



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**DETERMINAÇÃO DA DISSOLUÇÃO EM COMPRIMIDOS UTILIZADOS
PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PULMONAR EMPREGANDO A
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E MÉTODOS DE
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

Ana Carolina de Oliveira Neves

Orientador: Prof. Dr. Kássio Michell Gomes de Lima

Natal – RN

2010

Ana Carolina de Oliveira Neves

**DETERMINAÇÃO DA DISSOLUÇÃO EM COMPRIMIDOS UTILIZADOS
PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PULMONAR EMPREGANDO A
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E MÉTODOS DE
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

Monografia apresentada junto ao curso de Química Bacharelado da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito obrigatório à obtenção do título de bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Kássio Michell Gomes de Lima

Natal – RN

2010

Aos responsáveis pelo que há de bom em mim. Especialmente minha mãe, Conceição, e meu pai, Gladson, por todo apoio, confiança e paciência.

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

- Tendo em vista que esse trabalho representa a concretização de uma longa caminhada, e que durante este processo muitos foram os obstáculos e imprevistos ocorridos, devo agradecer primeira e sinceramente a Deus, por ter me mantido firme, me fortalecido e me dado paciência e sabedoria para continuar.
- E especialmente,
- Aos meus pais Maria da Conceição Tavares e Gladson de Vasconcelos Neves, como também ao meu irmão Flávio Henrique Neves. Por todo amor, atenção, compreensão, apoio, alegria, carinho e força nas horas mais difíceis. A vida torna-se muito mais valiosa quando estamos cercados por aqueles que amamos.
- A todos os outros integrantes de minha família, e carinhosamente aos meus avós.
- Aos meus amigos verdadeiros por aceitarem as minhas prioridades, e à minha amiga especial e grande companheira de estudos, Aline Marques, que sempre esteve ao meu lado.
- Ao professor e orientador Prof. Dr. Kássio Michell Gomes de Lima, por toda a sua atenção constante, apoio, cobrança, conhecimento e, antes de tudo, pela confiança que me foi depositada.
- Aos companheiros de trabalho Fernanda Saadna, Gustavo Mesquita e Stéphanie Cavalcante, pela dedicação e compromisso sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho. Além da amizade construída e dos momentos de descontração. Adoro vocês.
- A Dayanne e Marcelo, pela colaboração de ambos durante o período em que estive realizando análises no NUPLAM.
- A Universidade Federal do Rio Grande do Norte, ao Departamento de Química, ao NEPPGN e ao NUPLAM.

CURRICULUM VITAE

Ana Carolina de Oliveira Neves

E-mail: carolinaneves00@hotmail.com

Curriculo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9435525521723320>

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2007 - 2010 Graduação em QUÍMICA.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil

Título: BACHARELADO

Orientador: Prof. Dr. Kássio Michell Gomes de Lima

Bolsista: Iniciação Tecnológica (CNPq)

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2010 - 2010 Curso de curta duração de Inovações Tecnológicas Aplicadas às Indústrias Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil.

2010 - 2010 Curso de curta duração em Elucidação Estrutural de Compostos Orgânicos Através da Análise de Espectros de IV e RMN 1H. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil

2010 - 2010 Extensão universitária em OLIMPÍADAS DE QUÍMICA. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

2007 - 2007 Curso de curta duração em Polímeros Utilizados na Indústria de Petróleo. Universidade Federal do Rio

Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil.

BOLSA OBTIDA

10/2010 – 12/2010 Iniciação Tecnológica (CNPq)

02/2010 – 09/2010 Iniciação Científica (REUNI)

05/2009 – 01/2010 Monitoria (PROGRAD)

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Neves, A.C.O.; Soares, G.M.; Morais, S.C.; Costa, F.S.L.; Porto, D.L.; Lima, K.M.G.; Prediction of dissolution profile of tablets for tuberculosis using NIR spectroscopy and multivariate calibration; 15th Internacional Conference on Near Infrared Spectroscopy, 2011, Cidade do Cabo, África do Sul. (submetido)

Muniz, C. A. S.; Dantas, T. N. C.; Moura, E. F.; Fernandes, J. E. A.; Soares, A. P. J.; Neves, A. C. O.; Pimentel, V. C.; Obtenção de lubrificantes a partir de óleos naftênicos (NH-20) utilizando uma metodologia experimental; XLVII Congresso Brasileiro de Química, 2007, Natal, Brasil.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Neves, A.C.O.; Soares, G.M.; Morais, S.C.; Costa, F.S.L.; Porto, D.L.; Lima, K.M.G.; Prediction of dissolution profile of tablets for tuberculosis using NIR spectroscopy and multivariate calibration; *Anal. Chim. Acta.* **2010** (em fase de submissão).

*A vida é uma pedra de amolar:
desgasta-nos ou afia-nos, conforme o
material de que somos feitos.*

(George Bernard Shaw)

RESUMO

Este trabalho utilizou a espectroscopia NIR e calibração multivariada para determinar o perfil de dissolução de quatro princípios ativos (isoniazida, rifampicina, etambutol, pirazinamida), em comprimidos para o tratamento da tuberculose pulmonar, produzidos pela UFRN. Os métodos analíticos utilizados convencionalmente em controle de qualidade (perfil de dissolução) de medicamentos pela indústria farmacêutica são principalmente cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Estes métodos são lentos, destrutivos e invasivos, tem um alto custo de operação. Espectros NIR de reflectância (em triplicata) de 38 amostras foram medidos com um espectrofotômetro FT-NIR Bomem MB 160 na faixa 800-2500 nm. Cada espectro medido foi a média de 50 varreduras, obtidos por reflectância difusa. O teste de dissolução foi realizado em 900 mL de ácido clorídrico 0,1 N sob $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, e a porcentagem de dissolução do fármaco a partir de cada comprimido foi medida no mesmo intervalo de tempo (45 min), em pH 6,8. A medição dos fármacos foi realizada por HPLC (Shimadzu - Japão) e um sistema isocrático LC-20AT, SPD-m20A, detector de absorvância duplo, amostrador automático SIL-20A. A influência de vários pré-tratamentos espectrais (suavização Savitzky Golay, MSC, D1, D2, separadamente e combinados) e métodos de regressão (PLS1 e PLS2, calculados usando Unscrambler 9.1) sob erros de predição são comparados. O R^2 para os perfis de dissolução de equipamentos laboratoriais versus os valores preditos (NIR) variaram de 0,88 a 0,98. Erros de previsão (RMSEP) utilizando modelos PLS2, variaram entre 9,99 para isoniazida; 8,63 para rifampicina; 8,57 para etambutol e 9,97 pirazinamida, indicando que o método NIR é uma ferramenta alternativa e não-destrutiva para medições da dissolução de fármacos em comprimidos.

Palavras-Chaves: NIR; PLS; Dissolução; Tuberculose.

ABSTRACT

This work used NIR spectroscopy and multivariate calibration to determine dissolution profile of four active principles (isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamide) in tablets for treatment of pulmonary tuberculosis produced by UFRN. The analytical methods used conventionally in quality control (dissolution profile) of drugs by the pharmaceutical industry are mainly high-performance liquid chromatography (HPLC). These methods are slow, destructive and invasive, have a high cost operation. NIR reflectance spectra (in triplicate) of 38 samples were measured using an FT-NIR Bomem MB 160 spectrophotometer in the 800-2500 nm range. Each measured spectra was the average of 50 scans, obtained diffuse reflectance. The dissolution test was performed in 900 mL chloride acid 0,1 N at $37 \pm 0,5$ °C, and the percentage of drug dissolution from each tablet was measurement at same time interval (45 min), at pH 6.8. For the measurement the drugs were performed HPLC (shimadzu – Japan) and an isocratic system LC-20AT, SPD-m20A, dual absorbance detector, SIL-20A, auto sampler. The influence of various spectral pre-treatment (Savitzky Golay Smoothing, MSC, D1, D2 separately and combined] and regression methods (PLS1 and PLS2, using Unscrambler 9.1) on prediction error are compared. The squared correlation coefficients for the plots of dissolution from equipment laboratory versus the predicted values (NIR), varied from 0.88 to 0.98. Prediction errors (RMSEP) use PLS2 models, which varied between 9.99 for isoniazid, 8.63 for rifampicin, 8.57 for ethambutol and 9.97 pyrazinamide. These results indicating that the NIR diffuse reflectance spectroscopy method is an alternative, nondestructive tool for measurement of drug dissolution tablets.

Key-words: NIR, PLS; Dissolution; Tuberculosis.

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
PREFÁCIO	01
1. INTRODUÇÃO	02
1.1. A TUBERCULOSE	02
1.2. RESISTÊNCIA E COMPLICAÇÕES	03
1.3. FÁRMACOS E TRATAMENTO	04
1.4. NUPLAM	09
1.5. MÉTODOS ANALÍTICOS CLÁSSICOS PARA ANÁLISE DOS FÁRMACOS RIFAMPICINA, PIRAZINAMIDA, ISONIAZIDA E ETAMBUTOL	10
1.5.1. Estudo da dissolução	10
1.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência	11
1.6. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO	14

1.7.	MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS	18
2.	OBJETIVOS	24
3.	EXPERIMENTAL	24
3.1.	REAGENTES E SOLUÇÕES	24
3.2.	INSTRUMENTAÇÃO	24
3.3.	COMPOSIÇÃO DOS COMPRIMIDOS	25
3.4.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	26
3.4.1.	Obtenção dos espectros NIR	26
3.4.2.	Método de referência	26
3.4.2.1.	Preparação da solução tampão fosfato	26
3.4.2.2.	Preparação das fases móveis para CLAE	26
3.4.2.3.	Dissolução	27
3.4.2.4.	CLAE	27
3.5.	CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	27
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.	CONCLUSÃO	39

6.	PERSPECTIVAS FUTURAS	40
7.	REFERÊNCIAS	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	<i>Síndrome da imunodeficiência adquirida (acquired immunodeficiency syndrome)</i>
APC	Análise de componentes principais
BCG	Bacilo <i>Calmette-Guérin</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DFC	Dose fixas combinadas
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
FUNAM	Fundação Universitária do Alimento e do Medicamento
LAFAPI	Laboratório Farmacêutico de Produção Industrial
MSC	Correção multiplicativa de espalhamento de luz (<i>multiplicative scatter correction</i>)
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NEPPGN	Núcleo de Estudos e Pesquisas em Petróleo e Gás Natural
NIQUIFAR	Núcleo Industrial Químico Farmacêutico

NIR	Infravermelho próximo (<i>near infrared</i>)
NUPLAM	Núcleo de Pesquisa em Alimentos e Medicamentos
OMS	Organização mundial de saúde (<i>world health organization</i>)
PCR	Componente principal de regressão (<i>principal component regression</i>)
PLS	Mínimos quadrados parciais (<i>partial least squares</i>)
R ²	Coeficiente de correlação
RMSEC	Erro quadrático médio de calibração
REMSEP	Erro quadrático médio de previsão
RNA	Ácido ribonucléico (<i>ribonucleic acid</i>)
RP	Reconhecimento de padrões
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose Multirresistente confirmada
TB-XDR	Tuberculose extensivamente resistente
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>

LISTA DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1	Estruturas moleculares dos fármacos A) Rifampicina, B) Pirazinamida, C) Etambutol e D) Isoniazida.	04
Figura 2	Visão esquemática do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência: A) soluções, B) coluna cromatográfica, C) injetor, D) Computador para aquisição dos dados.	12
Figura 3	Representação esquemática do modelo harmônico (A) e do modelo não-harmônico (B) para a energia potencial de uma molécula diatômica.	15
Figura 4	Espectrofotômetro NIR modelo MB 160 D (Bomem).	16
Figura 5	Análise de Componentes Principais.	20
Figura 6	Cromatograma (CLAE) referente a isoniazida, rifampicina e pirazinamida.	30
Figura 7	Cromatograma (CLAE) referente ao etambutol.	30
Figura 8	Espectro NIR original de uma amostra de comprimido 4 em 1.	31
Figura 9	Espectros originais das 38 amostras de comprimidos 4 em 1.	32

Figura 10	Espectros derivativos originais de 38 amostras de comprimidos 4 em 1 depois de submetidos a pré-tratamentos de suavização, MSC e derivatização.	33
Figura 11	Análise dos Componentes Principais para as 38 amostras de comprimidos 4 em 1: ● Calibração; ▲ Validação; ▼ Previsão	34
Figura 12	Gráfico da variância explicada versus número de componentes principais.	35
Figura 13	Gráficos dos modelos de calibração, ilustrando a correlação entre os modelos obtidos por CLAE e NIR: A) isoniazida; B) rifampicina; C) pirazinamida; D) etambutol	37

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1 Resultados obtidos para modelos de calibração e previsão.	38

PREFÁCIO

Atualmente é evidenciada uma crescente busca por melhorias no controle de qualidade dos produtos fabricados pelas indústrias em geral, como exemplo a farmacêutica, agrícola, de cosméticos, alimentícia e etc. As chamadas técnicas de referência mais empregadas, tais como as cromatografias gasosa e líquida, ressonância nuclear magnética, espectrometria de massa, são custosas, exigem alto consumo de reagentes, pessoal especializado e como um dos maiores inconvenientes, são destrutivas, impossibilitando a reutilização da amostra após a análise, apesar de serem muito eficientes e fornecerem ótimos resultados, confiáveis e precisos.

