



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

**Desenvolvimento de uma metodologia baseada na
espectroscopia no infravermelho próximo para
determinação do produto de degradação do
captopril em comprimidos**

Julia Aparecida Lourenço de Souza

Recife – PE
2011

Souza, Julia Aparecida Lourenço de
Desenvolvimento de uma metodologia baseada
na espectroscopia no infravermelho próximo para
determinação do produto de degradação do captopril
em comprimidos / Julia Aparecida Lourenço de
Souza. – Recife: O Autor, 2011.
xvii + 48 folhas: il., fig.; 30 cm.

Orientador: Miracy Muniz de Albuquerque.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2011.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Dissulfeto de captopril. 2. Quantificação. 3.
NIR. I. Albuquerque, Miracy Muniz de. II. Título.

615.31

CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2011-089

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

Desenvolvimento de uma metodologia baseada na espectroscopia no infravermelho próximo para determinação do produto de degradação do captopril em comprimidos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos

Orientadora: Profa. Dra. Miracy Muniz de Albuquerque

Co-orientadora: Dra. Simone da Silva Simões

Julia Aparecida Lourenço de Souza

Recife – PE
2011

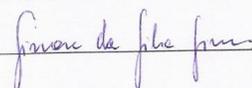


UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

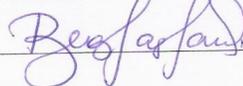
Recife, 28 de fevereiro de 2011.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 28 de fevereiro de 2011 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr.ª Simone da Silva Simões.
(Deptº de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

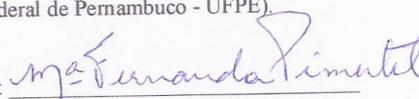
Assinatura: 

EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr.ª Beate Saegesser Santos.
(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: 

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr.ª Maria Fernanda Pimentel Avelar.

(Deptº de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: 

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

**Desenvolvimento de uma metodologia baseada na
espectroscopia no infravermelho próximo para
determinação do produto de degradação do
captopril em comprimidos**

BANCA EXAMINADORA

Presidente e Examinadora Interna

Dra. Simone da Silva Simões – UFPE

Examinador Interno Titular

Profa. Dra. Beate Saegesser Santos – UFPE

Examinador Interno Suplente

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto - UFPE

Examinador Externo Titular

Profa. Dra. Maria Fernanda Pimentel – UFPE

Examinador Externo Suplente

Profa. Dra. Claudete Fernandes Pereira – UFPB

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Pró-Reitor: Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

VICE-REITOR 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-REITOR DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

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

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

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

Profa. Dra. Beate Saegesser Santos - UFPE

Com amor dedico,
Aos meus pais Adelaide e Benedito pelo amor incondicional,
educação e apoio que dedicaram a mim. Aos meus irmãos Haroldo,
Fernando e João pelo amor e alegrias compartilhadas e pelo apoio à
realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que tem proporcionado em minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Miracy Muniz de Albuquerque pela oportunidade em tê-la como orientadora, pela amizade, carinho e respeito dedicados a mim.

À minha co-orientadora Dra. Simone da Silva Simões, pela grande dedicação, paciência e cumplicidade para a realização desse trabalho. Pela sua sincera amizade e apoio, muito obrigada!

À amiga Ruth Riesinger Strattmann pelos ensinamentos, conselhos e dedicação que sempre dispensou para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao colega e companheiro de laboratório Severino Granjeiro Júnior por toda ajuda, disposição e dedicação no decorrer desse trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Danilo Rafael B. dos Santos e Lindinaura B. de Oliveira pela colaboração.

Aos colegas Rosário, Rosana, Ana, Reniere e Luis do NCQMC (Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos) pelo companheirismo, alegrias compartilhadas e colaboração.

A Margarete Valdevino da Silva secretária da coordenação do PPGCF (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) por toda ajuda e dedicação. Muito obrigada por sua gentileza e palavras de conforto.

Às farmacêuticas Aila, Aline e Flávia do LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes) pela colaboração e fornecimento das amostras para a o desenvolvimento deste trabalho.

À profa. Dra. Maria Fernanda Pimentel do LAC (Laboratório de Combustíveis) pela colaboração, apoio e espaço cedido para a realização desta pesquisa.

Ao prof. Dr. Pedro José Rolim Neto coordenador do LTM (Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos) pela colaboração para a realização de parte desta pesquisa.

Ao colega José Lourenço do LTM pela colaboração.

Aos amigos que fiz no mestrado pelo companheirismo e alegrias compartilhadas, em especial às amigas Thays Gomes e Amanda Oliveira pela amizade sincera e por fazerem a minha estada em Recife mais alegre.

Ao amigo Cesar Sampaio por todo auxílio, dedicação e amizade desde que aqui cheguei.

À amiga Chaenne Alves pela amizade, companheirismo e incentivo para a realização desse trabalho.

Ao grande amigo, mestre e incentivador para a realização deste sonho Prof. Msc. Said Gonçalves da Cruz Fonseca da UFC (Universidade Federal do Ceará).

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Profissional de Ensino e Pesquisa Superior), que disponibilizou recursos para a efetivação desta pesquisa.

Aos amigos de Fortaleza que mesmo distante estão sempre torcendo pelas minhas conquistas.

À minha família por todo amor e apoio para a realização desse sonho. Pelo incentivo nas dificuldades enfrentadas e por vibrar comigo a cada conquista. Muito obrigada a todos!

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a concretização deste trabalho.

Palco da vida

Você pode ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não se esqueça de que sua vida é a maior empresa do mundo. E você pode evitar que ela vá à falência.

Há muitas pessoas que precisam, admiram e torcem por você. Gostaria que você sempre se lembrasse de que ser feliz não é ter um céu sem tempestade, caminhos sem acidentes, trabalhos sem fadigas, relacionamentos sem decepções.

Ser feliz é encontrar força no perdão, esperança nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros.

Ser feliz não é apenas valorizar o sorriso, mas refletir sobre a tristeza. Não é apenas comemorar o sucesso, mas aprender lições nos fracassos. Não é apenas ter júbilo nos aplausos, mas encontrar alegria no anonimato.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Ser feliz é deixar viver a criança livre, alegre e simples, que mora dentro de cada um de nós. É ter maturidade para falar "eu errei". É ter ousadia para dizer "me perdoe". É ter sensibilidade para expressar "eu preciso de você". É ter capacidade de dizer "eu te amo". É ter humildade e receptividade.

Desejo que a vida se torne um canteiro de oportunidades para você ser feliz... E, quando você errar o caminho, recomece, pois assim você descobrirá que ser feliz não é ter uma vida perfeita, mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância.

Usar as perdas para refinar a paciência.

Usar as falhas para lapidar o prazer.

Usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência.

Jamais desista de si mesmo.

Jamais desista das pessoas que você ama.

Jamais desista de ser feliz, pois a vida é um espetáculo imperdível, ainda que se apresentem dezenas de fatores a demonstrarem o contrário.

Pedras no caminho? Guardo todas... Um dia vou construir um castelo!

Fernando Pessoa

RESUMO

O captopril ingrediente ativo farmacêutico apresenta considerável estabilidade. No entanto, é fortemente susceptível à degradação oxidativa causada por elevadas temperaturas e umidade, ou ainda pela mistura a excipientes higroscópicos. A degradação do captopril leva à formação do dissulfeto de captopril (DSC). O aumento da quantidade do produto de degradação e a conseqüente diminuição do princípio ativo, leva à perda da eficácia e segurança do medicamento, pois não apresentará a dose terapêutica adequada ao tratamento dos pacientes. Além disso, uma quantidade de DSC acima do valor máximo permitido que, segundo a 4ª edição da Farmacopeia Brasileira é 3%, pode causar o aparecimento dos efeitos indesejáveis no organismo. Deste modo, é de extrema importância a quantificação do DSC em comprimidos. O presente trabalho propõe uma nova metodologia para a determinação deste produto de degradação, baseada na espectroscopia na região do infravermelho próximo e métodos quimiométricos. Para a realização deste estudo foram utilizados 52 blisteres (520 comprimidos) de um mesmo lote recém-produzido, coletados da linha de produção do LAFEPE. Destes, 12 blisteres (120 comprimidos) foram utilizados para os ensaios de qualidade no tempo 0. Os 40 blisteres restantes foram submetidos à degradação forçada por 6 meses, utilizando uma câmara climática de estabilidade acelerada. A faixa de concentração de DSC utilizada para a construção dos modelos de calibração foi de 0,1125 a 1,2100 mg (0,45 a 4,84%). Os espectros NIR de refletância difusa de todos os lotes foram registrados na região de 14000 a 3800 cm^{-1} , com resolução de 8 cm^{-1} e 32 varreduras. Os mesmos lotes também foram analisados pelo método de referência (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE). Vários pré-tratamentos espectrais foram testados e aquele que mostrou melhor desempenho foi a 2ª derivada utilizando o algoritmo Savitzky-Golay com polinômio de segunda ordem e janela de 41 pontos. A validação interna do modelo foi feita utilizando a validação cruzada completa e o número ideal de variáveis latentes para a construção do modelo foi 5. O desempenho do modelo desenvolvido foi testado a partir da previsão da concentração de DSC em um conjunto externo contendo amostras de 20 lotes distintos (amostras de previsão) e apresentou um RMSEP de 0,0750 mg, que representa um RSD de 13,72%. O presente estudo confirma a aplicabilidade da espectroscopia NIR para a quantificação do DSC em comprimidos. De acordo com os parâmetros de validação a metodologia desenvolvida pode ser facilmente utilizada para análise de rotina, pois é uma técnica não invasiva, não destrutiva, rápida e não utiliza reagentes químicos prejudiciais ao meio ambiente.

Palavras-chave: Dissulfeto de captopril, quantificação, NIR

ABSTRACT

Captopril active pharmaceutical ingredient has considerable stability. However, it is highly susceptible to oxidative degradation caused by high temperatures and humidity, or by mixing with hygroscopic excipients. Degradation of captopril leads to the formation of captopril disulfide (DSC). The increased amount of degradation product and the consequent decrease in the concentration of the active principle, leading to loss of efficacy and safety of the drug, because it will not have adequate therapeutic dose to treat patients. In addition, a amount of DSC above the maximum allowed, that according to the fourth edition of the Brazilian Pharmacopoeia is 3%, can cause undesirable effects in the body. Thus, it is extremely important to quantify the DSC in captopril tablets. This work proposes a new methodology for the determination of this degradation product, spectroscopy based on near infrared and chemometric methods. To conduct this study, we used 52 blisters (520 tablets) of a newly single batch, collected from the production line of LAFEPE. Of these, 12 blisters (120 tablets) were used for testing quality at time 0. The 40 remaining blisters were subjected to forced degradation for 6 months, using an environmental accelerated stability chamber. The concentration range of DSC used for constructing the calibration models was 0.1125 to 1.2100 mg (0.45 to 4.84%). The NIR diffuse reflectance spectra of all batches were recorded in the region $14000 - 3800 \text{ cm}^{-1}$ with resolution of 8 cm^{-1} and 32 scans. The same batches were also analyzed by the reference method (High Performance Liquid Chromatography - HPLC). Several spectral pretreatments were tested and the method that showed the best performance was second derived using the Savitzky-Golay algorithm with second-order polynomial and a window of 41 points. Internal validation of the model was made using the full cross-validation and the optimal number of latent variables for build the model is 5. The performance of the model was tested to predict the concentration of DSC in an external set containing samples from 20 different batches (samples of prediction) and an RMSEP of 0.0750 mg, which represents a 13.72% RSD. The present study confirms the applicability of NIR spectroscopy for the quantification of DSC in captopril tablets. According to the parameters of the validation, the methodology can be easily used for routine analysis because it is non-invasive, non-destructive, fast and does not use chemical agents harmful to the environment.

