



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

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**AVALIAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E
FERRAMENTAS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA NA DETERMINAÇÃO
DA DUREZA EM COMPRIMIDOS PARA TRATAMENTO DA TUBERCULOSE
PULMONAR**

Suerda Shirley Silva Rodrigues
Orientador: Prof. Dr. Kássio Michell Gomes de Lima

Natal - RN

2010

Suerda Shirley Silva Rodrigues

**AVALIAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E
FERRAMENTAS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA NA DETERMINAÇÃO
DA DUREZA EM COMPRIMIDOS PARA TRATAMENTO DA TUBERCULOSE
PULMONAR**

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

Dedico este trabalho
aos meus pais Francisco Hermínio e Francisca,
por fortalecerem e iluminarem a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Considerando esta monografia como resultado de uma longa caminhada, em que só a persistência e a fé podem levar ao final de uma trajetória árdua, devo agradecer primeiramente a Deus.

Agradeço a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a minha evolução.

E particularmente,

Aos meus pais Francisco Hermínio Rodrigues e Francisca Silva Rodrigues, por todo amor, carinho e apoio, não mediram esforços para a construção do ser que hoje sou.

Ao professor e orientador Prof. Dr. Kássio Michell Gomes de Lima por seu apoio, paciência e conhecimento, que levaram a construção deste trabalho.

Aos professores João Bosco Lucena de Oliveira, Ademir Oliveira da Silva, Fernanda Mazzé e Benito Maia Barros, pela generosa amizade e imenso carinho.

Aos amigos Isabella Leandro, Rafael Ventura e Karinne Fonseca, pela valorosa e importante contribuição neste trabalho, tornando sua realização possível.

As especiais amigas de Sarah Pollyana, Júlia Jurema, Janaína Monteiro, Donizete Prado e sua família, que me apoiaram em todo instante.

Especialmente a Universidade Federal do Rio Grande do Norte, ao Departamento de Química, ao NEPPGN e ao NUPLAM.

CURRICULUM VITAE

Suerda Shirley Silva Rodrigues

E-mail: suerda_rodri@yahoo.com.br

Currículo lattes: <http://www.cnpq.br/2067085990298889>

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2003 - 2008 Graduação em QUÍMICA.

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

Título: LICENCIATURA PLENA

2008 - 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: MONITORIA – PROGRAD

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2010 - 2010 Curso de curta duração em Ferramentas para o Ensino de Química para Deficientes Visuais. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Inovações Tecnológicas na Indústria Farmacêutica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Elucidação Estrutural de Compostos Orgânicos. Universidade Federal do Rio Grande do

- Norte, UFRN, Natal, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Redação Científica em Inglês e Português. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Tratamento de esgotos domésticos por Lodo Ativado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em MANUAL BASICO DO PET. Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil
- 2005 - 2005** Extensão universitária em OLIMPIADAS DE QUIMICA. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
- 2005 - 2005** Extensão universitárias em PROGRAMA TRILHAS POTIGUARES. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em II SEMINARIO DO NUCLEO SETORIAL DE AGUA MINERAL. Federação das Indústrias do Estado do Rio Grande do Norte, FIERN, Natal, Brasil
- 2005 - 2005** Extensão universitária em PARQUE DA CIENCIA. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em II SEMINARIO DE MEIO AMBIENTE. CONSELHO REGIONAL DE ENGENHARIA E ARQUITETURA RN, CREA RN, Brasil
- 2004 - 2004** Extensão universitária em PARQUE DA CIENCIA. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
- 2004 - 2004** Extensão universitária em SEMANA DE QUÍMICA.