Tendo em vista estes aspectos, torna-se notória a necessidade de técnicas alternativas que minimizem as desvantagens encontradas nos métodos de referência. A utilização da espectroscopia de infravermelho próximo tem atuado grandemente nesse sentido, nas últimas décadas. Entretanto, deve-se ser mencionada a dificuldade apresentada pela técnica: os dados obtidos são altamente sobrepostos. Sendo assim, a quimiometria assume papel importante aliada à espectroscopia de infravermelho próximo para utilização deste método nas mais diversas áreas da química.

Este trabalho visa à utilização do infravermelho próximo e quimiometria no controle de qualidade de comprimidos utilizados no tratamento de tuberculose pulmonar, com o objetivo de diminuir as desvantagens oferecidas pela atual técnica de referência empregada para análise dos mesmos.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A TUBERCULOSE

A tuberculose (TB), antigamente chamada de *peste cinzenta*, é uma doença altamente contagiosa. Existem casos relatados por médicos na Grécia e Roma antiga e até mesmo no Egito antigo onde foram encontradas lesões em múmias. O cientista alemão Robert Koch foi o responsável pelo isolamento da *Mycobacterium tuberculosis* (MBT), ou também chamada bacilo de Koch, a bactéria causadora da doença [1].

A TB é um dos mais importantes problemas de saúde mundial [2,3,9,15]. Devido ao seu fácil contágio, basicamente através do ar, e ao fato de a doença poder atingir todos os órgãos do corpo, apesar de o bacilo reproduzir-se e desenvolver-se mais rapidamente em áreas com alta concentração de oxigênio, explicando o ataque mais freqüente aos pulmões.

Nos últimos anos, morrem de TB cerca de 2 milhões de pessoas por ano, em todo o mundo, e a cada ano surgem de 9 a 10 milhões de novos casos [6,7]. Os dados estatísticos referentes à doença apresentam-se maiores, até mesmo, que o número de mortes de adultos portadores de AIDS (do inglês, “acquired immunodeficiency syndrome”) e pessoas em geral portadoras de malária e outras doenças tropicais. Existem estimativas de que 30% dos indivíduos em todo o mundo estejam infectados pelo MBT, e essa taxa ainda torna-se bem mais alarmante em países pobres, chegando a 70% da população [1].

Em países em desenvolvimento, existe um grande aumento no número de casos, devido a diferentes razões, onde uma das principais é a imigração de pessoas vindas de áreas endêmicas, fenômeno também responsável pelo aumento das formas mais complicadas e resistentes da TB. Até o ano de 2004, o Brasil ocupava o 13º lugar no ranking dos 22 países que concentram 80% dos casos de TB no mundo [2,3].

1.2 RESISTÊNCIA E COMPLICAÇÕES

Mesmo com a existência de tratamentos eficazes e as medidas de profilaxia contra a TB, como a vacina BCG (*Bacilo Calmette-Guérin*), a doença não deixa de ser um grave problema de saúde mundial, e o número de pessoas infectadas não para de crescer [3].

A doença tem maior incidência em países em desenvolvimento devido a sérios fatores como a pobreza, a falta de recursos sanitários e o aumento de pessoas portadoras de AIDS e doenças crônicas. Por sua vez, o fluxo de pessoas vindas de diversos países com alto número de casos também contribui para a rápida disseminação da doença [2,3]. Devido a estas condições, as pessoas tornam-se mais propensas a contraírem TB e não realizarem o tratamento da forma correta, não eliminando completamente o bacilo do sistema imunológico do hospedeiro, que além de favorecer o contágio da doença às pessoas saudáveis, fortalece o desenvolvimento de cepas resistentes aos fármacos antituberculostáticos, estimadas em 500.000 casos anuais de TB [3,10].

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelece, segundo o nível de resistência da cepa aos fármacos, que os pacientes classificam-se em [3]:

i) Monorresistência confirmada: Esse tipo compreende pacientes com TB, cujo isolamento do MBT se confirme resistente *in vitro* a um dos fármacos antituberculostáticos de primeira linha: isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol e estreptomina.

ii) Polirresistência confirmada: Pacientes com TB cujos isolamentos do MBT se confirmem resistentes *in vitro* a mais de um fármaco antituberculostático de primeira linha, diferente da associação de isoniazida e rifampicina.

iii) Tuberculose Multirresistente confirmada, TB-MDR, (do inglês, “mult drug resistant”): Pacientes com TB cujos isolamentos do MTB se confirmem resistentes *in vitro* pelo menos a isoniazida e rifampicina.

iv) Paciente com TB-XDR (do inglês, “extremely drug resistant”): Pacientes com TB-MDR que apresentam, além da resistência a isoniazida e

rifampicina, resistência também a qualquer fluoroquinolona e ao menos a um dos três fármacos de segunda linha: amicacina, canamicina ou capreomicina.

1.3 FÁRMACOS E TRATAMENTO

No ano de 1944, o pesquisador Selman Waksman descobriu a estreptomicina, o primeiro antibiótico com atuação eficaz contra a TB. Posteriormente, novos fármacos passaram a ser utilizados com bastante sucesso no tratamento da doença. Destacam-se a isoniazida (1952), rifampicina (1965), pirazinamida (sintetizada em 1936, mas utilizada somente em 1970) e o etambutol (1960), conforme Figura 1[1].

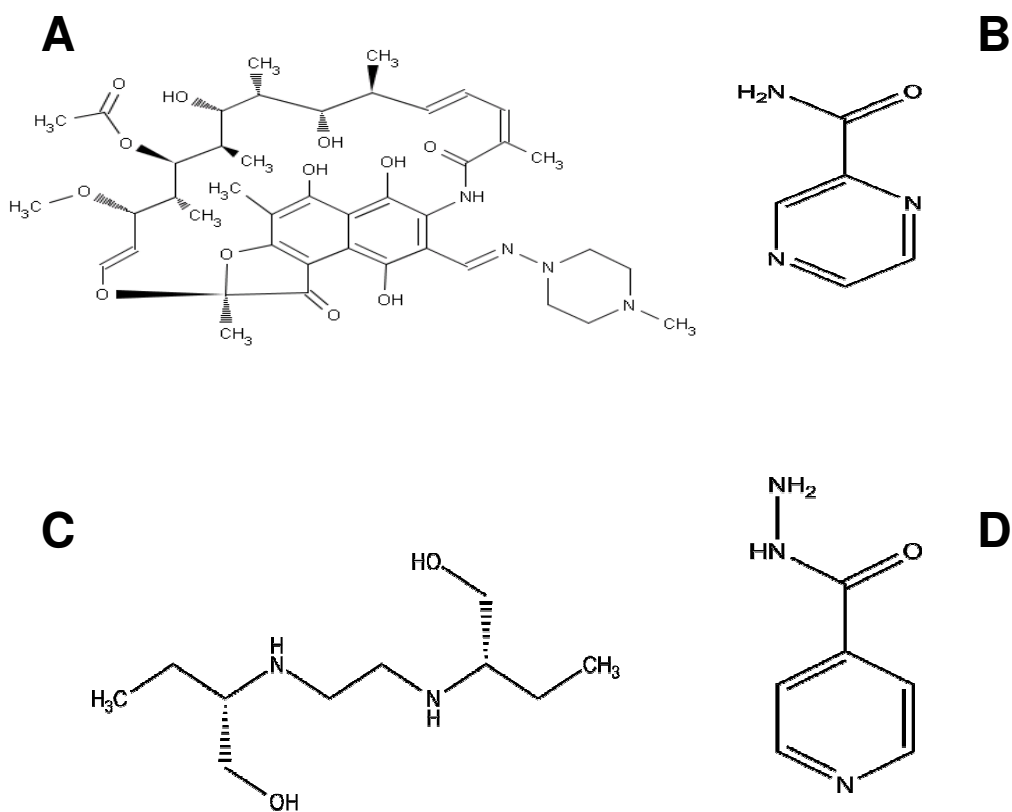


Figura 1: Estruturas moleculares dos fármacos A) Rifampicina, B) Pirazinamida, C) Etambutol e D) Isoniazida.

A seguir serão apresentadas as propriedades farmacopéicas mais relevantes dos fármacos ilustrados na figura acima.

i) Isoniazida (Hidrazida do ácido isonicotínico): É um fármaco com alta ação seletiva contra a *Mycobacterium*, capaz de se difundir em células de mamíferos para chegar a microorganismos intracelulares. É ativamente acumulada pelos bacilos da TB e, após sua conversão a um metabólito ativo, interfere com a síntese de ácido micólico e, portanto, a síntese da parede celular. Se é usada na ausência de qualquer outro fármaco antituberculostático, rapidamente causa resistência. A isoniazida é bem absorvida pelo trato gastrointestinal e amplamente distribuída pelo organismo [5]. Neurite periférica é o efeito adverso mais comum ao uso da droga [10].

ii) Rifampicina (3-[4-metilpiperaziniliminometil]-rifamicina SV): É um antibiótico que exerce ação antibacteriana através da inibição da polimerase do RNA (do inglês, “ribonucleic acid”) dependente do DNA (do inglês, “desoxyribonucleic acid”) mas não afeta a enzima homóloga nos núcleos das células de mamíferos. O fármaco entra nas células fagocíticas e por isso é ativo contra microorganismos intracelulares. No entanto, a resistência à rifampicina pode desenvolver-se rapidamente através da produção de polimerase alterada do RNA (do inglês, “ribonucleic acid”) dependente do DNA [5]. Devido a sua ação contra os bacilos que se multiplicam vagarosa e periodicamente [11], a rifampicina é indispensável ao tratamento contra tuberculose [8]. Reações adversas, tóxicas (principalmente gastrointestinais e hepáticas) ou imunológicas são relatadas em até 20% dos pacientes que consomem a droga [10].

iii) Pirazinamida (Pirazina-2-carboxamida): É uma pirazina sintética análoga à nicotinamida [10]. É relativamente específica ao bacilo, interferindo com o gene que codifica a síntese do ácido graxo da bactéria, causando interrupção da síntese da parede celular bacteriana. Tem melhor ação sob pH ligeiramente ácido, o que é favorecido devido às condições onde reside o bacilo. A droga também é eficaz contra os bacilos dormentes que não são afetados por outros fármacos antituberculostáticos, devido a sua capacidade de eliminar as bactérias persistentes [8]. A resistência ao fármaco desenvolve-se

rapidamente quando o mesmo é utilizado na ausência de outros componentes tuberculostáticos [5]. A pirazinamida é responsável por muitas das reações adversas causadas por fármacos antituberculostáticos [11], sendo elas principalmente tóxicas e podendo afetar vários sistemas e órgãos, como fígado, articulações, sistema gastrointestinal ou causar anorexia, reações cutâneas, febre isolada e hipersensibilidade [10].

iv) Etambutol ((2S,2'S)-2,2'-(etano-1,2-diilbis(azanodiil))dibutan-1-ol): O fármaco tem efeito relativamente específico contra as micobactérias, e depois de um período de 24 horas após sua administração, começa a fazer efeito contra o bacilo. Ocorre uma interferência com a atividade das enzimas transferase arabinosil, que estão diretamente envolvidas na síntese da parede celular [5]. É importante ressaltar que o (S,S)-etambutol é o isômero utilizado em fármacos, uma vez que o (R,R)-etambutol causa cegueira [1]. Se usado separadamente a outros fármacos antituberculostáticos, desenvolve-se rapidamente resistência à droga. A substância é bem absorvida através do trato gastrointestinal, e principalmente excretada na urina. Diminuição da acuidade visual e redução da capacidade de diferenciação entre vermelho e verde são alguns dos efeitos indesejados, mas de natureza reversível, decorrentes da ingestão do fármaco [5]. A reação adversa mais comum relacionada a medicamentos que contém etambutol é a toxicidade ocular. Febre, dispnéia, reações alérgicas na pele, infiltrações pulmonares, neuropatia, insuficiência renal aguda e choque anafilático são efeitos raramente causados pela ingestão da droga [3,10,14].

A OMS sugere que o tratamento da TB, incluindo os tipos mais complicados e de resistência a fármacos, deve-se realizar com base em uma terapia que consiste na associação de vários fármacos. O tratamento divide-se basicamente em duas etapas. A primeira corresponde à fase inicial intensiva, onde deve ser administrada pelo paciente uma associação de 3 a 4 fármacos antituberculostáticos, durante um período de 2 meses. A segunda etapa compreende a fase de continuação, onde a associação de dois fármacos antituberculostáticos deve ser administrada pelo paciente, durante os próximos 4 meses seguintes ao cumprimento da primeira fase. Em ambas as etapas, a

ingestão dos fármacos deve-se realizar apenas uma vez ao dia, preferencialmente durante o período da manhã. [6,8,10]. Seguindo essa linha, o tratamento visto como o padrão, também de acordo com a OMS, é a administração de isoniazida e rifampicina (devido aos seus grandes potenciais bactericidas) junto à pirazinamida (por sua atividade intracelular) acompanhadas ou não por um quarto fármaco, que poderia ser etambutol ou estreptomicina, todos empregados conjuntamente na primeira etapa. Já a segunda fase do tratamento, consistiria apenas da associação de isoniazida e rifampicina [7,11].

No que diz respeito aos tipos de TB resistente a fármacos, o tratamento padrão deve ser realizado inicialmente quando é feito o diagnóstico da tuberculose pulmonar, e quando for confirmado o tipo de resistência que a doença apresenta, deve-se seguir o tratamento excluindo a(s) droga(s) que o bacilo não apresenta sensibilidade [11], e para seguir o número correto de fármacos que devem ser conjuntamente empregados segundo o tratamento padrão, recorre-se às drogas de segunda linha. Entretanto, o uso destes medicamentos só deve ser feito quando se torna indispensável tendo o conhecimento prévio de que os mesmos são sempre menos eficientes quando comparados aos de primeira linha, além de apresentarem mais frequentemente reações adversas e efeitos secundários [3].

Embora o tratamento padrão seja nomeado como uma terapia de curto prazo, para os pacientes é difícil seguir o regime do tratamento corretamente, com conformidade, principalmente devido ao grande número de comprimidos que devem ser consumidos durante toda a terapia. E, certamente, o seguimento não-ideal do tratamento leva a sua falha e diminuição do seu potencial de cura. Surgiu, então, a idéia de dose fixas combinadas, DFC, (do inglês, “fixed dose combinations”) que corresponde à combinação de dois ou mais fármacos antituberculostáticos de primeira linha em uma única formulação. O emprego de DFC no tratamento beneficia grandemente sua eficácia contra a TB por fatores como a garantia das quantidades corretas de cada fármaco necessário, juntos em uma única formulação, reduzindo erros de medicação, além de reduzir os custos do tratamento e o risco do

desenvolvimento de estirpes resistentes aos medicamentos. Logo, os DFC assumem um papel significativo na luta contra a TB [6,10].

Entretanto, apesar de todas as vantagens dos DFC, uma baixa estimativa de casos notificados de TB (em torno de 24%) foi tratada com duas ou três drogas associadas em DFC [9]. A OMS recomenda o uso dos DFC tão somente quando a qualidade dos mesmos é assegurada [6]. Os maiores problemas associados com a qualidade dos DFC são a perda da biodisponibilidade da rifampicina sob administração e a instabilidade dos fármacos dentro do ambiente da formulação. Em ambos os casos, o problema pode ser atribuído à decomposição da rifampicina na presença de isoniazida formando isonicotinil-hidrazona [8,9,12,15].

Bhutani e colaboradores (2005) realizaram um estudo que comprovou a ação catalítica da pirazinamida e do etambutol (principalmente, devido ao seu alto caráter higroscópico) através da transferência de próton intra-molecular durante a reação entre isoniazida e rifampicina que ocorre através de um processo de formação de base catalisada de trans-hidrazona envolvendo um mecanismo tetraédrico, em DFC antituberculostáticos [15].

Outro estudo também foi realizado por Panchagnula e colaboradores (2004) visando analisar a bioequivalência da rifampicina quando contida em formulações farmacêuticas e a influência de fatores intrínsecos e extrínsecos na absorção da droga, e concluiu que os fatores extrínsecos ocorridos durante a realização do estudo, tais como volume e temperatura da água dada junto com a formulação aos pacientes, tipo e tempo de refeições, gênero e idade dos voluntários, tipo da população em estudo, dentre outros, são aqueles que afetam a absorção do fármaco pelo paciente [12]. Mais alguns estudos realizados por Panchagnula e colaboradores (2001, 2004) analisam as taxas de bioequivalência da rifampicina como também da isoniazida e pirazinamida quando juntas em um DFC contendo quatro drogas, comparando com formulações individuais de cada fármaco. As conclusões obtidas foram de que todos os parâmetros farmacocinéticos calculados em doses fixas e separadas

foram equivalentes, assegurando a bioequivalência dos fármacos em ambas as formulações [6,9].

Singh e colaboradores (2002), desenvolveram um estudo submetendo DFC antituberculostáticos à condições aceleradas de temperatura e umidade para identificar o comportamento de absorção de umidade dos fármacos e excipientes. O estudo concluiu que o etambutol, devido ao seu alto caráter higroscópico, é o responsável pelo aumento de peso das formulações devido às absorções de umidade, e que o aumento do número de drogas combinadas em uma única formulação leva a uma diminuição do ganho de peso [13].

1.4 NUPLAM

Segundo informações apresentadas no sitio oficial, o Nuplam foi originário do Laboratório Farmacêutico de Produção Industrial (LAFAPI), o Núcleo Industrial Químico Farmacêutico (NIQUIFAR) foi criado em 1972, como órgão suplementar da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Vinculado à Faculdade de Farmácia desde então, integrou o sistema de Laboratórios Oficiais do Brasil produtores de medicamentos para o Ministério da Saúde. Através da Resolução nº 49/77 CONSUNI, de 1º de Novembro de 1977, o NIQUIFAR tornou-se fundação, passando a se chamar Fundação Universitária do Alimento e do Medicamento (FUNAM). Com a Portaria nº 567/91-R, de 30 de Abril de 1991, foi extinta a FUNAM e criado o Núcleo de Pesquisa em Alimentos e Medicamentos (NUPLAM), que passou a integrar a estrutura orgânica da UFRN como órgão suplementar Vinculado à Reitoria [44]

Desde 1999 o NUPLAM disponibiliza a sua linha própria de medicamentos básicos para órgãos públicos de assistência farmacêutica vinculadas ao Sistema Único de Saúde de todos os estados do Brasil. A partir de 2003, o NUPLAM e a Faculdade de Farmácia reiniciam sua parceria estabelecendo projetos inovadores em que o ensino, a pesquisa e a extensão estejam indissociados.

Mesmo já produzindo a formulação 4 em 1 para o tratamento da tuberculose, o medicamento atualmente não se encontra disponível para

comercialização visto que os seus testes de controle de qualidade ainda estão sendo realizados, visando garantir a eficácia do produto.

1.5 MÉTODOS ANALÍTICOS CLÁSSICOS PARA ANÁLISE DOS FÁRMACOS RIFAMPICINA, PIRAZINAMIDA, ISONIAZIDA E ETAMBUTOL

1.5.1 Estudo da Dissolução

Um dos métodos mais utilizados para análise dos fármacos é o estudo do perfil de dissolução, como forma de avaliar a liberação dos fármacos, pois a dissolução do princípio ativo de formas farmacêuticas sólidas é considerada uma variável determinante no processo de absorção no trato gastrointestinal [15].

Dissolução é um processo dinâmico, fortemente dependente tanto da composição do meio quanto das condições hidrodinâmicas. Como o ambiente luminal do trato gastrointestinal varia consideravelmente, é necessária a utilização de diversas variáveis para se chegar a um quadro completo do comportamento do fármaco a partir de versões do seu princípio ativo.

Os procedimentos para a dissolução variam de acordo com o número de princípios ativos nas formulações. E são todos descritos pela USP (do inglês, “United States Pharmacopeia”). A USP 24 (2000) apresentava métodos oficiais apenas para rifampicina cápsula e isoniazida e rifampicina cápsula, onde o meio de dissolução foi de 0,1 mol L⁻¹ HCl. Os procedimentos para três fármacos DFC tornou-se oficial no Suplemento 2 da USP 24, mas esta monografia não especificou as condições de dissolução, que só foram adicionadas na USP 25 (2002). Finalmente, DFC com os quatro fármacos tornou-se oficial na USP 26 (2003) [16].

Agrawal e colaboradores (2004) desenvolveram um estudo para avaliar a qualidade das formulações contendo rifampicina em dose fixa, através de estudos de dissolução. Onde todos os procedimentos relacionados foram baseados nas instruções da USP-2003, amostras de 5 mL foram coletadas nos intervalos de tempo de 10, 20, 30 e 45 min, diluídas com o meio e analisadas

imediatamente por calorimetria, num comprimento de onda de 475 nm, sem interferência de outras drogas antituberculostáticas. Os resultados mostraram que o pH influenciava na taxa de dissolução e solubilidade, os testes foram feitos simulando o pH de todo o trato gastrointestinal. O comportamento anômalo da rifampicina foi atribuído à interação iônica do sulfato de sódio do meio, com os excipientes ácidos, formando um complexo que não se dissolve em pH baixo, justificando os grânulos insolúveis observados durante a dissolução em meio ácido. Conclui-se que a aplicação de propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas possibilitam a predição da taxa e extensão de liberação da rifampicina em relação aos valores de teste *in vitro* [16].

1.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Diferentes estudos, tais como ensaios de dissolução, fazem uso da técnica CLAE, para quantificação de fármacos, conforme regulamentado pela farmacopéia (USP e Brasileira). Atualmente, o emprego de métodos CLAE, conforme mostrado na Figura 2, nos estudos de dissolução vem aumentando, uma vez que a dissolução *in vitro* do princípio ativo é um importante parâmetro para as indústrias farmacêuticas em diferentes estágios das etapas de desenvolvimento e produção de um medicamento.

O interesse pelo desenvolvimento de métodos analíticos rápidos e que forneçam parâmetros apropriados para análises quantitativas de fármacos, tem se intensificado. Tais métodos são importantes para análises de rotina durante o controle de qualidade e também no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas [17].

A técnica submete as amostras juntamente com a fase móvel, que é eluída a grandes pressões, a colunas preenchidas com materiais especialmente preparados para cada tipo de amostra. Tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade.

O processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. Na cromatografia líquida a fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, a qual é atravessada pela fase móvel. São as forças físicas e químicas que atuam entre os solutos e as duas fases são responsáveis pela retenção dos solutos sobre a coluna cromatográfica. A diferença na magnitude dessas forças que determina a resolução e, portanto a separação dos solutos individuais [18].

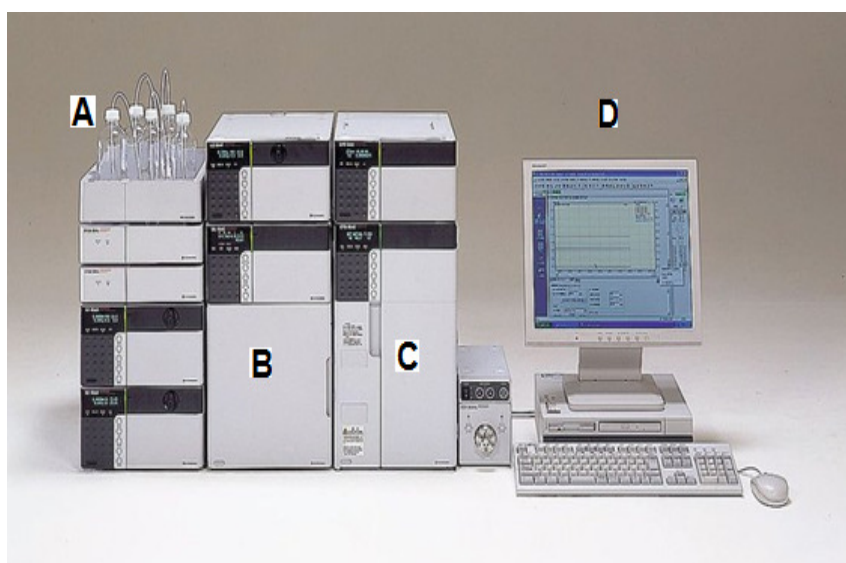


Figura 2: visão esquemática do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência: A) soluções, B) coluna cromatográfica, C) injetor, D) Computador para aquisição dos dados.

Agrawal e colaboradores (2004) desenvolveram um estudo que visava a comparação da biodisponibilidade de rifampicina, isoniazida e pirazinamida em formulações de DFC, com os valores obtidos para formulações separadas de doses de mesmos níveis. A bioequivalência da rifampicina foi estimada por análises de amostras retiradas do plasma e da urina, coletados de 22 voluntários saudáveis do sexo masculino, de acordo com o protocolo da ONU. Amostras de sangue de cerca de 3 ml foram coletadas no intervalo de 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 horas após a ingestão do fármaco, enquanto que as de urina no intervalo de 0-4h e 4-8h. A análise foi feita através de CLAE, utilizando formulações DFC de três marcas diferentes e comparando com as formulações separadas de outros seis fabricantes. Os resultados obtiveram a

bioequivalência da rifampicina, isoniazida e pirazinamida, tanto na forma separada, quanto na forma de DFC, de forma precisa e confiável [19].