Key-words: Captopril Disulfide, quantification, NIR

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CB	Com Blister
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DR-NIR	Diffuse Reflectance Near Infrared
DSC	Dissulfeto de Captopril
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
FAFAR/UFMG	Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais
FB	Farmacopeia Brasileira
GA	Genetic Algorithm
HCA	Hierarchical Cluster Analysis
ICH	International Conference on Harmonisation
iPLS	Interval Partial Least Square
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KNN	K-Nearest Neighbor
KS	Algoritmo Kennard-Stone
LAFEPE	Laboratório do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes
MIR	Medium Infrared
MLR	Multiple Linear Regression
MVC1	Multivariate calibration 1
NAS	Net Analyte Signal
NIPALS	Non-linear Iterative Partial Least Squares
NIR	Near Infrared
PAT	Process Analytical Technology
PC	Principal Component
PCA	Principal Component Analysis
PLS	Partial Least Square

RE	Resolução Específica
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RMSEC	Root Mean Square Error of Calibration
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross Validation
RMSEP	Root Mean Square Error of Prediction
RP	Reconhecimento de Padrões
rpm	Revoluções Por Minuto
SB	Sem Blister
SIMCA	Soft Independent Modelling of Class Analogy
SPA	Sucessive Projections Algorithm
SPXY	Sample set Partitioning based on joint X-Y distances
SQR	Substância Química de Referência
UR	Umidade Relativa
UV	Ultravioleta
UVE-iPLS	Elimination of Uninformative Variables in Partial Least Square
Vis	Visível
VL	Variáveis Latentes

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micromêtro
cm^{-1}	Centímetro à menos um
Kgf	Kilograma força
M	Molaridade
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
nm	Nanômetro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
p/V	Percentual peso por volume
V/V	Percentual volume por volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação de degradação do captopril.....	3
Figura 2: Modos de medida NIR: (a) refletância difusa, (b) transmitância e (c) transfectância.....	10
Figura 3: Organização dos dados na calibração multivariada.....	15
Figura 4: (a) Espectrofotômetro NIR, modelo FTLA2000-160 Bomem, (b) acessório Powder Sampl/R.....	24
Figura 5: Cromatograma do comprimido de captopril.....	30
Figura 6: Espectros NIR de refletância difusa sem pré-tratamento.....	31
Figura 7: Segunda derivada dos espectros NIR utilizando o algoritmo Savitzky-Golay com janela de 41 pontos e polinômio de segunda ordem.....	32
Figura 8: Variáveis selecionadas (●) no teste de significância (Jackknifing).....	33
Figura 9: Gráfico do valor medido pelo método de referência (CLAE) versus a concentração prevista pelo método NIR.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Especificações dos ensaios de qualidade segundo a Farmacopeia Brasileira.....	28
Tabela 2: Parâmetros físico-químicos de qualidade do lote 10041492 no tempo 0 e 184 dias, SB (Sem Blister) e CB (Com Blister).....	29
Tabela 3: Comparação entre modelos construídos com todas as variáveis espectrais e com aquelas selecionadas com base no princípio Jackknifing.....	34
Tabela 4: Figuras de mérito obtidas para o modelo desenvolvido.....	36
Tabela 5: Parâmetros de validação para o método desenvolvido (n=número de lotes).....	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	6
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
3.1 Métodos convencionais utilizados para quantificação do captopril e seu produto de degradação	8
3.2 Espectroscopia no infravermelho próximo.....	9
3.2.1 Modos de medida NIR	10
3.3 Métodos Quimiométricos.....	12
3.3.1 Métodos de planejamento e otimização de experimentos	12
3.3.2 Métodos de reconhecimento de padrões	13
3.3.3 Métodos de calibração multivariada	14
Regressão por mínimos quadrados parciais – PLS	16
Regressão linear múltipla - MLR	17
3.3.4 Seleção de amostras	18
Algoritmo Kennard-Stone (KS)	18
Algoritmo Sample set Partitioning based on joint X-Y distances (SPXY)	19
4. EXPERIMENTAL	22
4.1 Amostras.....	22
4.2 Ensaio físico-químico de qualidade.....	22
4.3 Processo de degradação das amostras.....	24
4.4 Registros dos espectros de refletância difusa na região NIR.....	24
4.5 Método de referência: CLAE.....	24
4.6 Análise Estatística.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
5.1- Parâmetros físico-químico de qualidade	28
5.2 Metodologia NIR	30
5.2.1 Pré-tratamento espectral.....	30
5.2.2 Seleção de amostras de calibração	32
5.3 Construção e validação dos modelos de calibração.....	32
6. CONCLUSÕES	39
PERSPECTIVAS FUTURAS	41

REFERÊNCIAS	43
ANEXO	49

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são distúrbios comuns que, se não forem tratadas convenientemente, resultam em um acentuado aumento da probabilidade de trombose coronariana, acidentes vasculares cerebrais e insuficiência renal^[1]. Elas são responsáveis por aproximadamente um terço das mortes em todo o mundo e aproximadamente 40% nos Estados Unidos^[2]. No Brasil, as doenças cardiovasculares são responsáveis por 33% dos óbitos por causa conhecida^[3]. A hipertensão é o fator de risco mais importante para a prevalência das doenças cardiovasculares. Aproximadamente metade das pessoas entre 60 e 69 anos e três quartos daquelas com mais de 70 anos apresentam pressão sanguínea elevada. A ocorrência da hipertensão como problema de saúde pública aumenta conforme a idade da população^[2].

A hipertensão ou “pressão arterial alta” ocorre quando a pressão arterial média está acima da faixa superior aceita como normal, ou seja, 90 mmHg. Na hipertensão grave, a pressão arterial média pode atingir 150 a 170 mmHg, com pressão diastólica elevada de até 130 mmHg e pressão sistólica atingindo até 250 mmHg. A elevação da pressão arterial, mesmo quando moderada, resulta em menor expectativa de vida^[4].

O captopril é um dos medicamentos para o tratamento da hipertensão arterial com ampla comercialização na indústria farmacêutica. Este medicamento está presente na RENAME (Relação Nacional de Medicamentos Essenciais), sendo um dos mais consumidos no Brasil. Ele é amplamente utilizado no tratamento da hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva^[5,6] podendo ser encontrado comercialmente na forma de comprimidos contendo 12,5; 25 e 50mg de princípio ativo^[7].

O captopril, 1-[(2S)-3-mercaptopropionil]-L-prolina, cuja fórmula química é $C_9H_{15}NO_3S$ (**Figura 1**), foi o primeiro inibidor oral efetivo da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) a ser comercializado^[8]. É um anti-hipertensivo clássico, cuja ação, se estabelece basicamente pela inibição da ECA, levando à redução da angiotensina II que se liga a receptores específicos na membrana celular de vários tecidos, exercendo ação fisiológica de regulação da tensão arterial e sendo um

potente vasopressor. Possui um grupo funcional sulfidril (-SH) que pode agir como um inibidor de radicais livres do organismo com grande eficiência^[9].

O captopril ingrediente ativo farmacêutico apresenta considerável estabilidade. No entanto, é fortemente susceptível à degradação oxidativa causada por elevadas temperaturas e umidade, ou ainda pela mistura a excipientes higroscópicos.

A degradação do captopril segue uma cinética de ordem zero, levando à formação do dissulfeto de captopril a partir de um complexo mecanismo de acordo com a equação da **Figura 1**^[7,10], sendo mais estável em soluções ácidas que em soluções básicas.

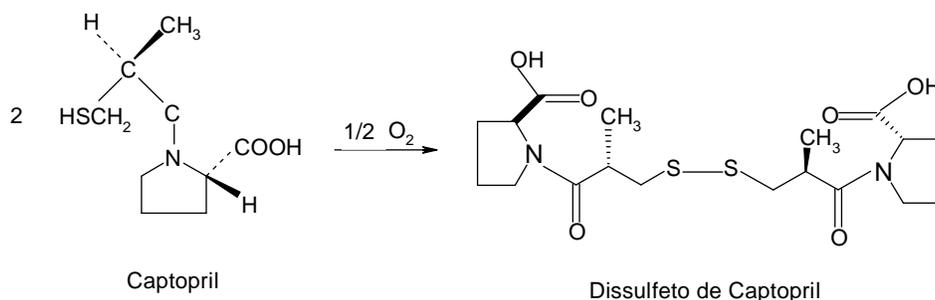


Figura 1: Reação de degradação do captopril^[7]

A velocidade da reação de oxidação depende principalmente do pH, da concentração de oxigênio e da presença de íons metálicos^[11]. O cobre e o ferro, que são os contaminantes mais comumente encontrados nas formulações devido ao contato com os equipamentos de produção e embalagens, são também os principais catalisadores desta reação. O efeito catalítico dos íons metálicos pode ser prevenido através da adição do agente quelante edetato de sódio (EDTA)^[7].

A degradação do captopril é danosa ao tratamento terapêutico, pois uma elevada concentração de dissulfeto de captopril implica na diminuição do teor do ativo^[12]. Além disso, o dissulfeto de captopril causará o aparecimento dos efeitos indesejáveis no organismo quando estiver acima do valor máximo permitido^[13,14]. Segundo a 4ª edição da Farmacopeia Brasileira^[15] a quantidade máxima de dissulfeto de captopril em comprimidos deve ser 3%. Diante do exposto fica clara a necessidade da determinação e quantificação do dissulfeto de captopril em comprimidos. A determinação de parâmetros de qualidade como, por exemplo, o teor de captopril e seu produto de degradação em comprimidos normalmente

envolve um grande número de análises. A maioria destas análises é realizada empregando métodos instrumentais. De acordo com a 4ª edição da Farmacopeia Brasileira, os métodos oficiais utilizados para a quantificação do teor de captopril são a titulação com iodo, ou com de iodato de potássio e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para a quantificação do teor de dissulfeto de captopril o único método descrito é a CLAE. Estes métodos, apesar de amplamente utilizados para o controle do teor de captopril e seu produto de degradação em comprimidos, apresentam alguns inconvenientes. Dentre estes, estão a necessidade de muitas manipulações analíticas, uso de reagentes químicos que são onerosos e prejudiciais ao homem e ao meio ambiente. Além disso, são destrutivos e apresentam alto custo de operação e manutenção.

A necessidade crescente por métodos mais rápidos, menos poluentes e mais econômicos e a escassez de metodologias analíticas que possam ser utilizadas para a quantificação do teor de dissulfeto de captopril em comprimidos, impulsionam o desenvolvimento de técnicas alternativas para este fim. O uso da tecnologia analítica de processos (PAT) na indústria farmacêutica tem sido enfatizado em todo o mundo devido aos ganhos em qualidade, segurança e eficácia. Estes ganhos surgem em consequência da redução do tempo de ciclos de produção por meio de: medições e o controle do processo; da prevenção de produção de material fora de especificação e de resíduos; das melhorias com a segurança do operário; da redução de erros humanos; da melhora da eficácia e do controle da variabilidade dos processos.

A metodologia proposta neste trabalho baseia-se na espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) para quantificar o produto de degradação do captopril em comprimidos, dentro das especificações do PAT.

Capítulo 2

Objetivos

2. OBJETIVOS

Geral

Desenvolver uma nova metodologia, baseada na espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e na quimiometria, para a quantificação de dissulfeto de captopril em comprimidos de captopril produzidos pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE).

Específicos

- Determinar os parâmetros de qualidade físico-químicos pelos métodos convencionais no início e no final do processo de degradação a fim de atestar a qualidade dos comprimidos utilizados para o desenvolvimento da metodologia proposta;

- Otimizar os dados obtidos através do uso de vários pré-tratamentos espectrais, como por exemplo, a suavização, derivação, correção multiplicativa de sinais (Multiplicative Scatter Correction -MSC), variação normal padronizada (Standard Normal Variate -SNV), entre outros;

- Construir modelos de calibração multivariada para quantificar o dissulfeto de captopril formado pela degradação;

- Validar o método empregando a espectroscopia NIR e calibração multivariada;

- Utilizar o modelo construído para fazer a previsão da quantidade de dissulfeto de captopril produzido em amostras desconhecidas.

Capítulo 3

Revisão da Literatura

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Métodos convencionais utilizados para quantificação do captopril e seu produto de degradação

A cromatografia líquida de alta eficiência é o método oficial recomendado pela Farmacopeia Brasileira para a quantificação de captopril e dissulfeto de captopril, sendo citada amplamente na literatura, seja para a análise de formas farmacêuticas ou de derivados biológicos contendo o fármaco.