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

2004 - 2004 Extensão universitária em OLIMPIADAS DE QUIMICA. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil

2003 - 2003 Extensão universitária em MEIO AMBIENTE E SUSTENTABILIDADE. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil

2003 - 2003 Extensão universitária em AQUICULTURA SUSTENTAVEL. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil

1997 - 1997 Curso de curta duração em SEMINARIO DE TECNOLOGIA AMBIENTAL. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, IFRN, Natal, Brasil

BOLSAS OBTIDAS

03/2010 - 12/2010 Monitoria (PROGRAD)

02/2009 - 12/2010 Tutoria em Ensino Superior (SEDIS-UAB-FNDE)

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

2010 - 2011 Rodrigues, S.S.S.; Ventura, R.A.; Soares, K.F.; Soares, I.L.; Porto, D.L.; Lima, K.M.G.; Evaluation of near infrared spectroscopy and multivariate calibration tools for the determination of hardness in tablets for the treatment of pulmonary tuberculosis; 15th Internacional Conference on Near Infrared Spectroscopy. **2011**, Cidade do Cabo, África do Sul.

2006 Rodrigues, S.S.S; Machado, S.F.; Silva, D.R. ,Oliveira, O.A. ; Estudo Termoanalítico de corantes Alimentícios Vendidos na cidade de Natal; XLVI

Congresso Brasileiro de Química; 2006; Salvador; Brasil.

2006 Rodrigues, S.S.S.; Xavier, J.C.; Moura, M.F.V.; Brito, G.Q; Feire, R.M.L.; Medeiros, J.F.; Determinação de proteínas em moluscos de estuários potiguares; V Encontro Nordestino de Grupos PET; 2006; Salvador; Brasil.

2005 Rodrigues, S.S.S.; Xavier, J.C.; Moura, M.F.V.; Brito, G.Q; Feire, R.M.L.; Medeiros, J.F.; Determinação de proteínas em moluscos de estuários potiguares; XVI Congresso de Iniciação Científica; 2005; Natal; Brasil.

2005 Rodrigues, S.S.S.; Xavier, J.C.; Moura, M.F.V.; Brito, G.Q; Determinação de minerais em moluscos de estuários potiguares; XLV Congresso Brasileiro de Química; 2005; Belém; Brasil.

2004 Rodrigues, S.S.S.; Carvalho, J.M.; Resultados da Implantação do Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos no Departamento de Química; XV Congresso de Iniciação Científica; 2004; Natal; Brasil.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Rodrigues, S.S.S.; Ventura, R.A.; Soares, K.F.; Soares, I.L.; Porto, D.L.; Lima, K.M.G. Evaluation of near infrared spectroscopy and multivariate calibration tools for the determination of hardness in tablets for the treatment of pulmonary tuberculosis; *Anal. Chim. Acta.* **2010** (em fase de submissão).

Não cai uma só folha seca sobre o chão, sem que Deus permita.

RESUMO

Este trabalho utilizou a espectroscopia NIR e calibração multivariada para determinar dureza em comprimido contendo quatro princípios ativos (isoniazida, rifampicina, etambutol, pirazinamida) para tratamento da tuberculose pulmonar produzido pela UFRN. Os métodos atuais de testes de dureza em comprimido são destrutivos. Espectros NIR de reflectância (em triplicado) de 157 amostras foram medidas com um espectrofotômetro FT-NIR Bomem MB 160 na faixa 800-2500 nm. Cada espectro medido foi a média de 50 varreduras, obtidos com resolução de 8 cm^{-1} . Os mesmos 157 comprimidos foram submetidos ao teste de dureza com o durômetro Varian VK 200. Esta ordem de testes permitiu correlação direta de dados para uma amostra específica comprimido. Os espectros foram submetidos a processos de calibração, validação cruzada, e foram tratados e correlacionados com os resultados de dureza, usando a Unscrambler 9.1 da Camo (Trondheim, Noruega). A influência de vários espectros de pré-tratamento [Savitzky Golay suavização, correção do espalhamento multiplicativo (MSC), primeira derivada (D1), segunda (D2) derivados separadamente e combinados] e métodos de regressão (PLS1 e PCR) e os erros de predição comparados. Os coeficientes de correlação para os dados da dureza do equipamento de laboratório (Varian VK 200) *versus* os valores preditos (NIR) são de 0,91. Erros de previsão (RMSEP) usando modelos PLS1 são 1,17. Estes resultados indicam que o método da espectroscopia NIR de reflectância difusa, não-destrutivo, é uma ferramenta alternativa para a medição de dureza de comprimidos.

Palavras-chave: Espectroscopia de Infravermelho Próximo; