidade física medida corretamente descrita pelo modelo ou equação de calibração. Nos casos das calibrações univariadas, a avaliação da linearidade é simples: obter uma relação linear entre a concentração e o parâmetro medido (absorvância no comprimento de onda, área do pico, etc). Quando se trabalha com calibração multivariada, é mais difícil avaliar a linearidade <sup>[118]</sup>. Assim, uma medida quantitativa para a linearidade não corresponderia a uma tarefa simples, ou mesmo possível. Qualitativamente, o gráfico dos resíduos para as amostras de calibração e validação pode indicar se os dados seguem um comportamento linear quando a distribuição desses resíduos for aleatória <sup>[78]</sup>. Uma adaptação proposta no guia ICH <sup>[108]</sup> para verificar a linearidade de um método multivariado recomenda representar os valores obtidos pelo método contra valores de referência conhecidos. É aconselhável usar um mínimo de cinco medidas que abrangem a faixa de concentração do método, usando amostras obtidas por diluição de soluções-padrão ou preparação de amostras sintéticas<sup>[118]</sup>. A linearidade aplicada à calibração multivariada, em particular a espectrofotometria, envolve a demonstração da resposta do equipamento correlacionada com valores de referência das amostras distribuídas por todo o intervalo definido pelo modelo de calibração.

#### 2.5.1.5 Intervalo

Intervalo são os níveis extremos de concentração (ou da propriedade de interesse) que podem ser determinados com exatidão, precisão e linearidade. Esse parâmetro geralmente é proveniente dos estudos de precisão e linearidade. Dependendo do tipo de análise realizada, a faixa de concentração de mínimo de cobertura varia. O ICH <sup>[108]</sup> recomenda intervalos de 80-120% de cobertura para as análises quantitativas ou 70-130%, para testes de uniformidade de conteúdo. Nos métodos multivariados o intervalo adequado vai depender do objetivo do método. É possível determinar propriedades que cobrem grandes intervalos de trabalho, ou em outros casos, variações pequenas<sup>[118]</sup>.

### 2.5.1.6 Sensibilidade

É definida como a fração do sinal responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração à propriedade de interesse. É o inverso da inclinação deste gráfico para o modelo inverso. Para modelos de calibração multivariada, como PLS, pode ser determinada como:<sup>[119,120,121]</sup>

$$S\hat{E}N = \frac{1}{\|b_k\|} \quad (15)$$

em que,  $b_k$  é o vetor dos coeficientes de regressão estimados pelo PLS.

### 2.5.1.7 Seletividade

É a medida do grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e os interferentes presentes na amostra, indicando também, a parte do sinal que é perdida por essa sobreposição<sup>[122]</sup>. Para modelos de calibração multivariada, a seletividade,  $S\hat{E}L_{k,i}$ , é definida como<sup>[123]</sup>:

$$S\hat{E}L_{k,i} = \frac{n\hat{a}s_{k,i}}{\|x_{k,i}\|} \quad (16)$$

em que,  $n\hat{a}s_{k,i}$  é o valor escalar do sinal analítico líquido para a amostra  $i$  e  $x_{k,i}$  representa o vetor de respostas instrumental para a amostra  $i$ .

### 2.5.1.8 Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação de um método analítico, expressam a menor quantidade da espécie de interesse que pode ser detectadas e quantificada com segurança, respectivamente. Para um conjunto de dados que apresenta comportamento homoscedástico, os LD e LQ na calibração multivariada podem ser calculados pelas equações a seguir<sup>[124]</sup>.

$$LD = 3\delta x \|b_k\| = 3\delta x \frac{1}{S\hat{E}N} \quad (17)$$

$$LQ = 10\delta x \|b_k\| = 10\delta x \frac{1}{S\hat{E}N} \quad (18)$$

em que,  $\delta x$  é o desvio padrão do sinal de referência,  $b_k$  é o vetor dos coeficientes de regressão do modelo PLS para a espécie  $k$ ,  $S\hat{E}N$  corresponde ao valor de sensibilidade obtido através da equação 15.

### 2.5.2 Parâmetros que indicam a qualidade de um modelo multivariado

Alguns parâmetros calculados com os resultados obtidos pelos modelos indicam a eficiência do mesmo. Esses parâmetros servem para fazer a escolha de modelos mais adequados à predição dos parâmetros desejados. Alguns parâmetros que podem ser adotados como critérios de avaliação: coeficiente de correlação ( $R$ ), o número de variáveis latentes, o valor do erro médio quadrático padrão de calibração (RMSEC), o valor do erro médio quadrático padrão de validação cruzada (RMSECV), e o valor do erro médio quadrático padrão de previsão (RMSEP). Para dados centrados na média estes erros estão definidos pelas equações 19 a 21.

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{cal}} (y_{prev} - y_{ref})^2}{n_{cal} - K - 1}} \quad (19)$$

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{cal}} (y_{prev} - y_{ref})^2}{n_{cal}}} \quad (20)$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{val}} (y_{prev} - y_{ref})^2}{n_{val}}} \quad (21)$$

onde  $n_{cal}$  é o número de amostras do conjunto de calibração,  $n_{val}$  é o número de amostras do conjunto de validação externa,  $K$  é o número ótimo de variáveis latentes.

# **OBJETIVOS**

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Desenvolver métodos analíticos para determinar os teores de AZT+3TC dose fixa combinada utilizando as regiões espectrais do ultravioleta (UV) e infravermelho próximo (NIR), bem como determinar a dureza no comprimido e umidade no granulado, empregando a espectrofotometria NIR.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver métodos utilizando a espectrofotometria derivativa no UV para quantificação da associação AZT+3TC nos granulados e comprimidos revestidos para dose fixa combinada;
- Desenvolver modelos de calibração multivariada empregando a espectrofotometria no UV e NIR para quantificação da associação AZT+3TC nos granulados, núcleos e comprimidos revestidos para dose fixa combinada;
- Validar os métodos baseados na espectrofotometria derivativa e os métodos multivariados UV e NIR;
- Determinar os teores da associação (AZT+3TC) na forma de comprimidos revestidos para diferentes laboratórios produtores, utilizando os métodos desenvolvidos UV/PLS e Derivativos;
- Quantificar a dissolução e perfil de dissolução dos comprimidos revestidos de diferentes laboratórios utilizando os métodos desenvolvidos (UV/derivativa e PLS) e comparar com o método de referência (CLAE);
- Determinar a dureza do núcleo de AZT + 3TC empregando a espectrofotometria NIR e calibração multivariada;
- Determinar o teor de água no granulado e comprimido de AZT+3TC empregando a espectrofotometria NIR e calibração multiavariada;

## **EXPERIMENTAL**

### **PARTE I – Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta**

## 4.0 EXPERIMENTAL - ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA

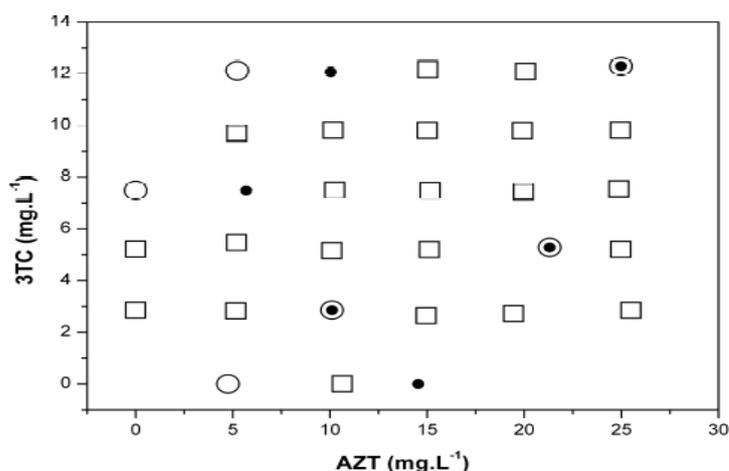
### 4.1 Padrões e amostras utilizados

Foram utilizadas substâncias químicas de referências (SQR) de 3TC e AZT da *United States Pharmacopeia* (USP) dos lotes GOF114 e HOF263, respectivamente. Esses padrões foram utilizados para secundarizar as matérias-primas, cedidas pelo LAFEPE, as quais apresentaram teor de 99,85% e 99,91% de AZT e 3TC, respectivamente. A partir dos padrões secundarizados, foram preparadas soluções estoque de 3TC e AZT nas concentrações 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,50 mg.mL<sup>-1</sup>, através de diluições em água ultra-pura.

Os comprimidos (300 e 150 mg) de AZT+3TC analisados foram cedidos pelos laboratórios farmacêuticos: Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco(LAFEPE), Farmanguinhos, Indústria Química do Estado de Goiás (IQUEGO), Fundação para o Remédio Popular (FURP) e GlaxoSmithKline, denominados aleatoriamente por A,B, C, D e E. O placebo foi realizado seguindo a formulação do LAFEPE composto pelos seguintes excipientes qualitativamente: amido, glicolato de amido, celulose microcristalina, polivinilpirrolidona, aerosil, estearato de magnésio.

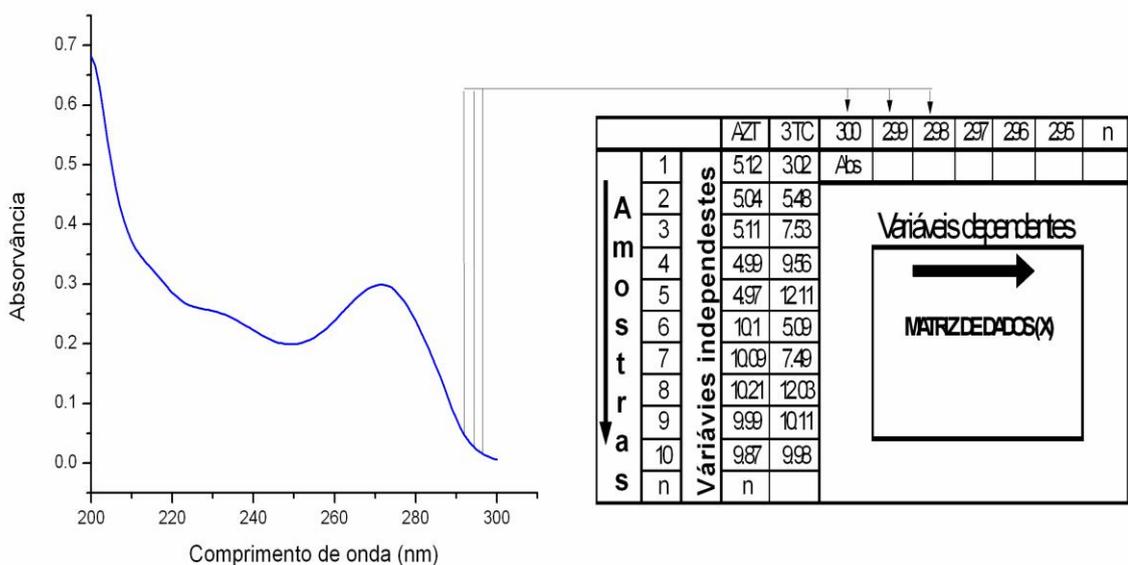
Para as análises utilizando espectrofotometria UV derivativa, PLS e CLAE, as amostras comerciais foram preparadas a partir de diluição. Para tanto, 20 comprimidos de cada fabricante foram pesados e posteriormente pulverizados utilizando almofariz e pistilo. Em seguida, pesou-se uma quantidade equivalente a 75 mg de 3TC e 150 mg de AZT, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e diluiu-se com água ultra-pura, de tal modo que a concentração final fosse as mesmas dos padrões 7,5 mg.L<sup>-1</sup> para a 3TC e 15 mg.L<sup>-1</sup> para o AZT.

Para a construção do modelo UV/PLS foram preparadas 31 misturas binárias de AZT+3TC de padrão secundário. O algoritmo de SPX<sub>Y</sub><sup>[96]</sup> (*Sample set Partitioning based on joint X-y distances algorithm*) foi usado para selecionar as amostras para a calibração e predição. Foram selecionadas 22 amostras para o conjunto de calibração (□). Seis amostras foram selecionadas para prever a concentração de AZT (•) e seis amostras para prever a concentração 3TC (O). A Figura 4 mostra a distribuição das amostras no conjunto de calibração e previsão. Trinta e nove amostras comerciais também foram utilizando na etapa de validação.



**Figura 4:** Distribuição das concentrações das misturas de calibração e previsão no espaço amostral empregando a espectrofotometria no UV

Para um melhor entendimento da metodologia aplicada a Figura 5 mostra como são construídas as planilhas para construção dos modelos multivariados. Para cada concentração variáveis independente (vetor  $y$ ) foram alimentadas a matriz  $X$  (variáveis dependentes) com os respectivos espectros.



**Figura 5:** Ilustração da forma como é montada o diagrama de organização dos amostras.

## 4.2 Registro dos espectros

Todos os espectros de absorção na região UV, tanto para a análise usando espectrofotometria derivativa quanto para o modelo UV/PLS, foram registrados utilizando um espectrofotômetro UV-VIS de feixe duplo da marca Shimadzu<sup>®</sup>, modelo UV-2401 PC, na região de 200 a 300 nm, com velocidade de varredura de 8,3 nm/s. As cubetas utilizadas foram de quartzo com percurso ótico de 10 mm.

## 4.3 Perfil de dissolução dos comprimidos revestidos de AZT + 3TC

Para realização dos perfis de dissolução utilizou-se um dissolutor de marca VANKEL<sup>®</sup>, modelo VK 7010, acoplado a um auto coletor, modelo VK 8000, da mesma marca. Os perfis de dissolução foram realizados utilizando oito cubas contendo 900 mL de água, rotação de 50 rpm, aparato pás e temperatura de  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Alíquotas de 2 mL do meio de dissolução foram coletadas nos intervalos de 3, 6, 10, 15, 20 e 30 min. Cada alíquota foi levada a um balão volumétrico de 50 mL de tal modo que as concentrações teóricas finais fossem  $13,33 \text{ mg.L}^{-1}$  de AZT e  $6,66 \text{ mg.L}^{-1}$  de 3TC.

## 4.4 Métodos de referência do teor de AZT + 3TC (*método cromatográfico*)

As análises cromatográficas foram realizadas empregando-se um sistema cromatográfico Shimadzu<sup>®</sup>, constituído por bombas binárias LC-10 ADvp, detector UV/VIS SPD 10 Avp em 270 nm, forno CTO-10ASvp ( $30^\circ\text{C}$ ), controlador do sistema SCL-10ADvp e auto-injetor SIL-10ADvp, fase estacionária (coluna C18 125 x 4,6 cm, porosidade 5  $\mu\text{m}$ ) e fase móvel (tampão de acetato de amônio pH 5,4 e metanol 65:35), fluxo de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Os cromatogramas foram obtidos e analisados através do programa Class-VP. O metanol e o acetato de amônio utilizados na fase móvel foram das marcas J.T.Baker e Merck, respectivamente. A água ultra-pura utilizada em todas as etapas foi obtida por sistema Milli-Q<sup>®</sup>-Gradient. Todas as vidrarias utilizadas foram da marca Pyrex<sup>®</sup> e certificadas por lote. Todos os equipamentos foram previamente qualificados e certificados.

#### 4.5 Programas estatísticos

O programa OriginLab<sup>®</sup> 8.0 foi utilizado para o processamento dos dados e cálculo das derivadas na espectrofotometria derivativa. O programa UNSCRAMBLER<sup>®</sup> v9.8 da CAMO foi empregado para pré-processamento dos espectro e construção dos modelos PLS. O algoritmo APS<sup>[88]</sup>, SPX<sub>Y</sub><sup>[96]</sup> e MVC1<sup>[119]</sup> executados empregando o ambiente MATLAB<sup>®</sup>, versão 6.5. Esses programas foram usados, respectivamente, para a seleção de variáveis nos modelos MLR, para seleção de amostras do conjunto de calibração e previsão e para o cálculo de algumas figuras de mérito analítico.

## **EXPERIMENTAL**

### **PARTE II – Espectrofotometria de absorção na região do Infravermelho próximo**

## **5. 0 EXPERIMENTAL - ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO**

### **5.1 Amostras**

#### **5.1.1 Determinação da umidade**

Para construção do modelo foram utilizadas 50 amostras distintas. Para o preparo das mesmas foram coletas 500 g do granulado AZT+3TC na linha de produção do LAFEPE, os quais foram distribuídos em placas de Petri (aproximadamente 7,0 g) e levados a estufa a pressão reduzida a 60°C por 20 horas, sobre uma pressão de 5 mmHg, para retirada da umidade residual. Em seguida, foram retiradas 30 amostras de aproximadamente 7,0 gramas e contaminadas com água em uma faixa de 25 a 500 µL, utilizando pipeta automática. Outras 20 amostras foram adquiridas de diferentes lotes da linha de produção do LAFEPE. As amostras de calibração e previsão foram selecionadas usando o algoritmo SPX-y. Desse modo, utilizou-se inicialmente 36 amostras para a etapa de calibração e 14 amostras para a etapa de previsão. As análises de referência foram realizadas utilizando o método potenciométrico de Karl Fischer.

#### **5.1.2 Dureza dos núcleos**

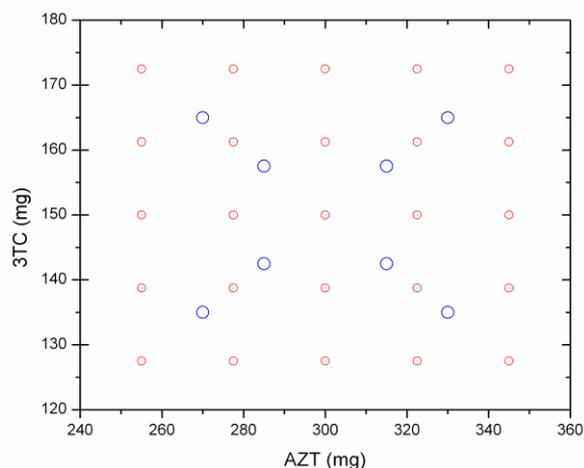
Para construção dos modelos foram utilizados 179 núcleos com diferentes forças de compressão. As amostras foram compostas por núcleos produzidos na compressora utilizada na planta industrial do LAFEPE em uma faixa de 1.7 a 15.9 Kgf/cm<sup>2</sup> de dureza. As amostras de calibração e previsão foram selecionadas utilizando o algoritmo SPX-y de modo que foram separadas inicialmente 120 amostras de calibração e 59 amostras para previsão, com dureza variando de 3.3 a 15.6 Kgf/cm<sup>2</sup>. Para cada núcleo foi registrado o seu espectro e em seguida determinada a dureza utilizando um durômetro digital.

### 5.1.3 Determinação dos teores dos granulados, núcleos e comprimidos revestidos de AZT + 3TC

Para a construção dos modelos foram preparadas 33 amostras em planta piloto do LAFEPE, de modo a ampliar a faixa de concentração dos comprimidos que compuseram os conjuntos de calibração, fornecendo suficiente variabilidade e evitando extrapolações do modelo.

Estas misturas foram elaboradas a partir de um planejamento fatorial experimental  $5^2$  (Figura 6) totalizando 25 amostras (○). Oito (8) misturas (○) foram adicionadas ao espaço amostral definido pelo planejamento  $5^2$  com o objetivo de obter maior robustez ao modelo.

Cada uma das misturas do planejamento experimental tem uma massa média de 300 g e foi preparada através da mistura dos dois princípios ativos e dos excipientes. Para isso as massas de AZT +3TC foram variadas dentro de uma faixa de  $\pm 15\%$  do valor rotulado. Os diluentes (celulose e amido) foram usados para completar a massa total do comprimido (800 mg) e a massa dos demais excipientes (aerosil, polivinilpirrolidona, estearato de magnésio) foi mantida constante para preservar as características físico-químicas dos comprimidos. A partir de cada mistura por via úmida foram obtidos aproximadamente 60 comprimidos e separados cerca de 50 g do granulado para posterior análise utilizando a espectrofotometria NIR e CLAE. O conjunto de previsão foi composto por lotes pilotos produzidos em bancada e por granulados, núcleos e comprimidos revestidos produzidos na linha de produção do LAFEPE.



**Figura 6:** Distribuição das misturas de AZT+3TC no espaço amostral para compor o conjunto de calibração (○) amostra do planejamento fatorial (○) amostras adicionadas ao planejamento .

As amostras dos granulados em todas as concentrações definidas pelo planejamento experimental foram coletadas antes de serem processadas em núcleos, etapa que antecede o revestimento. Dos 33 lotes pilotos 28 desses foram utilizados no conjunto de calibração e 5 foram utilizados para a validação externa (conjunto de previsão). Quarenta e nove (49) amostras de granulados também foram coletadas de diferentes lotes da linha de produção. Dessas, 12 amostras foram utilizadas na calibração de forma a representar características do processo de produção. As outras 37 amostras foram utilizadas para avaliar a capacidade preditiva do modelo construído.

Para construir o modelo de calibração para a previsão do teor de AZT e 3TC nos núcleos e comprimidos revestidos, 33 amostras foram preparadas em uma planta piloto após a compressão (núcleo), com concentração descrita, conforme Figura 6. Dos 33 lotes pilotos 28 desses foram utilizados no conjunto de calibração e 5 foram utilizados para a validação externa (conjunto de previsão). Os comprimidos da linha de produção também foram usados nas etapas de calibração e previsão. Quarenta e sete (47) núcleos de diferentes lotes foram coletados antes do revestimento (núcleo), sendo que 22 desses foram utilizados no conjunto de calibração e 25 na previsão. Trinta e um (31) comprimidos de diferentes lotes foram coletados após a fase de revestimento. Destes 17 foram utilizados no conjunto de calibração e 14 na previsão. Dessa forma inicialmente foram utilizados para compor os modelos de calibração 40, 50 e 45 amostras e para previsão 42, 30 e 19 amostras dos granulados, núcleos e comprimidos revestidos, respectivamente.

## **5.2 métodos de referência**

### **5.2.1 Determinação da umidade**

A determinação da umidade foi realizada pelo método volumétrico de Karl Fischer conforme preconizado pelos compêndios oficiais, utilizando um equipamento da SCHOTT modelo Titroline alpha. A titulação por Karl Fischer é um método químico seletivo para determinação do teor de água em diferentes matrizes. Isto só é possível pela reação química que ocorre entre a água na amostra e um álcool, imidazol como o dióxido de enxofre e iodo <sup>[125]</sup>. Foram utilizados 150 mg de cada amostra em estudo.

Com o objetivo de realizar um estudo comparativo, também foi utilizada para determinar a umidade, uma balança de umidade, da Mettler Toledo. O equipamento tem o mesmo princípio da termogravimetria, determinando a massa da amostra quando esta é aquecida rapidamente com a unidade de secagem, por lâmpada halógena integrada. Foram utilizados 500 mg de cada amostra.

### **5.2.2 Determinação da dureza**

Os testes de resistência mecânica, como dureza, são considerados oficiais dentro do contexto legal da Farmacopéia, constituindo-se em elementos úteis na avaliação da qualidade integral dos comprimidos. Esses testes visam demonstrar a resistência dos comprimidos à ruptura provocada por quedas ou fricção. Ela é proporcional à força de compressão e inversamente proporcional à sua porosidade. As análises de referência foram realizadas utilizando um durômetro digital modelo VK 200.

### **5.2.3 Determinação do teor de AZT + 3TC (método cromatográfico)**

O método de referência já foi descrito no Ítem 4.4 parte da experimental da espectrofotometria no ultravioleta.