Na literatura é apresentada uma grande variedade de métodos para a determinação do captopril em preparações farmacêuticas. Entre eles podemos citar o trabalho de Valentini, Someer e Mاتيoli^[16], no qual eles validaram três métodos analíticos para a quantificação de captopril em comprimidos: o método espectrofotométrico baseado na reação do captopril com o reagente Folin-Ciocalteu formando um cromógeno azul com estabilidade de uma hora e com absorvância máxima em 670 nm; o método titulométrico utilizando iodato de potássio como titulante e o um método cromatográfico. Os autores concluíram que o método cromatográfico é o mais adequado para tal análise, e que os métodos espectrofotométrico e titulométrico possuem uma baixa sensibilidade, mas satisfazem aos critérios de aceitação farmacopéicos. A titulação iodimétrica também é bastante usada, no entanto é útil apenas para a quantificação de captopril em comprimidos por não detectar o seu produto de degradação^[5,17]. Outro exemplo é o método por quimiluminescência, onde foi estudado o comportamento quimiluminescente do captopril a partir da reação de oxidação do permanganato de potássio em diferentes meios ácidos utilizando a técnica *stopped-flow* em um sistema de fluxo contínuo^[5]. Rahman, Singh e Hoda^[17] validaram um método volumétrico e espectrofotométrico simultaneamente para doseamento de captopril em formas farmacêuticas. O método volumétrico utiliza o iodato de potássio como titulante e amaranço como indicador. O iodo formado durante a titulação foi extraído com tetracloreto de carbono e quantificado por espectrofotometria. Um método eletroanalítico desenvolvido por Lourenção, Marcolino-Júnior e Fatibello-Filho^[9], no qual o teor de captopril em comprimidos foi determinado utilizando uma titulação condutimétrica com sulfato de cobre (II) como titulante. Gao, Wu e Li^[6], determinaram o teor de captopril em comprimidos utilizando um método espectrofotométrico indireto onde o captopril em pH 13 catalisa a reação entre o

sódio 1,2-naftoquinona-4-sulfonato e o íon OH^- formando 2-hidroxi-1,4-naftoquinona que tem absorvância máxima em 442 nm.

A maioria desses métodos são lentos e trabalhosos, pois requerem dissolução e extração da amostra, além de preparações frequentes de reagentes e soluções de calibração, principalmente quando aplicados a produtos farmacêuticos em fase sólida. Estes métodos são relativamente dispendiosos, pois requerem o uso de solventes e reagentes caros, precisam de pessoal qualificado para a manipulação analítica e produzem resíduos químicos prejudiciais ao meio ambiente. Além disso, somente a CLAE é sensível para a quantificação do dissulfeto de captopril.

Uma boa alternativa para contornar os problemas apresentados pelas técnicas convencionais é o uso da espectrometria NIR. As metodologias baseadas nesta técnica apresentam como características análises não destrutivas, dispensam a preparação da amostra, não utiliza solventes orgânicos e reagentes químicos. Estas características fazem da espectroscopia NIR um método ideal para o controle de qualidade em uma linha de produção ou no produto acabado. Por este motivo, espectroscopia NIR associada à quimiometria tornou-se uma metodologia cada vez mais difundida nas mais diversas áreas de aplicações como na agricultura, indústrias alimentícias, petrolíferas, têxteis, polímeros, biomédicas e farmacêuticas^[18,19].

Simões^[20] desenvolveu uma metodologia baseada na espectrometria DR-NIR (Diffuse Reflectance Near Infrared) e técnicas quimiométricas de calibração multivariada para a quantificação de captopril em comprimidos.

3.2 Espectroscopia no infravermelho próximo

A espectroscopia NIR emprega a faixa de comprimentos de onda adjacente ao infravermelho médio e se estende até a região do visível (faixa de comprimentos de onda de 750 a 2500 nm que corresponde de 13300 a 4000 cm^{-1}). Para que ocorra absorção de radiação no infravermelho próximo é necessário que ocorra uma variação no momento de dipolo da molécula como consequência do movimento vibracional ou rotacional. Assim, o campo elétrico da radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de um de seus movimentos^[21]. Se a frequência deste campo elétrico coincidir com a frequência vibracional da molécula, ocorrerá transferência de energia que resultará na variação da amplitude da

vibração molecular. A consequência disso é a absorção de radiação pela molécula. A rotação de moléculas assimétricas em torno dos seus centros de massa também resulta em uma variação do dipolo que pode interagir com a radiação, ocasionando absorção de radiação. Moléculas homonucleares, como O_2 , N_2 ou Cl_2 não podem absorver radiação no infravermelho, pois nenhuma variação efetiva no momento de dipolo ocorre durante sua vibração ou rotação^[21]. No NIR, os sinais observados são principalmente referentes aos sobretons e às combinações de vibrações fundamentais, dos grupos funcionais $-CH$, $-NH$, $-OH$ e $-SH$, que ocorrem no infravermelho médio (MIR- Medium Infrared)^[19]. As bandas que ocorrem nesta região são tipicamente largas e sobrepostas, pouco intensas (10 a 1000 vezes menores que as bandas fundamentais na região MIR)^[18,19,22,23].

O sinal analítico NIR traz em uma única medida informações sobre as propriedades físicas e químicas de uma amostra. Deste modo é possível a determinação de vários parâmetros de qualidade com uma única medida^[20]. Esta característica faz com este método tenha aplicação universal.

A principal dificuldade para o uso da espectrometria NIR é a complexidade de seus espectros que diferentemente dos espectros obtidos na região do MIR, não podem ser interpretados diretamente^[18].

3.2.1 Modos de medida NIR

A **Figura 2** esquematiza os modos de medida NIR que são mais utilizados.

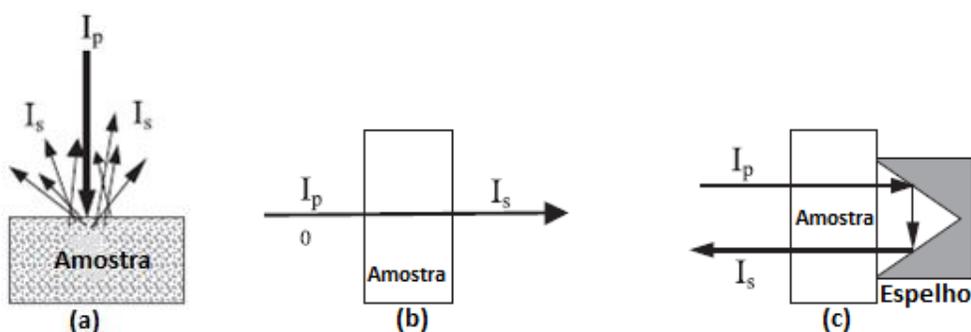


Figura 2: Modos de medida NIR: (a) refletância difusa, (b) transmitância e (c) transflectância^[19]

A reflexão difusa mostrada na **Figura 2a** ocorre quando a radiação penetra na superfície da amostra (sólidos, placas, filmes, pós ou grânulos) interagindo com a matriz e retornando à superfície da mesma, após absorção parcial e múltiplos espalhamentos. A radiação incidente entra em contato diversas vezes com as partículas da amostra sendo conseqüentemente atenuada. Assim ela sofre a reflexão difusa e fornece informações qualitativas e quantitativas sobre a amostra. A intensidade da radiação que retorna de forma difusa é geralmente muito inferior em magnitude que a radiação incidente^[24,25,26]. Diante dessa mudança de sinal, vários tratamentos matemáticos foram sugeridos para melhor explicar tal processo. Kubelka e Munk^[27] desenvolveram uma teoria que é válida para materiais transparentes e homogêneos, onde a luz incide no meio dispersante e sofre os processos de absorção e dispersão ao mesmo tempo, estabelecendo uma relação linear entre a concentração (C) e a refletância difusa (R), conforme Equação 1:

$$f(C) = \frac{(1 - R)^2}{2R}$$

Eq. 1

A refletância difusa (R) é descrita pela seguinte Equação:

$$R = \frac{I_R}{I_{R0}}$$

Eq. 2

Onde I_R é a intensidade da radiação refletida pela amostra e I_{R0} é a mesma quantidade refletida por um material não absorvente em toda faixa de medição espectral.

A medida das intensidades (I_R e I_{R0}) requer que a radiação espalhada seja coletada por uma esfera de integração, um material de referência (100% de reflexão em todos os comprimentos de onda). Por este motivo a equação de Kubelka e Munk raramente é utilizada, e foi substituída por uma equação mais prática embora não linear, descrita na Equação 3:

$$f(C) = \text{Log} \frac{1}{R}$$

Eq. 3

Essa equação não se distancia muito da sugerida por Kubelka e Munk, sendo bastante utilizada para o desenvolvimento de métodos analíticos baseados em medidas de refletância difusa^[19].

A transmitância mostrada na **Figura 2b** é outro tipo de medida NIR, e ocorre de forma semelhante aos métodos utilizados na espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis). Nela a amostra é colocada em cubetas com caminho óptico conhecido e a

luz incidente penetra a amostra por um lado e é transmitida pelo lado oposto sendo detectada pelo equipamento, onde é registrado o seu espectro. Esse tipo de medida é bastante útil na análise de amostras líquidas^[19,28].

A **Figura 2c** mostra um tipo especial de medida, a transflectância, onde a luz incide a amostra, atinge um espelho e a luz refletida atravessa novamente a amostra e esta é detectada. Este tipo de medida difere das medidas de transmitância pela duplicação do caminho óptico, pois o feixe de radiação passa duas vezes pela amostra. Esse método é bastante empregado com a utilização de sondas^[19].

3.3 Métodos Quimiométricos

A quimiometria é uma ferramenta que utiliza dados originados na química e emprega métodos matemáticos e estatísticos para fornecer o máximo de informação com base na análise dos dados obtidos^[29,30]. A partir da quimiometria é possível determinar, muitas vezes de forma indireta, propriedades de substâncias que seriam difíceis de determinar diretamente^[31].

Depois do surgimento da quimiometria vários métodos analíticos foram desenvolvidos possibilitando a análise de uma grande quantidade de dados que antes não eram possíveis, como exemplo a análise de dados obtidos pelo NIR. Com isso, várias ferramentas quimiométricas foram desenvolvidas para o tratamento de dados conforme a necessidade de cada caso, e as mais utilizadas são: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões (métodos de análise exploratória e classificação) e a calibração multivariada^[32].

3.3.1 Métodos de planejamento e otimização de experimentos

Tão importante quanto a análise estatística dos dados é o planejamento dos experimentos pelos quais esses dados serão obtidos. No Brasil o uso de experimentos estatisticamente planejados cresceu bastante com a utilização da quimiometria. É importante planejar para não perder tempo nem dinheiro. Um bom experimento consiste em projetá-lo de forma que se obtenha exatamente o tipo de informação que se procura^[33]. Os planejamentos experimentais mais usados são os fatoriais, completos ou fracionários, e os planejamentos compostos centrais. Além

disso, é interessante que os experimentos sejam realizados de forma aleatória para se obter uma estimativa confiável do erro experimental^[32].

3.3.2 Métodos de reconhecimento de padrões

Os métodos de reconhecimento de padrões (RP) são uma das principais vertentes do uso da estatística multivariada em química analítica e podem ser aplicados com a finalidade de análise exploratória (RP não supervisionado) de dados e/ou a classificação de amostras (RP supervisionado)^[32,34]. O RP viabiliza a obtenção de mais informações quando comparado com procedimentos univariados que são usualmente adotados^[34]. Nessa área, ferramentas computacionais são desenvolvidas para auxiliar na interpretação dos resultados obtidos por meio de análises químicas, para observar se há similaridade entre as amostras.

Quando não se tem informação prévia sobre as amostras, procura-se identificar no conjunto de treinamento possíveis padrões de agrupamento, usando-se um método de reconhecimento não supervisionado. As técnicas mais populares para este fim são a análise por agrupamento hierárquico (HCA - Hierarchical Cluster Analysis) e a análise de componentes principais (PCA - Principal Component Analysis)^[32]. Essas técnicas diminuem a dimensionalidade do conjunto de dados permitindo a sua visualização gráfica mesmo que este possua um número de variáveis elevado.