A técnica CLAE de fase reversa foi utilizada por Panchagnula e colaboradores (1999) para determinar rifampicina e seu principal metabolismo no plasma e na urina, em presença de pirazinamida e isoniazida. O trabalho teve como objetivo desenvolver um método sensível e simples para determinar simultaneamente rifampicina e desacetil rifampicina em fluídos biológicos, pois existem muitos relatos na literatura de estimações quantitativas de rifampicina, através da técnica CLAE, porém que apresentam como desvantagens, a lentidão do método, necessidade de grandes volumes de amostra, gasto excessivo de reagentes e até mesmo, requerem às vezes, uma composição de fase móvel bastante complexa. Como resultado, observou-se que o método de fase reversa discutido é simples, sensível e com grande reprodutibilidade para análises de rifampicina e desacetil rifampicina em amostras de plasma e urina. O método é capaz de fazer estimações seletivas, além de necessitar de um volume bem menor de amostras e simplicidade nos procedimentos de extração, bem como uma fase móvel de simples preparo [20].

Khuhawar e colaboradores (2002) utilizaram a técnica CLAE, para determinação de rifampicina, isoniazida e pirazinamida em formulações farmacêuticas e no sangue, coletados de pacientes que sofrem de tuberculose e se submeteram ao tratamento quimioterápico com esses três fármacos. Os resultados foram satisfatórios e a separação dos três fármacos foi obtida. Os aditivos comuns presentes, bem como as demais drogas não interferiram na determinação. O método mostrou-se de aplicação viável para a quantificação destas espécies a partir de sangue [21].

Os exemplos citados comprovam a eficácia do método CLAE, devido a sua grande precisão e exatidão nas análises, reprodutibilidade de resultados, entre outras vantagens. Porém, esta é uma técnica que tem um custo alto, pois requer uso de muitos reagentes para o preparo das amostras. O tempo é outra variável desfavorável, pois, em geral, as leituras, tanto das amostras quanto do padrão, são feitas em triplicata, dependendo do material analisado pode

demorar alguns minutos, cada leitura. O preparo das soluções utilizadas na análise também torna o método demorado. Além disso, necessita de pessoas especializadas para manusear o equipamento e fazer a interpretação dos resultados. Por todos estes motivos, a busca por novas técnicas analíticas que tornem as análises mais rápidas e com menor custo tem se intensificado, devido a sua importância fundamental no controle de qualidade dos processos de produção.

1.6 ESPECTROSCOPIA NIR

A região do infravermelho próximo (NIR, do inglês, “near infrared”) situa-se entre as faixas acima do visível e abaixo do infravermelho médio, e o comprimento de onda varia no intervalo de 780 a 2500 nm. O espectro NIR é formado a partir dos sinais devido às vibrações moleculares das ligações C-H, N-H e O-H [22]. Para a luz NIR ser absorvida, sua energia deve ser alta o suficiente para produzir transições vibracionais nas moléculas, ou seja, sua energia deve ser exatamente a mesma que a frequência de vibração fundamental para a molécula específica e a molécula deve sofrer uma mudança em seu momento de dipolo em virtude da sua vibração fundamental [23]. Para a vibração ser ativa, é necessário que o campo de oscilação elétrico da onda eletromagnética (a luz) possa interagir com a molécula. Isso só ocorre se o deslocamento dos átomos em um modo vibracional puder produzir uma mudança no momento dipolar da molécula ou em um grupo local de um átomo vibrante [24].

A intensidade de uma dada banda de absorção é associada com a magnitude da mudança de dipolo durante o deslocamento dos átomos em uma vibração e com o seu decréscimo de não-harmonicidade. Ambos os fenômenos são presentes em grande intensidade associados a ligações envolvendo o átomo de hidrogênio e alguns outros elementos mais pesados como carbono, nitrogênio e enxofre [24].

As técnicas de absorção da espectroscopia NIR podem ser explicadas a partir de modelos de osciladores harmônicos e não-harmônicos. Uma molécula diatômica é considerada como sendo um modelo de oscilador harmônico e sua

freqüência vibracional pode ser determinada a partir da Lei de Hooke, onde os átomos se deslocam da posição de equilíbrio com uma força de deslocamento proporcional. Neste caso, a curva da variação energia potencial com o comprimento da ligação é uma parábola centrada sobre a distância de equilíbrio com níveis de energia de vibração uniformemente espaçados. A restrição adicional imposta pelo modelo quântico harmônico é que as transições só podem ocorrer entre níveis adjacentes. Além disso, para este modelo, a diferença de energia para dois estados vizinhos é sempre a mesma (Figura 3A) [23, 24, 25].

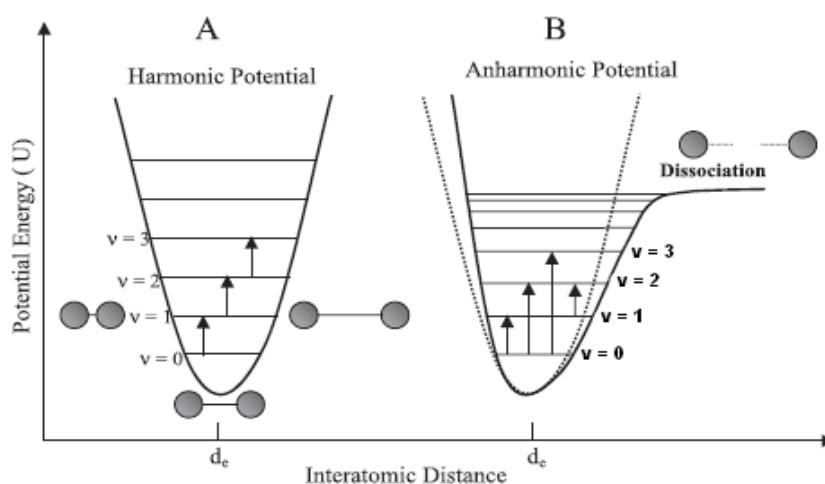


Figura 3: Representação esquemática do modelo harmônico: (A) e do modelo não-harmônico (B) para a energia potencial de uma molécula diatômica [24].

A Figura 3B mostra um modelo mais realista para a mecânica de uma molécula diatômica. O modelo considera alguns comportamentos não ideais do oscilador que correspondem à força de repulsão das nuvens eletrônicas quando os núcleos atômicos se aproximam e ao comportamento variável da força de união quando os átomos se movem separados um do outro. Em uma molécula do modelo não-harmônico, o deslocamento dos núcleos atômicos irá causar a ruptura da ligação da molécula com conseqüente dissociação do átomo [24].

No modelo de oscilador não-harmônico, ao contrário do harmônico, os níveis de energia já não são equidistantes e a regra de transição rigorosa é

expandida para transições de mais de um nível de energia. Além disso, a curva de energia potencial é representada por uma função Morse assimétrica (Figura 3B). Geralmente uma molécula não-linear contendo N átomos terá $3N - 6$ graus de liberdade vibracional, enquanto uma molécula linear terá $3N - 5$. O número de graus de liberdade vibracionais representa o número de frequências de vibração fundamental da molécula [25].

Atualmente, a espectroscopia NIR tem ganhado grande aceitação pela indústria farmacêutica como um método de análises qualitativo, quantitativo e de controle de parâmetros físico-químicos das amostras, fornecendo medições diretas de amostras sólidas a partir de rápidas análises, precisas e com pouca ou nenhuma manipulação da amostra [26].

O uso do novo método espectroscópico trouxe benefícios para as indústrias farmacêuticas, pois dispensa a diluição prévia do analito, economiza tempo aumentando a produtividade e pode determinar diversas propriedades físico-químicas dos fármacos, como, por exemplo, teor, densidade, dureza, dispersão das moléculas, entre outras. Uma das vantagens mais relevantes do método é o caráter não destrutivo da matéria, pois evita etapas importantes responsáveis pela geração de erros e permite a reutilização do comprimido após a medição [27].

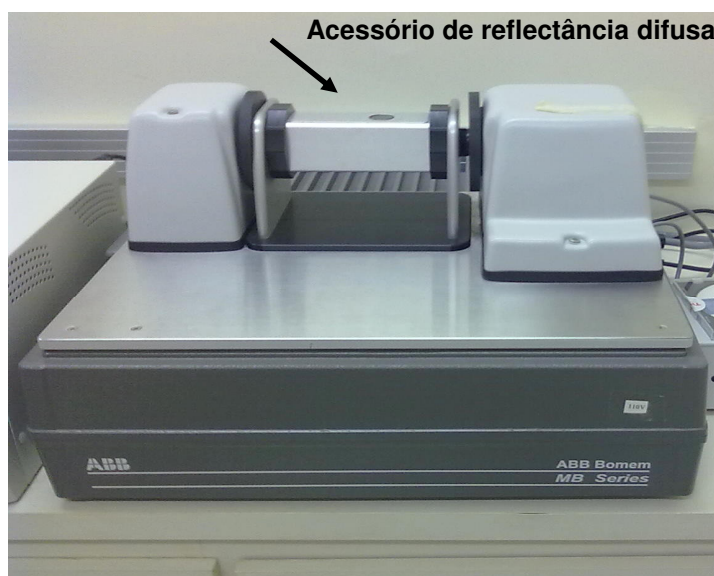


Figura 4: Espectrofotômetro NIR modelo MB 160 D (Bomem).

Todas as indústrias que adotarem esse novo método de análise das amostras devem possuir um acervo com as matrizes e espectros das matérias-primas utilizadas para a produção dos fármacos. Após a medição espectroscópica dos comprimidos, os resultados são comparados com as matrizes originais e os fármacos são identificados e determinados qualitativamente e quantitativamente [27].

Stephen W. Hoag e colaboradores (2009) utilizaram a espectroscopia NIR e modelos de calibração multivariada para prever o comportamento de dissolução da teofilina. Foram utilizadas 117 comprimidos de 5 lotes de diferentes proporções de *Eudragit NE 30D*. Os comprimidos foram lidos por um espectrômetro NIR e, em seguida, suas características de liberação foram investigadas em tampão de acetato por 4 horas. Modelos de calibração foram construídos para liberação percentual de 1, 2, 3 e 4 horas. Para todas as leituras, o erro padrão de calibração foi inferior ao erro padrão de previsão, com isso, os resultados foram considerados um sucesso e mostraram que a espectroscopia NIR, juntamente com os modelos multivariados, foi capaz de diferenciar variações na formulação dos comprimidos e correlacionar perfis de dissolução de cada lote [28].

Weiyong Li e colaboradores (2009) utilizaram o NIR com base na análise de componentes principais (ACP) para prever a uniformidade de conteúdos de comprimidos de baixa dose fabricados por um processo de compressão direta. Espectros NIR de 180 comprimidos de 3 lotes foram usados como conjunto de pseudo-calibração. A correlação foi estabelecida entre valores ACP e um conjunto de valores de referência obtidos por CLAE. As amostras de dois lotes foram preditas pelo modelo de ACP e os resultados foram consistentes com os valores de referência do CLAE. O modelo foi capaz de prever a uniformidade de conteúdo para os comprimidos que foram preparados com diferentes graus de lactose [29].

Apesar de a técnica ser antiga, a espectroscopia NIR só veio a ser utilizada nos últimos anos devido à informatização, pois necessita de alta tecnologia que envolve sofisticadas técnicas de calibração matemática, e

devido ao advento da quimiometria para o tratamento de dados com alta sobreposição de bandas de absorção.

1.7. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

A Quimiometria é uma área da química que usa matemática, estatística e lógica formal: para projetar ou selecionar os melhores procedimentos experimentais, para prever máximas informações químicas relevantes pela análise de dados químicos e obter conhecimento sobre sistemas químicos [30]. Em termos gerais, a quimiometria fornece os meios para transformar dados em previsões. Os dados podem ser na forma de, por exemplo, espectros, cromatogramas, interferogramas, pH, temperatura, pressão, e as previsões derivadas podem ser concentração, a qualidade, a espessura, a classificação, etc. [31]. É ainda capaz de comprimir informações complexas em poucas variáveis, tornando mais fácil a compreensão dos fenômenos observados [32].

Os trabalhos em quimiometria podem ser agrupados em três áreas principais:

- i) Planejamento e Otimização de experimentos;
- ii) Reconhecimento de padrões (métodos de análise exploratória e classificação);
- iii) Calibração Multivariada.

O uso de experimentos estatisticamente planejados cresceu rapidamente com o advento da Quimiometria, em vários campos de pesquisa no Brasil, especialmente Química, Engenharia Química, Engenharia de Alimentos e Medicamentos e Biotecnologia. Dentre esses planejamentos experimentais, os mais usados são os fatoriais, completos ou fracionários, e os planejamentos compostos centrais. Onde é recomendável que esses experimentos sejam executados em ordem aleatória, para se obter uma estimativa confiável da extensão do erro experimental [33].

Os métodos de Reconhecimento de Padrões (RP) podem ser aplicados com diferentes finalidades, entre elas a análise exploratória de dados, a classificação de amostras e a resolução de curvas. A análise exploratória é usada para se tentar detectar padrões de associação no conjunto de dados, a partir dos quais se podem estabelecer relações entre objetos e variáveis, descobrir objetos anômalos ou agrupar objetos. Entretanto, primeiramente deve-se realizar o pré-tratamento dos dados obtidos, visando cálculos computacionais com maior precisão e exatidão em suas respostas. Sendo assim, esta etapa torna-se rotineiramente aplicada aos espectros, precedendo as outras análises. O fato justifica-se baseado na idéia de que existem ruídos nos espectros que dificultam a interpretação dos dados analíticos neles contidos.