### 5.3 Aquisição dos espectros NIR

Os espectros de todas as amostras foram registrados na faixa de 14.000 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$  utilizando um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier da marca BOMEM, modelo FTLA 2000 (Figura 7). No registro do espectro do branco foi utilizado Teflon (99% reflective Spectralon, Labsphere me., North Sutton, NH, USA). Todos os espectros foram registrados com temperatura ambiente (em torno de  $25\pm 5^\circ\text{C}$ ) e umidade (45%) relativa controladas. Para o registro dos espectros das amostras dos granulados foi empregado o acessório *Powder Samplir* (Figura 8). No caso dos núcleos e comprimidos revestidos, foi utilizado um suporte construído no laboratório para adaptação dos comprimidos ao percurso óptico, utilizando a técnica de reflectância difusa (Figura 8). Para a determinação da umidade e teores de AZT e 3TC foram obtidos os espectros empregando medidas de 32 varreduras e resolução de  $8\text{ cm}^{-1}$ . Para a determinação de dureza os espectros foram obtidos com 64 varreduras e resolução de  $16\text{ cm}^{-1}$



**Figura 7:** Espectrofotômetro NIR, modelo ABB BOMEM , e acessório *Powder Samplir*.



**Figura 8:** Acessórios *Powder Samplir* + acessório adaptado.

#### 5.4 Calibração multivariada

Neste trabalho, foram construídos modelos PLS-1 e MLR. Todos os modelos foram obtidos utilizando validação cruzada completa para definir o número de variáveis latentes (VL) do PLS ou número de variáveis no caso do MLR. Vários tipos diferentes de pré-processamentos foram testados (Suavização e derivadas com filtros de Savitzky-Golay variando-se o número de pontos das janelas em 7, 15, 21 e 41 pontos), (*Multiplicative Signal Correction* – MSC), usando a mesma faixa espectral para todos os modelos. Para a escolha do melhor modelo foram analisados os valores dos menores erros de previsão (RMSECV e RMSEP). Além disso, foram avaliados os coeficientes de correlação dos conjuntos de calibração ( $R_{cal}$ ) e validação externa ( $R_{val}$ ). O algoritmo  $SPX_Y$  foi empregado para dividir as amostras de calibração e previsão. No caso do MLR, as variáveis foram selecionadas através do algoritmo APS.

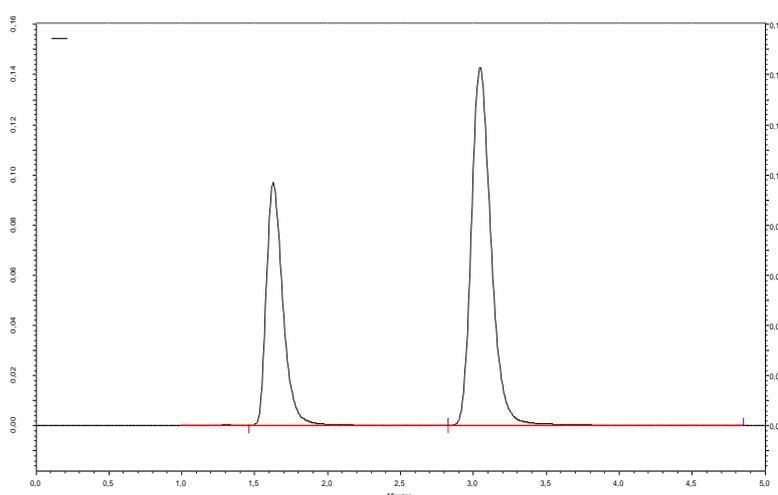
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **PARTE III – Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta**

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO - ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA.

### 6.1 método de referência (CLAE)

O método analítico utilizado como referência para a doseamento do AZT+3TC foi a CLAE. A fase móvel constituída de metanol e tampão acetato de amônia (35:65) pH 5,4 mostrou-se adequada. De acordo com a Figura 9 pode-se perceber um adequado tempo (5 min) de análise, picos com boa assimetria ( $T < 2$ ), capacitância e tempo de retenção relativo. A eficiência da coluna ficou bem acima do preconizado pela literatura (pratos teóricos  $> 2000$ ). As curvas analíticas apresentaram linearidade significativa nas concentrações dos fármacos na faixa de 1- 50 ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) para 3TC e 1-100 ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) com 8 pontos diferentes de concentrações. A especificidade do método ficou comprovada através da comparação obtida entre os cromatogramas do placebo e padrão com os dois ativos na mesma solução. A inexistência de qualquer pico nas condições de estudo evidenciou a especificidade do método. O ensaio da precisão, na repetitividade de seis réplicas autênticas na concentração teórica de 100% para 3TC ( $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e AZT ( $15 \text{ mg.L}^{-1}$ ) apresentaram um desvio padrão relativo baixo atendendo as normas vigentes (Tabela 1). Para a robustez do método foram avaliados: temperatura do forno, composição da fase móvel, variação de pH do tampão e lotes de colunas. Todas as variações ficam estatisticamente dentro do limite especificado. Na Tabela 1 estão relacionados os resultados da validação do método.



**Figura 9:** Cromatograma da amostra de 3TC+AZT condição: coluna RP-18 (125x4nm, 5 $\mu\text{m}$ ); fase móvel: metanol:tampão acetato amônio (35:65) pH 5,4; fluxo: 1,0 mL/min; detector: UV 270 nm.

**Tabela 1:** Resultados da validação do método (CLAE).

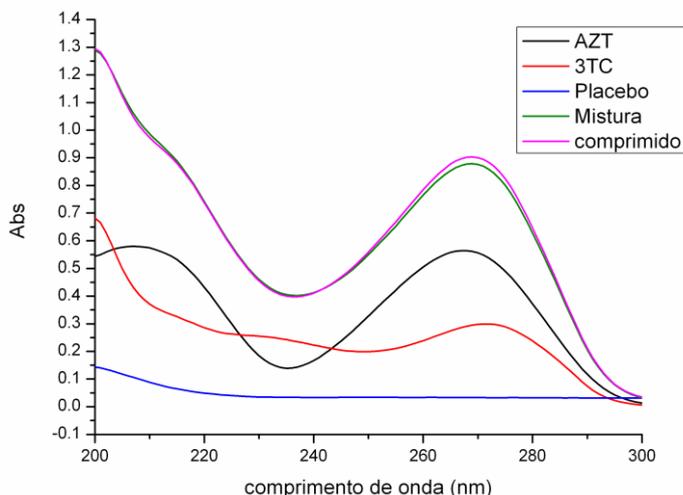
Método	Parâmetros	3 TC	AZT
	Faixa linearidade (mg.L <sup>-1</sup> )	1-50	1-100
	Inclinação	51444,7	43589,3
	Coefficiente linear	171,79	172,6
	R	0,9999	0,9999
CLAE	Repetitividade(%)	98,58 ±1,05	98,62±0,83
	DPR%	1,07	0,84
	LD (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0790	0,07144
	LQ (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0237	0,02143
	Exatidão 50%	50,10 ± 0,97	50,11 ± 0,99
	Exatidão 100%	99,12 ± 0,45	99,83 ± 0,68
	Exatidão 150%	148,94 ± 1,03	148,99 ± 0,94

Os resultados da exatidão nas concentrações 50, 100 e 150%, através do teste de Student confirmaram a exatidão do método no intervalo de 95% de confiança. Os resultados mostraram t calculados (2,4; 2,0 e 3,5) para AZT e (2,7; 1,0 e 3,1) para 3TC, inferiores ao t-tabelado (4,3). Todos os parâmetros estatísticos ficaram dentro do esperado atendendo as normas oficiais.

## 6.2 Espectrofotometria UV-VIS

### 6.2.1 Espectrofotometria derivativa

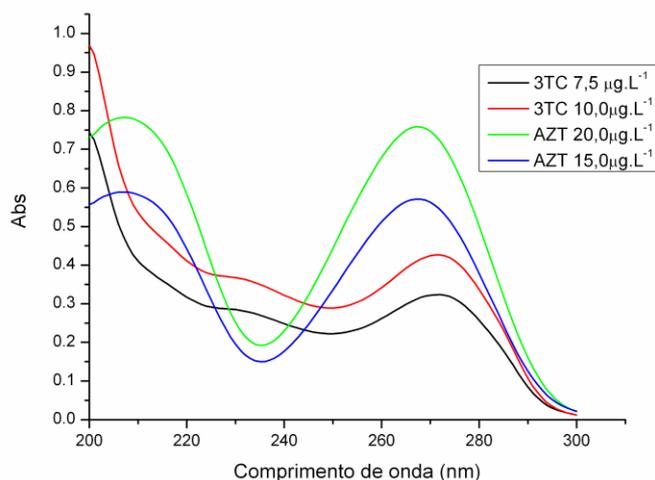
Os espectros das análises utilizando a espectrofotometria UV para o AZT (15 mg.L<sup>-1</sup>), a 3TC (7,5 mg.L<sup>-1</sup>), mistura dos dois fármacos (AZT -15 mg.L<sup>-1</sup> e 3TC -7,5 mg.L<sup>-1</sup>), comprimido (AZT -15 mg.L<sup>-1</sup> e 3TC -7,5 mg.L<sup>-1</sup>) e o placebo, estão ilustrados na Figura 10. Como pode ser observado o AZT e o 3TC apresentam uma forte sobreposição espectral. Para superar este problema utilizou-se a espectrofotometria derivativa e a calibração multivariada usando a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).



**Figura 10:** Espectros na região UV do AZT ( $15 \text{ mg.L}^{-1}$ ), 3TC ( $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), mistura dos dois fármacos (AZT -  $15 \text{ mg.L}^{-1}$  e 3TC -  $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), comprimido (AZT -  $15 \text{ mg.L}^{-1}$  e 3TC -  $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e do placebo em solução aquosa.

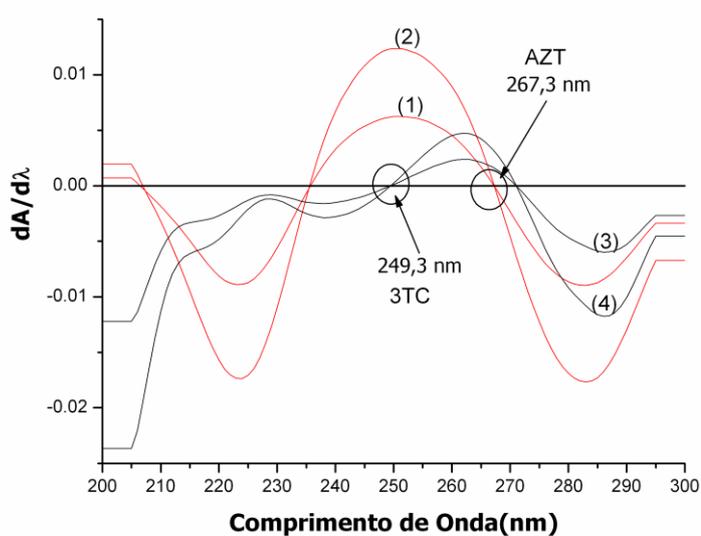
Para determinar a concentração de AZT e 3TC nas amostras comerciais utilizando a espectrofotometria derivativa com maior precisão e exatidão, foi realizado um estudo dos parâmetros instrumentais que afetam a forma da derivada espectral. Os parâmetros estudados foram: a velocidade de varredura, aplicação da função de atenuação e o incremento do comprimento de onda ( $\Delta\lambda$ ) para obter a derivada espectral. Para isto foram realizadas varreduras em diferentes velocidades e variações nos comprimentos de onda. Além disso, foram aplicadas várias janelas para a suavização dos espectros derivativos. As condições ideais para o registro dos espectros de absorvância na região de 200 a 300 nm foram velocidade de varredura  $8,3 \text{ nm/s}$ ,  $\Delta\lambda=1,0 \text{ nm}$  e para a suavização dos espectros utilizando o algoritmo Savitzky-Golay, janelas de suavização de 11 pontos para a primeira derivada e 17 pontos para a segunda derivada.

Após este estudo registrou-se espectros de absorvância de soluções individuais nas concentrações  $15$  e  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  para o AZT e  $7,5$  e  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  para o 3TC, respectivamente como mostra a Figura 11.



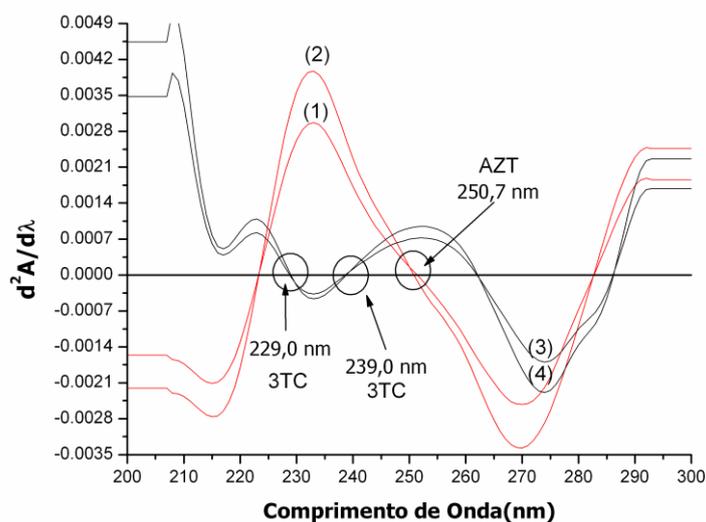
**Figura 11:** Espectros de absorção na região UV do AZT (15 e 20 mg.L<sup>-1</sup>) e 3TC (7,5 e 10 mg.L<sup>-1</sup>).

A estes espectros foram aplicadas a primeira e segunda derivada, mostradas nas Figuras 12 e 13, e a partir deles foi possível determinar o sinal de absorvância no comprimento de onda em que a contribuição de um dos componentes é zero. Para a primeira derivada, Figura 12, o 3TC foi determinado medindo-se o sinal da primeira derivada no ponto de interseção do AZT (267,30 nm). Já para o AZT, o ponto de interseção do 3TC foi determinado como sendo 249,30 nm, onde foi medido o sinal de absorvância do AZT.



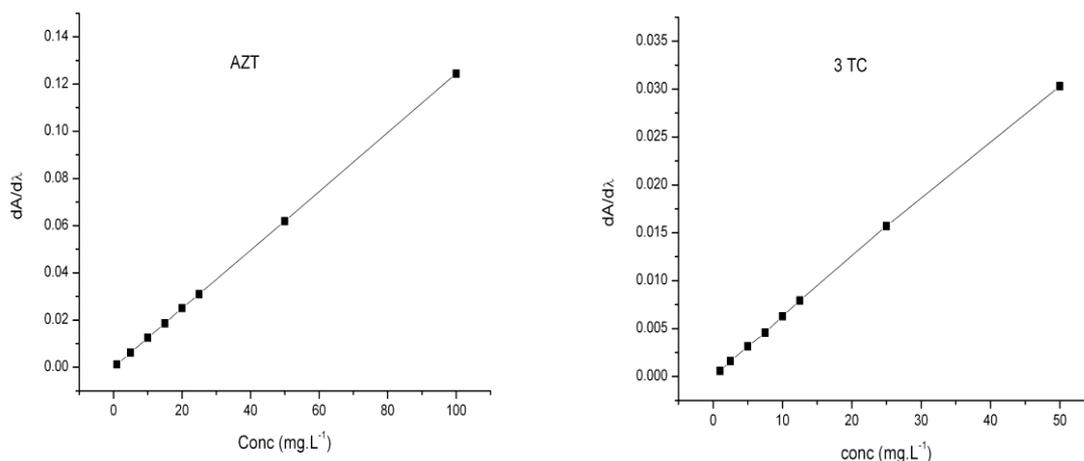
**Figura 12:** Espectros de primeira derivada do 3TC nas concentrações (1) 7,5 mg.L<sup>-1</sup> e (2) 10 mg.L<sup>-1</sup> (\_\_\_\_) AZT nas concentrações (3) 15 mg.L<sup>-1</sup> e (4) 20 mg.L<sup>-1</sup> (\_\_\_\_).

Para a segunda derivada, o 3TC foi determinado medindo-se o sinal de absorvância no ponto de interseção do AZT (250,70 nm), enquanto a de AZT foi determinado medindo-se o sinal de absorvância no ponto de interseção do 3TC (239,00 nm e 229,0 nm), como mostra a Figura 13.



**Figura 13:** Espectros da segunda derivada do 3 TC nas concentrações (1) 7,5 mg.L<sup>-1</sup> e (2) 10 mg.L<sup>-1</sup> (\_\_\_\_) AZT nas concentrações (3) 15 mg.mL<sup>-1</sup> e (4) 20 mg.L<sup>-1</sup> (\_\_\_\_).

Em seguida, registrou-se espectros das soluções de AZT na faixa de concentração de 1,0 -100,0 mg.L<sup>-1</sup> e de 3TC na faixa de concentração de 1,0 -50,0 mg.L<sup>-1</sup>. Construiu-se então a curva analítica de concentração de AZT ou 3TC *versus* absorvância derivativa, mostradas nas Figuras 14a (AZT) e 14b (3TC). Pode-se notar que foi obtida uma relação linear entre o sinal de absorvância obtido através das derivadas e a concentração dos fármacos em estudo.



**Figura 14:** Curvas analíticas do (a) AZT na faixa de 1-100 mg.L<sup>-1</sup> e (b) 3TC na faixa de 1-50 mg.L<sup>-1</sup>.

O método desenvolvido foi validado de acordo com os procedimentos descritos na RE nº 899/2003. Os parâmetros da validação do método são apresentados na Tabela 2.

De acordo com a ANOVA as três curvas autênticas obtidas não demonstraram falta de ajuste, mostrando que o método é capaz de gerar resultados proporcionais às concentrações estudadas. A especificidade do método foi verificada quando aplicado às amostras de placebo do comprimido LAFEPE, mostrando que os excipientes não interferem no método.

No ensaio da precisão, a repetitividade das seis réplicas autênticas na concentração teórica de 100% para 3TC ( $7,5\text{mg.L}^{-1}$ ) e AZT ( $15\text{ mg.L}^{-1}$ ) apresentou um baixo desvio padrão relativo (DPR), atendendo às normas vigentes. Os resultados da exatidão mostraram uma concordância entre os resultados encontrados para a análise dos comprimidos nas concentrações de 50, 100 e 150% da concentração esperada (Tabela 2).

A exatidão dos métodos foi verificada pela análise estatística através do teste-t de Student no intervalo de confiança 95%. Os resultados mostraram t calculados para 50, 100 e 150% (2,3; 1,9 e 3,3 para ED<sup>1</sup> e 2,8; 2,9 e 1,3 para ED<sup>2</sup>) inferiores ao t-tabelado (4,3).

Os limites de detecção e quantificação foram calculados pelo método da curva analíticas, dividindo-se o desvio padrão dos coeficientes lineares das três curvas de calibração pelas médias dos coeficientes angulares, e os resultados obtidos estão de acordo com as normas vigentes.

**Tabela 2:** Resultados da validação dos métodos baseados em espectrofotometria derivativa para o AZT + 3TC.

Métodos	Parâmetros	3 TC	AZT	
ED <sup>1</sup>	Faixa linear (mg.L <sup>-1</sup> )	1- 50	1-100	
	λ de interseção (nm)	267,3	249,3	
	Inclinação	0,0006	0,00124	
	Coefficiente linear	0,0002	0,00004	
	R <sup>2</sup>	0,9996	0,9999	
	Repetitividade(%)	98,2 ± 1,1	99,8 ± 1,2	
	DPR%	1,2	1,2	
	LD(mg.L <sup>-1</sup> )	0,181	0,035	
	LQ(mg.L <sup>-1</sup> )	0,603	0,117	
	Exatidão 50%	49,35 ± 0,8	50,99 ± 0,4	
	Exatidão 100%	98,8 ± 0,9	101,28 ± 0,7	
Exatidão 150%	149,55 ± 0,9	150,61 ± 0,6		
ED <sup>2</sup>	Faixa linear (mg.L <sup>-1</sup> )	1- 50	1-100	
	λ de interseção (nm)	250,7	229,0	239,0
	Inclinação	0,00009	0,0002	0,0001
	Coefficiente linear	0,000006	0,00003	0,00005
	R <sup>2</sup>	0,9998	0,9999	0,9999
	Repetitividade(%)	100,08 ± 1,48	98,51 ± 1,59	98,36 ± 1,40
	DPR%	1,47	1,61	1,42
	LD(mg.L <sup>-1</sup> )	0,1029	0,0986	0,4973
	LQ(mg.L <sup>-1</sup> )	0,3431	0,3287	1,6575
	Exatidão 50%	50,2 ± 0,3	49,8 ± 0,4	49,9 ± 0,3
	Exatidão 100%	99,85 ± 0,46	100,2 ± 0,3	100,1 ± 0,3
Exatidão 150%	150,1 ± 0,3	149,9 ± 0,5	149,8 ± 0,6	

ED<sup>1</sup>: Espectrofotometria primeira derivada, ED<sup>2</sup> Espectrofotometria segunda derivada.  
LD - Limite de detecção, LQ – Limite de quantificação

Os parâmetros avaliados no teste de robustez foram: água ultra-pura e deionizada; tempo de sonicação; solução sem e com filtração; estabilidade da solução (em 0, 24 e 48 h). Todas as variações produziram resultados (Tabela 3) estatisticamente dentro do limite especificado com 95% de confiança.

**Tabela 3:** Parâmetros avaliados na robustez para o UV/derivadas.  $t=2.77$  e  $n=3$ .

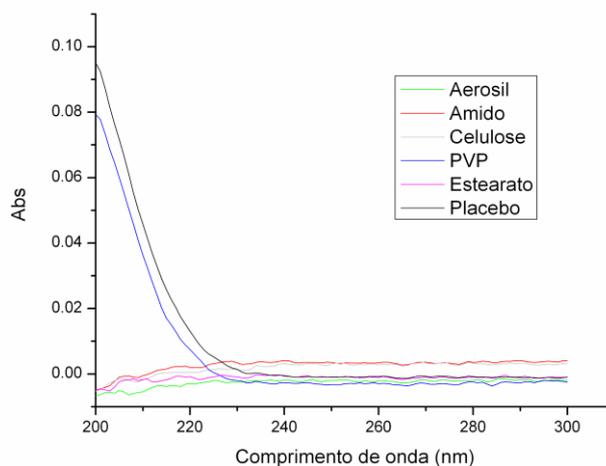
Variáveis da robustez		1º derivada		2º derivada	
		AZT (%)	3TC (%)	AZT (%)	3TC (%)
Água	Ultra-pura	96,32 ± 1,38	99,77 ± 0,71	96,28 ± 1,28	99,87 ± 0,69
	Deionizada	95,78 ± 1,09	99,05 ± 1,02	95,66 ± 1,11	99,10 ± 0,97
	t - calculado	1,17	1,46	1,17	1,57
Tempo sonicação(min)	10	96,74 ± 1,26	97,65 ± 1,42	96,62 ± 1,38	97,66 ± 1,51
	15	96,34 ± 1,42	97,32 ± 1,32	96,36 ± 1,32	97,22 ± 1,48
	t - calculado	0,37	0,40	0,38	0,52
Tipo de solução	Filtrada	97,22 ± 1,13	98,63 ± 1,18	97,41 ± 0,93	98,83 ± 1,09
	Não filtrada	97,13 ± 0,98	98,42 ± 0,40	96,93 ± 0,93	98,31 ± 0,52
	t - calculado	0,4976	1,12	0,35	1,13
Estabilidade (h)	0	96,88 ± 0,62	99,33 ± 0,53	96,87 ± 0,54	99,47 ± 0,43
	24	97,13 ± 0,75	99,56 ± 0,84	97,23 ± 0,85	99,66 ± 0,78
	t - calculado	0,7719	0,61	0,65	0,59
Estabilidade (h)	0	97,19 ± 0,57	99,19 ± 0,58	96,89 ± 0,46	99,09 ± 0,49
	48	97,18 ± 0,38	99,33 ± 0,64	97,16 ± 0,35	99,23 ± 0,53
	t - calculado	1,11	0,87	1,31	0,62

### 6.2.2 Calibração multivariada usando o PLS

Outra alternativa para superar a alta sobreposição espectral das amostras de AZT, 3TC e das doses fixas combinadas contendo esses fármacos é a utilização da calibração multivariada através do algoritmo PLS.

O modelo UV/PLS foi construído a partir dos espectros na faixa espectral de 200 a 300 nm das 31 amostras de calibração. O modelo obteve valores de erros (RMSEC e RMSECV) adequados quando aplicado às misturas sintéticas de AZT e 3TC em variadas proporções, porém quando aplicado aos comprimidos comerciais, este não respondeu como esperado.

Após investigação foi verificado que um dos excipientes absorvia na faixa de 200 a 230 nm (Figura 15) e interferia na capacidade preditiva do modelo UV/PLS desenvolvido.



**Figura 15:** Varredura individual dos excipientes e do placebo.

Deste modo, a região espectral de 200 a 230 nm foi excluída e um novo modelo foi construído com o objetivo de eliminar os possíveis interferentes.

A validação do modelo foi avaliada verificando os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, exatidão, precisão, intervalo de confiança. Os cálculos e análises das figuras de mérito certificam que o modelo multivariado é confiável e atende às especificações impostas pelos órgãos fiscalizadores nacionais e internacionais

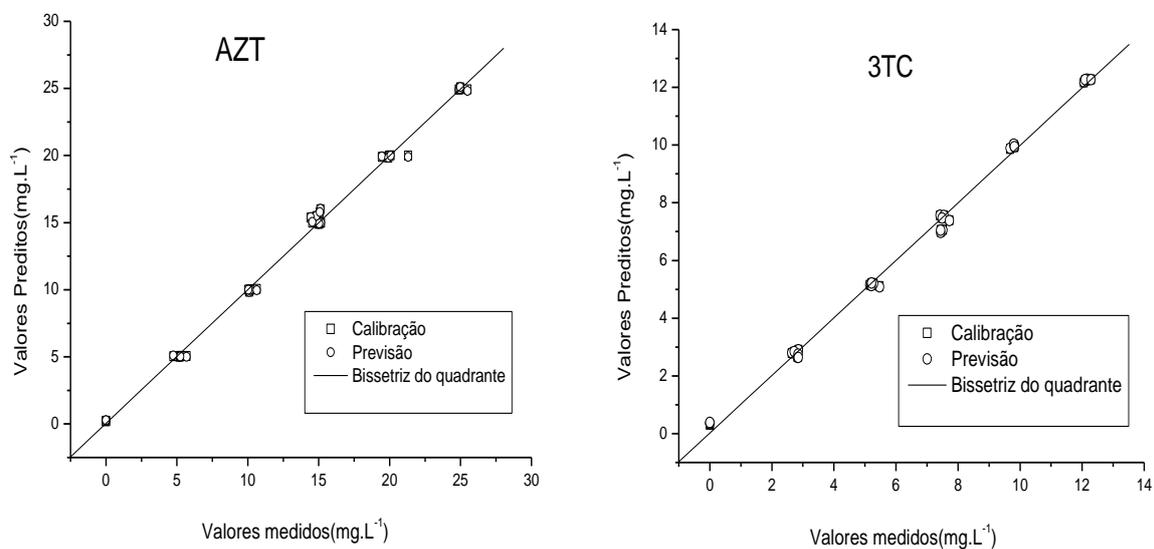
Os parâmetros de calibração e validação são apresentados na Tabela 4. O número de variáveis latentes (VL) utilizado no modelo PLS foi determinado com base no PRESS, utilizando o critério Haaland e Tomas <sup>[102]</sup>. Duas variáveis latentes foram selecionadas para ambos os modelos, que está em conformidade com o número de princípios ativos. A sensibilidade (SEN), a seletividade (SEL), e o limite de detecção (LD) foram calculados com base na teoria de NAS, utilizando o algoritmo MVC1 <sup>[119]</sup>. Para calibração multivariada, a seletividade indica a parte do sinal total que não é perdida devido à sobreposição espectral. A sensibilidade mede as variações na resposta em função da concentração de um analito particular <sup>[120]</sup>.

**Tabela 4:** Resultados da validação do método calibração multivariada (PLS).

<b>Parâmetros ( calibração n = 22)</b>	<b>3 TC</b>	<b>AZT</b>
RMSEC (mg.L <sup>-1</sup> )	0,14	0,34
RMSECV (mg.L <sup>-1</sup> )	0,17	0,39
Nº de variáveis latentes(VL)	2	2
R ( <i>predito versus valor de referência</i> ).	0,9977	0,9973
Inclinação ( <i>predito versus valor de referência</i> )	0,998 ±0.020	0,9970±0.022
Coefficiente linear ( <i>predito versus valor de referência</i> )	0.01±0.14	0.03±0.36
Faixa de linearidade (mg.L <sup>-1</sup> )	2,5 – 12,5	5,0 – 25,0
<b>Parâmetros ( validação n = 47)</b>		
RMSEP (mg.L <sup>-1</sup> )	0,41	0,34
SEL	0,269	0,300
SEN	0,091	0,062
LOD (mg.L <sup>-1</sup> )	0,12	0,16
R ( <i>predito versus valor de referência</i> ).	0,9768	0,9947
Inclinação ( <i>predito versus valor de referência</i> )	0,976±0,024	0,995±0,022
Coefficiente linear ( <i>predito versus valor de referência</i> )	0,14±0,23	0,24±0,31
Repetitividade(%)	98,0 ±0,88	99,1±0,86
DPR%	0,89	0,87
Especificidade	0,000	0,000
Exatidão 50% (n=3)	50,3 ± 0,20	50,3 ± 0,20
Exatidão 100% (n=3)	98,4 ± 0,25	100,4 ± 0,41
Exatidão 150% (n=3)	149,0± 1,03	148,9 ± 0,94

Os resultados da exatidão evidenciaram uma concordância entre os resultados encontrados nos comprimidos nas concentrações de 50, 100 e 150%. As análises estatísticas através do teste t Student ratificam a exatidão dos métodos no intervalo de 95% de confiança. Os mesmos mostraram t calculados (1,3; 2,3; 2,3) inferiores ao t-tabelado (4,3).

Analisando a Figura 16, que apresenta os valores da metodologia de referência *versus* os valores preditos pelo modelo para as amostras de calibração e validação, pode-se observar que as curvas obtidas tanto para AZT (Figura 16a) quanto para o 3TC (Figura 16b), mostram boa correlação indicando com maior segurança a previsão das concentrações planejadas.



**Figura 16:** Curvas do valor medido *versus* o valor previsto para os modelos de calibração multivariada (PLS) para AZT (a) e 3TC (b).

Os parâmetros avaliados no teste de robustez foram: água ultra-pura e deionizada; tempo de sonicação; solução sem e com filtração; estabilidade da solução (em 0, 24 e 48 h). Todas as variações ficaram (Tabela-5) estatisticamente dentro do limite especificado com 95% de confiança. Os erros médios quadrados relativos de previsão (RMSEP) entre o PLS e o método de referência (CLAE) foram de 0,34% para a AZT e 0,41 % para 3TC, o que indica boa capacidade de previsão dos teores dos fármacos na forma farmacêutica estudada.

**Tabela 5:** Parâmetros avaliados na robustez para a UV/PLS.  $t=2.77$  e  $n=3$ .

Variáveis da robustez		AZT (%)	3TC (%)
Água	Ultra-pura	96,44 ± 1,58	99,97 ± 0,79
	Deionizada	95,36 ± 1,19	98,95 ± 0,92
	t - calculado	1,09	1,68
Tempo sonicação(min)	10	96,84 ± 1,36	97,46 ± 1,71
	15	96,54 ± 1,52	97,12 ± 1,40
	t - calculado	0,29	0,31
Tipo de solução	Filtrada	97,31 ± 1,03	98,73 ± 1,08
	Não filtrada	96,93 ± 0,93	98,11 ± 0,40
	t - calculado	0,55	1,08
Estabilidade (h)	0	96,77 ± 0,42	99,53 ± 0,33
	24	97,03 ± 0,65	99,76 ± 0,84
	t - calculado	0,67	0,51
Estabilidade (h)	0	96,99 ± 0,46	99,09 ± 0,49
	48	97,36 ± 0,25	99,33 ± 0,53
	t - calculado	1,41	0,66

Considerando os valores apresentados nas Tabelas 4 e 5 o novo modelo apresentou valores de RMSECV e RMSEP dentro dos limites preconizados é considerado validado, conforme recomendação da Resolução específica RE n ° 899 com base no ICH e IUPAC.

### 6.3 Determinação do teor do AZT + 3TC em comprimidos dose fixa combinada de cinco diferentes laboratórios pelos métodos desenvolvidos

Uma vez que os métodos UV derivativo, UV/PLS e cromatográfico foram desenvolvidos e validados, estes foram aplicados à determinação do teor de 150+300 mg/comprimido de AZT+3TC produzidos por cinco diferentes laboratórios farmacêuticos (LAFEPE, Farmanguinhos, IQUEGO, FURP, GlaxoSmithKline).

Com o objetivo de demonstrar a confiabilidade dos métodos desenvolvidos frente a outros fabricantes realizou-se a comparação entre os resultados obtidos para cada um dos métodos. Para avaliar o grau de exatidão dos métodos desenvolvidos em relação ao método de referência, os ensaios foram realizados em octuplicata ( $n=8$ ) nas mesmas concentrações, AZT

15 mg.L<sup>-1</sup> e 3TC-7,5 mg.L<sup>-1</sup>, utilizando as mesmas soluções para os quatro métodos e para cinco fabricantes diferentes (Tabela 6).

Os métodos foram avaliados estatisticamente utilizando o teste-t pareado frente ao método de referência. Todos os t-calculados ficaram abaixo de t-tabelado (2,14) com nível de 95% de confiança, mostrando que não há diferenças significativas entre os métodos propostos e que estes podem ser aplicados.

**Tabela 6:** Resultados dos teores médios dos diferentes fabricantes e métodos. (n=8).

		LAB-1		LAB-B		LAC-C		LAB-D		LAB-E	
		AZT	3TC								
		300 mg	150 mg								
CLAE	Teor (mg/comp)	295,1 ± 3,1	149,4 ± 2,8	304,6 ± 1,8	150,9 ± 1,9	296,8 ± 5,1	151,8 ± 0,8	302,7 ± 3,7	146,2 ± 0,6	291,8 ± 2,5	147,2 ± 1,4
	DPR (%)	1	1,8	0,6	1,3	1,7	0,5	1,4	0,4	0,9	0,9
ED <sup>1</sup>	Teor (mg/comp)	297,1 ± 2,1	148,5 ± 1,8	306,5 ± 4,6	152,0 ± 1,5	295,7 ± 1,9	152,2 ± 1,7	301,7 ± 1,0	147,2 ± 1,5	291,1 ± 4,1	145,8 ± 2,3
	DPR (%)	0,7	1,2	1,5	1,0	0,6	1,1	0,3	1,1	1,5	1,6
ED <sup>2</sup>	Teor (mg/comp)	295,1 ± 1,3	149,4 ± 1,2	303,8 ± 3,9	151,9 ± 2,4	299,8 ± 4,6	152,0 ± 1,9	302,6 ± 1,9	147,7 ± 1,6	291,0 ± 5,1	147,4 ± 1,6
	DPR (%)	1,2	1,5	1,3	1,5	1,5	1,3	0,7	1,1	1,8	1,1
PLS	Teor (mg/comp)	297,7 ± 1,7	148,6 ± 1,1	307,6 ± 4,7	151,3 ± 6,2	299,3 ± 1,6	156,0 ± 1,9	305,4 ± 4,1	149,1 ± 2,0	294,8 ± 1,7	153,0 ± 1,8
	DPR (%)	0,6	0,7	3,6	4,2	0,5	1,2	1,6	1,4	0,6	0,5

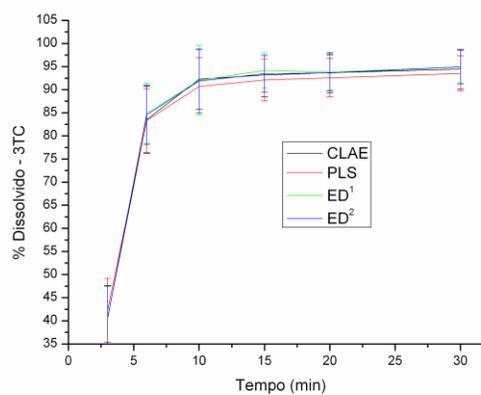
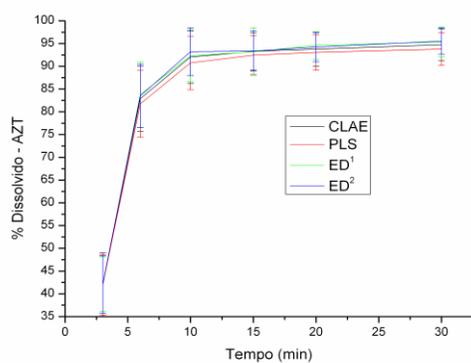
#### **6.4 Determinação do perfil de dissolução da dose fixa combinada dos comprimidos de diferentes fabricantes de AZT + 3TC pelos métodos desenvolvidos**

A avaliação de perfil de dissolução é útil para selecionar formulações durante o processo de desenvolvimento farmacotécnico, avaliar a estabilidade, otimizar formulações, avaliar o efeito de determinadas alterações realizadas em produtos já em comercialização, como ferramenta no controle de qualidade lote a lote e, também, para estabelecer a semelhança entre uma nova formulação genérica e seu produto de referência.<sup>[126,127,128]</sup> As metodologias desenvolvidas foram avaliadas realizando perfil com 6 (seis) tempos de coleta utilizando 8 (oito) cubas contendo 900 mL de água, rotação 50 rpm, pás, temperatura  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  de acordo com o método de dissolução desenvolvido e validado no LAFEPE. Os perfis de dissolução dos cinco fabricantes entre o método de referência CLAE, foram comparados com os obtidos pelos métodos (PLS,  $\text{ED}^1$  e  $\text{ED}^2$ ), como mostram as Tabelas 7 a 11 e Figuras 17 a 21.

Todos os perfis foram analisados ponto a ponto através do teste-t, demonstrando que não há diferença estatisticamente significativa entre os métodos. A aplicação do perfil evidenciou a aplicabilidade do modelo frente a uma faixa maior para os fármacos estudados para os cinco fabricantes. O método PLS tem maior vantagem em relação a espectrofotometrias derivativas, visto que uma vez o modelo sendo desenvolvido, é só aplicar as varreduras de todos os pontos de dissolução, fazer o pré-tratamento e prever os resultados. No caso das derivadas o processo é demorado e trabalhoso. É necessário derivar cada ponto nos comprimentos já definidos, verificar absorvância e aplicar individualmente na curva.

**Tabela 7:** Resultados obtidos do percentual dissolvido do comprimido dose fixa combinada AZT + 3TC nas amostras do laboratório -A empregando os métodos CLAE, PLS, ED<sup>1</sup> e ED<sup>2</sup>.

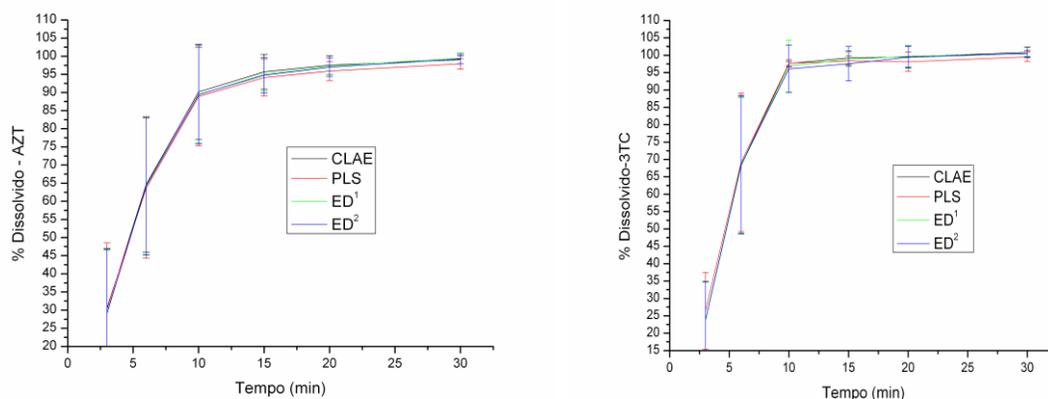
Tempo (min)	Laboratório -A							
	CLAE		PLS		ED <sup>1</sup>		ED <sup>2</sup>	
	AZT (%)	3 TC %	AZT %	3 TC %	AZT %	3 TC %	AZT %	3 TC %
3	42,0 ± 6,9	40,7 ± 7,0	41,9 ± 6,6	42,3 ± 6,9	42,1 ± 5,9	40,5 ± 6,9	42,1 ± 6,3	40,6 ± 6,9
6	83,9 ± 7,2	83,5 ± 7,2	81,8 ± 7,3	83,3 ± 6,9	83,8 ± 7,2	84,9 ± 6,5	83,5 ± 6,9	84,6 ± 6,4
10	92,1 ± 5,8	92,3 ± 6,5	90,8 ± 5,9	90,7 ± 6,2	92,3 ± 5,6	92,0 ± 7,5	93,2 ± 5,3	91,9 ± 6,9
15	93,3 ± 4,1	93,2 ± 4,7	92,5 ± 4,3	92,1 ± 4,5	93,2 ± 5,3	94,2 ± 3,7	93,4 ± 4,5	93,5 ± 4,0
20	93,8 ± 3,8	93,7 ± 4,4	93,1 ± 3,9	92,6 ± 4,2	94,6 ± 3,1	93,8 ± 3,9	94,2 ± 3,2	93,6 ± 3,9
30	94,7 ± 3,5	94,4 ± 4,3	93,8 ± 3,6	93,5 ± 3,8	95,4 ± 3,3	94,9 ± 3,6	95,5 ± 2,9	94,9 ± 3,6



**Figura 17-** Gráfico do percentual dissolvido versus tempo para as amostra do laboratório-A empregando os métodos CLAE, PLS, ED<sup>1</sup> e ED<sup>2</sup>.

**Tabela 8:** Resultados obtidos do percentual dissolvido do comprimido dose fixa combinada AZT + 3TC nas amostras do laboratório -B empregando os métodos CLAE, PLS, ED<sup>1</sup> e ED<sup>2</sup>.

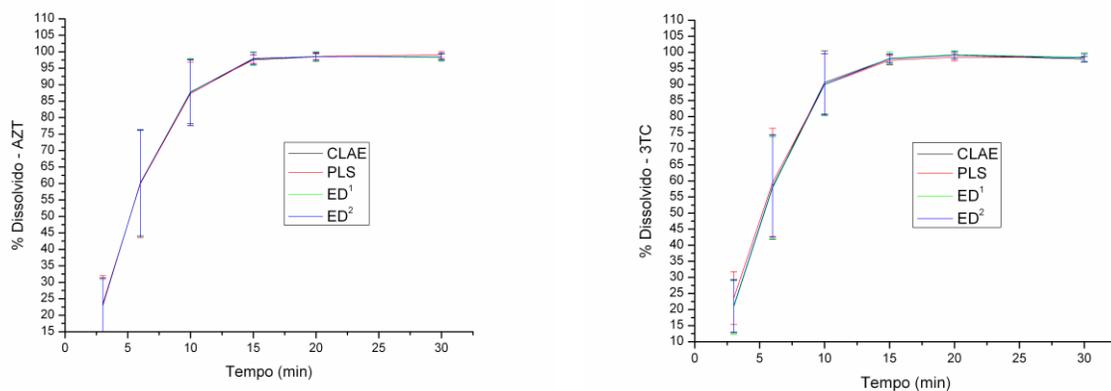
Tempo (min)	Laboratório -B							
	CLAE		PLS		ED <sup>1</sup>		ED <sup>2</sup>	
	AZT %	3 TC %	AZT %	3 TC %	AZT %	3 TC %	AZT %	3 TC %
3	30,3 ± 16,8	23,8 ± 11,1	30,6 ± 17,9	26,4 ± 11,1	29,1 ± 17,40	23,5 ± 11,1	29,1 ± 17,5	23,8 ± 10,9
6	64,7 ± 18,7	68,4 ± 19,7	63,6 ± 19,3	69,2 ± 19,9	64,4 ± 18,9	68,14 ± 19,6	64,2 ± 19,0	68,6 ± 19,8
10	90,1 ± 13,1	96,8 ± 2,5	88,8 ± 13,6	97,7 ± 1,1	89,3 ± 13,1	96,87 ± 7,5	89,4 ± 13,6	96,1 ± 6,8
15	95,7 ± 4,8	99,3 ± 2,0	94,1 ± 5,1	98,4 ± 1,5	95,1 ± 4,6	98,89 ± 1,9	94,8 ± 4,9	97,6 ± 4,9
20	97,5 ± 2,6	99,5 ± 3,0	95,9 ± 2,6	98,1 ± 2,8	97,3 ± 2,3	99,73 ± 3,0	97,0 ± 2,5	99,5 ± 3,1
30	99,1 ± 1,2	100,9 ± 1,5	97,9 ± 1,5	99,6 ± 1,3	99,5 ± 1,5	100,4 ± 0,9	99,2 ± 1,3	100,5 ± 0,8



**Figura 18-** Gráfico do percentual dissolvido versus tempo para as amostras do laboratório-B empregando os métodos CLAE, PLS, ED<sup>1</sup> e ED<sup>2</sup>

**Tabela 9:** Resultados obtidos do percentual dissolvido do comprimido dose fixa combinada AZT + 3TC nas amostras do laboratório -C empregando os métodos CLAE, PLS, ED<sup>1</sup> e ED<sup>2</sup>.

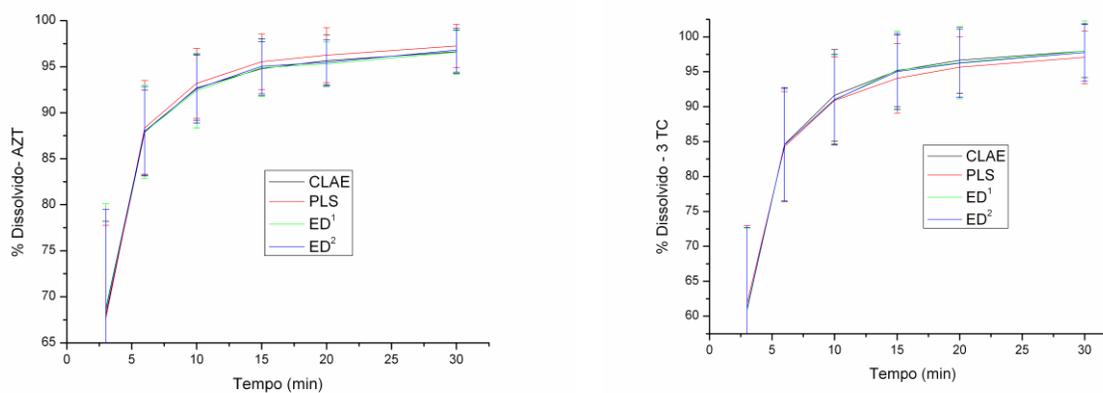
Tempo (min)	Laboratório -C							
	CLAE		PLS		ED <sup>1</sup>		ED <sup>2</sup>	
	AZT %	3 TC %	AZT %	3 TC %	AZT %	3 TC %	AZT %	3 TC %
3	22,9 ± 8,4	20,8 ± 8,2	23,5 ± 8,6	23,5 ± 8,2	23,0 ± 8,0	20,7 ± 8,4	22,8 ± 8,1	21,1 ± 8,2
6	60,1±16,0	58,1 ±16,3	59,9± 16,4	59,5±16,8	60,2 ±16,1	57,7±15,8	60,2 ±16,2	58,3 ±15,8
10	87,9 ± 9,7	90,6 ± 9,8	87,2± 9,7	87,0 ± 9,5	87,8 ±10,3	89,9 ± 9,6	87,6 ±10,1	90,0 ± 9,5
15	97,5 ± 1,6	98,1 ± 1,2	97,8± 1,3	97,5 ± 1,3	97,9 ± 2,0	98,2 ± 1,9	98,0±1,8	98,0 ± 1,6
20	98,5± 0,9	99,1 ± 1,1	98,6 ± 1,0	98,5 ± 1,1	98,5 ± 1,5	99,3 ± 1,3	98,5±1,3	99,1 ± 1,1
30	98,5 ± 0,8	97,9 ± 0,9	99,1 ± 1,0	98,5 ± 1,3	98,3 ± 1,2	98,5 ± 1,3	98,5 ±1,0	98,3 ± 1,2



**Figura 19-** Gráfico do percentual dissolvido versus tempo para as amostras do laboratório-C empregando os métodos CLAE, PLS, ED<sup>1</sup> e ED<sup>2</sup>.

**Tabela 10:** Resultados obtidos do percentual dissolvido do comprimido dose fixa combinada AZT + 3TC nas amostras do laboratório -D empregando os métodos CLAE, PLS, ED<sup>1</sup> e ED<sup>2</sup>.

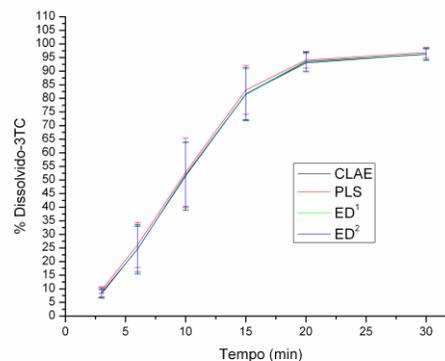
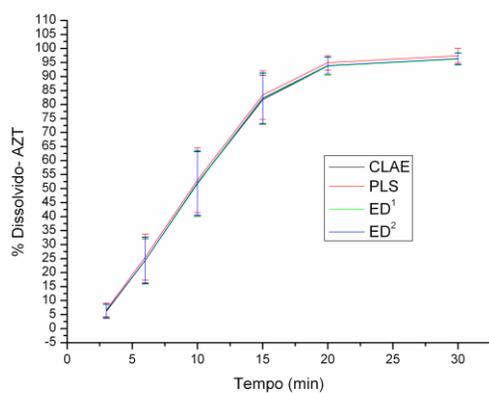
Tempo (min)	Laboratório -D							
	CLAE		PLS		ED <sup>1</sup>		ED <sup>2</sup>	
	AZT %	3 TC %	AZT %	3 TC %	AZT %	3 TC %	AZT %	3 TC %
3	68,0 ± 10,2	60,9 ± 11,7	67,6 ± 10,1	61,9 ± 11,1	68,8 ± 11,3	61,0 ± 11,7	68,6 ± 10,9	61,1 ± 11,6
6	87,9 ± 4,6	84,6 ± 8,1	88,3 ± 5,1	84,2 ± 7,9	87,9 ± 5,1	84,5 ± 8,1	88,0 ± 4,8	84,5 ± 8,1
10	92,7 ± 3,5	91,6 ± 6,5	93,2 ± 3,8	90,9 ± 6,2	92,4 ± 4,1	91,0 ± 6,4	92,6 ± 3,8	91,0 ± 6,5
15	94,8 ± 2,9	95,2 ± 5,1	95,5 ± 3,0	94,1 ± 4,9	94,9 ± 3,1	95,3 ± 5,6	95,1 ± 3,0	95,0 ± 5,4
20	95,7 ± 2,8	96,6 ± 4,7	96,3 ± 2,9	95,7 ± 4,4	95,3 ± 2,4	96,30 ± 5,2	95,5 ± 2,4	96,2 ± 4,9
30	96,6 ± 2,3	98,0 ± 3,8	97,2 ± 2,4	97,1 ± 3,8	96,6 ± 2,4	97,9 ± 4,3	98,6 ± 2,4	97,8 ± 4,1



**Figura 20-** Gráfico do percentual dissolvido versus tempo para as amostras do laboratório-D empregando os métodos CLAE, PLS, ED<sup>1</sup> e ED<sup>2</sup>.

**Tabela 11:** Resultados obtidos do percentual dissolvido do comprimido dose fixa combinada AZT + 3TC nas amostras do laboratório -E empregando os métodos CLAE, PLS, ED<sup>1</sup> e ED<sup>2</sup>.

Tempo (min)	Laboratório -E							
	CLAE		PLS		ED <sup>1</sup>		ED <sup>2</sup>	
	AZT %	3 TC %	AZT %	3 TC %	AZT %	3 TC %	AZT %	3 TC %
3	6,1 ± 2,3	8,1 ± 1,6	6,7 ± 2,4	9,5 ± 1,2	6,2 ± 2,2	8,5 ± 1,6	6,3 ± 2,3	8,7 ± 1,6
6	24,2 ± 7,9	24,6 ± 8,4	25,5 ± 8,2	28,0 ± 8,4	24,2 ± 8,3	24,4 ± 8,9	24,4 ± 8,3	24,6 ± 9,1
10	51,6 ± 11,5	51,5 ± 12,5	53,0 ± 11,5	54,9 ± 12,8	51,6 ± 11,7	51,7 ± 11,9	52,0 ± 11,5	51,9 ± 12,0
15	81,6 ± 8,8	81,5 ± 9,4	83,8 ± 9,0	84,5 ± 9,1	82,1 ± 9,1	81,4 ± 9,6	82,3 ± 9,0	81,6 ± 9,7
20	93,6 ± 3,2	93,0 ± 3,5	95,9 ± 3,4	95,6 ± 3,6	93,67 ± 3,1	93,4 ± 3,9	93,9 ± 2,9	93,6 ± 3,6
30	96,2 ± 2,1	96,1 ± 2,1	98,3 ± 2,1	97,6 ± 1,9	96,2 ± 2,1	96,1 ± 2,2	96,4 ± 2,1	96,3 ± 2,1



:

**Figura 21-** Gráfico do percentual dissolvido versus tempo para as amostras do laboratório-E empregando os métodos CLAE, PLS, ED<sup>1</sup> e ED<sup>2</sup>.

De acordo com as Tabelas 7 a 11 os resultados dos primeiros tempo de amostragem mostraram uma grande variabilidade devido aos aspectos tecnológicos inerente ao processo de fabricação de comprimidos. Dentre estes, podemos citar a variabilidade da espessura da camada de revestimento de tamanho de partícula, e força de compressão aplicada. Além disso, as irregularidades na posição de amostragem podem interferir nos resultados. Esses fatores são mais relevantes no primeiro tempo de amostragem pelo fato de que é realizado em três minutos, um tempo não suficiente para a total desintegração do comprimido. No entanto, comparando-se os valores ponto a ponto em relação aos métodos, pode-se notar que não há diferença significativa de acordo com teste-t pareado em um nível de 95%.

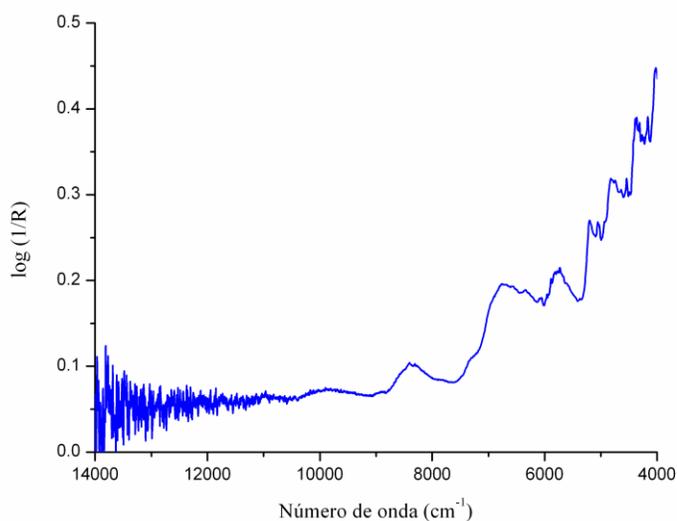
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **PARTE III - Espectrofotometria na região do Infravermelho próximo**

## 7.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO - ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

### 7.1 Pré-processamento dos espectros NIR dos granulados, núcleos e comprimidos revestidos de AZT + 3TC

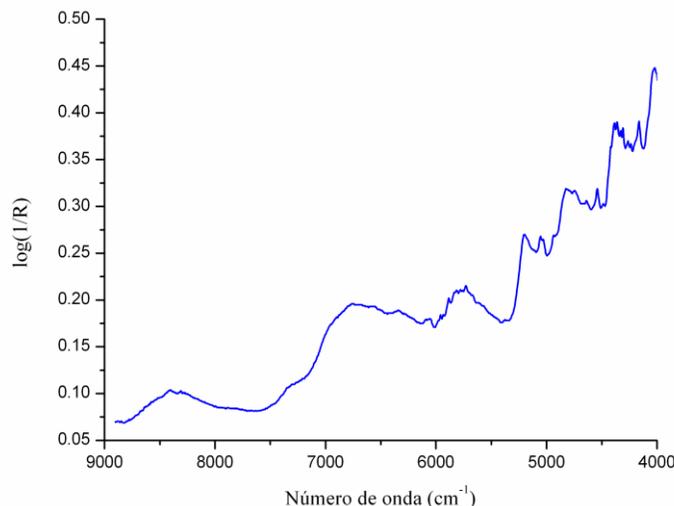
Os espectros dos granulados, núcleos e comprimidos revestidos para as propriedades em estudo foram registrados na faixa de 14.000 a 3.800  $\text{cm}^{-1}$  como mostra a Figura 22.



**Figura 22:** Espectro NIR típico do granulado AZT + 3 TC na faixa de 14.000 a 3.800  $\text{cm}^{-1}$

Todavia a região do espectro acima de 8.980  $\text{cm}^{-1}$  apresenta muitos ruídos. Isto ocorre porque nesta região o detector à base de Arseneto de Gálio e Índio ( $\text{AsGaIn}$ )<sup>[129]</sup> do espectrômetro, no qual foram registrados os espectros NIR, apresenta uma baixa relação sinal/ruído.

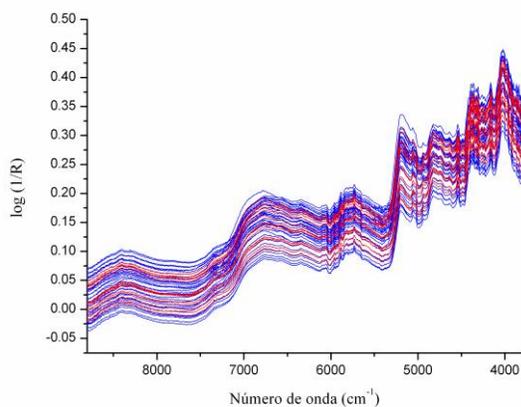
Essas regiões foram descartadas (Figura 23) para evitar à inserção de informação ruidosa aos modelos quimiométricos e a região espectral de 8.900 a 3.840  $\text{cm}^{-1}$  foi adotada como região de trabalho.



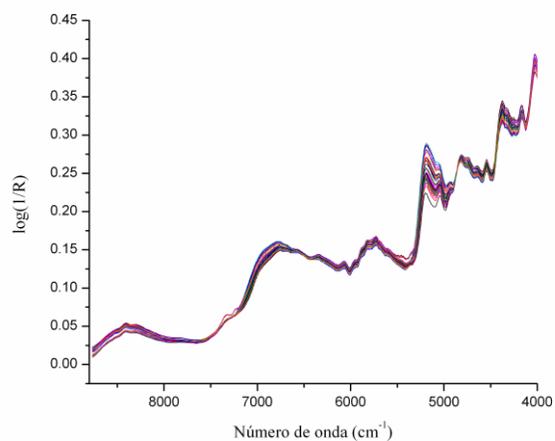
**Figura 23:** Espectro NIR do granulado AZT + 3 TC na faixa de 8.900 - 3.840  $\text{cm}^{-1}$

Testaram-se várias técnicas de pré-processamento e optou-se por usar a suavização Savitzky-Golay (polinômio de segunda ordem) e *Multiplicative Signal Correction*-MSC, já que esses pré-tratamentos apresentaram, em geral, os menores erros de previsão e calibração. MSC é um tratamento matemático bastante utilizado com a finalidade de corrigir os efeitos diferenciados de espalhamento de luz produzidos pela diferente reflexão das superfícies analisadas. A melhor suavização para teor de umidade e dureza foi obtida usando uma janela de 21 pontos. Para os teores de AZT e 3TC dos granulados, núcleos e comprimidos revestidos os melhores resultados foram obtidos usando uma janela de 41 pontos. Desta forma, os modelos foram construídos sempre empregando os espectros NIR suavizados pelo algoritmo Savitzky-Golay usando uma janela de 21 para modelo para umidade e dureza e 41 pontos para os teores de AZT e 3 TC no granulado, núcleo e comprimidos revestidos, com MSC para todos os modelos. O método de pré-processamento empregado nas variáveis (colunas) da matriz consistiu apenas na centralização dos dados na média<sup>[80]</sup>, uma vez que dados espectrais possuem variáveis contínuas (comprimentos de onda) e não se justifica utilização de autoescalamamento.

Nas Figuras 24 e 25 são mostrados os espectros NIR das 50 amostras empregadas na construção e validação dos modelos para determinação de umidade sem e com pré-processamento (Suavização Savitzky-Golay janela de 21 pontos + MSC) dos quais 36 amostras (em azul) foram utilizadas inicialmente para calibração e 14 (em vermelho) para previsão, escolhidas pelo algoritmo SPXY.

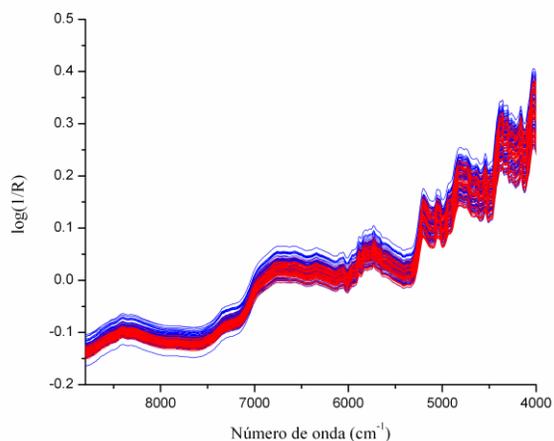


**Figura 24:** Espectros NIR sem pré-processamento das amostras do granulado AZT+3TC empregadas na umidade

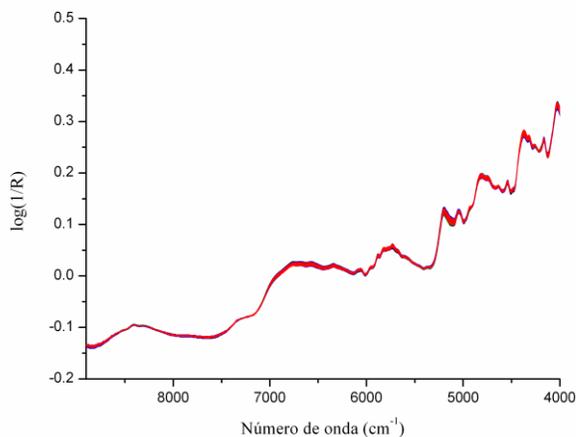


**Figura 25:** Espectros NIR com pré-processamento ( Suavização Savitzky-Golay janela de 21 Pontos + MSC) das amostras do granulado AZT+3TC empregadas na umidade

Nas Figuras 26 e 27 são mostrados os espectros NIR de 179 comprimidos (núcleos) com diferentes durezas sem e com pré-processamento (Suavização Savitzky-Golay janela de 21 pontos + MSC). Das quais 120 amostras (em azul) foram utilizadas inicialmente para calibração e 59 (em vermelho) para previsão.

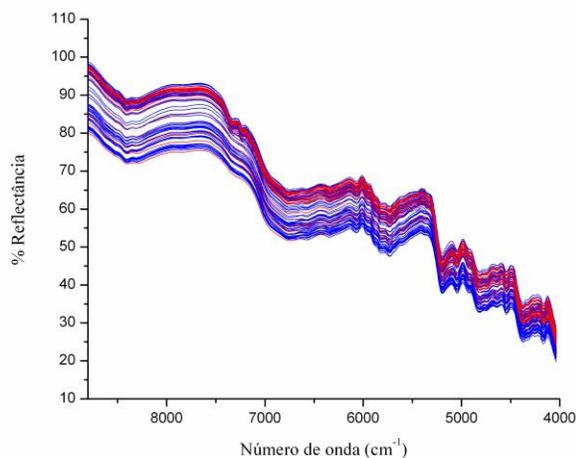


**Figura 26:** Espectros NIR sem pré-processamento dos comprimidos (núcleos) de AZT+3TC com diferentes durezas

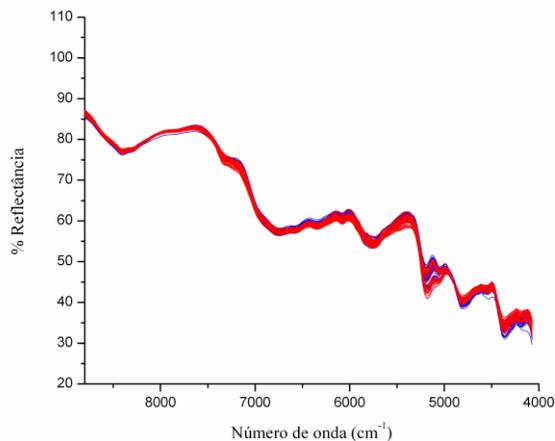


**Figura 27:** Espectros NIR com pré-processamento (Suavização Savitzky-Golay janela de 21 pontos + MSC) dos comprimidos (núcleos) de AZT+3TC Com diferentes durezas

Nas Figuras 28 e 29 são mostrados os espectros NIR de 82 amostras de granulados sem e com pré-processamento (Suavização Savitzky-Golay janela de 41 pontos + MSC). Destas, 40 amostras (em azul) foram utilizadas inicialmente para calibração e 42 (em vermelho) para previsão.

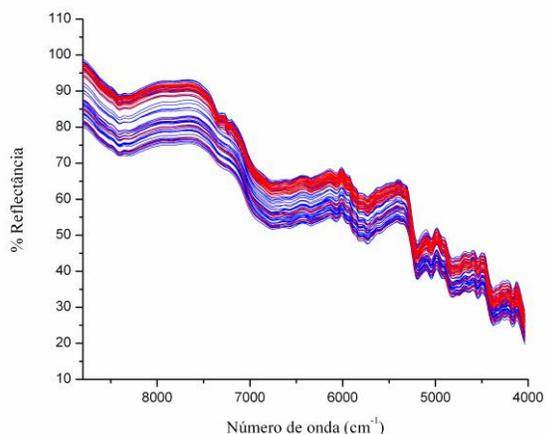


**Figura 28:** Espectros NIR sem pré-processamento dos granulados de AZT+3TC.

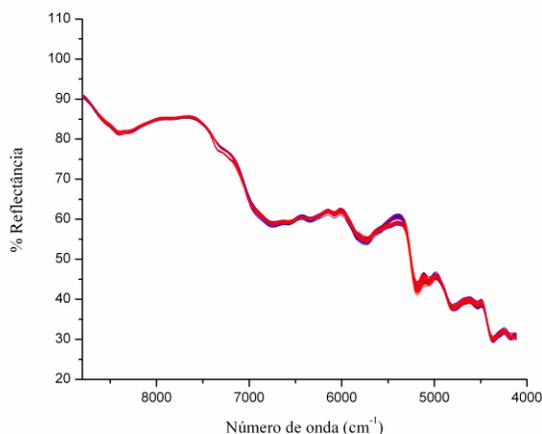


**Figura 29:** Espectros NIR com pré-processamento ( Suavização Savitzky-Golay janela de 41 pontos + MSC ) dos granulados de AZT+3TC.

Nas Figuras 30 e 31 são mostrados os espectros NIR de 80 amostras de núcleo sem e com pré-processamento (algoritmo Savitzky-Golay janela de 41 pontos + MSC). Destas amostras, 50 amostras (em azul) foram utilizadas inicialmente para calibração e 40 (em vermelho) para previsão.

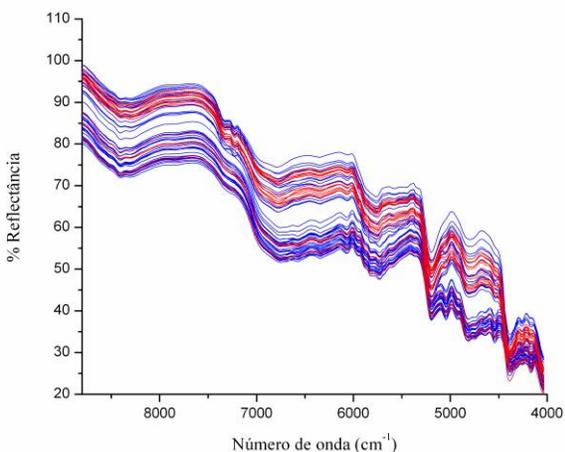


**Figura 30:** Espectros NIR sem pré-processamento dos núcleos de AZT+3TC.

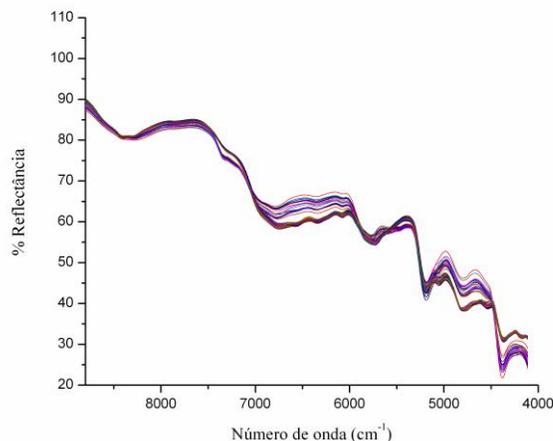


**Figura 31:** Espectros NIR com pré-processamento o (Suavização Savitzky-Golay janela de 41 pontos +MSC) dos núcleos AZT+3TC.

Nas Figuras 32 e 33 são mostrados os espectros NIR de 64 amostras de núcleos e comprimidos revestidos sem e com pré-processamento (algoritmo Savitzky-Golay janela de 41 pontos + MSC). O conjunto de calibração foi composto por 45 amostras (em azul) e o conjunto de validação externa composto por 19 amostras (em vermelho).



**Figura 32:** Espectros NIR sem pré-processamento dos comprimidos revestidos de AZT+3TC.



**Figura 33:** Espectros NIR com pré-processamento o algoritmo Savitzky-Golay janela de 41 pontos +MSC dos comprimidos revestidos de AZT+3TC.

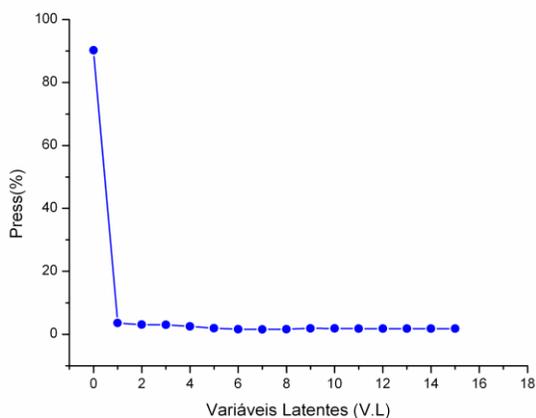
## 7.2 Detecção das amostras anômalas

A presença de anomalias (*outliers*) no conjunto de calibração e previsão foi avaliada utilizando-se os critérios adotados pelo *Software* MVC<sub>1</sub> e pela avaliação dos resíduos em **X** e **y** utilizando o *Software* Unscrambler.

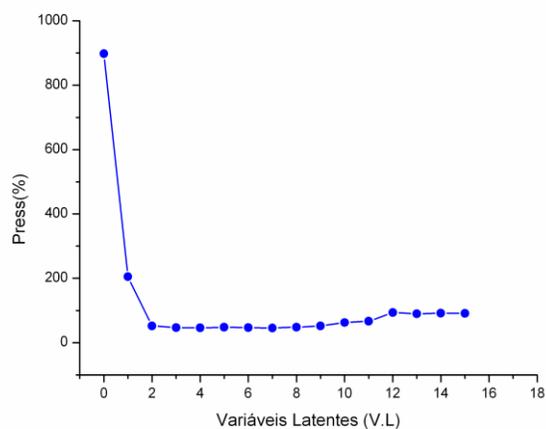
Para os teores de 3TC e AZT, o conjunto de calibração foi escolhido pelo algoritmo SPXy totalizando um total inicialmente de 40, 50 e 45 amostras de granulados, núcleos e comprimidos revestidos. Após a eliminação das amostras consideradas anômalas, os modelos foram construídos com 37, 40 e 36 amostras. No caso da umidade, após a detecção das amostras anômalas, os modelos foram construídos com 34 amostras das 36 iniciais. Após a detecção das amostras anômalas, o modelo de calibração para a dureza foi construído com 70 amostras das 119 inicialmente. Muitas amostras foram consideradas anômalas no caso da dureza, possivelmente devido a forma como foi obtido o conjunto de calibração (variando-se as pressões da compressor).

### 7.3 Construção dos modelos PLS-1

A escolha do número de variáveis latentes é um dos parâmetros mais importantes no desenvolvimento do modelo. A validação cruzada foi utilizada como ferramenta no auxílio da seleção do número de variáveis latentes. O parâmetro envolvido na seleção das variáveis latentes para cada modelo desenvolvido foi o que proporcionou a menor soma do erro médio quadrático (PRESS) na validação cruzada. A partir dos dados das Figuras 34 e 35 foi possível observar que os modelos obtidos não apresentaram ganho significativo em termos de minimização dos valores de PRESS com mais de 4 variáveis latentes para a umidade e dureza, respectivamente.

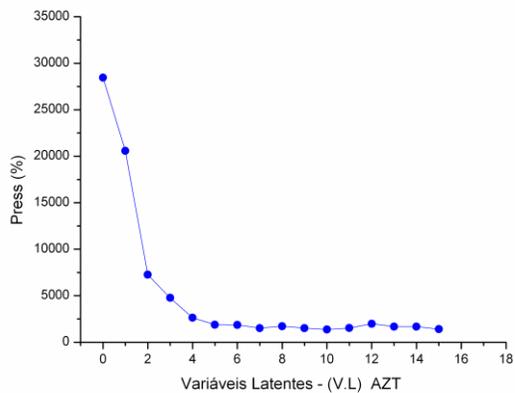


**Figura 34:** Press *versus* número de variáveis latentes na construção do modelo PLS para determinação de umidade

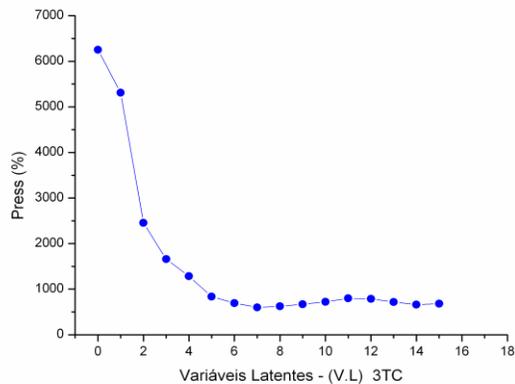


**Figura 35:** Press *versus* número de variáveis latentes na construção do modelo PLS para determinação da dureza.

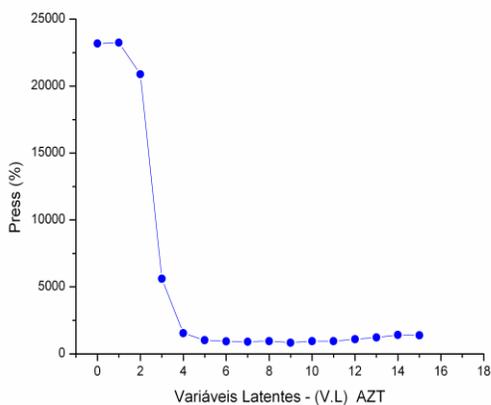
A partir dos dados das Figuras-36 a 41 é possível observar que os modelos obtidos não apresentaram ganho significativo em termos de minimização dos valores de PRESS com mais de 5 variáveis latentes para granulados de AZT e 3TC e 5 e 6 para os núcleos, e 7 e 8 para os comprimidos revestidos, respectivamente.



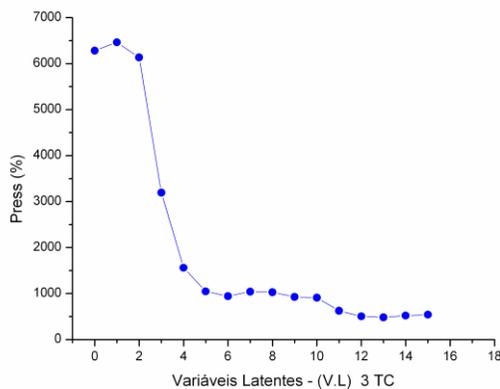
**Figura 36:** Press *versus* número de variáveis latentes na construção dos modelos PLS para determinação teor de AZT do granulado



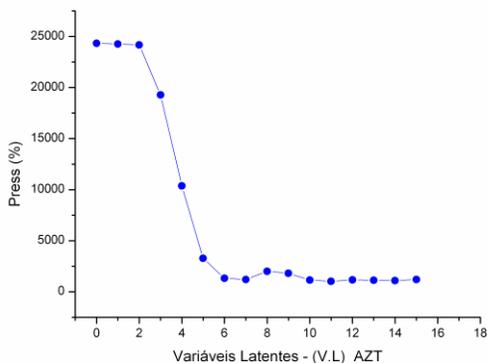
**Figura 37:** Press *versus* número de variáveis latentes na construção dos modelos PLS para determinação do teor de 3TC do granulado



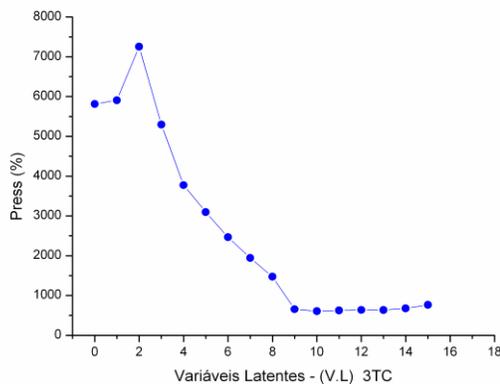
**Figura 38:** Press *versus* número de variáveis latentes na construção dos modelos PLS para determinação teor do núcleo de AZT



**Figura 39:** Press *versus* número de variáveis latentes na construção dos modelos PLS para determinação teor do núcleo de 3 TC



**Figura 40:** Press *versus* número de variáveis latentes na construção dos modelos PLS para determinação do teor de AZT no comprimido revestido

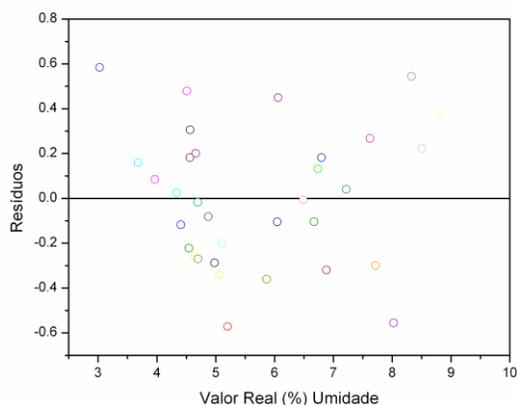


**Figura 41 :** Press *versus* número de variáveis latentes na construção dos modelos PLS para determinação do teor de 3 TC no comprimido revestido

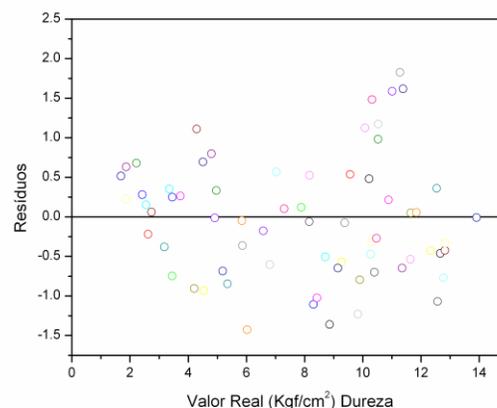
A escolha de um pequeno número de VLs pode excluir do modelo informações analíticas relevantes, enquanto um grande número de VLs pode gerar modelos superestimados e ocasionar o comprometimento da previsão dos parâmetros de interesse em amostras que não participaram do conjunto de calibração, devido à agregação de ruídos ao modelo.

Ao avaliar a capacidade de previsão dos teores de água presente nos granulados e a força aplicada a cada núcleo observou-se que os melhores modelos estão associados ao uso de 4 variáveis latentes em virtude de ser realizado na matriz em estudo uma única alteração. Já para os teores dos granulados, núcleos e comprimidos revestidos foram necessários mais variáveis latentes devido a variações serem realizadas na composição da matriz como por exemplo variações dos dois ativos e os excipientes.

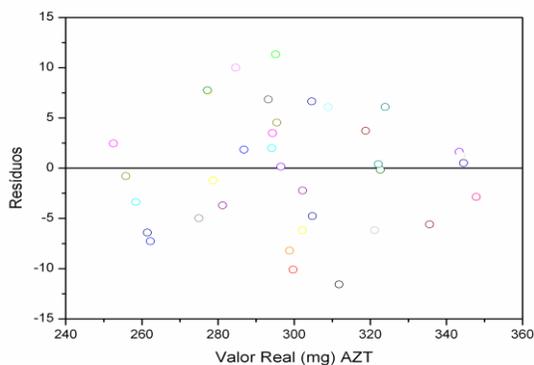
Os modelos para umidade, durezas e teores do granulados, núcleos e os comprimidos revestidos não apresentaram comportamentos tendenciosos o que pode ser comprovado pela distribuição aleatória dos resíduos em  $y$  das amostras do conjunto de calibração como são mostrados nas Figuras 42 a 49.



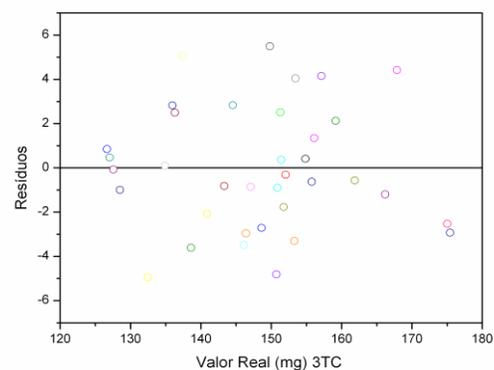
**Figura 42:** Resíduos *versus* valores experimentais (do conjunto de calibração) obtidos pelo modelo de calibração PLS para umidade.



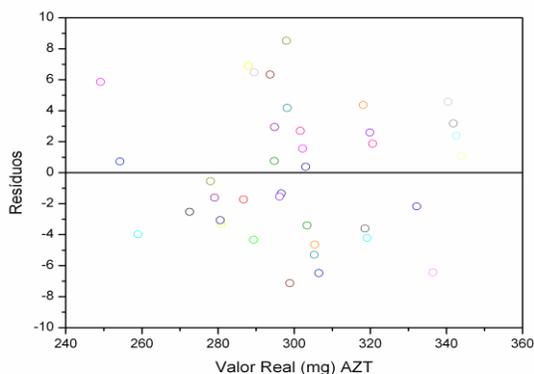
**Figura 43:** Resíduos *versus* valores experimentais (do conjunto de calibração) obtidos pelo modelo de calibração PLS para dureza.



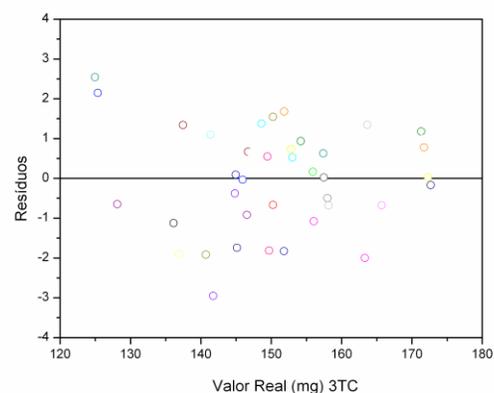
**Figura 44 :** Resíduos *versus* valores experimentais (do conjunto de calibração) obtidos pelo modelo de calibração PLS para determinação de AZT no granulado.



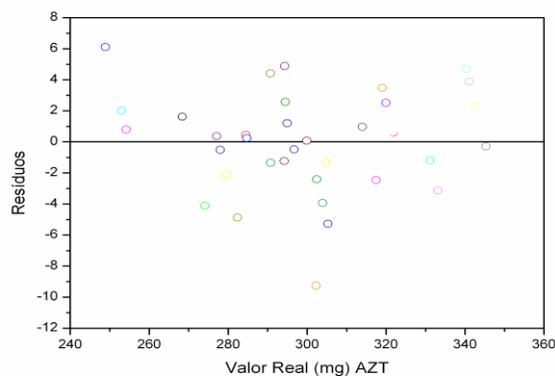
**Figura 45:** Resíduos *versus* valores experimentais (do conjunto de calibração) obtidos pelo modelo de calibração PLS para determinação de 3TC no granulado.



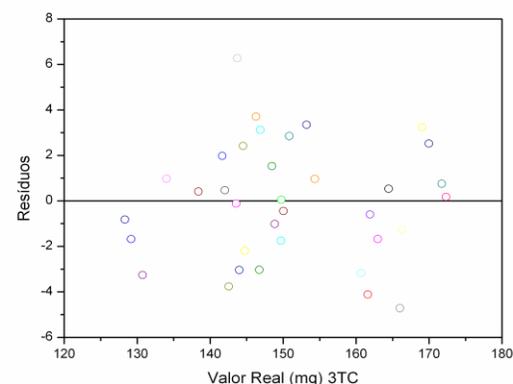
**Figura 46:** Resíduos *versus* valores experimentais (do conjunto de calibração) obtidos pelo modelo de calibração PLS para determinação de AZT no núcleo ..



**Figura 47:** Resíduos *versus* valores experimentais (do conjunto de calibração) obtidos pelo modelo de calibração PLS para determinação de 3TC no núcleo

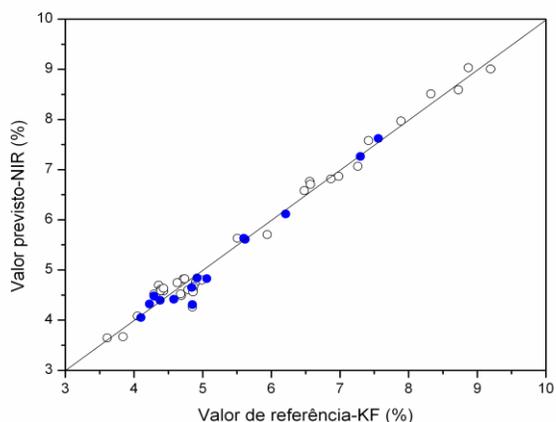


**Figura 48:** Resíduos *versus* valores experimentais (do conjunto de calibração) obtidos pelo modelo de calibração PLS para determinação de AZT nos comprimidos revestidos

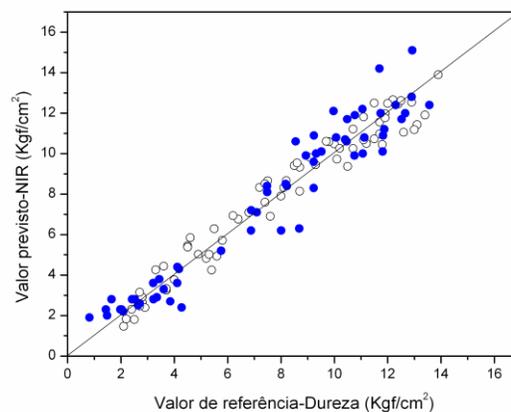


**Figura 49:** Resíduos *versus* valores experimentais (do conjunto de calibração) obtidos pelo modelo de calibração PLS para determinação de 3TC nos comprimidos revestidos .

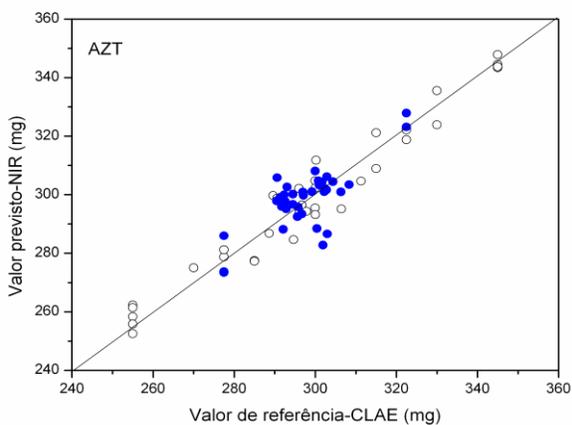
As Figuras 50 a 57 mostram os gráficos dos valores de referência *versus* valores previstos pelos modelos para a umidade, dureza, teores de AZT+3TC nos granulados, núcleos e comprimidos revestidos. Os círculos brancos representam o conjunto de calibração e os azuis de validação externa (previsão). As retas representam a bissetriz do quadrante.



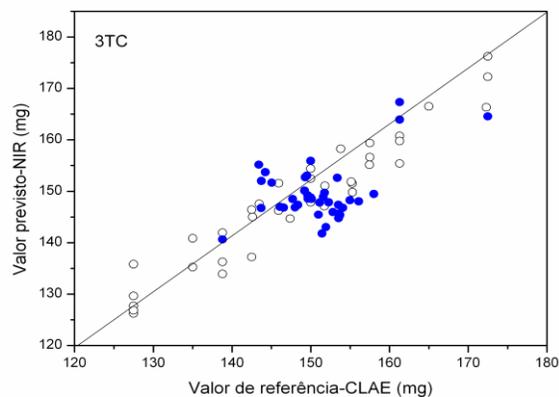
**Figura 50:** Valor de referência *versus* valor previsto pelo modelo PLS para determinação de umidade no material granulado



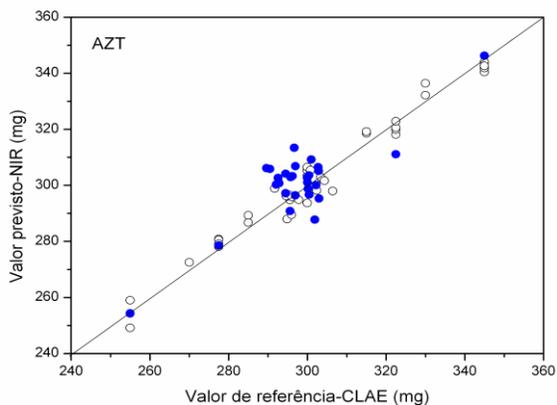
**Figura 51:** Valor de referência *versus* valor previsto pelo modelo PLS para determinação da dureza do núcleo.



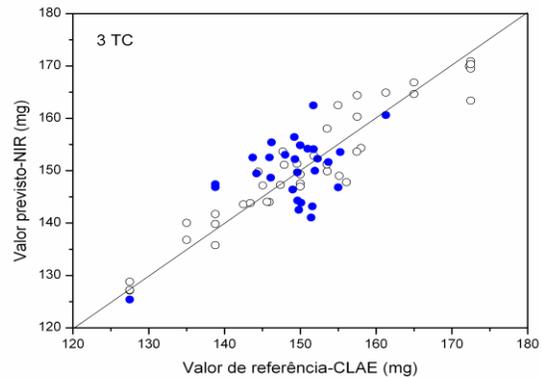
**Figura 52:** Valor de referência *versus* valor previsto pelo modelo PLS para determinação do teor de AZT no granulado.



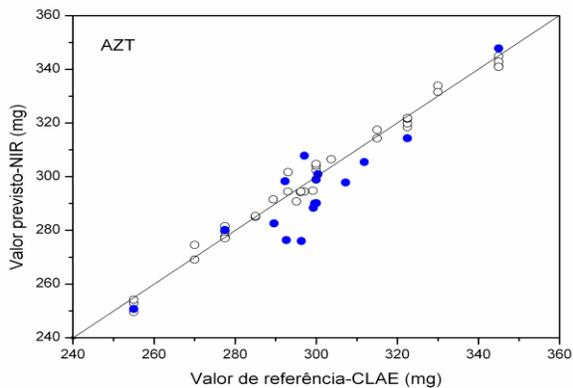
**Figura 53:** Valor de referência *versus* valor previsto pelo modelo PLS para determinação do teor de 3TC no granulado..