A HCA agrupa de forma hierárquica as amostras em classes, baseando-se na similaridade dos participantes de uma mesma classe e nas diferenças dos membros de classes diferentes. O que define a similaridade entre dois pontos é a distância entre eles no mesmo espaço. Quanto menor for essa distância, maior será a similaridade entre os objetos ou variáveis que representam os dois pontos^[32,34].

A PCA tem como objetivo principal reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, preservando ao mesmo tempo o máximo da informação. Essa redução se dá através da obtenção de cálculos de combinações lineares das variáveis originais, que são denominadas de componentes principais (PC's) e estas são organizadas em ordem decrescente de importância^[32,34].

A classificação é um tipo de análise por RP que se baseia nas medidas indiretamente relacionadas com a propriedade de interesse. Neste tipo de método, é

utilizado um conjunto de amostras de treinamento com propriedades conhecidas. Os métodos que utilizam esse tipo de procedimento são chamados de métodos de RP supervisionados e os mais utilizados são: SIMCA (Soft Independent Modelling of Class Analogy) e a regra dos vizinhos mais próximos (KNN – *K*-Nearest Neighbor)^[29,32].

3.3.3 Métodos de calibração multivariada

A calibração multivariada é um dos métodos quimiométricos mais utilizados em química analítica. Baseia-se na construção de modelos de calibração dos dados obtidos a partir de uma análise, para relacioná-los às propriedades físico-químicas da amostra em estudo^[32].

Esse método é constituído de três etapas: calibração, validação e previsão. Na calibração, através de métodos matemáticos é construído o modelo que servirá de base para todo o método; na validação esse modelo construído será avaliado por programas estatísticos de diagnósticos e na previsão o modelo de calibração criado e validado será aplicado para prever parâmetros ou concentrações de uma amostra desconhecida em estudo^[20].

Um resumo sobre a organização do método de calibração multivariada está ilustrado na **Figura 3**:

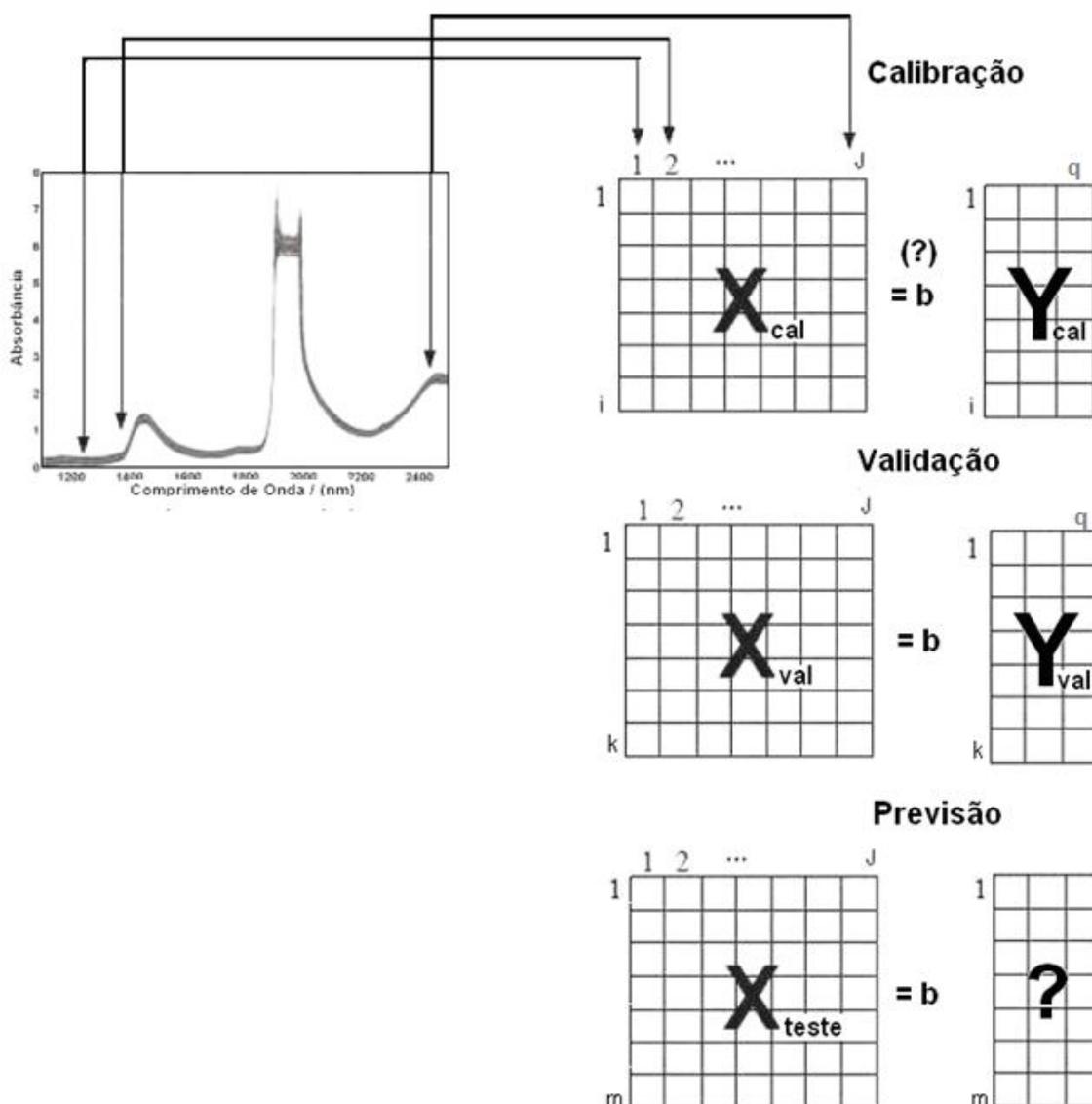


Figura 3: Organização dos dados na calibração multivariada^[20].

Espectros de “ i ” amostras do conjunto de calibração e de “ k ” amostras de validação são obtidos em “ j ” valores de comprimento de onda diferentes, formando uma matriz X_{cal} ($i \times j$) para a fase de calibração e outra matriz X_{val} ($k \times j$) para a fase de validação. Duas matrizes Y_{cal} ($i \times q$) e Y_{val} ($k \times q$) também são formadas com “ q ” colunas, relacionadas aos diferentes componentes presentes nas amostras e cujos valores de concentração são conhecidos geralmente por métodos de análise de referência^[20].

A calibração multivariada é uma das mais bem sucedidas combinações de métodos estatísticos com dados químicos. Os métodos mais usados incluem a

regressão linear múltipla (MLR) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)^[30].

Esses métodos são utilizados para a construção de modelos lineares. A PLS frequentemente utiliza toda a faixa espectral para a construção dos modelos de calibração multivariada. Para a utilização da MLR é necessário o emprego de algoritmos de seleção de variáveis espectrais não redundantes dentro da faixa espectral de trabalho.

Regressão por mínimos quadrados parciais – PLS

PLS é um dos métodos de regressão mais utilizados para a construção de modelos de calibração multivariada a partir de dados de primeira ordem. A modelagem é feita utilizando tanto as informações da matriz de dados espectroscópicos (matriz **X**), como as informações da matriz de concentrações ou propriedade de interesse (matriz **Y**). PLS não exige um conhecimento exato de todos os componentes presentes nas amostras, ela consegue fazer a previsão das propriedades de interesse das novas amostras mesmo na presença de interferentes, desde que estes estejam também presentes na construção do modelo^[22,35]. Este método atende ao conceito de modelo inverso (propriedade como função da resposta instrumental) trocando as variáveis originais por um subconjunto truncado das variáveis latentes dos dados originais^[20,22,29].

De uma forma geral podemos considerar as matrizes **X_{cal}** e **Y_{cal}** (**Figura 3**) decompostas em suas matrizes de pesos e escores, como mostrado respectivamente nas Equações 4 e 5.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 4}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^T + \mathbf{F} \quad \text{Eq. 5}$$

Onde: **T** e **U** são as matrizes dos escores e **P** e **Q** são as matrizes dos pesos das matrizes **X** e **Y**, respectivamente. **E** é a matriz de resíduos espectrais e **F** é a matriz dos resíduos de concentração. Essa decomposição pode se feita por vários tipos de algoritmos, e no final todos apresentam resultados semelhantes. Um exemplo deste tipo de algoritmo é o NIPALS (Non-linear Iterative Partial Least Squares), ele consiste em relacionar linearmente os escores da matriz **X** com os escores da matriz **Y**, conforme as Equações 6 e 7:

$$\mathbf{U} = \mathbf{BT} + \mathbf{G} \quad \text{Eq. 6}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{BTQ}^T + \mathbf{H} \quad \text{Eq. 7}$$

Onde: **B** é a matriz dos coeficientes de regressão; **G** é a matriz de resíduos dos escores e **H** a matriz de resíduos de concentração^[20,22].

Regressão linear múltipla - MLR

A regressão linear múltipla gera um dos modelos mais simples de calibração multivariada. Esse modelo pode ser obtido expressando-se cada variável dependente, ou seja cada vetor **y**_{cal} da matriz **Y**_{cal}, como uma combinação linear das variáveis independentes da matriz **X**_{cal} e um vetor **b**_{MLR} que contém os coeficientes de regressão. Esta expressão é dada pela Equação 8:

$$\mathbf{Y}_{\text{cal}} = \mathbf{X}_{\text{cal}} \mathbf{b}_{\text{MLR}} + \mathbf{e} \quad \text{Eq. 8}$$

Onde **e** é o resíduo.

Esta equação pode ser resolvida por mínimos quadrados para a obtenção do vetor dos coeficientes de regressão, conforme equação 9:

$$\mathbf{b}_{\text{MLR}} = (\mathbf{X}_{\text{cal}}^T \mathbf{X}_{\text{cal}})^{-1} \mathbf{X}_{\text{cal}}^T \mathbf{Y}_{\text{cal}} \quad \text{Eq. 9}$$

onde: os índices sobrescritos -1 e T representam a inversão e transposição de uma matriz ou vetor, respectivamente.

Uma estimativa para a previsão do valor da concentração ou do parâmetro de interesse em uma amostra desconhecida pode ser obtida por:

$$\hat{\mathbf{Y}}_{\text{desc}} = \mathbf{X}_{\text{desc}} \mathbf{b}_{\text{MLR}} + \mathbf{e} \quad \text{Eq.10}$$

No entanto, a regressão linear múltipla apresenta alguns problemas. Um deles 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. Quando o número de variáveis é maior que o número de amostras, ou vice-versa, o sistema de equações a ser resolvido torna-se indeterminado. Outro problema encontrado neste tipo de regressão é que a matriz $(\mathbf{X}_{\text{cal}}^T \mathbf{X}_{\text{cal}})$ pode não apresentar inversa devido à alta correlação entre as variáveis, esse problema pode ser solucionado usando um algoritmo de seleção de variáveis^[20,22].

3.3.4 Seleção de variáveis

Pesquisas demonstraram que a eficiência do modelo de calibração multivariada é melhorada significativamente com a escolha correta das regiões espectrais. Através da seleção de variáveis é possível fazer essa escolha, seja de um comprimento de onda ou de um conjunto de comprimento de ondas, de forma independente e mais restrita, minimizando assim os erros de previsões do modelo. A seleção de variáveis permite produzir modelos mais robustos, simples de interpretar e com melhor precisão nas previsões^[36].

Vários algoritmos de seleção de variáveis foram desenvolvidos. O que difere um algoritmo do outro é o procedimento realizado para a escolha da região espectral. Alguns desses algoritmos são: *brand and bound*, aplicado em otimização combinatória, algoritmo genético (GA), método de mínimos quadrados parciais por intervalo (iPLS – Interval Partial Least Square), método de mínimos quadrados parciais com eliminação de variáveis não-informativas (UVE-iPLS - Elimination of Uninformative Variables in Partial Least Square). O GA tem sido largamente utilizado, mas os resultados das seleções de variáveis nem sempre são reproduzíveis. Um método alternativo ao GA é algoritmo das projeções sucessivas (SPA - Successive Projections Algorithm) que apresenta como característica a reprodutibilidade dos seus resultados de seleção de variáveis^[20,22].