Dentre esses pré-tratamentos, está a suavização savitzky-Golay, baseada em regressão polinomial, utilizada para retirar dos espectros a presença de ruídos instrumentais aleatórios. Também se destaca a correção de espalhamento multiplicativo da luz, MSC, utilizada com o fim de corrigir o espalhamento de luz dos espectros obtidos por reflectância difusa. Já para correção da linha de base dos espectros, utiliza-se o cálculo das derivadas.

Dando seguimento, apresenta-se um dos métodos de análise exploratória mais usado: análise por componentes principais, ACP. O principal objetivo de uma ACP é reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, preservando ao mesmo tempo o máximo da informação. Isto é feito calculando-se combinações lineares das variáveis originais. A primeira componente principal, CP1, é a combinação linear de máxima variância (isto é, de máxima informação). A segunda componente, CP2, também é de máxima variância, porém ortogonal a CP1, conforme a Figura 5. A terceira é de máxima variância e ortogonal às duas primeiras CP, e assim por diante. Os métodos de resolução de curvas são métodos quimiométricos utilizados para determinar corretamente os perfis de resposta (perfis espectrais ou de concentrações) de compostos presentes em misturas complexas. Esses métodos pressupõem que a matriz original pode ser representada pelo produto de duas matrizes

menores, uma com o perfil das concentrações e a outra com os espectros puros de cada composto [33].

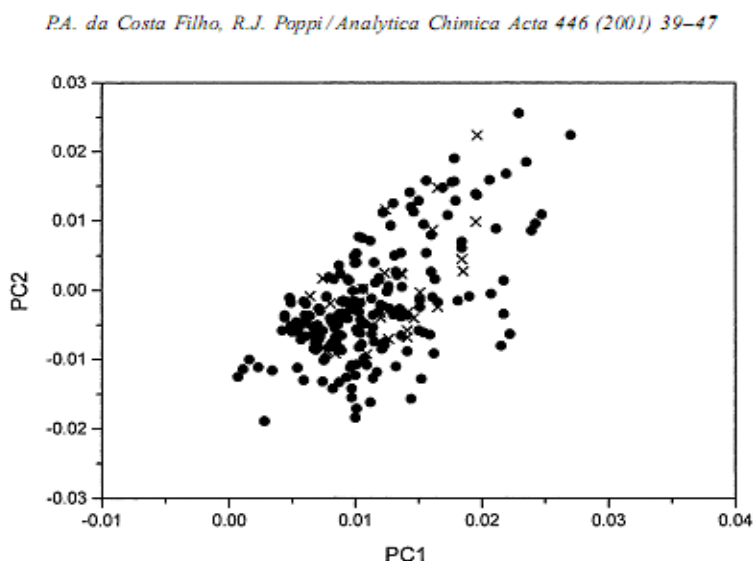


Figura 5: Análise de Componentes Principais.

A calibração multivariada é uma das mais bem sucedidas combinações de métodos estatísticos com dados químicos, tanto na química analítica quanto na química teórica [33]. Esse procedimento tem a finalidade de encontrar um algoritmo matemático que produza propriedades de interesse a partir dos resultados registrados pelo instrumento. Uma vez encontrado, este algoritmo poderá ser usado para prever a concentração do componente químico de interesse em amostras de composição desconhecida, usando a resposta instrumental das mesmas [34]. Para tanto, o conjunto de dados é apresentado em uma matriz, onde as linhas da matriz correspondem ao conjunto de amostras e as colunas, às variáveis medidas. Os métodos mais usados incluem as regressão por componentes principais (PCR, do inglês “Principal Component Regression”) e por quadrados mínimos parciais (PLS, do inglês “Partial Least Squares”), que são análises baseadas na decomposição em componentes principais (ACP), e incluem diferenças de conjuntos de dados que são extremamente semelhantes um ao outro, a redução de ruído, redução de erros sistemáticos e redução da linearidade de dependência perfeita [31].

Métodos esses, mais adequados para a análise de misturas ternárias ou quaternárias de fármacos em medicamentos.

No PLS, a construção do modelo de calibração dispõe os dados na forma de matrizes: Matriz **X** e Matriz **Y**, onde as mesmas contém os valores das variáveis independentes x e dependentes y , respectivamente. Em seguida, as matrizes são decompostas em matrizes de variações dos espectros denominados loadings ou pesos e em posição das amostras, os scores, que representam as contribuições das combinações lineares das variações dos espectros originais.

Uma relação entre os dois blocos (variáveis independentes **X** e variáveis dependentes **Y**) pode ser realizada correlacionando-se os "scores" dos blocos X e Y. Visando a melhor correlação possível, torna-se importante manipular a informação dos blocos ao mesmo tempo. O número de variáveis latentes utilizado no processo de calibração é obtido por meio de validação cruzada, uma metodologia baseada na magnitude dos erros de previsão de um dado modelo de calibração. Posteriormente, o modelo é destinado à previsão do parâmetro analisado, mas para novas amostras [42].

Para construir um modelo de calibração através de regressão linear univariada, alguns pressupostos básicos devem ser preenchidos, dois dos mais importantes são:

i) Seletividade: Um modelo de calibração univariada só pode fornecer resultados precisos, se o sinal de medida não têm contribuições de outras fontes. Por isso, somente o analito de interesse deve contribuir para a medida do sinal. A importância disso é significativa. Se outros analitos contribuírem para o sinal, os resultados serão tendenciosos. O pior é que não há nenhuma maneira de detectar a partir do sinal univariado que resultados incorretos são obtidos.

ii) Linearidade: deve haver uma relação linear entre a concentração do analito e o sinal [35].

Métodos Multivariados são geralmente melhores do que métodos univariados. Eles aumentam a quantidade de informação possível que pode ser obtida, sem perda; modelos multivariados podem sempre ser simplificados para um modelo univariado. As vantagens de métodos multivariados vêm a um custo de poder computacional e complexidade, mas estes inconvenientes são facilmente tratadas com pacotes de software matemáticos comuns, onde os únicos requisitos para o emprego de métodos quimiométricos são um instrumento adequado e software para interpretar os padrões nos dados (por exemplo, Matlab e Unscrambler) [36]. Outra vantagem desses métodos é a redução do ruído, que se dá somente por meio da média ponderada de todas as medições; e também é possível detectar que interferentes não calibrados estão presentes [35].

Erdal Dinç e colaboradores (2002) fizeram uma determinação espectrofotométrica quantitativa de cilazapril e hidroclorotiazida em comprimidos através desses métodos quimiométricos (PLS e PCR). A partir da comparação dos resultados concluiu-se que os métodos de investigação são melhores do que o método CLAE. Por outro lado, as recuperações e os resultados apresentados no estudo desse comprimido são comparáveis com os divulgados pelo método CLAE. Com isso, os métodos quimiométricos propostos podem ser aplicados para a análise de rotina desses dois fármacos na formulação de comprimidos [37].

Em outro estudo, Erdal Dinç e colaboradores (2003) realizaram o ensaio de dissolução de comprimidos contendo paracetamol, cafeína e propifenazona, segundo o método USP 23 (50 rpm) em suco gástrico simulado em $37,0 \pm 0,1$ °C . A amostra foi colhida por meio de um injetor com membrana filtrante (0,20 mm) e diluída com quantidade suficiente de dissolução média. A solução final foi analisada pelos métodos de calibração PLS e PCR. E observou-se que a determinação dos resultados obtidos nos métodos quimiométricas propostos são comparáveis com o CLAE. Além disso, o calibrações propostas não requerem nenhum pré-tratamento [38].

Matheus P. Freitas e colaboradores (2005) realizaram um estudo dos perfis de dissolução do fármaco clonazepam em comprimidos utilizando espectroscopia de reflectância difusa. Três comprimidos de cada lote foram avaliados para a dissolução usando um aparelho de dissolução Hanson. Os testes de dissolução foram realizados em 900 ml de água destilada em $37 \pm 0,5$ °C, e a porcentagem de dissolução do fármaco a partir de cada comprimido foi medida em diferentes intervalos de tempo (3, 7, 11, 15, 20, 30 e 45 min), em três diferentes meios de comunicação (pH 3,0, 4,5 e 6,8), utilizando um CLAE com um Detector UV-vis ($\lambda_{\max} = 254$ nm). Aparelhos e condições USP foram usadas para executar dissolução de acetato (pH 3,0 e 4,5) e fosfato (pH 6,8) na preparação do tampão. O procedimento NIR de reflectância difusa teve as vantagens sobre a técnica de referência que não requer nenhuma preparação da amostra e aquisição de resultados de forma rápida. O método quimiométrico utilizado foi o PLS, que demonstrou ser um método de regressão adequado na construção de modelos de calibração, sem recorrer ao pré-tratamento de dados. O método potencialmente prestado mostrou assistência suficiente para o desenvolvimento de formulações com o perfil de dissolução adequada, uma vez que todas as 21 curvas previstas versus porcentagens de dissolução medidos foram consistentes e apresentaram correlação satisfatória [39].

Historicamente, a quimiometria tem sido mais estreitamente ligada à espectroscopia de infravermelho próximo, mas mais recentemente estendeu-se a uma gama de diferentes aplicações. A maioria das aplicações desta técnica na área farmacêutica envolve análises espectroscópicas ou processos utilizando NIR. Estas aplicações podem ser destinadas para uso no controle de processo de fabricação ou no modo de desenvolvimento, como a determinação eficaz da velocidade da reação através da modelagem [31].

A ciência da quimiometria dá à espectroscopistas muitas maneiras eficientes para resolver o problema de calibração para análise de dados espectrais. Os requisitos quimiométricos são:

- i) A correta aplicação dos dados espectroscópicos de pré-processamento, reduzindo e corrigindo as interferências, tais como bandas sobrepostas, desvios da linha de base e a variação caminho ótico;
- ii) Calibração forte e diagnóstico através de seleção da amostra e variáveis, cálculo de resultado estatístico para construir modelos representativos e confiáveis;
- iii) Validação do modelo e a integração de meios para abastecer previsão rigorosa [40].

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo a investigação da possibilidade de se utilizar a técnica de espectroscopia de infravermelho próximo conjuntamente às ferramentas de calibração multivariada na determinação da dissolução de isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol em formulações farmacêuticas voltadas ao tratamento de tuberculose pulmonar, produzidos pelo NUPLAM-UFRN.

3. EXPERIMENTAL

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Para a determinação dos quatro princípios ativos através do método de dissolução foram utilizados os seguintes reagentes e soluções:

Fosfato de sódio dibásico anidro P.A. 99,0% (Labsynth); ácido fosfórico P.A. 85,0% (Reagentes Analíticos); acetonitrila 0,7791 g/mL (J. T. Backer Solusorb); trietilamina (Vetec); metanol (J. T. Backer Solusorb); padrão isoniazida 98,21%; padrão rifampicina 93,09%; padrão pirazinamida 99,10%; padrão etambutol 100,87%.

3.2 INSTRUMENTAÇÃO

Neste trabalho foi utilizado Espectrofotômetro no Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (Bomem) de modelo MB 160 D acoplado a um

acessório de reflectância difusa, localizado no NEPPGN (Núcleo de Estudos e Pesquisas em Petróleo e Gás Natural), Departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Para auxiliar na obtenção dos espectros tem-se a utilização de um aparato confeccionado em formato cilíndrico com cavidade apropriada ao comprimido.

O dissolutor automático (Erweka) de modelo BT-80 existente no NUPLAM foi utilizado para a realização da dissolução das amostras de comprimidos contendo os princípios ativos. O equipamento CLAE (Shimadzu), utilizado para a obtenção dos cromatogramas, consiste nos seguintes módulos: degaseificador (DGU-20A5); bomba (LC-20AT); auto-injetor (SIL-20A); forno da coluna (CTO-20A); detector de arranjo de iodo (SPD-M20A); comunicação (CBM-20A). O equipamento Milli-Q (Millipore) de modelo Advantage foi utilizado na purificação da água. Para as pesagens das amostras e padrões utilizou-se balança analítica de alta precisão (Ohaus) de modelo Adventure. O agitador magnético (FANEM) de modelo 257 foi utilizado para homogeneização das soluções preparadas. O pHmetro (Tecnal) de modelo Tec-3MP foi utilizado para o controle de pH das soluções tampão preparadas. A bomba a vácuo (Eletrolab) de modelo 504 foi utilizado para auxiliar a filtração das soluções preparadas. A lavadora ultrasônica (UNIQUE) foi utilizada para sonicar as amostras.

3.3 COMPOSIÇÃO DOS COMPRIMIDOS

A formulação farmacêutica utilizada para estudo da dissolução foi o chamado 4 em 1, composto por isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol como princípios ativos, e como excipientes o amido glicolato de sódio, estearato de magnésio, talco e celulose, em forma de comprimidos ainda não revestidos, cedidos pelo NUPLAM.

3.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.4.1 Obtenção dos Espectros

Foram utilizadas um total de 38 amostras de comprimidos 4 em 1 para a aquisição dos espectros de reflectância (triplicata) através do espectrofotômetro Bomem na faixa de 800-2500 nm com uma média de 50 varreduras, obtidos com a resolução de 8 cm^{-1} , em absorbância *versus* comprimento de onda.

3.4.2 Método de Referência

3.4.2.1 Preparação da Solução Tampão Fosfato

Utilizou-se cerca de 1,4 g de fosfato de sódio dibásico anidro para cada litro de água purificada. Regulou-se o pH em cerca de $6,8 \pm 0,1$ utilizando-se quantidades de ácido fosfórico P.A. Seguido de filtração a vácuo e degaseificação por um intervalo de 10 minutos.

3.4.2.2 Preparação das Fases Móvel

i) Fase Móvel A

Preparou-se a solução seguindo a proporção de 96:4 de tampão fosfato e acetonitrila, respectivamente. Seguida de filtração a vácuo e degaseificação por 10 minutos.

ii) Fase Móvel B

Preparou-se a solução seguindo a proporção de 55:45 de tampão fosfato e acetonitrila, respectivamente. Seguida de filtração a vácuo e degaseificação por 10 minutos.

iii) Fase Móvel C

Preparou-se o tampão de trietilamina em água seguindo a proporção de 1:1000, respectivamente. Regulou-se o pH em $7,0 \pm 0,1$ utilizando-se ácido fosfórico P.A. Seguida de filtração à vácuo e degaseificação por 10 minutos.

Preparou-se a solução seguindo a proporção de 50:50 de tampão e acetonitrila, respectivamente. Seguida também de filtração a vácuo e degaseificação por 10 minutos.

3.4.2.3 Dissolução

Utilizando-se o dissolutor automático, configurou-se o equipamento nas seguintes especificações: tempo de 45 minutos, temperatura de 37°C , aparato pás, 900 mL de tampão fosfato como meio de dissolução e rotações de 100 rpm.

Submeteram-se os comprimidos à dissolução automática sob as condições citadas. Alíquotas de cada amostra dissolvida foram colhidas e filtradas utilizando-se papel filtro $14\ \mu\text{m}$ e transferidas para vial para serem submetidas à leitura no cromatógrafo.

3.4.2.4 CLAE

Os vials foram colocados em ordem sequencial dentro do cromatógrafo e foi realizada a leitura separadamente dos princípios ativos e de seus padrões: isoniazida + rifampicina + pirazinamida, utilizando-se as fases móveis A e B e coluna cromatográfica Nucleosil, onde cada leitura (triplicata) tinha duração de 25 minutos; para o etambutol, utilizou-se a fase móvel C e coluna cromatográfica ACE, com leituras de 15 minutos de duração.

3.5 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

A importação dos dados obtidos, seus pré-tratamentos e a construção dos modelos quimiométricos foram realizados utilizando-se o software

Unscrambler 9.1 da Camo S.A. O Pré-tratamento dos dados deve ser aplicado aos espectros antes de qualquer técnica multivariada. Alguns aplicativos nesse trabalho foram suavização Savitzky-Golay, correção de espalhamento multiplicativo (MSC) e cálculo das derivadas. Por fim realizou a APC. Baseado no gráfico dos escores as amostras foram subdivididas em três categorias: calibração, validação e previsão.

Foram construídos diversos modelos distintos, variando as janelas dos pré-tratamentos, o número e a classificação das amostras selecionadas, através do gráfico dos escores, e utilizando-se PLS1 e PLS2.

O modelos escolhidos foram construídos com 24 amostras de calibração, 7 amostras de validação e 7 amostras de previsão, utilizando PLS2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Anteriormente ao seguimento da dissolução através do método de referência, os 38 comprimidos foram submetidos à leitura no espectrofotômetro NIR e seus espectros devidamente armazenados, em virtude do procedimento tradicional de dissolução ser destrutivo, invasivo e tornar as amostras inutilizadas.

Para a realização propriamente dita da dissolução dos comprimidos, o dissolutor automático foi configurado sob as seguintes condições, com os propósitos de:

- i) Tempo de dissolução: 45 minutos

Este intervalo de duração é estabelecido como padrão pela USP. Para tanto, realizou-se um estudo dos perfis de dissolução, onde durante 45 minutos, 100% do comprimido apresentava-se dissolvido.

- ii) Meio: Tampão fosfato (pH 6,8)

Também padronizado pela USP, o pH 6,8 visa simular as condições de pouca acidez do intestino, onde o comprimido é dissolvido, pois devido aos seus revestimentos o mesmo não é bem dissolvido em pH ácido do estômago.

- iii) Aparato de dissolução: Pás

Padronizado pela USP para todos os tipos de comprimidos.

- iv) Temperatura do meio: 37 °C
Simular a temperatura corporal.
- v) Velocidade de rotação do aparato: 100 rpm
Simular os movimentos peristálticos.
- vi) Volume do meio: 900 ml
Volume suportado pelo estômago sob condições normais.

Depois de submetidos à dissolução automática nas condições citadas acima, alíquotas das soluções contendo os comprimidos dissolvidos foram coletadas diretamente da cuba de dissolução, filtradas, evitando qualquer vestígio de comprimido ainda sólido, submetidas a vials, e finalmente lidas através da técnica CLAE, juntamente aos seus padrões. É importante mencionar que as leituras dos quatro princípios ativos são feitas separadamente, devido às características semelhantes entre os princípios ativos e a fase móvel utilizada.

Para a leitura de isoniazida + rifampicina + pirazinamida, utilizam-se as fases móvel A e B. Este procedimento justifica-se baseado em que a fase móvel A, que contém bastante solvente polar (água) é muito específica para isoniazida, pelo fato da molécula também possuir alto caráter polar. A isoniazida é percebida no cromatograma com tempo de retenção de aproximadamente 4 minutos. A mesma fase móvel também é específica para pirazinamida, só que um pouco menos comparada à isoniazida. A pirazinamida é registrada no cromatograma com um tempo de retenção por volta de 5,5 minutos, onde ocorre a troca da fase móvel A para B. Já a rifampicina tem bastante afinidade pela fase móvel B, devido a sua grande cadeia carbônica. Geralmente é registrada com tempo de retenção por volta de 12 minutos.

Cada cromatograma é realizado num intervalo de 25 minutos, onde: de 0 – 5 min ocorre eluição da fase móvel A; 5 – 15 min eluição da fase móvel B; 15 – 25 min eluição da fase móvel A, novamente, para limpar a coluna.

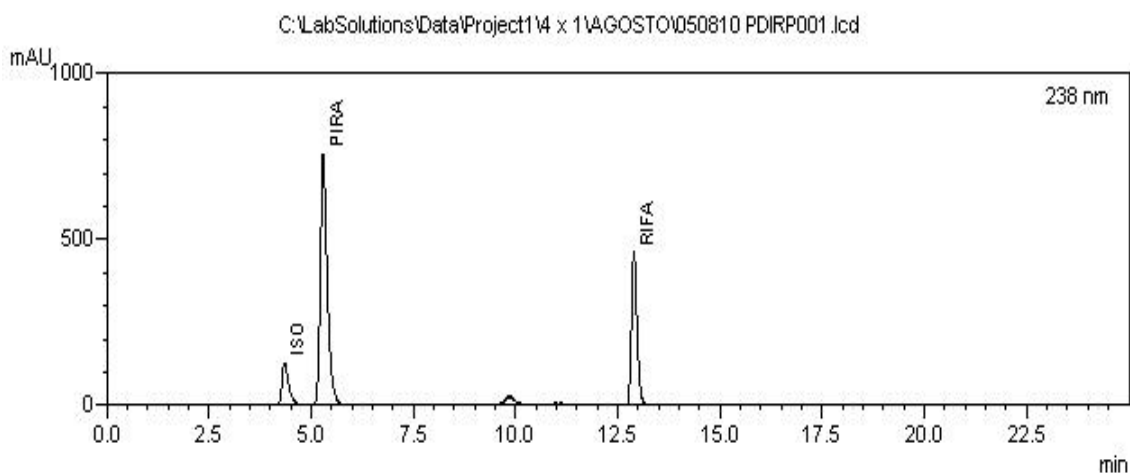


Figura 6: Cromatograma (CLAE) referente a isoniazida, rifampicina e pirazinamida.

De acordo com a Figura 6, são percebidos os picos de retenção referentes aos três princípios ativos analisados.

Diferentemente, a leitura do etambutol é realizada utilizando-se apenas a fase móvel C, que tem alta quantidade de solvente polar (água) e trietilamina, molécula que possui grande afinidade ao princípio ativo em questão. Cada leitura tem duração de 15 minutos, onde através da coluna só é eluída a fase móvel C, e o tempo de retenção do etambutol geralmente é de 8 min, conforme pode ser observado a partir da Figura 7.

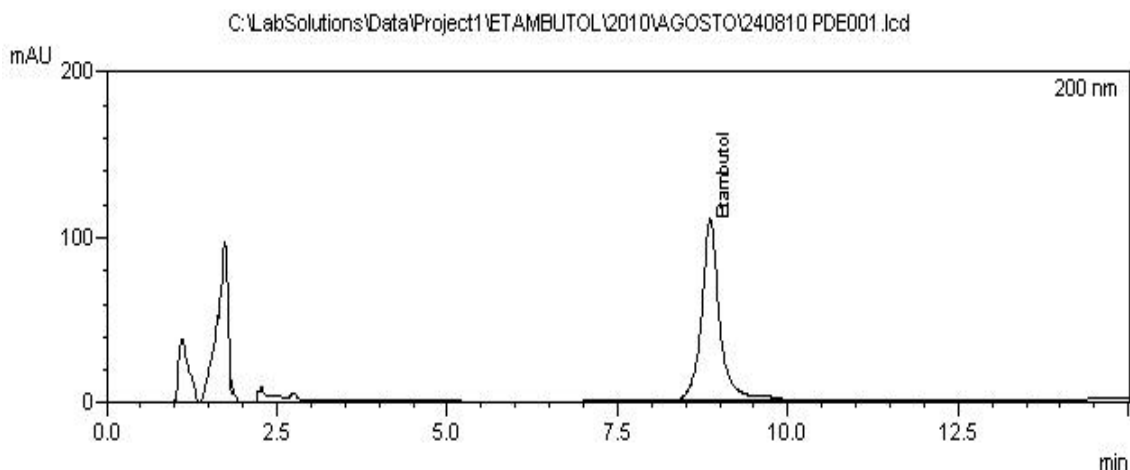


Figura 7: Cromatograma (CLAE) referente ao etambutol.

De posse dos cromatogramas para os quatro princípios ativos, a porcentagem de dissolução é calculada através da fórmula matemática abaixo:

$$\% = \left(\frac{C_p \times A_a}{C_a \times A_p} \right) \times 100 \quad \text{Equação 01}$$

Onde: C_p = concentração padrão

A_a = área da amostra

C_a = concentração da amostra

A_p = área do padrão

E, finalmente, tem-se determinado o perfil de dissolução dos fármacos, que deve ser um valor partindo de 75%.

Por outro lado, quando submetidas à radiação correspondente à região do NIR, as moléculas tendem a experimentar transições vibracionais e rotacionais atingindo, então, níveis energéticos superiores. Por isso, são observadas as chamadas bandas de combinação e sobretons, que são resultado das vibrações fundamentais de ligações C-H, N-H e O-H.

A Figura 8, ilustra o espectro de apenas uma das 38 amostras utilizadas neste trabalho, quando submetida à radiação na região de 1100 a 2500 nm.

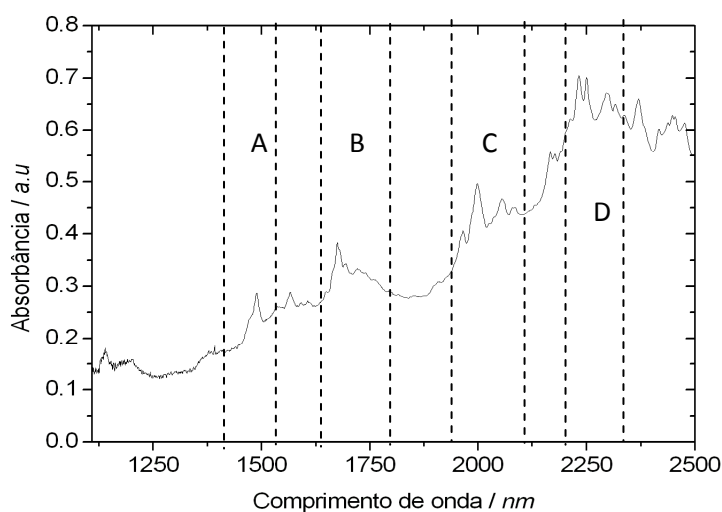


Figura 8: Espectro NIR original de uma amostra de comprimido 4 em 1.

É possível a atribuição de algumas bandas de combinação e sobretons evidenciadas no espectro, dentre elas podem-se citar: região A (1450 – 1460) atribuída a *N-H (amidas) referente ao primeiro sobretom; região B (1600 – 1800) atribuída a C-H referente ao primeiro sobretom; região C (1910 – 1980) atribuída a *C=O (amidas) referente ao segundo sobretom; região D (2110 a 2205 – 2250 a 2260) atribuída a *N-H (aminas) e O-H (água) referente a uma combinação de vibrações.