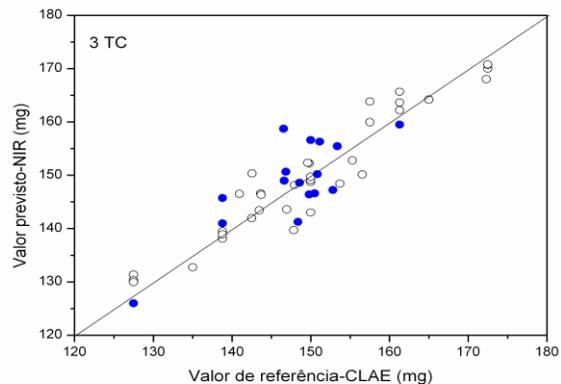
**Figura 54:** Valor de referência *versus* valor previsto pelo modelo PLS para determinação do teor de AZT no núcleo



**Figura 55:** Valor de referência *versus* valor previsto pelo modelo PLS para determinação teor de 3TC no núcleo.



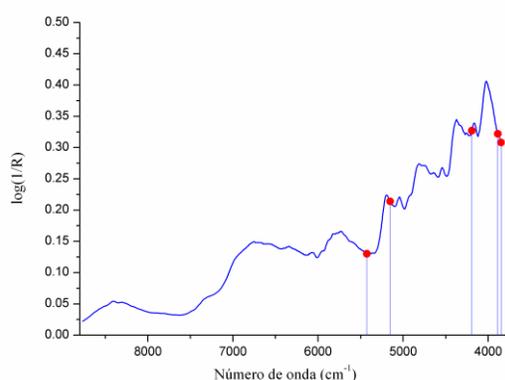
**Figura 56:** Valor de referência *versus* valor previsto pelo modelo PLS para determinação do teor de AZT no comprimido revestido



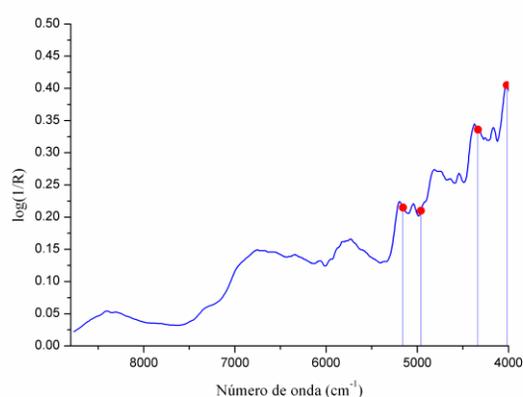
**Figura 57:** Valor de referência *versus* valor previsto pelo modelo PLS para determinação do teor de 3TC no comprimido revestido.

#### 7.4 Modelos de calibração por regressão linear múltipla (MLR-APS)

Nas Figuras 58 a 65, são mostradas indicando as variáveis selecionadas pelo algoritmo APS na construção dos modelos MLR. Para a unidade no granulado foram selecionados 5 números de onda dos 1279 originais (Figura 58); para a dureza dos núcleos 4 números de onda foram selecionados, dos 676 originais (Figura 59).

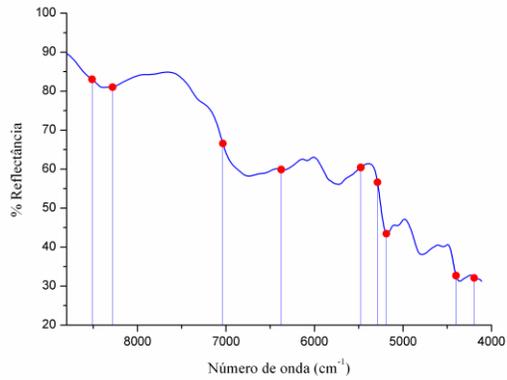


**Figura 58:** Posição das variáveis selecionadas durante a construção do modelo MLR-APS para Determinação de umidade

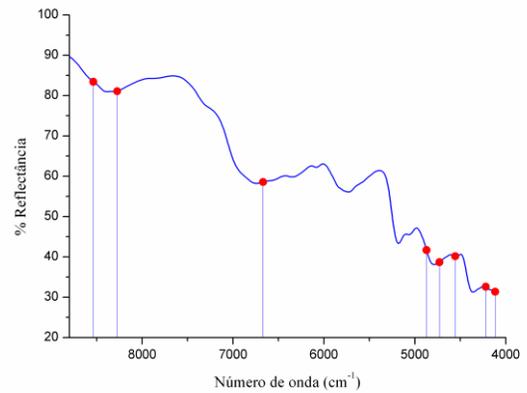


**Figura 59:** Posição das variáveis selecionadas durante a construção do modelo MLR-APS para determinação de dureza

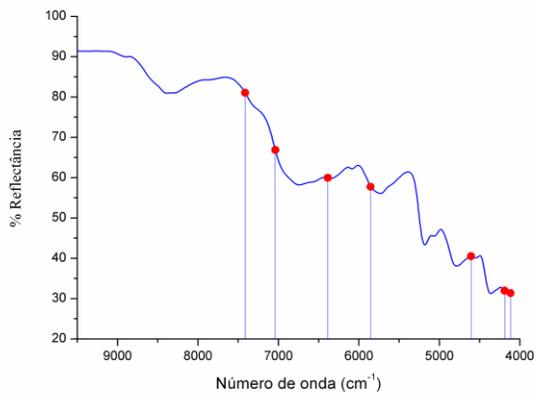
Como mostram as Figuras 60 e 61, nos modelos MLR para determinação dos teores de 3TC e AZT no granulado, o APS selecionou 9 e 8 números de onda, respectivamente (dos 1395 originais). Para os núcleos (Figuras 60 e 61), foram selecionados 7 e 6 números de onda (3TC e AZT, respectivamente), dos 1540 originais (Figuras 60 e 61). Para os comprimidos revestidos, nos modelos construídos para determinação dos teores de 3TC e AZT foram selecionados 10 e 6 números de onda, respectivamente, dos 1540 originais (Figuras 62 e 63).



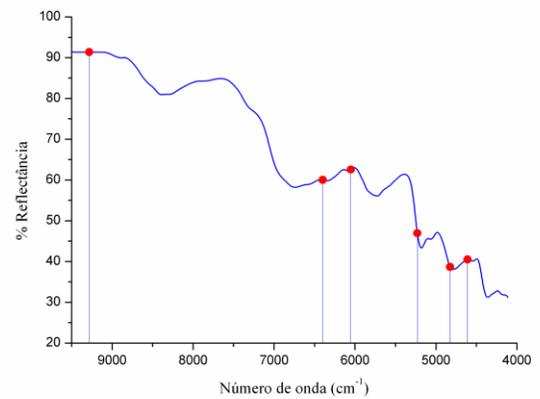
**Figura 60:** Posição das variáveis selecionadas durante a construção do modelo MLR-APS para 3 TC Nos granulados.



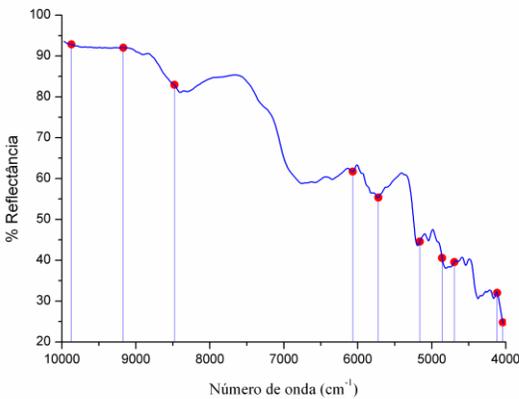
**Figura 61:** Posição das variáveis selecionadas durante a construção do modelo MLR-APS para AZT nos granulados.



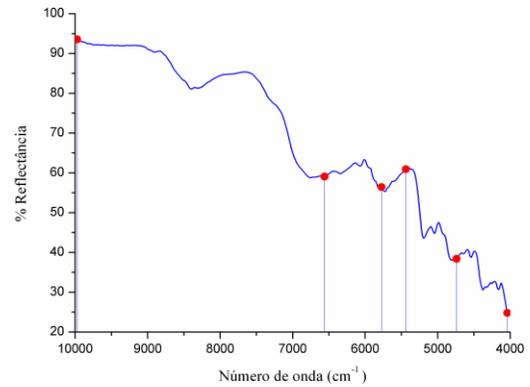
**Figura 62:** Posição das variáveis selecionadas durante a construção do modelo MLR-APS para determinação de 3TC nos núcleos.



**Figura 63-** Posição das variáveis selecionadas durante a construção do modelo MLR-APS para determinação de AZT nos núcleos

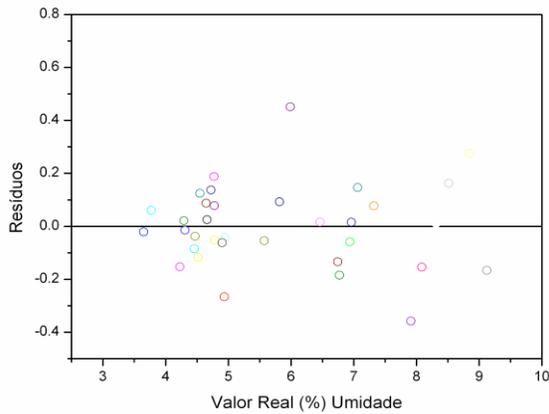


**Figura 64 :** Posição das variáveis selecionadas durante a construção do modelo MLR-APS para determinação de 3 TC nos comprimidos revestidos

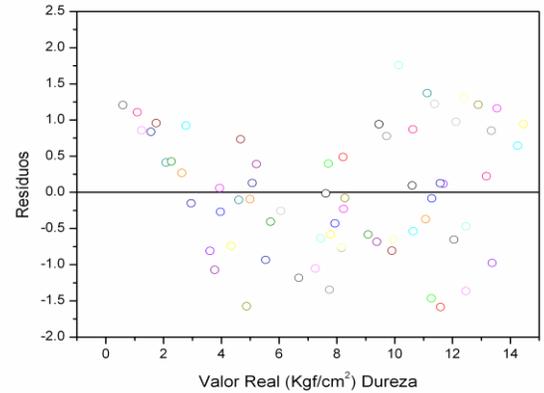


**Figura 65 :** Posição das variáveis selecionadas durante a construção do modelo MLR-APS para Determinação de AZT nos comprimidos revestidos

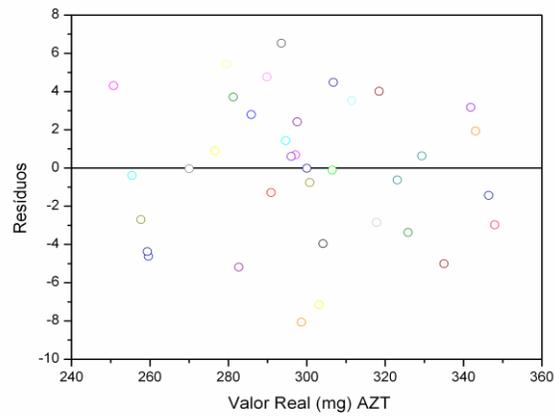
Os modelos de MLR-APS para umidade, durezas e teores de AZT e 3 TC dos granulados, núcleos e comprimidos revestidos não apresentaram comportamentos tendenciosos, como pode ser comprovado pela distribuição aleatória dos resíduos em  $\hat{y}$  das amostras do conjunto de calibração, como são mostrados nas Figuras 66 a 73.



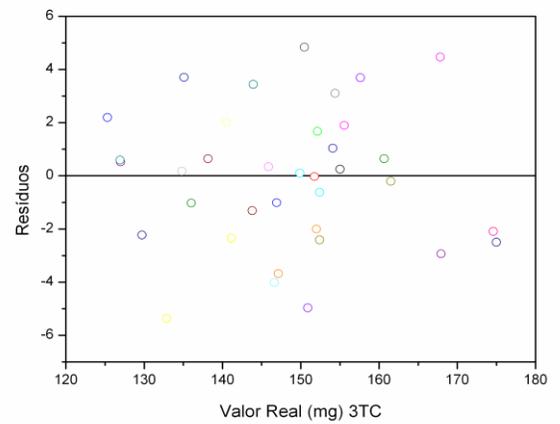
**Figura 66:** Resíduos *versus* valores experimentais obtidos (conjunto de calibração) pelo modelo MLR-APS na determinação de umidade.



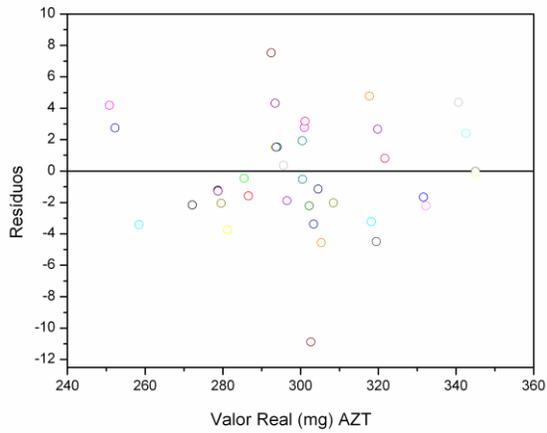
**Figura 67:** Resíduos *versus* valores experimentais obtidos (conjunto de calibração) pelo modelo MLR-APS na determinação da dureza.



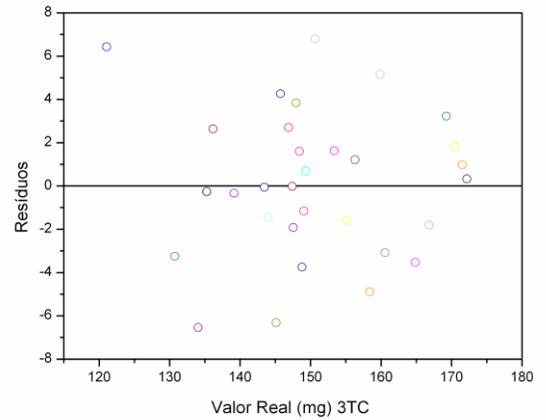
**Figura 68:** Resíduos *versus* valores experimentais obtidos (conjunto de calibração) pelo modelo MLR-APS na determinação de AZT no granulado



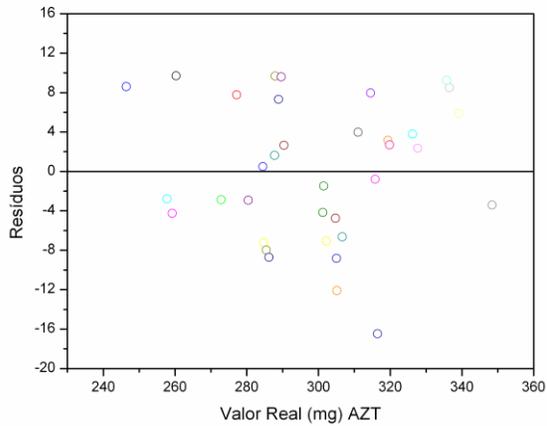
**Figura 69:** Resíduos *versus* valores experimentais obtidos (conjunto de calibração) pelo modelo MLR-APS na determinação de 3TC no granulado.



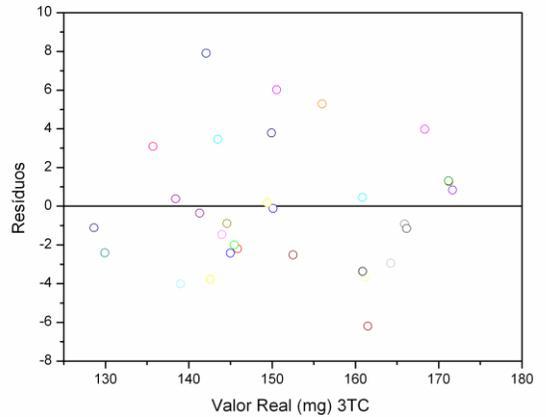
**Figura 70:** Resíduos *versus* valores experimentais obtidos (conjunto de calibração) pelo modelo MLR-APS na determinação de AZT no núcleo .



**Figura 71:** Resíduos *versus* valores experimentais obtidos (conjunto de calibração) pelo modelo MLR-APS na determinação de 3TC no núcleo

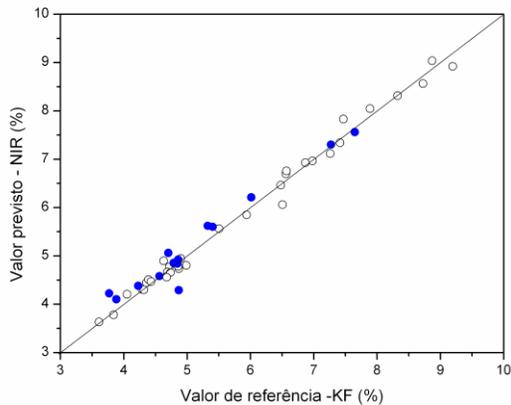


**Figura 72:** Resíduos *versus* valores experimentais obtidos (conjunto de calibração) pelo modelo MLR-APS na determinação de AZT nos comprimidos revestido.

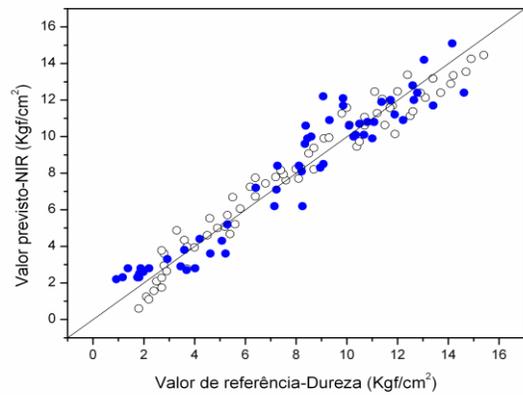


**Figura 73 :** Resíduos *versus* valores experimentais obtidos (conjunto de calibração) pelo modelo MLR-APS na determinação de 3TC nos comprimidos revestidos..

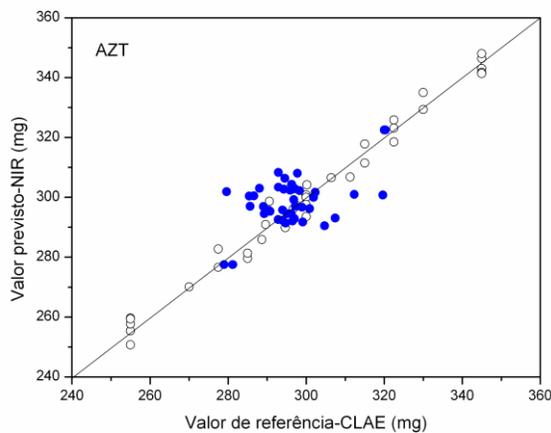
As Figuras 74 a 81 mostram os gráficos dos valores de referência *versus* valores previstos pelos modelos para a umidade, dureza, teores de AZT+3TC nos granulados, núcleos e comprimidos revestidos para o modelo MLR-APS. Os círculos brancos representam o conjunto de calibração e os azuis de validação externa (previsão). As retas representam a bissetriz do quadrante.



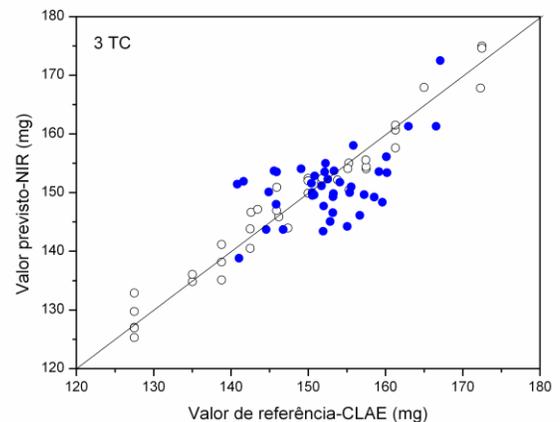
**Figura 74:** Valor de referência *versus* valor previsto pelo modelo MLR-APS para determinação de umidade no material granulado.



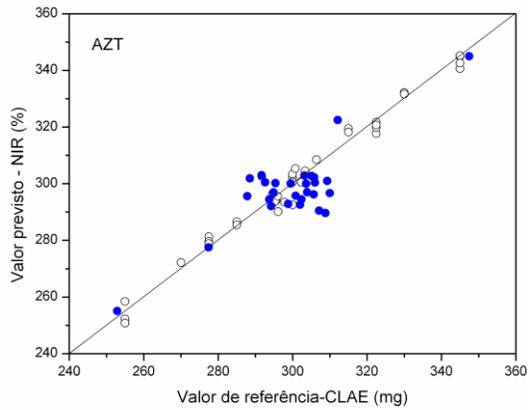
**Figura 75:** Valor de referência *versus* valor previsto pelo modelo MLR-APS para determinação da dureza.



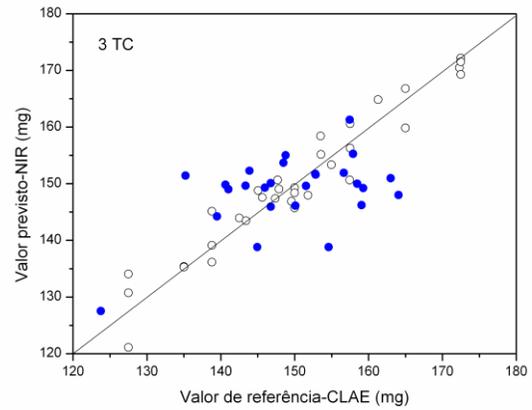
**Figura 76:** Valor de referência *versus* valor previsto pelo modelo MLR-APS para determinação do teor de AZT no granulado



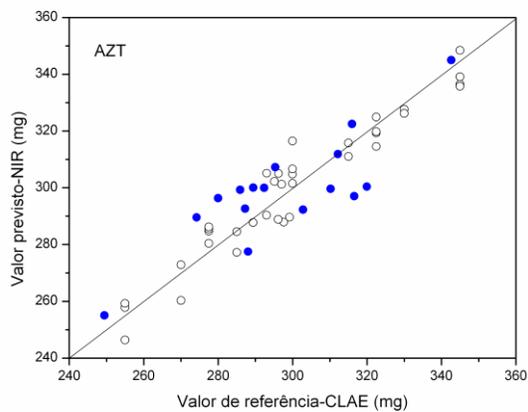
**Figura 77:** Valor de referência *versus* valor previsto pelo modelo MLR-APS para determinação do teor de 3TC no granulado.



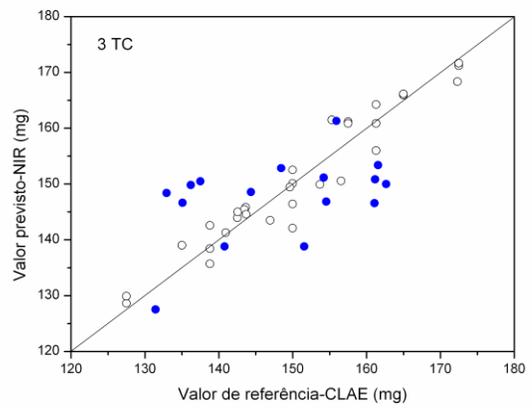
**Figura 78:** Valor de referência *versus* valor previsto pelo modelo MLR-APS para determinação do teor de AZT no núcleo



**Figura 79:** Valor de referência *versus* valor previsto pelo modelo MLR-APS para determinação do teor de 3TC no núcleo



**Figura 80:** Valor de referência *versus* valor previsto pelo modelo MLR-APS para determinação do teor de AZT no comprimido revestido



**Figura 81 :** Valor de referência *versus* valor previsto pelo modelo MLR-APS para determinação do teor de 3TC no comprimido revestido

## 7.5 validação dos modelos PLS-1 E MLR-SPA para umidade e dureza

Os modelos foram validados segundo critérios estabelecidos pela EMEA, USP e IUPAC (segundo o algoritmo MVC1). Foram estimados o intervalo de trabalho, linearidade, precisão, exatidão, robustez, sensibilidade e seletividade.

A linearidade para umidade foi avaliada contaminando a amostra com água na faixa de 3,60 a 9,19 % com 17 pontos de intervalo de concentrações extremas. O valor mínimo de 3,60% foi obtido com a amostra submetida a 20 h de estufa sob pressão reduzida a uma temperatura de 60°C com uma pressão de 5 mmHg. Os demais pontos foram obtidos adicionando-se 25 µL de água para cada amostra contendo aproximadamente 7,00 gramas. O máximo que foi adicionado foi 500 µL pois a amostra já se apresentava bastante úmida, não sendo possível adicionar mais água.

A dureza foi avaliada aplicando diferentes forças de compressão ao granulado no intervalo de 1,70 a 15,9 Kgf/cm<sup>2</sup> de forças de compressão.

A Tabela 12 apresenta os principais parâmetros de desempenho dos modelos PLS e MLR. As Figuras de mérito sensibilidade e seletividade não foram calculadas para os modelos de MLR porque, atualmente, não existem estudos sobre os cálculos de NAS neste tipo de modelo de regressão. Observando-se os resultados apresentados, os modelos PLS e MLR apresentam desempenhos similares, tanto para a umidade quanto para dureza

**Tabela 12:** Parâmetros dos modelos PLS e MLR desenvolvidos para umidade do granulado e dureza.

Parâmetros	Umidade/PLS (%)	Umidade/MLR (%)	Dureza/PSL (Kgf/cm <sup>2</sup> )	Dureza/MLR (Kgf/cm <sup>2</sup> )
<b>PLS - VL*</b>	4	-	4	-
<b>MLR- n° var**</b>	-	5	-	4
<b>RMSECV</b>	0.27	0.18	0.94	0.89
<b>RMSEP</b>	0.21	0.27	0.98	1.12
<b>Sensibilidade</b>	0.0551	-	0.0044	-
<b>Seletividade</b>	0.5120	-	0.6360	-

\* número de variáveis latentes utilizadas para construir os modelos PLS.

\*\* número de variáveis selecionadas para os modelos MLR-APS

A Tabela 13 mostra os resultados obtidos na validação dos modelos MLR e PLS, com relação à linearidade, precisão, robustez e exatidão.

O coeficiente angular e linear das retas construídas entre os valores estimados pelo modelo *versus* valores de referência para o conjunto de calibração não diferiram estatisticamente de um e zero, respectivamente, demonstrando que não há tendências nos modelos desenvolvidos.

A precisão, no nível de repetitividade, foi estimada pela análise de seis replicatas do mesmo lote, na faixa de trabalho do processo. Todas as determinações foram realizadas no mesmo dia e com o mesmo analista. As repetitividades, tanto para dureza como para a umidade, representadas pelo desvio padrão relativo, ficaram abaixo do 5% preconizado pelos guias oficiais.

Os testes de robustez para os modelos desenvolvidos para umidade e dureza podem ser considerados satisfatórios, uma vez que os resultados para as amostras utilizadas na validação externa (previsão) dos referidos modelos foram consistentes. Para a umidade foram utilizadas amostras representativas (n=14) e diversificadas como: amostras com adição de água, diferentes lotes do processo com pequenas variações de quantitativas de excipientes, água, granulometria, frascos diversos e manipulações. Para a dureza foram utilizadas amostras representativas (n=55) e diversificadas como: amostras com diferente força de compressão, diferentes lotes do processo com pequenas variações quantitativas de excipientes, água e manuseio da compressora. Pode-se observar que os modelos foram capazes de realizar boas previsões, não se mostrando sensível às variações mencionadas. O teste *Student* pareado, no nível de confiança de 95%, sobre os valores estimados por espectrofotometria NIR e obtidos pelos métodos de referência (Karl Fischer e durômetro) revelaram a ausência de diferenças significativas.

**Tabela 13:** Validação dos modelos PLS e MLR para determinar o teor de umidade no granulado e dureza do núcleo.

Parâmetros de validação		Teor de umidade/PLS	Teor de umidade/MLR	Dureza/PLS	Dureza /MLR
Valores					
<b>Linearidade</b>	<b>n</b>	34	34	70	70
	<b>faixa de trabalho (valor nominal)</b>	3,60 a 9,19 %		1,70 a 15,9Kg/cm <sup>2</sup>	
	<b>Coefficiente linear</b>	0,11±0,30	0,05±0,21	0,38±0,46	0,36±0,44
	<b>Inclinação</b>	0,980±0,049	0,991±0,034	0,952±0,051	0,956±0,050
	<b>R*</b>	0,9901	0,9953	0,9758	0,9776
<b>Exatidão</b>	<b>n</b>	10	10	45	45
	<b>Diferença da média (valor nominal)</b>	0,08	-0,19	-0,02	0,11
	<b>sd</b>	1,07	0,16	4,01	3,99
	<b>t<sub>exp</sub></b>	1,09	1,55	0,16	0,69
	<b>t<sub>crit</sub></b>	2,26	2,26	2,01	2,01
<b>Repetitividade (n=6)</b>	<b>média (valor nominal)</b>	4,4	4,7	10,8	10,5
	<b>DPR%</b>	3,5	3,5	4,3	4,1
<b>Robustez</b>	<b>n</b>	14	14	55	55
	<b>t<sub>exp</sub></b>	0,21	0,19	0,08	0,23
	<b>t<sub>crit</sub></b>	2,05	2,05	1,98	1,98

\* Reta construída entre os valores previstos pelos modelos e valores de referência, considerando o conjunto de calibração ( $\pm$ intervalo com 95% de confiança).

## 7.6 comparação dos três métodos para determinação do teor de água

A balança halógena é uma técnica bastante utilizada nas indústrias de alimentos e farmacêuticas e, embora não seja um método oficial, está em conformidade com as normas e diretrizes atuais e com todos os sistemas internacionais de garantia de segurança. O instrumento dispõe de certificação de acordo com ISO 9001 e ISO 14001. A técnica proporciona um aquecimento uniforme da superfície da amostra que garante uma boa reprodutibilidade de secagem e permite a utilização de pequenas quantidades. Ela permite análises mais rápidas, sem consumo de reagente, em comparação com o método de Karl Fischer. Foram analisados 15 lotes da linha de produção do LAFEPE comparando os três métodos (K.F, NIR e Balança de umidade). Podem-se observar na Tabela 14 que para os três métodos estudados de acordo com teste t pareado, os mesmos não apresentaram diferenças significativas no nível de 95% de confiança, evidenciando uma confiabilidade das técnicas para utilização na rotina da indústria farmacêutica.

**Tabela 14:** Determinação de umidade pelo método de K.F, NIR e Balança.

Lotes	Karl Fischer(%)	NIR (%)	Balança (%)	t- cal (NIR)	t- cal (balança)	t- tab
<b>01</b>	5,55	5,52	5,42			
<b>02</b>	4,99	4,47	5,04			
<b>03</b>	4,39	4,39	4,28			
<b>04</b>	5,39	4,43	4,54			
<b>05</b>	4,86	4,61	4,94			
<b>06</b>	4,68	4,66	4,58			
<b>07</b>	4,38	4,44	4,42	0,88	0,31	2,048
<b>08</b>	4,74	4,53	4,82			
<b>09</b>	4,32	4,21	4,25			
<b>10</b>	4,29	4,48	4,35			
<b>11</b>	4,58	4,52	4,62			
<b>12</b>	4,10	4,12	4,18			
<b>13</b>	4,85	4,91	4,92			
<b>14</b>	4,29	4,37	4,32			
<b>15</b>	4,36	4,28	4,42			

## **7.7 validação dos modelos PLS-1 e MLR-SPA para determinação de AZT + 3TC nos granulados, núcleos e comprimidos revestidos**

### **7.7.1 PLS**

Os modelos foram validados segundo critérios estabelecidos pela EMEA, USP e IUPAC (seguindo o algoritmo MVC1). Foram estimados o intervalo de trabalho, linearidade, precisão, exatidão, robustez, sensibilidade e seletividade.

A Tabela 15 mostra os principais parâmetros de desempenho dos modelos PLS desenvolvidos para quantificação do AZT + 3TC nos materiais granulados, núcleos e comprimidos revestido. As figuras de mérito seletividade, sensibilidade e LOD foram estimadas com base na teoria do NAS. O NAS do analito de interesse é a fração do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos outros compostos presentes na amostra<sup>[119]</sup>. Para a calibração multivariada, a seletividade indica a parte do sinal total que não é perdido devido à sobreposição espectral. A sensibilidade mede as mudanças na resposta em função da concentração de um analito particular.<sup>[119-123]</sup>

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos na validação dos modelos PLS, com relação à linearidade, precisão, robustez e exatidão. Os coeficientes angular e linear das retas construídas entre os valores estimados pelo modelo *versus* valores de referência para o conjunto de calibração não diferem estatisticamente de um e zero, respectivamente, demonstrando que não há tendências nos modelos desenvolvidos.

A precisão, no nível de repetitividade, foi estimada pela análise de seis replicatas do mesmo lote, na faixa de trabalho do processo. Todas as determinações foram realizadas no mesmo dia e com o mesmo analista. As repetitividades, para as formas farmacêuticas estudadas, representadas pelo desvio padrão relativo, ficaram abaixo de 5% , como preconizado pelo guias oficiais.

Nos testes de robustez foram utilizadas amostras representativas (42, 30 e 19 para os granulados, núcleos e comprimidos, respectivamente) e diversificadas como: diferentes lotes do processo com pequenas variações quantitativas de excipientes, água, granulometria, frascos diversos e manipulações e revestimento no caso de comprimidos revestidos. Os testes de robustez para os modelos desenvolvidos para os granulados, núcleos e comprimidos revestidos podem ser considerados satisfatórios, uma vez que os resultados apresentados para as amostras utilizadas na validação externa (previsão) dos referidos modelos foram consistentes. Pode-se observar que os

modelos foram capazes de realizar previsões confiáveis, não se mostrando sensível às variações mencionadas. O teste *Student* pareado com nível de confiança de 95% sobre as diferenças entre os valores obtidos pelos modelos e de referência (CLAE) revelaram a ausência de diferenças significativas entre os métodos propostos e o método referência.

A exatidão ( tabela-16) foi avaliada através de amostras de processo. Realizando-se um teste t pareado entre os valores estimados pelo modelo e os valores de referência não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no nível de 95% de confiança.

**Tabela 15:** Figuras de méritos obtidos para os modelos PLS desenvolvidos para quantificação do AZT + 3TC nos materiais granulados, núcleos e comprimidos revestidos.

PLS	AZT (300 mg)			3TC (150 mg)		
	Granulados	Núcleos	Comprimidos revestidos	Granulados	Núcleos	Comprimidos revestidos
<b>n</b>	37	40	36	37	40	36
<b>LV</b>	5	5	7	5	6	8
<b>RMSECV (mg)</b>	7,12	4,01	3,10	3,60	3,90	3,58
<b>RMSEP (mg)</b>	7,11	8,15	9,41	5,86	5,99	5,07
<b>Sensibilidade</b>	0,19	0,18	0,14	0,27	0,28	0,18
<b>Seletividade</b>	0,75	0,14	0,096	0,64	0,16	0,060
<b>LOD</b>	1,53	2,44	1,75	2,23	0,77	0,84

**Tabela 16:** Validação dos modelos PLS desenvolvidos para quantificação do AZT+3TC nos materiais granulados, núcleos e comprimidos revestidos.

Parametro de validação  PLS		Modelos PLS					
		AZT			3TC		
		Granulados	Núcleos	Comprimidos revestidos	Granulados	Núcleos	Comprimidos revestidos
Linearidade	n	37	40	36	37	40	36
	Faixa de concentração (%)	85-115	85-115	85-115	85-115	85-115	85-115
	Coefficiente linear	13 ± 21	9±17	4±130	12±14	13±14	13±15
	Inclinação	0,956±0,069	0,971±0,055	0,985±0,042	0,919±0,093	0,909±0,094	0,916±0,096
	R*	0,9780	0,9852	0,9924	0,9585	0,9535	0,9569
Exatidão	n	21	18	10	21	18	10
	Diferença média ( valor nominal )	0,37	-1,47	2,46	-2,77	0,60	-1,52
	sd	3,63	5,38	5,34	2,39	5,25	3,80
	t <sub>exp</sub>	0,47	0,98	1,45	1,53	0,38	1,19
	t <sub>crit</sub>	2,08	2,11	2,26	2,08	2,11	2,26
Repetibilidade (n=6)	Média NIR (% valor nominal )	99,33	99,41	98,94	98,55	100,22	100,03
	DPR%	0,82	2,11	2,17	1,25	0,96	2,02
Robustez	n	42	28	16	42	28	16
	t <sub>exp</sub>	1,07	0,82	0,71	1,75	0,09	0,38
	t <sub>crit</sub>	1,99	2,00	2,04	1,99	2,00	2,04

\* Reta construída entre os valores previstos pelos modelos e valores de referência, considerando o conjunto de calibração ( $\pm$ intervalo com 95% de confiança).

### 7.7.2 MLR

A Tabela 17 mostra os principais parâmetros de desempenho dos modelos MLR desenvolvidos para quantificação do AZT + 3TC no material granulados, núcleos e comprimidos revestidos.

**Tabela 17:** Figuras de méritos obtidos para os modelos desenvolvidos para quantificação do AZT + 3TC nos materiais granulados, núcleos e comprimidos revestidos para os modelos MLR

MLR	AZT (300 mg)			3TC (150 mg)		
	Granulados	Núcleos	Comprimidos revestidos	Granulados	Núcleos	Comprimidos revestidos
<b>n</b>	37	40	36	37	33	32
<b>n° var</b>	8	6	7	9	7	10
<b>RMSECV (mg)</b>	3,62	3,41	6,80	2,59	3,29	3,21
<b>RMSEP (mg)</b>	8,86	8,20	11,72	5,77	10,92	9,96

Como já comentado, as figuras de mérito de sensibilidade e seletividade não foram calculadas para os modelos de MLR/APS por que não existem atualmente estudos sobre os cálculos de NAS neste tipo de modelo de regressão.

A Tabela 18 apresenta os resultados obtidos na validação dos modelos MLR, com relação à linearidade, precisão, robustez e exatidão. Os coeficientes angular e linear das retas construídas entre os valores estimados pelo modelo *versus* valores de referência para o conjunto de calibração não diferem estatisticamente de um e zero, respectivamente, demonstrando que não há tendências nos modelos desenvolvidos.

A precisão, no nível de repetitividade, foi estimada pela análise de seis replicatas do mesmo lote, na faixa de trabalho do processo. Todas as determinações foram realizadas no mesmo dia e com o mesmo analista. As repetitividades, para as formas farmacêuticas estudadas, representadas pelo desvio padrão relativo, ficaram abaixo de 5% , como preconizado pelos guias oficiais.

Os testes de robustez foram conduzidos com as mesmas amostras e condições da validação dos modelos PLS. Os testes de robustez para os três modelos desenvolvidos também podem ser considerados satisfatórios, uma vez que os resultados para as amostras utilizadas foram consistentes, mostrando que as alterações envolvidas no processo não interferiram nos resultados. O teste t *Student* pareado com nível de confiança de 95% sobre as diferenças entre os valores previstos e de referência (CLAE) revelaram a ausência de diferenças significativas entre os métodos propostos e o método referência.

A exatidão foi avaliada através de amostras de processo. Realizando-se um teste t emparelhado entre os valores estimados pelo modelo e os valores de referência não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no nível de 95% de confiança.

**Tabela 18:** Parâmetro da Validação do método desenvolvidos para quantificação do AZT+3TC nos materiais granulados, núcleos e comprimidos revestidos para os modelos MLR

Parametro de validação MLR		Modelos-MLR					
		AZT			3TC		
		Granulados	Núcleos	Comprimidos revestidos	Granulados	Núcleos	Comprimidos revestidos
Linearidade	n	37	40	36	37	33	36
	Faixa de concentração (%valor nominal)	85-115	85-115	85-115	85-115	85-115	85-115
	Coefficiente linear	5±14	6±14	22±27	6±10	10±14	10±14
	Inclinação	0,982±0,045	0,978±0,045	0,927±0,090	0,957±0,069	0,932±0,092	0,933±0,093
	R*	0,9909	0,9893	0,9630	0,9787	0,9657	0,9658
Exatidão	n	21	18	10	21	18	10
	Diferença média (mg valor nominal)	1,03	-1,62	2,22	-1,53	2,01	-2,64
	S.D	7,57	5,59	10,71	6,94	11,33	10,43
	t <sub>exp</sub>	0,63	1,05	0,99	0,92	0,69	0,82
	t <sub>crit</sub>	2,08	2,,11	2,26	2,08	2,11	2,26
Repetibilidade (n=6)	Média NIR (% valor nominal)	98,60	99,41	100,51	99,89	98,77	102,12
	DPR%	0,79	2,11	1,37	2,25	2,006	3,95
Robustez	n	42	28	16	42	28	16
	t <sub>exp</sub>	1,02	0,82	0,61	0,68	0,55	0,14
	t <sub>crit</sub>	1,98	2,00	2,04	1,98	2,00	2,04

\* Reta construída entre os valores previstos pelos modelos e valores de referência, considerando o conjunto de calibração (±intervalo com 95% de confiança).

Em resumo, ambos os modelos MLR e PLS produzem resultados confiáveis e foram validados. Cabe ressaltar ainda, que o limite de tolerância descrito pela Farmacopéia é de 10 % para mais ou para menos da concentração indicada no rótulo do medicamento. Assim, todos os modelos e formas farmacêuticas estariam aprovados de acordo com a concentração fornecida pelo método de calibração multivariada construído com os espectros de infravermelho próximo.

# **CONCLUSÃO**

## 8.0 CONCLUSÕES

Os métodos espectrofotométricos derivativos e PLS propostos utilizando a espectrofotometria na região UV foram desenvolvidos, validados e aplicados com sucesso às amostras dos comprimidos, AZT+3TC, dose fixa combinada, de diferentes fabricantes. O Emprego desses métodos também foi possível prever o perfil de dissolução desses comprimidos.

Os métodos espectrofotométricos utilizando a região do infravermelho próximo e a calibração multivariada (tanto PLS quanto MLR-APS) foram validados e aplicados na determinação de dureza e teores dos granulados, núcleos e comprimidos revestidos, fornecendo resultados confiáveis. Esses métodos atendem muitos dos requisitos de Tecnologias Analíticas de Processo – PAT que requer metodologias que: possam ser facilmente adaptadas ao processo industrial existente; permitam monitoramento de diferentes etapas do processo e forneçam resultados confiáveis de forma simples, rápida e pouco onerosa. Finalmente pode-se vislumbrar uma diminuição do impacto ambiental originado pela utilização sistemática de solventes orgânicos e colunas cromatográficas.

A disponibilização dos métodos alternativos, desenvolvidos neste trabalho, na rotina do controle de qualidade, sem prévia separação química, resolvendo o problema de sobreposição espectral é de fundamental importância, colaborando e disponibilizando ferramentas simples, rápidas e de baixo custo

**PERSPECTIVAS**

## 9.0 PERSPECTIVAS

As perspectivas do nosso trabalho continuam com a utilização do infravermelho próximo e constam das seguintes etapas:

- Acompanhar as análises de processo na rotina do LAFEPE para AZT+3TC;
- Implementar estratégias de PAT na linha de produção de AZT+3TC do LAFEPE, empregando as metodologias desenvolvidas, visando o controle mais eficiente do processo e da qualidade do produto e redução dos custos;
- Estender as metodologias e estratégias de PAT para outras linhas de produção do LAFEPE, consideradas prioritárias.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]-Physicians Desk Reference (PDR), 54<sup>th</sup> ed. Published by Medical Economics Co., Montvale, NJ, pp.1164, 1172.
- [2]-Brunton, L.L.; Lazo, J.S.; Parker, L. K.; Goodman & Gilman. “**As Bases Farmacológicas da Terapêutica**”. 11. ed. 2007.
- [3]-Carpenter, C.C.; Fischl, M.A.; Hammer, S.M.; Hirsch, M.S.; Jacobsen, D.M.; Richman, D.D.; Saag, M.S.; Thompson, M.A.; Vella, S.; Yeni, P.G.; Volberding, P.A. “Antiretroviral Therapy for Infection in 1996”. In: J. Am. Méd Assoc. **JAMA**, v. 276, n. 2, p. 146-54, 1996.
- [4]-Moore, K. H.; Shaw, S.; Laurent, A. L.; Lloyd, P.; Duncan, B.; Morris, D. M.; O’mara, M. J.; Pakes, G. E. “Lamivudine/zidovudine as combined formulation tablet: bioequivalence compared with lamivudine and zidovudine administered concurrently and the effect of food on absorption”. In: **J. Clin. Pharmacol**, v. 39, n. 6, p. 593-605, 1999.
- [5]Swarbrick, B., Process analytical technology: A strategy for keeping manufacturing viable in Australia, In: **Vibrational Spectroscopy**, v.44, p.171-178, 2007.
- [6]-Karpinska, J.; Szostak, J. “Determination of chlorprothizene and amitriptyline hydrochlorides by UV-derivative spectrophotometry and UV-solid-phase spectrophotometry. In: **Spectrochim. Acta Part A**. Vv. 61, p. 975-981, 2005.
- [7] Vidotti, E.C.; Rollemberg, E.C.M. “Espectrofotometria derivativa: uma estratégia simples para a determinação simultânea de corantes em alimentos”. In: **Química Nova**, v. 29, n. 2, 230-233, 2006
- [8]-Markopoulou, C.K.; Malliou, E.T.; Koundourellis, J.E. “Chemometric and derivative methods as flexible spectrophotometric approaches for dissolution and assaying tests in multicomponent tablets”. In: **IL Farmaco**. v. 59, p.627-36. 2004.
- [9]-Dave, H. N.; Mashru, R. C.; Thakkar, A. R. “Simultaneous determination of salbutamol sulphate, bromhexine hydrochloride and etofylline in pharmaceutical formulations with the use of four rapid derivative spectrophotometric methods” In: **Analytica Chimica Acta**. v. 597, p.113-20, 2007.
- [10]-Osborne, B.G.; Fearn, T.; Hindle, P.H.; “**Practical NIR Spectroscopy**”. 2<sup>nd</sup> ed. Longman. 1993.
- [11]-Skoog, D. A; Holler, F.J.; Nieman, T.A. “ **Principios de análise instrumental**”. 5<sup>o</sup> ed. São Paulo: Bookman, 2002.
- [12]-Larder, B. A.; Kemp, S. D.; Harrigan, P. R. “Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT- 3TC combination therapy”. In: **Science**, v. 269, p. 696-99, 1995.

- [13]-Van Leeuwen, R.; Katlama, C.; Kitchen, V. "Evaluation of safety efficacy of 3TC (Lamivudine) in patients with asymptomatic or mildly symptomatic human immunodeficiency virus infection: a phase I/II study". **In: J. Infect. Dis**, v. 171, p. 1166-71, 1995.
- [14]-Carpenter, C. C.; Fischl, M. A.; Hammer, S. M.; Hirsch, M. S.; Jacobsen, D. M.; Katzenstein, D. A.; Montaner, J. S.; Richman, D. D.; Saag, M. S.; Schooley, R. T.; Thompson, M. A.; Vella, S.; Yeni, P. G.; Volberding, P. A. "Antiretroviral therapy for infection in 1996". **In: J. Am. Med. Assoc. JAMA**. v . 276, p. 146-54, 1996.
- [15]-Moore, K. H.; Shaw, S.; Laurent, A. L.; Lloyd, P.; Duncan, B.; Morris, D. M.; O'mara, M. J.; Pakes, G. E. "Lamivudine/zidovudine as a combined formulation tablet: bioequivalence compared with lamivudine and zidovudine administered concurrently and the effect of food on absorption". **In: J. Clin. Pharmacol**. v. 39, p. 593-605, 1999.
- [16]-Laurent C. et al. "Effectiveness and Safety of a generic fixed-dose combination of nevirapine, stavudine and lamivudine in HIV-1-infected adults in Cameroon: open-label multicentre trial". **In: The lancet**. v. 364, p. 29-34, 2004.
- [17]-Brasil. **RDC- nº 17 de Abril de 2010**. Dispõe sobre o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para Fabricação de Medicamentos, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010.
- [18]-Korokolvas, A. "**Dicionário Terapêutico Guanabara**". Edição 2005/06. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2005.
- [19]-Özgür, M.Ü.; Alpdogan, G.; Koyuncu, I. "Zero-Crossing derivative spectrophotometry y determination of mixtures of sunset yellow and erythrosine in pure form and in tablets". **In: Analytical Letters**. v. 35, p. 721-32, 2002.
- [20]-**Farmacopéia Brasileira**; 5ª ed. Volume -1 e 2 ANVISA, 2010.
- [21]-**The United States Pharmacopéia - USP-33. NF-28**. 2010
- [22]-**British Pharmacopoeia**. The Stationery Office, London, 2008, volume: I-IV
- [23]-**Farmacopéia Portuguesa VIII edição oficial**. LISBOA, 2005.
- [24]-**Farmacopea de Los Estados Unidos Mexicanos**, Octava edición, 2004.
- [25]-**The Japanese Pharmacopoeia**, Fourteenth Edition. Disponível: <<http://jpdbs.nihs.go.jp/jp14e/contents.html>>. Acessado em: 12 abr. 2008.
- [26] Lavra, Z. M. M, Rolim Neto, P.J, Ferreira R. M.S. Medeiros, F. P. M.; "Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de lamivudina, zidovudina e nevirapina em comprimidos dose-fixa combinada por cromatografia líquida de alta eficiência" **In: Química Nova**, v. 31, nº 5, 969-74, 2008.