Algoritmo Kennard-Stone (KS)

Quando há um conjunto com grande número de amostras isso pode ser um problema na construção de modelos de calibração multivariada. 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.

Existem alguns métodos para este fim como o método de seleção aleatória (Random Search - RS) que é uma técnica simples pelo qual o grupo de dados é extraído do conjunto maior seguindo a distribuição estatística do conjunto inteiro. No entanto, esse método não garante a representatividade do conjunto de dados nem previne alguns problemas de extrapolação. Um boa alternativa para contornar esses

problemas é o algoritmo Kennard-Stone (KS) que seleciona as amostras com base em suas distâncias.

O algoritmo KS tem como objetivo selecionar um subconjunto significativo em um conjunto de N amostras. Assegurando a uniformidade de distribuição de cada subconjunto ao longo do espaço de dados \mathbf{X} (respostas instrumentais), o KS segue o procedimento *stepwise* no qual uma nova seleção é feita nas regiões do espaço longe das amostras já selecionadas. Ou seja, a primeira amostra selecionada pelo algoritmo é a que apresenta a maior distância em relação à amostra média. A segunda amostra a ser selecionada será a que apresentar maior distância em relação à primeira amostra selecionada. A próxima amostra a ser selecionada apresentará maior distância em relação à última amostra selecionada, e assim por diante até atingir o número de amostras desejadas. Para atender esse objetivo o algoritmo aplica a distância Euclidiana $d_x(p,q)$ entre os vetores \mathbf{X} de cada par (p,q) como mostra a Equação 11.

$$d(x,p) = \sqrt{\sum_{j=1}^J [x_p(j) - x_q(j)]^2}; \quad p,q \in [1,N] \quad \text{Eq. 11}$$

Para dados espectrais, $x_p(j)$ e $x_q(j)$ são as respostas instrumentais no j -ésimo comprimento de onda para as amostras p e q , respectivamente, e j denota o número de comprimentos de onda no espectro.

Normalmente, esse algoritmo é aplicado para realizar a seleção das amostras que irão compor o conjunto de calibração, uma vez que este procede a seleção das amostras de maior variabilidade, ou seja, as amostras mais “externas” do conjunto total^[20,22,37].

Algoritmo Sample set Partitioning based on joint X-y distances (SPXY)

O SPXY é uma extensão do algoritmo KS e leva em consideração tanto as diferenças de \mathbf{X} quanto de \mathbf{y} no cálculo das distâncias inter-amostras.

O SPXY foi inicialmente utilizado em um problema de calibração multivariada envolvendo espectrometria NIR para análise de amostras de diesel. O SPXY foi comparado com o KS e RS para a divisão do conjunto de dados em calibração e de validação para a regressão PLS. Os desempenhos dos modelos foram comparados em termos de menor erro médio de previsão – RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction). A fim de assegurar a independência desses conjuntos, as amostras

de previsão foram aleatoriamente extraídas do conjunto inicial de dados experimentais, antes de iniciar o processo de validação.

O propósito do algoritmo SPXY é prever a distância definida na Equação 11 como a distância no espaço variável dependente (y) do parâmetro em estudo. Cada distância $d_y(p,q)$ pode ser calculada para cada par de amostras p e q como:

$$d_y(p, q) = \sqrt{(y_p - y_q)^2} |y_p - y_q| \quad p, q \in [1, N] \quad \text{Eq. 12}$$

De forma a atribuir a mesma importância para a distribuição das amostras nos espaços X e Y , as distâncias $d_x(p,q)$ e $d_y(p,q)$ são divididas pelos seus valores máximos no conjunto de dados. Assim a distância normalizada é calculada conforme a Equação 13.

$$d_{xy}(p, q) = \frac{d_x(p, q)}{\max_{p, q \in [1, N]} d_x(p, q)} + \frac{d_y(p, q)}{\max_{p, q \in [1, N]} d_y(p, q)}; \quad p, q \in [1, N] \quad \text{Eq. 13}$$

Um procedimento de seleção *stepwise* similar ao algoritmo KS pode ser aplicado com $d_{xy}(a,b)$ ao invés de $d_x(a,b)$ sozinho^[20,37].

Capítulo 4

Parte Experimental

4. EXPERIMENTAL

4.1 Amostras

Para a realização deste estudo foram utilizados 23 lotes de comprimidos de Captopril 25 mg produzidos pelo LAFEPE. Destes, 400 comprimidos pertenciam ao mesmo lote e 220 de 22 lotes distintos, dos quais foi coletado 1 blister (10 comprimidos) de cada lote.

4.2 Ensaios físico-químicos de qualidade

Antes de iniciar o estudo de degradação, uma amostra de 120 comprimidos do lote 10041492 foi submetida aos ensaios físico-químicos de qualidade segundo a monografia da Farmacopeia Brasileira 4ª edição^[15]. Os comprimidos foram analisados antes do início do processo de degradação (tempo zero) e ao final de 184 dias (o último dia do processo de gradação).

Os ensaios físico-químicos de qualidade realizados foram os seguintes:

Determinação do peso: Foram pesados individualmente 20 comprimidos e determinado o peso médio. Segundo a Farmacopeia Brasileira^[15], para os comprimidos que tem peso médio entre 80 e 250 mg o limite de variação é de $\pm 7,5 \%$.

Dureza: A dureza foi determinada utilizando um durômetro Vankel VK-200 da Varian, onde 10 comprimidos foram submetidos à força aplicada diametralmente pelo equipamento necessária para esmagá-lo. O limite mínimo aceitável é de 3 Kgf, segundo a Farmacopeia Brasileira^[15].

Friabilidade: Foram pesados com exatidão 20 comprimidos e colocados no friabilômetro Vankel 45-2000 da Varian e submetidos a 100 rotações por minuto. Após a parada do equipamento os comprimidos foram retirados cuidadosamente removendo-se as partículas de pó e foram novamente pesados para ser calculada a massa perdida. Para tal ensaio o limite aceitável é que a perda seja inferior a 1,5 % do peso inicial^[15].

Teste de desintegração: Seis comprimidos foram colocados nos tubos da cesta e a eles adicionados um disco de acrílico. A cesta foi colocada no desintegrador da Ética 301 sob temperatura de 37°C em água purificada, medida com o termômetro LTR 3017/04. O equipamento foi acionado e os comprimidos observados cronometrando-se até a sua completa desintegração. O limite de especificação farmacopéico para desintegração é de no máximo 30 minutos^[15].

Uniformidade de doses unitárias: Foram pesados individualmente 10 comprimidos e transferidos cada um para um balão volumétrico de 100 mL contendo 5 mL de água e agitados até sua completa desintegração. Adicionou-se aproximadamente 50 mL de solução de etanol e água (1:1) e agitado em banho de ultra-som por 15 minutos. Após este período foi agitado mecanicamente por mais 15 minutos. Os balões tiveram seus volumes completados com a mesma solução, foram homogeneizados e seus conteúdos filtrados. Foi retirada uma alíquota de 2 mL de cada balão e transferida para balões volumétricos de 25 mL, chegando-se a concentração de 0,002% (p/V). Foi preparada uma solução padrão de captopril na mesma concentração de 0,002% (p/V). As amostras e o padrão tiveram suas absorvâncias medidas em espectrofotômetro da Varian-Vankel 50 UV/Vis em 212 nm, utilizando como branco a solução de etanol e água (1:1). A quantidade de captopril em cada comprimido foi calculada relacionando a absorvância de cada amostra com a absorvância obtida da solução padrão de captopril.

Teste de dissolução: Foram pesados individualmente 6 comprimidos e colocados no dissolutor Vankel VK7010, com o meio de dissolução ácido clorídrico 0,1M, contendo 900 mL em cada cuba, com o aparato cesta à 50 rpm por 20 minutos. Após esse tempo a amostra foi filtrada e sua absorvância medida em 212 nm em espectrofotômetro. A quantidade dissolvida foi medida correlacionando a leitura da concentração com a solução padrão de captopril que foi preparada utilizando o mesmo meio de dissolução a uma concentração de 26,72 µg/mL.

4.3 Processo de degradação das amostras

Dos quinhentos e vinte comprimidos, do lote 10041492 produzidos pelo LAFEPE, 200 comprimidos foram preservados dentro da sua embalagem primária,

(blister com 10 comprimidos) e 200 comprimidos foram retirados dos blisteres e distribuídos em placas de Petri sem a tampa para que ficassem mais expostos às condições de degradação. Todos os comprimidos (400) foram submetidos à degradação forçada utilizando uma câmara climática de estabilidade acelerada, Nova Ética Modelo 420/CLD-300, à $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\%\text{UR} \pm 5\%\text{UR}$ ^[38]. O estudo de degradação teve a duração de 6 meses.

4.4 Registros dos espectros de refletância difusa na região do NIR

Os espectros de refletância difusa foram registrados na região espectral de 14000 a 3800 cm^{-1} . Para isto utilizou-se um espectrofotômetro FTIR, Bomem Modelo FTLA2000-160, resolução de 8 cm^{-1} e 32 varreduras, conforme mostrado na **Figura 4a** e com acessório para refletância difusa Powder SamplIR (**Figura 4b**).

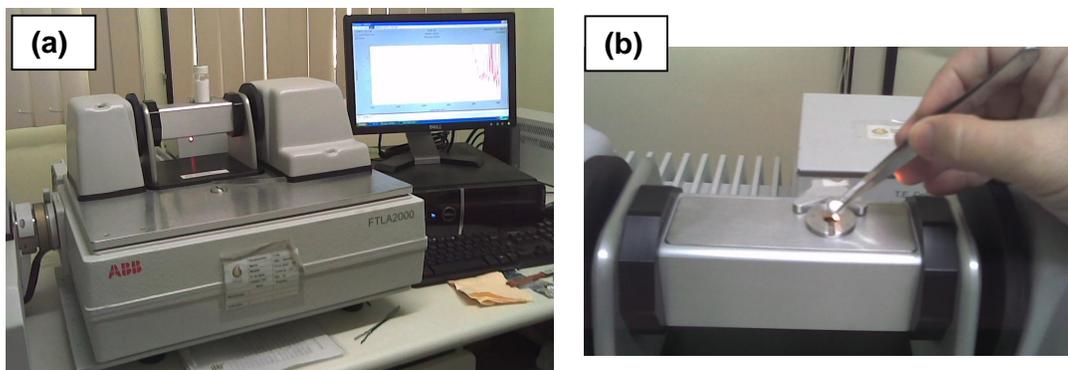


Figura 4: (a) Espectrofotômetro NIR, modelo FTLA2000-160 Bomem, (b) acessório Powder SamplIR.

Antes do início da degradação os espectros NIR de 10 comprimidos foram registrados. Em seguida, submeteram-se os comprimidos ao processo de degradação e os espectros NIR de 10 comprimidos foram registrados inicialmente a cada 07 dias no primeiro mês e a cada 15 dias nos meses restantes.

4.5 Método de referência: CLAE

Simultaneamente ao registro dos espectros NIR, os comprimidos foram submetidos ao ensaio de doseamento pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência, método oficial descrito na Farmacopeia Brasileira 4ª edição^[15]. Para isso

utilizou-se um cromatógrafo Shimadzu Class-VP V6.14 SP2 com detector ultravioleta de 220 nm; coluna de 250 mm e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 μm) da Shimadzu. Como fase móvel a mistura de ácido fosfórico 0,11% (V/V) e metanol (45:55).

Foi preparada uma solução padrão de dissulfeto de captopril na concentração de 1 mg/mL em fase móvel, utilizando para pesagem uma balança analítica Mettler AE 260. O dissulfeto de captopril utilizado foi o produzido pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais – FAFAR-UFMG lote 120108.

A partir dessa solução foi preparada a solução teste do padrão de dissulfeto de captopril, retirando uma alíquota de 3 mL e transferida para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com fase móvel, chegando a concentração final de 30 $\mu\text{g/mL}$.