Um total de 38 amostras foi submetido ao espectrofotômetro NIR, onde foram coletados os espectros referentes a cada comprimido, em triplicata, sobre a região de 1100 a 2500 nm, onde a matriz de dados construída compreendia um total de 1316 variáveis (comprimentos de onda).

Através da Figura 9 é possível observar os espectros brutos, resultantes da média da triplicata obtida para cada amostra, altamente sobrepostos entre si, onde não há possibilidade de qualquer tipo de identificação prévia dos constituintes das amostras, princípios ativos e excipientes, ou de características semelhantes entre os mesmos.

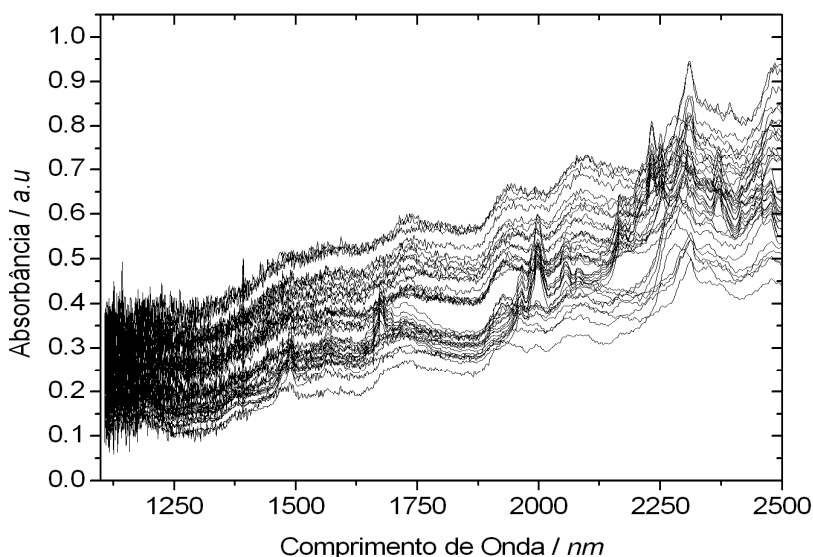


Figura 9: Espectros originais das 38 amostras de comprimidos 4 em 1.

Os espectros vistos acima se apresentam ainda com ruídos instrumentais e erros no espalhamento de luz, que provocam o deslocamento do espectro na vertical e espalhamentos multiplicativos. Logo, faz-se necessária a aplicação dos pré-tratamentos de modo a facilitar a interpretação das propriedades relacionadas aos sinais analíticos. A suavização de Savitzky Golay foi utilizada para remover dos espectros a presença de ruídos instrumentais aleatórios, aumentando, assim, a razão sinal/ruído. As janelas de suavização variaram de 1 a 9 pontos, onde quanto maior o número de pontos utilizados, maior a suavização percebida nos espectros. A correção de espalhamento multiplicativo de luz, MSC, também foi realizada sobre os espectros, devido às dispersões de luz em todas as direções ocasionadas por granulação e geometria das partículas na amostra, provocando alterações na relação entre a intensidade das medidas de reflectância e a concentração das espécies em análise. Esta etapa facilita a construção de modelos mais precisos e robustos, com boa habilidade de previsão. Finalmente, realizou-se sobre os espectros o cálculo da derivada, de primeira e segunda ordem, visando a correção da linha de base. As janelas variaram partindo de 1 até 31 pontos, utilizando-se polinômio do primeiro e segundo grau.

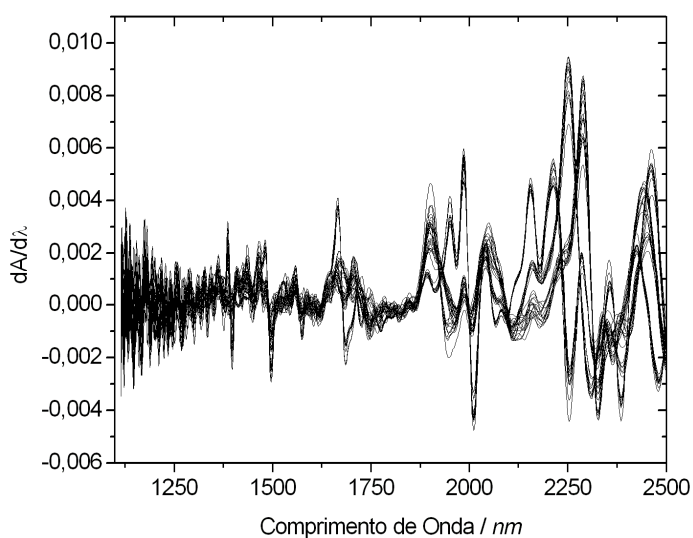


Figura 10: Espectros derivativos originais de 38 amostras de comprimidos 4 em 1 depois de submetidos a pré-tratamentos de suavização, MSC e derivação.

Os melhores resultados obtidos durante a realização dos pré-tratamentos foram aqueles onde a suavização e a primeira derivada utilizaram, ambas, janelas de 5 e 7 pontos e polinômio do primeiro grau, conforme representado na Figura 10.

Depois de pré-tratada, a matriz de dados agora é submetida à base fundamental dos tratamentos de dados multivariados: ACP.

Este tipo de análise é empregado para separação ou classificação de grupos amostrais, de acordo com suas características similares. Tem como objetivo retirar o máximo de informação dos dados (matriz), convertendo-as em gráficos que mostram a relação entre as amostras e variáveis, transformando um conjunto de dados complexos, com muitas dimensões, em um conjunto mais simples, com menos dimensões.

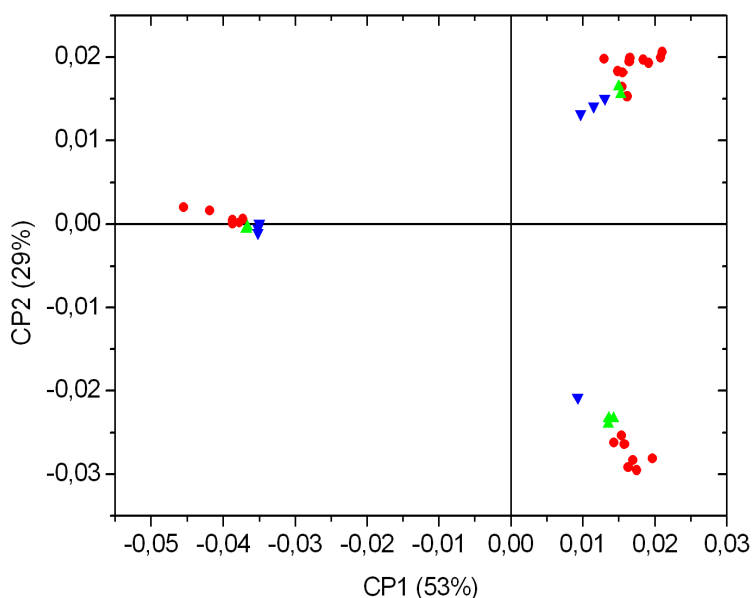


Figura 11: Análise dos Componentes Principais para as 38 amostras de comprimidos 4 em 1:
● Calibração; ▲ Validação; ▼ Previsão

Sendo assim, realizou-se a ACP para as 38 amostras de comprimidos e foram observados dois resultados satisfatórios, os quais foram utilizados para a posterior construção dos modelos quimiométricos: 1ª derivada e suavização com 5 pontos e 1ª derivada e suavização com 7 pontos. A Figura 8 mostra o gráfico dos escores da ACP para o resultado com 1ª derivada e suavização de 7 pontos. Também são observados os agrupamentos apresentados pelas

amostras, devido as suas características semelhantes. Nessa etapa, cada amostra é tratada de forma independente, sem nenhum tipo de colinearidade.

Também é notado através da Figura 11 que a CP1 (53%) é definida na direção de máxima variância dos dados de todo o conjunto de amostras. Já CP2 (29%) está descrita na direção que descreve a variação máxima no subespaço ortogonal a CP1.

Depois de realizada a ACP, são conhecidos outros gráficos de importância relevante para a análise quimiométrica. São eles o gráfico dos *loadings* e da variância explicada. Em relação a este último, é possível se observar quais e quantas CP são necessárias e suficientes para descrever o conjunto de dados. Serão elas, aquelas que contemplarem o máximo de informação útil ao modelo, com o mínimo de influência causada pelos ruídos.

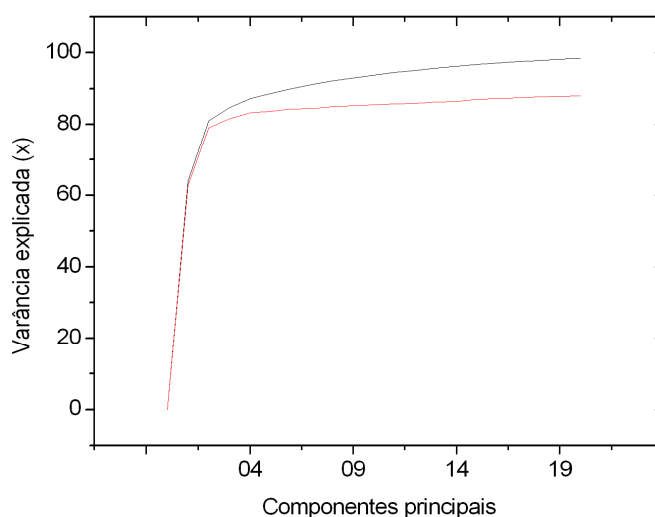


Figura 12: Gráfico da variância explicada versus componentes principais

O gráfico ilustrado pela Figura 12 foi obtido através de uma ACP utilizando um número de vinte CP. Visualizando-se este gráfico é possível observar que um número ótimo de CP seria três. Ultrapassando este valor, as componentes passam a contemplar também os ruídos ou sinais que não são de interesse para a análise em questão. Isso pode contribuir negativamente na construção dos modelos quimiométricos.

Realizada a ACP, as linhas (amostras) das matrizes de trabalho foram renomeadas dentro de três categorias: calibração, validação e previsão. A

primeira é empregada para construção de todos os modelos a serem considerados. A segunda é usada para escolher o melhor modelo em termos de exatidão e precisão, e a terceira para estimar o desempenho do modelo na previsão de dados futuros.

Foram construídos diversos modelos de calibração, validação e previsão, através dos métodos de regressão PLS1 e PLS2, onde foram utilizadas diferentes matrizes de trabalho, devido às condições de pré-tratamento que as diferenciavam.

Através da observação dos dados fornecidos por cada modelo construído, chegou-se à conclusão de que dois deles foram os mais adequados, devido a apresentarem os resultados mais satisfatórios.

Para a escolha dos melhores modelos, foram considerados parâmetros como o coeficiente de correlação (R^2), e os erros quadráticos padrão de calibração, validação cruzada e de previsão, RMSEC, RMSECV e RMSEP, respectivamente.

O RMSEP realiza a estimativa do desempenho futuro do modelo de calibração, utilizando para isso um conjunto de dados que não foi empregado na determinação dos parâmetros do modelo. É calculado por:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum (y_{real} - y_{prev})^2}{n}} \quad \text{Equação 02}$$

Onde: y_{real} = valores reais de dissolução

y_{prev} = valores encontrados pelo modelo construído

n = número de amostras utilizadas

As matrizes de trabalho de cada modelo diferem nas janelas utilizadas nas etapas de suavização e cálculo da derivada: uma matriz foi tratada com janelas de 5 pontos para suavização e derivada, e a outra com janelas de 7 pontos.

Os dois modelos foram construídos com base nas amostras de calibração pré-selecionadas especificamente para cada matriz, utilizando-se PLS2, como método de regressão que representa o grande número de

informações contidas nos espectros em outro sistema de variáveis, mais reduzido, entretanto ainda contendo a informação relevante, chamadas de variáveis latentes ou fatores.