- [27]-Beck, R.C.R.; Cardoso, S.G.; Athayde, M. L.; Codevilla, C.; Kreutz, O.; Dalmora, S.L. “Validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da lamivudina e zidovudina em comprimidos”. **In: Química Nova**, v. 30, p.1225, 2007.
- [28]-Verweij-van Wissen, C.P.W.G.M.; Aernoutse, R.E.; Burger, D.M. “Simultaneous determination of the HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors lamivudine, didanosine, stavudine, zidovudine and abacavir in human plasma by reversed phase high performance liquid chromatography”. **In: Journal of Chromatography B**. v. 816, p. 121-29, 2005.
- [29]-Fan, B.; Stewart, J.T. “Determination of zidovudine/lamivudine in human plasma using ion-pair HPLC”. **In: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 28, p. 903-08, 2002.
- [30]-Nascimento, J.E.; Magalhães.; N.S.S, Ribeiro.; Pontes, A.; Alves, A.J. “ Avaliação farmacocinética de comprimidos contendo lamivudina e zidovudina em plasma humano”. **In: Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 40, p. 60-66, 2004.
- [31]-Kenney, K.B.; Wring, S.A.; Carr, R.M.; Wells, G. N.; Dunn, J.A. “Simultaneous determination of zidovudine and lamivudine in human serum HPLC with tandem mass spectrometry”. **In: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 22, p. 967-83. 2000.
- [32]-Sozgen, K.; Tütem, E. “Second derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of cobalt, nickel and iron using 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol”. **In: Talanta**. v. 62, p.971-976, 2004.
- [33]-Rocha, F. R. P.; Teixeira, L. S. G. “Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS” . **In: Química Nova**.v. 27, p. 807, 2004.
- [34]-Sayar, S.; Özdemir, Y.; “First-derivative spectrophotometric determination of ponceau 4R, sunset yellow and tartrazine in confectionery products”. **In: Food Chemistry**. v. 61, p. 367-72, 1998.
- [35]-Berzas-Nevado, J. J.; Guiberteau-Cabanillas, C.; Contento-Salcedo, A. M.; “Simultaneous spectrophotometric determination on three food dyes by using the first derivative of ratio spectra”. **In: Talanta**. v. 42, p. 2043-47, 1995.
- [36]-Ojeda, C. R.; Rojas, F. S. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. **In: Anal. Chim. Acta**. v. 518, p. 1-24, 2004.
- [37]-Karpinska, J. “Derivative spectrophotometry – recent applications and directions of developments”. **In: Talanta**. v. 4, p. 801-22, 2004.
- [38]-Karpiska, J.; Sokól, A.; Skoczylas, M; “An application of UV-derivative spectrophotometry and bivariate calibration algorithm for study of photostability of levomepromazine hydrochloride”. **In: Spectrochimica Acta Part A**. v. 71, p. 1562–64, 2008.

- [39]-Benamor, M.; Aguerssif, N. "Simultaneous determination of calcium and magnesium by derivative spectrophotometry in pharmaceutical products". In: **Spectrochimica Acta Part A**. v. 69, p. 676-81, 2008.
- [40]-Hadad, G. M, El-Gindy, A, Mahmoud W. M.M. "HPLC and chemometrics-assisted UV-spectroscopy methods for the simultaneous determination of ambroxol and doxycycline in capsule". In: *Spectrochimica Acta Part A* . v. 70, p. 655-63, 2008.
- [41]-El-Yazbi, F. A.; Hammud, H. H.; Sulaf, A. A. "Derivative-ratio spectrophotometric method for the determination of ternary mixture of aspirin, paracetamol and salicylic acid". In: **Spectrochimica Acta Part A**. v. 68, p.275-78, 2007.
- [42]-Busaranon, K.; Suntornsuk, W.; Suntornsuk, L. "Comparison of UV spectrophotometric method and high performance liquid chromatography for the analysis of flunarizine and its application for the dissolution test". In: **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 41, p. 158-64, 2006.
- [43]-Shehata, M.A.M.; El Sabed, M.A.; El Tarras, Mohammad F. El Bardicy, M.G. "Stability-indicating methods for determination of vincamine in presence of its degradation product". In: **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 38, 72-78, 2005.
- [44]-Garcia, P. L.; Santoro, M. I. R.M.; Kedor-Hackman, E.R.M., Singh A. K. "Development and validation of a HPLC and a UV derivative spectrophotometric methods for determination of hydroquinone in gel and cream preparations". In: **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 39, p. 764-68, 2005.
- [45]-Uslu, B.; Ozkan, Sibel. "Determination of lamivudine and zidovudine in binary mixtures using first derivative spectrophotometric, first derivative of the ratio-spectra and high-performance liquid chromatography-UV methods". In: **Analytica Chimica Acta**. v. 466, p. 175-85, 2002.
- [46]-Kapoor, N. Khandavilli. S, Panchagnula, R. "Simultaneous determination of lamivudina and stavudina in antiretroviral fixed dose combinations by first derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography". In: **Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 41, p. 761, 2006.
- [47]-Catherine K. Markopoulou, Eleftheria T. Malliou, John E. Koundourellis. "Chemometric and derivative methods as flexible spectrophotometric approaches for dissolution and assaying tests in multicomponent tablets". In: **IL FARMACO**. v. 59, p. 627-636, 2004.
- [48]-El-Gindy, A. Emar, S. Mostafa, A. "Application and validation of chemometrics-assisted spectrophotometry and liquid chromatography for the simultaneous determination of six-component pharmaceuticals". In: **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** . v. 41, p. 421-30, 2006.
- [49]-Ni, Yongnian.; Qi, Zhengbao.; Kokot, Serge. "Simultaneous ultraviolet-spectrophotometric determination of sulfonamides by multivariate calibration approaches". In: **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v. 82, p. 241-47, 2006.

- [50]-Khoshayand, M.R.; Abdollahi, H.; Shariatpanahi, M.; Saadatfard, A.; Mohammadia, A . “Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, ibuprofen and caffeine in pharmaceuticals by”. **In: Chemometric methods Spectrochimica Acta Part A**. v. 70, p. 491-99, 2008.
- [51]-Metwally, F. H. “Simultaneous determination of Nifuroxazide and Drotaverine hydrochloride in pharmaceutical preparations by bivariate and multivariate spectral analysis”. **In: Spectrochimica Acta Part A**. v. 69, p. 343-49, 2008.
- [52]-Ni, Yong Nian, Xiao, Wei Qiang. “ Simultaneous kinetic spectrophotometric determination of cephalexin and trimethoprim in pharmaceutical preparation and human urine with the aid of”. **In: Chemometrics Chinese Chemical Letters**. v. 19, p. 981-84, 2008.
- [53] Burns, D. A.; Ciurczak, E. W. **Handbook of Near-Infrared Analysis**. New York, Marcel Dekker, 2001 *apud* VALDERRAMA, P. **Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectrofotometria no infravermelho próximo**. 2005. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Instituto de Química. Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- [54]-Workman, J.J.; Mobuley, P.R.; Kowalski, B.R. and Bro, R.; ”Review of chemometrics applied to spectroscopy”: 1985-95.2. **In: Appl. Spectroscopy Reviews**, v. 31, p.347-68, 1996.
- [55]-Coates, J. A. “Review of current new technology: “Used in instrumentation for industrial vibrational spectroscopy”. **In: Spectroscopy**. v. 10, p.20-24, 1999.
- [56]-Williams, P.; Norris, K. ”**Near Infrared technology in the agricultural and food industries**”. Minnesota: AACC, 1998.
- [57]-Roggo, Y. ; Chalus, P. ; Maurer, L ; Lema-Martinez, C. ; Edmond, A . ; Jent, N.; “A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies”. **In: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 44, p. 683-700, 2007.
- [58] Davidson, M.W.; Parry-Hill, M.J.; Sutter, R.T.2005. Reflection of Light. Disponível em <<http://micro.magnet.fsu.edu/optics/lightandcolor/reflection.html>>. Acessado em: 13 out. 2010.
- [59] Kubelka, P.; Munk, F.Z.; **Tech. Physik.**, v. 12, p. 593, 1931
- [60] Pasquini, C. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **In: Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, p. 198-219, 2003.

- [61] Stuart, A.D.; Trotman, S.M.; Doolan, K.J.; Fredericks, P.M. Spectroscopy measurement of used lubricating oil quality, **Apl. Spectrosc.**, 43,55-60, 1989. apud BORGES NETO, W. **Parâmetro de qualidade de óleos lubrificantes e óleo de oliva através de espectrofotometria vibracional, calibração multivariada e seleção de variáveis, 2005. Tese (Doutorado em química) Instituto de química.** Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- [62] Naes, T.; Isaksson, T.; Fearn, T.; Davies, T. **In: A user-friendly guide to Multivariate Calibration and Classification, Chichester - UK, NIR Publications, 2002**
- [63] Kamadaa, K,b.; Yoshimurac, S.; Muratac, M, et al . “Characterization and monitoring of pseudo-polymorphs in manufacturing process by NIR”. **In:International Journal of Pharmaceutics** v. 368, p. 103–108, 2009
- [64]-Blanco, M.; Alcalá, M.; González, J.M.; Torras, E. “Near infrared spectroscopy in the study of polymorphic transformations”.**In: Analytica Chimica Acta.** v. 567, p. 262-68, 2006.
- [65] Blanco,M .; Alcalá, M.; Bautista, M. “Pharmaceutical gel analysis by NIR spectroscopy Determination of the active principle and low concentration of preservatives”. **In: European Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 33, p. 409–414, 2008.
- [66] Sarraguça, M.C.; Cruz , V.,A .; Soares, S, O. “Determination of flow properties of pharmaceutical powders by near infrared spectroscopy” **In: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v. 52, p 484–492, 2010.
- [67]-Dou, Y.; Sin, Y.; Ren, Y; Ju, P.; Ren, Y. “Simultaneous non-destructive determination of two components of combined paracetamol and amantadine hydrochloride in tablets and powder by NIR spectroscopy and artificial neural networks.” **In:Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis .** v. 37, p. 543-49, 2005.
- [68] Ito, M.; Suzukib, T.; Yadab, S.; et al “Development of a method for nondestructive NIR transmittance spectroscopic analysis of acetaminophen and caffeine anhydrate in intact bilayer tablets. **In: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v. 53, p. 396–402, 2010.
- [69] Blanco, M, R.;Mestanza,C.;Peguero, A. “Controlling individual steps in the production process of paracetamol tablets by use of NIR spectroscopy. **In: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 51, p. 797–804, 2010.
- [70]-Freitas, P. M.; Sabadin, A.;Silva M. L.; Gioannotti, M.F et al. “Prediction of drug dissolution prolis from tablets using NIR diffuse reflectance spectroscopy: A rapid and nondestructive method”. **In: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 39, p. 17-21, 2005.
- [71]-Blanco, M.; Alcalá, M. “Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by near infrared spectroscopy A contribution to process analytical technologies”. **In: Analytica Chimica Acta,** v. 557, p. 353-59, 2006.
- [72]-Otto, M. **Chemometrics – Statistics and Computer application in Analytical Chemistry.** Weinheim:, Wiley, 1999.

- [73] Hopke, P.K. The evaluation of chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, v. 500, p. 365-377, 2003. *apud* MADAZOLLO, E.S. **Caracterização físico-química de ricotas via espectrofotometria no infravermelho e métodos de calibração multivariada**.2010. Dissertação (mestrado em ciência e tecnologia de alimentos) Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2010.
- [74] Brereton, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry, **In Analyst** v. 124, p. 2125-2154. 2000.
- [75] Bruns, R.E.; Faigle, J.F.G. “Quimiometria”. **In: Química Nova**. v. 8, p.84-99, 1985.
- [76] Montgomery, D. C.; **Design and Analysis of Experiments**; 5<sup>th</sup> ed.; Wiley, New York, 2001.
- [77] Simões, S.S . “**Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrofotometria NIRR e calibração multivariada**”. 2008. Tese (Doutorado em Ciências) Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.
- [78] Martens, H.; Naes, T. “**Multivariate Calibration**”. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- [79] Helland, I.S. “On the structure of partial least square regression. **In: Communications. Statistics - simulation and computation**”. v. 17, p. 2, 1998.
- [80] Beebe, K. R.; Randy, J. P.; Seasholtz, M. B., **Chemometrics: A practical guide**, Wiley-Interscience, New York, 1998.
- [81] Vandeginste, B.G.M., Massart, D.L., Buydens, L.M.C., Jing, S., Lewi, P.J., SMEYERS-VERBEKE, J., **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B**. Amsterdam: Elsevier, 1998.
- [82] Geladi, P.;Kowalski, B.R. “Partial least-squares regression – A tutorial” **In: Analytica Chimica Acta**. v. 185, p.1-17, 1986.
- [83] Nagata, N.;Bueno, M.I.M.S.; Peralta-Zamora,P. Métodos matemáticas para a correlação de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de raio-X. **In: Química Nova**, v. 24, p.531-539, 2001.
- [84] Jouan-Rimbaud, D., Walczak, B., Poppi, R. J., de Noord, O. E., Massart, D. L., “Application of wavelet transform to extract the relevant component from spectral data for multivariate calibration” **In: Analytical. Chemistry**, v. 69, p.4317 -23, 1997.
- [85] Ferreira, M. M. C., Montanari, C. A., Gaudio, A. C., “Seleção de variáveis em QSAR” **In: Química Nova**, V25, p. 439- 48, 2002.
- [86] Leardi, R. “Genetic algorithms in chemometrics and chemistry: a review”, **In: Journal of Chemometrics**, v. 15, p.559-569, 2001.

- [87] Forina, M.; Lanteri, S.; Casale, M.; Oliveros, M. C. C., “Stepwise orthogonalization of predictors in classification and regression techniques: An “old” technique revisited, “ In: **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 87, p. 252-61, 2007.
- [88] Araújo, M. C. U.; Saldanha, T. C. B.; Galvão, R. K. H.; Yoneyama, T.; Chame, H. C.; Visani, V. “The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopy multicomponent analysis”. In: **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.57, p. 65-73, 2001.
- [89] Norgaard, L.; Saudland, A.; Wagner, J.; Nielsen, J. P.; Munck, L.; Engelsen, S. B. Interval partial least-squares regression (i-PLS): A comparative chemometric study with an example from near infrared spectroscopy. In: **Applied Spectroscopy**, v.54, p.413-19, 2000.
- [90] Pontes, M.J.C. “**Algoritmo das Projeções Sucessivas para Seleção de Variáveis Espectrais em Problemas de Classificação**”. 2009. Tese (Doutorado em Ciências). Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.
- [91] Galvão, R.K.H., Araújo, M.C.U., Fragoso, W.D., Silva, E.C., José, G.E., Soares, S.F.C. Paiva, H.M.: A variable elimination method to improve the parsimony of MLR models using the successive projections algorithm. In: **Chemom. Intell. Lab. Syst.** V.92,p.83–91, 2008.
- [92] Galvão, R. K. H.; Araújo, M. C. U.; Silva, E. C.; José, G. E.; Soares, S. F. C.; Paiva, H.M. Cross-validation for the selection of spectral variables using the successive projections algorithm. In: **J. Braz. Chem. Soc.**, v.18 (8), p.1580-84, 2007.
- [93] Lira, L.F.B. “**Desenvolvimento de Métodos Analíticos para Monitoramento da Qualidade do Biodiesel e suas Misturas**”, 2010. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.
- [94] Kennard, R.W.; Stone, L.A. “Computer aided desing of experiments, In: **Technometrics**”,v. 11, n°1, p.137-148, 1969.
- [95] Honorato, F. A.; Barros Neto, B.; Martins, M.N.; Galvão, R.K.H.; Pimentel, M.F.; Transferência de calibração em métodos multivariados. In: **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1301-12, 2007.
- [96] Galvão, R.K.H; Araujo, M.C.U; Jose, G.E, et al.; A method for calibration and validation subset partitioning, *Talanta*, 67,736, 2005. Simões, S.S . *apud* **Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrofotometria NIRR e calibração multivariada**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências) Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.
- [97] Maesschalck, R. De; Joun-Rimbaud, D.; Massart, D.L. “The mahalanobis distance”, In: **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v. 50, p.1-18, 2000.
- [98] Hoy, M.; Steen, K.; Martens, H. “Review of partial least squares regression prediction error in Unscrambler”, In: **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 44, p. 123-33, 1998.

- [99] Fernández Pierna, J.A.; Wahl, F.; Noord, O.E.; Massart, D.L. “Methods for outlier detection in prediction”, **In: Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 63, p. 27-39, 2002.
- [100] Fernández Pierna, J.A.; Jin, L.; Daszykowski, M.; Wahl, F.; Massart, D.L. “A Methodology to detect outlier/inliers in prediction with PLS”, **In: Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 68, p. 17-28, 2003.
- [101] American Society for Testing and Materials. Standards practices for infrared multivariate, quantitative analysis, E1655-05 vol 03.06. West Conshohocken, Pennsylvania, USA, 2005.
- [102] Haaland, D.M.; Thomas. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information . **In: Anal. Chem.** v. 60, p. 1193–1202, 1988.
- [103] Reich, G.; Near-Infrared spectroscopy and imaging: “Basis principles and pharmaceutical applications”, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1109-1143 . 2005.
- [104] Honorato, F.A. “**Previsão de propriedades das gasolinas do Nordeste empregando espectrofotometria NIR/MIR e transferência de calibração**”.2007. Tese (Doutorado em Química) Departamento de Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.
- [105] Immel, B.K.A. “A Brief History of the GMPs for pharmaceuticals”. **In: Pharmaceutical Technology**. Disponível em: <<http://ptech.adv100.com/pharmatech/data/articlestandard/Pharmatech/252002/22732/article.pdf>>. Acessado em 12 maio 2010.
- [106] Barros, C.B. “Validação de métodos analíticos”. **In: Biológico**, v. 64, n. 2, p. 175-177, 2002.
- [107] Brasil. **RE nº 899, de 29 de Maio de 2003**, Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília. DOU de 02/06/2003.
- [108] ICH, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration on Pharmaceuticals for Human Use Q2A. “**Text on Validation of Analytical Procedures**” March, 1995; Genebra, 1994.
- [109] Blanco, M.; Eustaquio, A.; González, J.M.; Serrano, D. **In: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 22, p.139-48, 2000.
- [110] El-Gindy, A. Emara, S. Mostafa, A. “Application and validation of chemometrics-assisted spectrophotometry and liquid chromatography for the simultaneous determination of six-component pharmaceuticals”. **In: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 41, p. 421–430, 2006.
- [111] Braga , J.W. B.; Poppi, R. J. “Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polifórfica de carbamazepina por espectrofotometria no infravermelho próximo”. **In: Química Nova**. v. 27, p.1004-11, 2004.

- [112] Pimentel, M. F.; Galvão, R.K.H.; Araújo, M.C.U. “Recomendações para calibração em química analítica parte-2. calibração multianalito”. **In: Química Nova**. v. 31, p.462, 2008.
- [113] IUPAC Technical Report 78 – Olivieri, A.C.; Faber, N.K.M.; Ferré, J.; Boqué, R.; Kalivas, J.H.; Mark, H.; **In: Pure and Applied Chemistry**, 2006.
- [114] Note for guidance on the use of near-infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, CPMP/QWP/3309/01, EMEA/CVPM/96/01, 2003, London, 1-14., Disponível em: <<http://www.emea.eu.int/pdf/shuman/qwp.en.pdf>>.
- [115] **The United States Pharmacopéia, USP-30, NF-25**, 2007. General information <1119> Near- Infrared Spectrophotometry.
- [116] Eurachem/Citac – Work Group. **Guide of quality in analytical chemistry – An aid to accreditation**. 2. ed. 2002.
- [117] M. Blanco, M.; Alcalá, M Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation: Development and validation of a near infrared spectroscopic method. **In: European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p.280-86, 2006.
- [118] Gamero, M.A.R. “**Desarrollo de nuevas metodologías analíticas em el control de calidad de la industria farmacéutica**”, 2001. Tese (Doctor en Ciencia Química) Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Química.
- [119] Olivieri, A. C.; Goicoechea, H.C.; Añón, A.F . MVC1: An integrated MatLab toolbox for first-order multivariate calibration. **In: Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** v. 73, p. 189-97, 2004.
- [120] Oliviere, A. C.; Faber, N. M.; Ferré, J.; Boqué, R.; Kalivas, J. H.; Mark. H.; Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration; **In: Pure Appl. Chem.**, v. 78, p. 663, 2006
- [121] Muñoz de la Pena, A.; Espinosa-Mansilla, A.; Acedo Valenzuela, M. I.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C. “Comparative study of net analyte signal-based 128 methods and partial least squares for the simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid by stopped-flow kinetic analysis”, **In: Analytica Chimica Acta.**, v. 463, p.75-88, 2002
- [122] Vessman, J.; Stefan, R. I.; Van Staden, J. F.; Danzer, K.; Lindner, W.; Burns, D. T.; Fajgelj, A.; Muller, H. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001), **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 8, p.1381-1386, 2001. VALDERRAMA, P *apud* Tese (Doutorado em química) Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectrofotometria no infravermelho próximo, 2005. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP, 2005.
- [123] Lorber, A.; Faber, K.; Kowalski, B. R. Net analyte signal calculation in multivariate calibration, **Analytical Chemistry**. v. 69, n°8, p.1620-1626, 1997. VALDERRAMA, P *apud* Tese

(Doutorado em química) Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectrofotometria no infravermelho próximo, 2005. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP, 2005.

[124] Boqué, R.; Rius, F. X. Multivariate detection limits estimators, **In: Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 32, p. 11-23, 1996.

[125] Scholz, E (1984) Karl Fischer-titration. Springer. New York (and references therein).

[126] Abdou, H.M. Dissolution, Bioavailability e Bioequivalence. Easton, Mack Publishing Company, p. 554, 1989.

[127] Banakar, U.V. Pharmaceutical Dissolution Testing. New York, Marcel Dekker Inc., p.437, 1992.

[128] Gibaldi, M. Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics. 4 ed. Philadelphia; Lea & Febiger, 1991.

[129] Disponível em: <[http://www.eosystems.com/pdf/IGA\\_Series\\_spectral\\_responsivity.pdf](http://www.eosystems.com/pdf/IGA_Series_spectral_responsivity.pdf)>. Acesso em: 26 set. 2010.