A solução padrão de captopril foi preparada pesando-se 100 mg da Substância Química de Referência (SQR) de captopril da Farmacopeia Brasileira - FB lote 1001 (lote corrente - 2011) e transferida para um balão volumétrico de 100 mL. A ela foi adicionada uma alíquota de 3 mL da solução padrão de dissulfeto de captopril 1 mg/mL e o volume completado com fase móvel.

As amostras foram preparadas em triplicatas. Os comprimidos foram pesados, pulverizados e foi transferido o equivalente a um peso médio do comprimido para balão volumétrico de 25 ml e adicionado 15 ml de fase móvel e posteriormente levado à agitação em banho de ultra-som por 15 minutos e agitação mecânica por mais 15 minutos. Após este procedimento o volume foi completado, a mistura foi homogeneizada e filtrada.

As amostras e as soluções padrões foram colocadas em vials e levadas ao cromatógrafo onde foram injetados separadamente 20 μL de cada. Os cromatogramas foram registrados e suas áreas medidas pelos picos obtidos.

O teor de captopril e dissulfeto de captopril presentes nas amostras foram calculados em relação aos valores obtidos das soluções padrões de captopril e dissulfeto de captopril, os quais apresentam valores de especificação de no mínimo 90% e no máximo 110 % para o captopril e para o dissulfeto de captopril o limite máximo é de 3 % segundo a Farmacopeia Brasileira 4ª edição^[15].

4.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o pacote quimiométrico The Unscrambler X[®] para o pré-tratamento espectral, a detecção de amostras anômalas, seleção de faixas espectrais mais informativas (Jackknifing) e construção dos modelos PLS.

O algoritmo SPXY foi utilizado para a seleção das amostras de calibração e o algoritmo MVC1 para a validação do método, ambos foram escritos em ambiente MATLAB R2010a[®].

Capítulo 5

Resultados e Discussões

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1- Parâmetros físico-químicos de qualidade

Na **Tabela 1** estão presentes as especificações para o comprimido de captopril segundo a monografia do produto pela Farmacopeia Brasileira 4ª edição. Diante dessas especificações observamos que os comprimidos apresentaram-se dentro dos parâmetros de qualidade no que se refere aos ensaios realizados no tempo “0” (**Tabela 2**), ou seja, antes de se iniciar a degradação acelerada.

Para os comprimidos analisados no tempo de 184 dias (com e sem blister), alguns desses parâmetros como o teor de dissulfeto de captopril e a dureza dos comprimidos SB, apresentaram-se fora das especificações, conforme mostrado na **Tabela 2**, o que já era previsível devido à degradação forçada que eles foram submetidos. O calor e a umidade excessiva, fatores que elevam a degradação desse produto, foram os responsáveis pela elevação do teor do seu produto de degradação^[7,10]. Já a umidade excessiva tornou os comprimidos que ficaram fora do blister (SB) mais friáveis, justificando a sua baixa dureza.

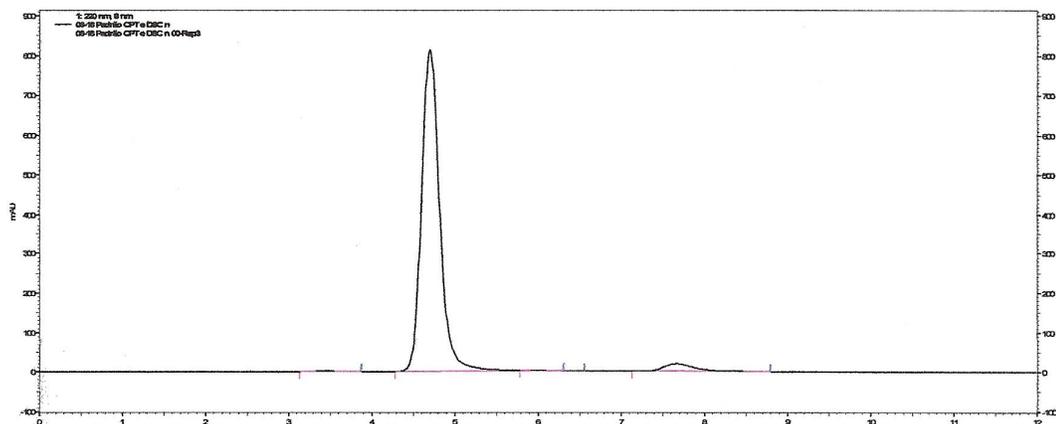
Tabela 1: Especificações dos ensaios de qualidade segundo a Farmacopeia Brasileira

Ensaio	Especificação segunda a Farmacopeia 4ª Edição
Teor de captopril (%)	90 a 110
Teor de DSC (%)	≤ a 3
Peso médio (mg)	150 mg ± 7,5%
Dureza (Kgf)	≥ de 3,0
Friabilidade (%)	≤ 1,5%
Desintegração (minutos)	≤10
Uniformidade de dose unitária	85 a 115% (DPR = 6%)
Dissolução	80% em 20 minutos (DPR≤10%)

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos de qualidade do lote 10041492 no tempo 0 e 184 dias, SB (Sem Blister) e CB (Com Blister).

Ensaio	Parâmetros Físico-Químicos de Qualidade Obtidos nos Ensaios		
	0	Tempo (dias)	
		SB	CB
Teor de captopril (%) [*]	96,50	92,43	93,27
Teor de DSC (%) [*]	0,53	4,84	2,23
Peso médio (mg)	151,5	150,1	149,2
Dureza (Kgf)	9,00	2,46	6,08
Friabilidade (%)	0,2899	0,9938	0,3170
Desintegração (minutos)	4:00	1:30	2:40
Uniformidade de dose unitária (%)	103,17 (DPR=3,2)	100,60 (DPR= 1,8)	98,96 (DPR= 2,4)
Dissolução (%)	99,79 (DPR= 6,6)	98,67 (DPR=0,85)	99,90 (DPR=0,21)

Além do seu produto de degradação, algumas impurezas como a L-prolina, ácido 3-mercaptopropanoico e ácido 3-acetilpropanoico e impurezas comuns, tais como resíduos de ignição e metais pesados, podem ser encontradas no perfil de impurezas do captopril^[39]. A **Figura** traz o cromatograma das substâncias químicas de referência captopril e dissulfeto de captopril, onde podemos observar a detecção de outras impurezas com seus respectivos picos de absorção.



Pico	Nome	Tempo de retenção	Área	Área (%)	Altura	Altura (%)
1		3,418	24865	0,191	1932	0,232
2	Captopril	4,694	12475058	95,957	809246	97,339
3		5,952	8115	0,062	649	0,078
4	Dissulfeto de captopril	7,661	492668	3,790	19539	2,350
Total			13000707	100,000	831367	100,000

Figura 5: Cromatograma do captopril e dissulfeto de captopril

5.2 Metodologia NIR

5.2.1 Pré-tratamento espectral

Cada linha das matrizes de calibração e previsão representa a média dos espectros de 10 comprimidos. Este procedimento foi feito para aumentar a representatividade de cada espectro no conjunto de dados, já que cada espectro representa 10 comprimidos e a variabilidade contida no processo de produção.

Uma etapa importante antes de se iniciar a construção dos modelos de calibração multivariada é a análise dos espectros. A **Figura 6** mostra os espectros registrados em toda a faixa espectral do NIR, sem que estes fossem submetidos a nenhum pré-tratamento. Podemos notar que os espectros apresentam, em algumas regiões, ruídos espectrais que podem prejudicar a modelagem e, portanto devem ser eliminados. Deste modo, a região de 14000 a 10354 cm^{-1} , destacada, foi excluída e a região de 10353 a 3800 cm^{-1} foi selecionada como faixa espectral de trabalho.

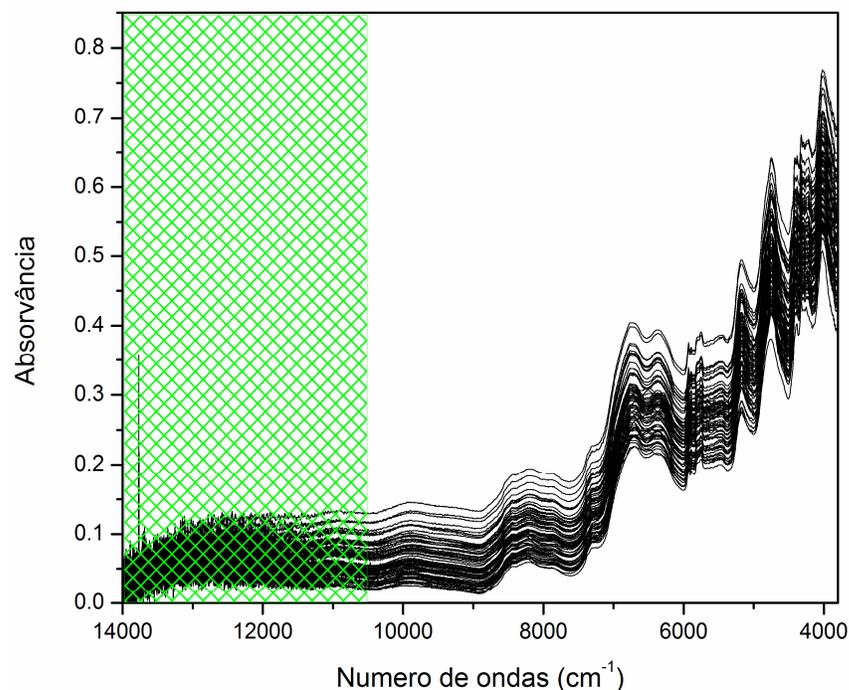


Figura 6: Espectros NIR de refletância difusa sem pré-tratamento mostrando a área destacada excluída da faixa espectral de trabalho

Para isso vários pré-tratamentos espectrais, como exemplo suavização e derivação, foram testados. Outros pré-tratamentos destinados a eliminar espalhamento de sinal e outros efeitos indesejados também foram avaliados (por exemplo: derivação, SNV, MSC, correção de linha de base). Dentre eles o que se apresentou melhor resultado, ou seja, aquele com menor valor de RMSEP, foi a segunda derivada utilizando o algoritmo Savitzky-Golay com janela de 41 pontos e polinômio de segunda ordem, mostrado na **Figura 7**.

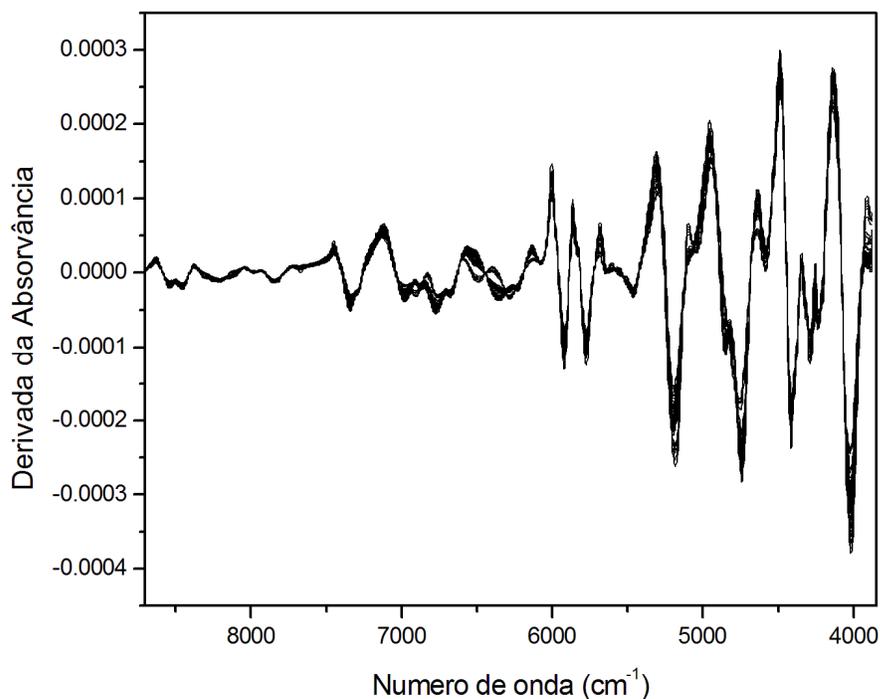


Figura 7: Segunda derivada dos espectros NIR utilizando o algoritmo Savitzky-Golay com janela de 41 pontos e polinômio de segunda ordem.