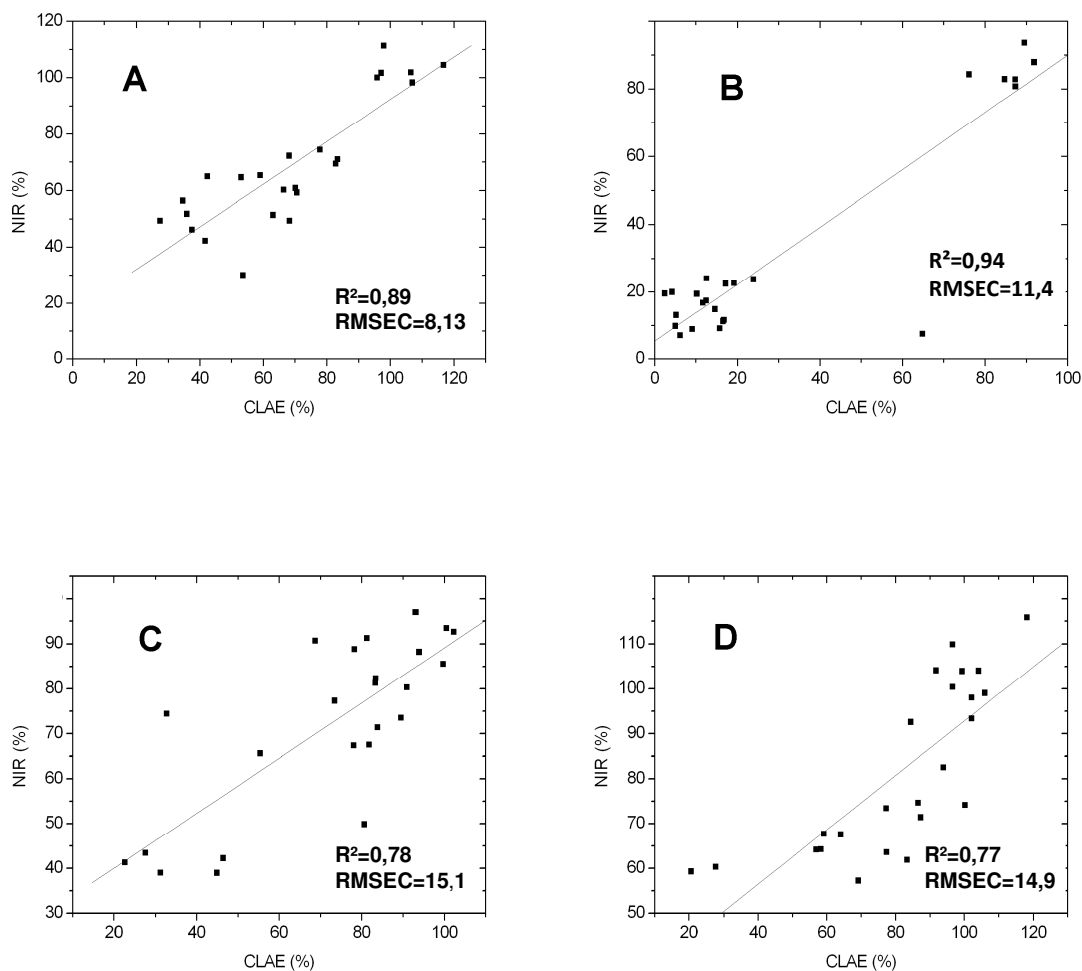


Figura 13: Gráficos dos modelos de calibração, ilustrando a correlação entre os valores obtidos por CLAE e NIR: **A)** isoniazida; **B)** rifampicina; **C)** pirazinamida; **D)** etambutol

A Figura 13 ilustra o comportamento das amostras de calibração para cada princípio ativo estudado. O modelo que utilizou a matriz tratada com janelas de 7 pontos, descreve o comportamento das amostras em relação a isoniazida (Figura 13-A) e rifampicina (Figura 13-B). Para isoniazida o valor do coeficiente de correlação foi de 0,89 e o RMSEC de 8,13. Enquanto que para rifampicina, o coeficiente de correlação foi de 0,94 e o RMSEC de 11,4.

Já o segundo modelo, construído com base na matriz tratada com janelas de 5 pontos, descreve o comportamento das amostras de calibração, agora em relação a pirazinamida (Figura 13-C) e etambutol (Figura 13-D). Os valores do coeficiente de correlação e RMSEC, para pirazinamida, foram de 0,78 e 15,1, respectivamente. Para o etambutol, os valores encontrados foram de 0,77 e 14,9, para o coeficiente de correlação e RMSEC, respectivamente.

Posteriormente à determinação das relações entre os espectros e os valores de referência do parâmetro analisado, taxa de dissolução, o procedimento seguinte realizado foi o teste sobre o modelo. Para tanto, foi utilizado um conjunto de amostras externas, renomeadas como previsão. Estas, não foram utilizadas para a construção do modelo de calibração, mas seus espectros serão utilizados para que seja predito o valor da taxa de dissolução, partindo dos modelos anteriormente construídos.

Serão considerados os melhores modelos de previsão aqueles que apresentarem os maiores valores de R², e menores valores de RMSEP (erro quadrático padrão de previsão) e RMSEP relativo, que pode ser calculado pela seguinte equação:

$$RMSEP_{rel} = \left(\frac{RMSEP}{\sum y/n} \right) \times 100 \quad \text{Equação 03}$$

Onde:

y = valores de referência das amostras de previsão

n = número de amostras de previsão

Tabela 1: Resultados obtidos para modelos de calibração e previsão.

Princípio Ativo	R ² (cal)	RMSEC (%)	R ² (prev)	RMSEP(%)	RMSEPrel(%)	CP
Isoniazida	0,89	8,13	0,90	9,99	11,81	4
Rifampicina	0,94	11,47	0,98	8,63	17,7	4
Pirazinamida	0,78	15,1	0,88	9,97	14,1	3
Etambutol	0,77	14,9	0,90	8,57	10,5	3

Para a previsão, foram utilizadas 7 amostras previamente escolhidas, salientando que para cada matriz de dados utilizada foram escolhidas 7 amostras específicas, e então os resultados obtidos aparecem ilustrados acima, na Tabela 1. Pode-se observar que os valores de R^2 para os quatro princípios ativos foram bastante próximos de 1, evidenciando uma boa correlação entre os valores dos pontos com a reta obtida, tanto na etapa de calibração quanto na previsão, e os erros quadráticos padrão de calibração e previsão e relativo também estiveram na mesma proporção para as duas etapas, com valores aceitáveis para que os modelos sejam considerados satisfatórios, e eficientes para a análise realizada neste trabalho

5. CONCLUSÃO

A espectroscopia de infravermelho próximo por reflectância difusa, aliada aos métodos quimiométricos, apresentou-se como uma técnica analítica satisfatória e eficiente, especialmente quando utilizada no estudo dos perfis de dissolução de comprimidos, quando comparada à atual técnica de referência, CLAE, amplamente utilizada pelas indústrias para tal análise.

De acordo com os resultados obtidos, o PLS apresenta-se como um bom método de regressão a ser utilizado conjuntamente às etapas de pré-tratamento que devem ser realizadas inicialmente sobre os espectros das amostras, garantindo a construção de bons modelos de calibração, e coerentes resultados de previsão, observados para os comprimidos 4 em 1 analisados.

Também devem-se ser notadas as vantagens oferecidas pelo método alternativo em questão sobre a técnica de referência, tais como: não há consumo de reagentes durante as análises ou necessidade de pessoal especializado para realizá-las, técnica de baixo custo e não destrutiva.

Partindo das vantagens citadas, e dos resultados obtidos durante este trabalho, conclui-se que a espectroscopia NIR e quimiometria são eficientes e confiáveis para serem aplicadas às diversas etapas do controle de qualidade dos medicamentos, principalmente ao estudo dos perfis de dissolução de fármacos em comprimidos.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Após a realização deste trabalho, foram observadas perspectivas futuras para dar continuidade ao mesmo. Algumas etapas poderiam ser seguidas para que o trabalho fosse retomado, tais como: utilização de um maior número de amostras, investigação de modelos multivariados não lineares; seleção de variáveis; controle de qualidade.

7. REFERÊNCIAS

- [1] Sousa, M. V. N.; Vasconcelos, T. R. A.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 678.
- [2] Fernández, J. A. et al.; *Assoc. Esp. Pediatr.* **2008**, *69*, 271
- [3] Peña, M. J. M.; Baquero-Artigão, F.; Moreno-Perez, D.; *An. Pediatr.* **2009**, *71*, 5.
- [4] Small, R. C.; *pharmacology* **2005**, 380.
- [5] Panchagnula, R.; Kaul, C. L.; Bhade, S. R.; Singh, I.; Kaur, K. J.; Agrawal, S.; *Int. J. Pharm.* **2001**, *233*, 169.
- [6] Tostmann, A.; Boeree, M. J.; Peters, W. H. M.; Roelofs, H. M. J.; Aarnoutse, R. E.; van der Ven, A. J. A. M.; Dekhuijzen, P. N. R.; *Int. J. Antimicrob. Agents* **2008**, *31*, 577.
- [7] Jain, A.; Mehta, V. L.; Kulshrestha, S.; *Tuberc. And Lung Disease* **1993**, *74*, 87.
- [8] Panchagnula, R.; Kaul, C. L.; Bhade, S. R.; Singh, I.; Kaur, K. J.; Agrawal, S.; *Int. J. Pharm.* **2004**, *276*, 41.
- [9] Carvalho, R.; Silva, I.; Leiria-Pinto, P.; Rosado-Pinto, J.; *Research letters* (**2009**), doi: 10.1016/j.aller.2009.05.006
- [10] Tost, J. R.; Vidal, R.; Maldonado, J.; Caylà, J. A.; *Original Articles* **2008**, *44*, 478.
- [11] Panchagnula, R.; Kaul, C. L.; Bhade, S. R.; Singh, I.; Kaur, K. J.; Agrawal, S.; *Pharm. Res.* **2004**, *50*, 317.
- [12] Singh, S.; Bhutani, H.; Mariappan, T. T.; Kaur, H.; Bajaj, M.; Pakhale, S. P.; *Int. J. Pharm.* **2002**, *245*, 37.

- [13] Choi, W.; Jeon, Y. J.; Kwon, K.Y.; Ko, S. M.; Keum, D. Y.; Park, C. K.; *Respirat. Medicin. Extra* **2006**, 2, 55.
- [14] Singh, S.; Bhutani, H.; Jindal, K. C.; Chakraborti, A. K.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 39, 892.
- [15] Dévay, A.; Mayer, K.; Pál, S.; Antal, I.; *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2006, 69, 197.
- [16] Agrawal, S.; Panchagnula, R.; *Int. J. Pharm.* **2004**, 287, 97.
- [17] Ruela, A.; L.; M.; Araújo, M.; B.; Pereira, G.; R.; *Quím. Nova.* **2009**, 32,
- [18] <http://www.ifrj.edu.br/aluno/a/instrumental/CLAE.pdf>. Acessado em outubro de 2010.
- [19] Agrawal, S.; Singh, I.; Kaur, K. J.; Bhade. S. R.; Kaul, C. L.; Panchagnula, R.; *Int. J. Pharm.* **2004**, 276, 41.
- [20] Panchagnula, R.; Sood. A.; Sharda, N.; Kaur, K.; Kaul, C. L.; *J. Biochem. Biophys. Methods.* **1999**, 18, 1013.
- [21] Khuhawar, M.Y.; Rind, F.M.A; *J. Chromatogr.,B.* **2002**, 766, 357.
- [22] Luypaert, J.; Massart, D. L.; Heyden, Y. V.; *Talanta* **2007**, 72, 865.
- [23] Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S.; de La Pezuela, C.; *Analyst (Cambridge, U. K.)* **1998**, 123, 135.
- [24] Pasquini, C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, 14, 198.
- [25] Burns, D. A.; Ciurczak, E.W.; *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 3th ed., Boca Ratom: New York, 2008.
- [26] Blanco, M; Coello, J.; Eustaquio, A.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S; *Anal. Chim. Acta* **1999**, 392, 237.
- [27] Blanco, M.; Romero, M. A.; *Analyst (Cambridge, U. K.)* **2001**, 126, 2212.

- [28] Tabasi, S. H.; Moolchandani, V.; Fahmy, R.; Hoag, S. W.; *Int. J. Pharm.* **2009**, 382, 1.
- [29] Li, W.; Bagnol, L.; Berman, M.; Chiarella, R. A.; Gerber, M.; *Int. J. Pharm.* **2009**, 380, 49.
- [30] Luypaert, J.; Massart, D. L.; Heyden, Y. V.; *Talanta*. **2007**, 72, 865.
- [31] Doherty, S. J.; Lange, A. J.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2006**, 25, 1097.
- [32] Maggio, R. M.; Castellano, P. M.; Kaufman, T. S.; *Int. J. Pharm.* **2009**, 378, 187.
- [33] Neto, B. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; *Quim. Nova*. **2006**, 29, 1401.
- [34] Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O.; *Quim. Nova*. **1999**, 22.
- [35] Bro, R.; *Anal. Chim. Acta*. **2003**, 185.
- [36] Keithley, R. B.; Heien, M. L.; Wightman, R. M.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2009**, 28, 1127.
- [37] Dinç, E.; Baleanu, D.; *Int. J. Pharm.* **2002**, 30, 715.
- [38] Dinç, E.; Serin, D.; Tugcu-Demiröz, F.; Doganay, T.; *Int. J. Pharm.* **2003**, 250, 339.
- [39] Freitas, M. P.; Sabadin, A.; Silva, L. M.; Giannotti, F. M.; Couto, D. A.; Tonhi, E.; Medeiros, R. S.; Coco, G. L.; Russo, V. R. T.; Martins, J. A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 39, 17.
- [40] <http://www.camo.com>, acessada em setembro de 2010.
- [41] <http://www.nuplam.ufrn.br>, acessado em novembro de 2010.
- [42] Barthus, R. C.; Mazo, L. H.; Poppi, R. J.; *Quim. Nova*. **2007**, 30, 1638.