5.2.2 Seleção de amostras de calibração

Outra etapa importante na construção dos modelos quimiométricos é a seleção de um conjunto de amostras representativas do processo em estudo. Neste trabalho, a seleção dos conjuntos de calibração e previsão foi feita utilizando-se o algoritmo SPXY^[37]. Este algoritmo seleciona as amostras com maior distância nos espaços X e y para compor o conjunto de calibração e as amostras com menor distância para compor o conjunto de previsão.

5.3 Construção e validação dos modelos de calibração

Com os resultados do pré-tratamento espectral, foi realizado a construção dos modelos de regressão. Neste trabalho foi utilizada a regressão em mínimos quadrados parciais utilizando o pacote quimiométrico The Unscrambler X[®].

A modelagem inicial foi feita utilizando os 48 espectros dos comprimidos degradados e não-degradados e toda a faixa espectral de trabalho. Um estudo de

influência foi realizado e 06 amostras anômalas foram detectadas e excluídas do conjunto de calibração. Para melhorar o desempenho dos modelos de calibração foi feito um teste de significância das variáveis espectrais, o qual acessa a estabilidade do modelo de regressão. Este teste é realizado durante a validação cruzada e é baseado no princípio de Jackknifing^[40] que retira da modelagem as variáveis espectrais menos informativas. Deste modo, o número de variáveis espectrais utilizadas diminuiu de 1260 para 166. A **Figura 8** mostra as variáveis utilizadas (•) na construção do modelo após a aplicação do teste de significância.

Uma atribuição de bandas foi feita para as variáveis selecionadas no teste de significância (**Figura 8**). Como pode-se observar foram escolhidas variáveis espectrais nas regiões do primeiro sobretom (b) e do segundo sobretom (a) e também das combinações (c). O primeiro sobretom de SH está bem caracterizado na região de 5050 cm^{-1} . A mais importante região de combinações de CH ($6666\text{--}7690\text{ cm}^{-1}$), combinação de CH metil (4395 cm^{-1}), combinação de COC (4210 cm^{-1}), segundo sobretom de CH ($8264\text{--}8696\text{ cm}^{-1}$) e a região de combinação do estiramento C-H e COH também foram selecionadas^[41].

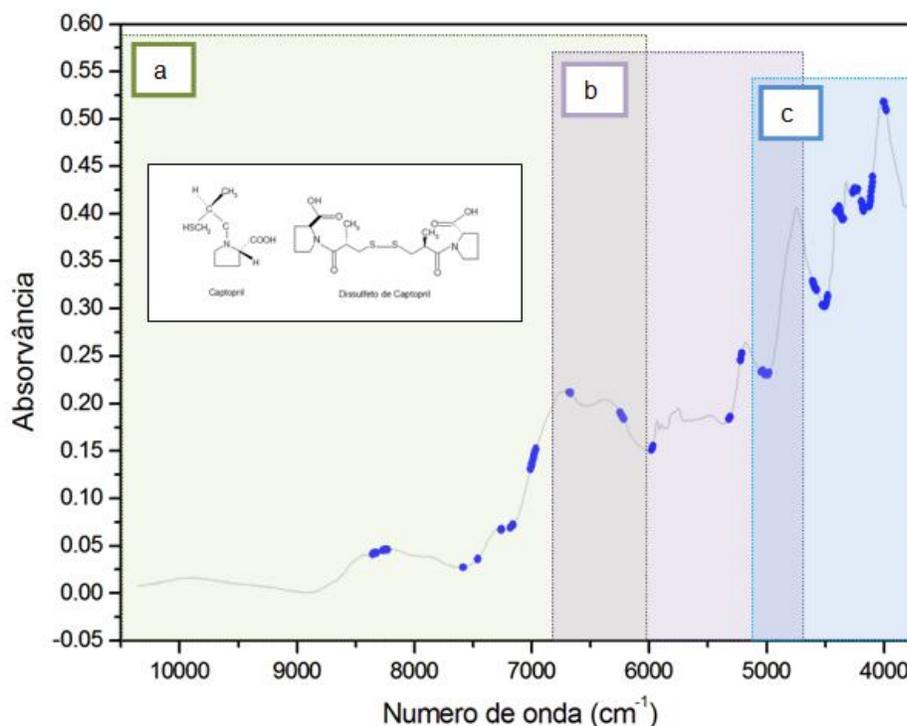


Figura 8: Variáveis selecionadas (•) no teste de significância (Jackknifing).

Este procedimento é realizado para simplificar o modelo e torná-lo mais confiável. De fato, como podemos observar na **Tabela 3** ao construir o modelo retirando as variáveis espectrais que não trazem informação e perturbam o modelo, os valores de RMSEC e RMSECV ficam mais próximos mostrando que o modelo se torna mais coerente. O número de variáveis latentes (VL) também diminuiu deixando o modelo mais parcimonioso.

Tabela 3: Comparação entre modelos construídos com todas as variáveis espectrais e com aquelas selecionadas com base no princípio Jackknifing.

	RMSEC	RMSECV	n _{var} **	VL***
PLS	0,0693 (0,9496)*	0,1084 (0,8819)*	1260	7
Jackknifing-PLS	0,0496 (0,9734)*	0,0671 (0,9536)*	166	5

* Coeficiente de correlação (R^2)

** Número de variáveis espectrais utilizadas para a construção do modelo

*** Número de variáveis latentes utilizadas para a construção do modelo de calibração.

A escolha do número ideal de fatores para a construção do modelo foi feita por validação cruzada completa (full crossvalidation).

Para que uma metodologia analítica possa ser usada deve-se comprovar que a mesma é exata, reprodutível e robusta na faixa de concentrações que o analito está sendo avaliado. Esta avaliação atesta a conformidade da metodologia desenvolvida com as exigências legais e, geralmente, é feita pela avaliação de parâmetros chamados figuras de mérito. A validação de uma metodologia NIR é conceitualmente diferente daquela realizada para as técnicas convencionais, como as descritas em farmacopeias^[15,39,42] e resoluções específicas como a RE 899^[43], e é feita através de parâmetros quimiométricos. Esses parâmetros podem ser relacionados às características de validação fundamentais que são requeridas para qualquer método analítico.

Muitas figuras de mérito (como por exemplo sensibilidade, seletividade e limite de detecção) têm seu cálculo estritamente ligado ao conceito de sinal analítico líquido (Net Analyte Signal – NAS)^[44,45]. Alguns trabalhos científicos têm sido desenvolvidos e enfocam a determinação de figuras de mérito em calibração multivariada. O NAS do analito de interesse é a fração do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos outros compostos presentes na amostra^[46]. Para calibração multivariada a seletividade indica a parte do sinal total que não é perdida devido a sobreposição espectral. A sensibilidade mede as mudanças na resposta como

função do analito^[47,48]. A **Tabela 4** mostra as figuras de mérito obtidas baseada no NAS para o modelo construído para quantificação de dissulfeto de captopril em comprimidos.

Neste trabalho as figuras de mérito foram calculadas utilizando o algoritmo MVC1 desenvolvido por Olivier et al^[46]. O pacote MVC1 calcula importantes figuras de mérito que podem ser usadas para avaliar a qualidade dos modelos desenvolvidos.

A raiz quadrada do erro médio de calibração (RMSEC), da validação cruzada (RMSECV) e da previsão (RMSEP) foram parâmetros utilizados para avaliar a qualidade dos modelos construídos e estão listados na **Tabela 4**. Esses parâmetros podem ser utilizados para avaliar a confiabilidade da metodologia multivariada desenvolvida.

Em metodologias univariadas a precisão é dada pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV%), como descrito na Equação 14.

$$\text{RSD ou CV\%} = \frac{S}{\text{CMD}} \quad \text{Eq. 14}$$

Onde: S é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

Normalmente os métodos desenvolvidos para determinações de quantidades macro requerem um RSD de 1 a 2%. No entanto para metodologias desenvolvidas para análises de traços ou impurezas são aceitos RSD até 20%^[49,50].

Em metodologias multivariadas o RMSE é uma estimativa do desvio padrão do valor previsto. Deste modo a equação 15 pode ser escrita como:

$$\text{RSD} = \frac{\text{RMSE}}{\text{CMD}} \quad \text{Eq. 15}$$

De acordo com a **Tabela 4**, a etapa de previsão obteve um RSD de 13,72%. O que mostra juntamente aos demais parâmetros de validação, que a metodologia proposta é precisa e reprodutível para o analito em questão na faixa de concentrações estudada.

Tabela 4: Figuras de mérito obtidas para o modelo desenvolvido.

n_{cal}	42
VL	5
Intervalo de concentração (mg)	0,1125 – 1,2100
Intercepto**	0,0118 ± 0,028***
Inclinação**	0,9730 ± 0,052***
RMSEC (mg)	0,0496
R^2	0,9734
RMSECV (mg)	0,0671
n_{pred}	20
RMSEP (mg)	0,0750
Sensibilidade	9,0578x10 ⁻⁵
Seletividade	3,1721x10 ⁻¹

n_{cal} e n_{pred} são o número de amostras de calibração e previsão, respectivamente.

** Valores de referência versus valores de previsão do conjunto de calibração utilizando validação cruzada (intervalo de confiança ± 95%)

*** intervalo de confiança.

O método desenvolvido foi validado com base na RE nº 899^[43] e de acordo com os guias ICH e IUPAC^[47,45]. Assim, foram avaliados os seguintes parâmetros: precisão, repetibilidade e robustez. A **Tabela 5** mostra os parâmetros de validação para o método desenvolvido.

Tabela 5: Parâmetros de validação para o método desenvolvido (n = números de lotes).

	n	20
	Erro médio*	-0,0006
Exatidão	D.P**	0,0770
	t_{exp}	0,9742
	t_{crit}	2,0930
Repetibilidade (n=10)	Média NIR *	0,2081
	RSD%	12,44
	n	20
Robustez	t_{exp}	0,9958
	t_{crit}	2,0244

* Em relação ao valor de referência

** Desvio Padrão

A exatidão foi avaliada para amostras de 20 lotes distintos produzidos pelo LAFEPE. Para isso, a diferença média entre os valores obtidos usando espectroscopia NIR e o método de referência e também o desvio padrão foram calculados. Um teste-t emparelhado foi aplicado a um nível de 95% de confiança.

A repetibilidade foi avaliada calculando a média e o desvio padrão relativo para os valores obtidos para 10 amostras de um mesmo lote da produção.

A robustez da metodologia foi avaliada utilizando amostras de 20 lotes diferentes. Um teste-t, com um nível de 95% de confiança, foi empregado para comparar os valores obtidos usando NIR e o método de referência.

O modelo desenvolvido e validado foi utilizado para prever a concentração de dissulfeto de captopril em amostras de 20 lotes distintos produzidos pelo LAFEPE. A **Figura 9** mostra o gráfico das concentrações medidas pelo método de referência versus a concentração prevista pelo modelo para as amostras de calibração (●) e de previsão (●).

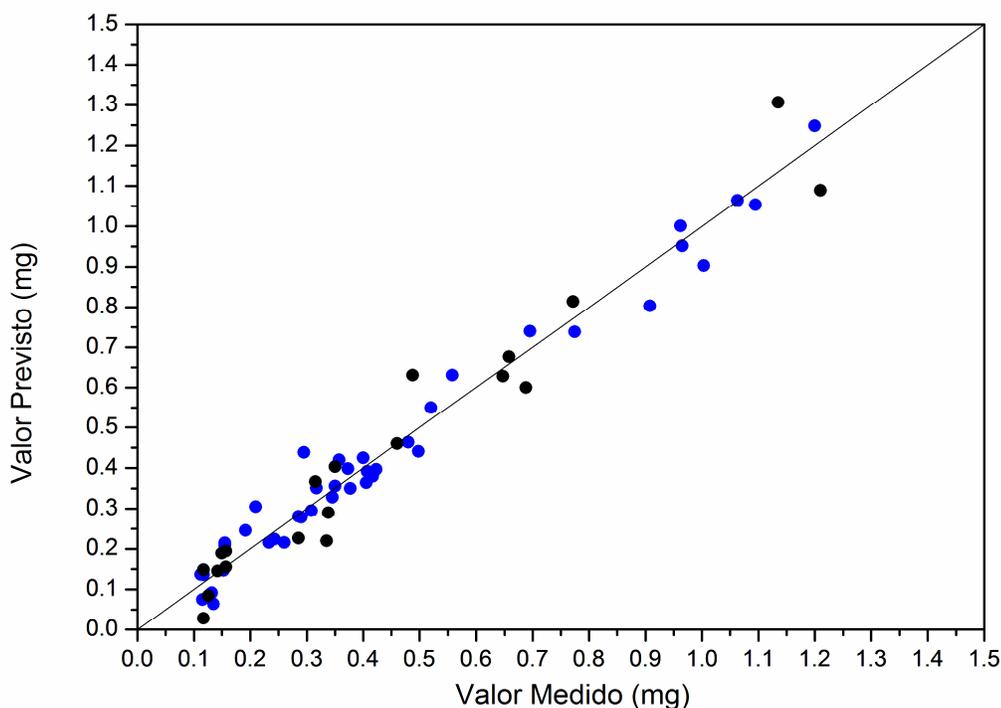


Figura 9: Gráfico do valor medido pelo método de referência (CLAE) versus a concentração prevista de DSC pelo método NIR

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A espectroscopia no infravermelho próximo mostrou-se uma ferramenta adequada para a quantificação do dissulfeto de captopril em comprimidos. A metodologia desenvolvida foi validada de acordo com a legislação vigente (RE nº 899) e os guias ICH e IUPAC e obteve resultados comparáveis a metodologia referência (CLAE). O RMSEP obtido na etapa de previsão foi de 0,0750 mg, que corresponde a um RSD de 13,72%. Este valor está dentro dos limites de RSD requeridos para determinação de traços ou impurezas (20%).

No entanto, para que se possam obter bons modelos de calibração existem etapas cruciais como: a escolha de um conjunto representativo de amostras, a escolha do pré-tratamento espectral e a exclusão de amostras anômalas do conjunto de calibração. A seleção de variáveis utilizando o princípio Jackknifing produz modelos mais confiáveis e parcimoniosos, pois elimina variáveis não informativas que trazem perturbação ao modelo.

De acordo com os resultados obtidos e os parâmetros de validação, a metodologia desenvolvida mostrou-se uma alternativa bastante viável para uso em análises de rotina, pois é exata, precisa e robusta. Além de suas características inerentes como: ser não-destrutiva, rápida, não utilizar reagentes químicos prejudiciais ao meio ambiente. As metodologias NIR possuem a grande vantagem de serem de fácil manutenção quando o modelo já está calibrado e validado, necessitando apenas de um monitoramento periódico para checar os seus resultados em relação ao método referência. Além disso, caso haja alguma mudança no processo de produção, o modelo pode ser facilmente atualizado para atender às mudanças empregadas, pela inserção de espectros de novas amostras no conjunto de calibração, sem que traga prejuízo a robustez e precisão do modelos desenvolvido.

Perspectivas

PERSPECTIVAS FUTURAS

Como propostas para a continuidade deste trabalho, pretende-se:

- Aplicar o algoritmo das projeções sucessivas (APS) para a seleção das variáveis espectrais mais importantes e testar o desempenho da regressão linear múltipla (MLR) para a construção de modelos de calibração multivariada.
- Desenvolver metodologias NIR de reconhecimento de padrões para a identificação de comprimidos de captopril com teor de dissulfeto de captopril acima do permitido pela agência reguladora (ANVISA).
- Aplicar metodologias baseadas na espectroscopia NIR por imagem para verificação da distribuição do dissulfeto de captopril em comprimidos.

Referências

REFERÊNCIAS

- [1] RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**, 4ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2001.
- [2] MINNEMAN, K.; WECKER, L.; LARNER, J.; BRODY, T. M. **Brody - farmacologia humana**, 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2006.
- [3] PASSOS, V. M. A.; ASSIS, T. D.; BARRETO, S. M. Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional, **Epidemiologia e Serviço da Saúde**, v.15, n.1, jan/mar, p.35-45, 2006.
- [4] GYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**, 10ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002.
- [5] PULGARÍN, J. A. M.; BERMEJO, L. F. G.; LÓPEZ, P. F. Sensitive determination of captopril by time-resolved chemiluminescence using the stopped-flow analysis based on potassium permanganate oxidation, **Analytica Chimica Acta**, 546, p. 60-67, 2005.
- [6] GAO, L., WU, L., LI, Q., Catalysis reaction between sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate and hydroxyl ion using captopril as catalyzer and determination of captopril, **Analytica Chimica Acta**, 626, p. 174-179, 2008.
- [7] LAMIM, R. **Quitosana e n-carboximetilquitosana: desenvolvimento e biofilmes para aplicações farmacêuticas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.
- [8] GENNARO, A. R. **Remington A ciência e a prática da farmácia**, 20ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- [9] LOURENÇÃO, B. C., MARCOLINO-JUNIOR, L. H., FATIBELLO-FILHO, O. Determinação condutométrica de captopril em formulações farmacêuticas utilizando sulfato de cobre (II) como titulante, **Química Nova**, v.31, n.2, p. 349-

352, 2008.

- [10] STULZER, H. K., SILVA, M. A. S. Estudo de estabilidade de grânulos revestidos e comprimidos contendo captopril, **Acta Farmacêutica Bonaerense**, 25, p.497-504, 2006.
- [11] BAZZO, G. C., SILVA, M. A. S. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 315-322, jul./set., 2005.
- [12] PEIXOTO, M. M., SANTOS JÚNIOR, A. F., SANTOS, C. A. A., CAETITÉ JÚNIOR, E. Avaliação da qualidade de comprimidos de captopril dispensados em Feira de Santana – BA, **Revista Pharmacia Brasileira**, ano IX, n.47, mar/abr/mai, p.69-73, 2005.
- [13] MARCOLINO JÚNIOR, L. H. **Eletrodos voltamétricos e amperométricos para a determinação de espécies de interesse farmacêutico**. 2007. 138f. Tese (Doutorado em Ciências)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- [14] NÓBREGA, I. M. F. **Desenvolvimento farmacotécnico e estudo de estabilidade de comprimidos à base de captopril**. 2006. 58f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- [15] FARMACOPEIA **Brasileira**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.
- [16] VALENTINI, S. R., SOMMER, W. A., MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos na quantificação de comprimidos de Captopril - comparação de metodologias para um programa de garantia de qualidade, **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v.26, n.2, p. 357-364, 2004.

- [17] RAHMAN, N., SINGH, M., HODA, M. N. Validation of simultaneous volumetric and spectrophotometric methods for the determination of captopril in pharmaceutical formulations, **II Farmaco**, 60, p. 569-574, 2005.
- [18] ROGGO, Y., CHALUS, P., MAURER, L., LEMA-MARTINEZ, C., EDMOND, A., JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical, **Technologies Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 44, p. 683-700, 2007.
- [19] PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamental, practical aspects and analytical applications, **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 14, n.2, p.198-203, 2003.
- [20] SIMÕES, S. S. **Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIRR e calibração multivariada**. 2008. 83p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- [21] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. São Paulo: Bookman, 2002.
- [22] VALDERRAMA, P. **Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo**. 2005. 128p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- [23] SCAFI, S. H. **Espectroscopia no infravermelho próximo para identificação de medicamentos falsificados**. 2000. 124p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- [24] SOUZA, J. S.; FERRÃO, M. F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio.

- Parte I: dosagem por regressão multivariada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.3, p.437-445, 2006.
- [25] FERRÃO, M. F.; FURTADO, J. C.; NEUMANN, L. G.; KONZEN, P. H. A.; MORGANO, M. A. BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M. M. C. Técnica não destrutiva de análise de tanino em café empregando espectroscopia no infravermelho e algoritmo genético, **Tecno-log. Santa Cruz do Sul**, v.7, n.1., p.9-26, 2003.
- [26] SABIN, J. G.; FERRÃO, M. F.; FURTADO, J. C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n.3, p.387-396, 2004.
- [27] KUBELKA, P.; MUNK, F.; **Zeit. Tech. Physik.** 12:593, 1931.
- [28] SIESLER, H. W.; OZAKI, Y.; KAWATA, S.; HEISE, M. **Near-Infrared Spectroscopy**, Germany: WILEY-VCH, 2002.
- [29] BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B., **Chemometrics: A practical guide**, Wiley-Interscience, New York, 1998.
- [30] FERREIRA, M. M. C., ANTUNES, A. M., MELGO, M. S., VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial, **Química Nova**, v.22, n.5, p. 724-731, 1999.
- [31] LAVINE, B. K. Chemometrics, **Analytical Chemistry**, 72, p.91-97, 2000.
- [32] BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil **Química Nova**, v.29, n.6, p.1401-1406, 2006.
- [33] BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

- [34] CORREIA, P. R. M., FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando Procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos, **Química Nova**, v. 30, n2, p.481-487, 2007.
- [35] BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, v.125, p.2125-2154, 2000.
- [36] OLIVEIRA, F. C.; SOUZA, A. T. P. C.; DIAS, J. A. DIAS, S. C. L.; RUBIM, J. C. A escolha da faixa espectral no uso combinado de métodos espectroscópicos e quimiométricos, **Química Nova**, v.27, n.2, p.218-225, 2004.
- [37] GALVÃO, R. K. H., ARAUJO, M. C. U., JOSE, G. E., PONTES, M. J, C., SILVA, E. C., SALDANHA, T. C. B., A method for calibration and validation subset partitioning. **Talanta**, 67,p.736-740, 2005.
- [38] BRASIL. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 ago. 2005.
- [39] UNITED STATES PHARMACOPEIA. 26th ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, Inc. 2003.
- [40] CHIOQUOINE, B., HJALMARSSON, E., Jackknifing stock return predictions. **Journal of Empirical Finance**, 16, p.793-803, 2009.
- [41] WOLKMAN JR., J., WEYER, L. **Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy**. CRC Press, 2008.
- [42] **BRITISH** Pharmacopoeia 1998, CD-ROM, Version 2.0.
- [43] BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 jun. 2003.

- [44] LORBER, A.; Error propagation and figures of merit for quantification by solving matrix equations, **Analytical Chemistry**, 58, 1167, 1986.
- [45] OLIVIERE, A. C.; FABER, N. M.; FERRÉ, J.; BOQUÉ, R.; KALIVAS, J. H.; MARK. H.; Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration; **Pure Appl. Chem.**, 78:663, 2006.
- [46] OLIVIERI, A. C., GOICOECHEA, H. C., IÑÓN, F. A. MVC1: an integrated MatLab toolbox for first-order multivariate calibration. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 73, p.189-197, 2004.
- [47] ICH Guidelines: Q2(R1) **Text on Validation of Analytical Procedures**; at <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf> accessed May 2009.
- [48] BLANCO, M., CUEVA-MESTANZA, R., PEGUERO, A. Controlling individual steps in the production process of paracetamol tablets by use of NIR spectroscopy **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v.51, Issue 4, p.797-804, 2010.
- [49] RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, H. C., JARDIM, I. C. S. F., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
- [50] HUBER, L., Validation of analytical methods: review and strategy. **LC-GC International**, Feb., p.96-105, 1998.



**Methodology based on near infrared spectroscopy for
determination of the degradation product of captopril in
tablets**

Journal:	<i>Journal of Pharmaceutical Sciences</i>
Manuscript ID:	11-270
Wiley - Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	16-Mar-2011
Complete List of Authors:	Simões, Simone; UFPE, DEQ de Souza, Julia; UFPE, Departamento de Ciências Farmacêuticas de Albuquerque, Miracy; UFPE, Departamento de Ciências Farmacêuticas Pimentel, Maria Fernanda; UFPE, Departamento de Engenharia Química Grangeiro Junior, Severino; UFPE, Departamento de Ciências Farmacêuticas de Santana, Davi; UFPE, Departamento de Ciências Farmacêuticas
Keywords:	Chemometrics, Degradation products, Multivariate analysis, Near- infrared spectroscopy, Partial least squares, Solid dosage form

SCHOLARONE™
Manuscripts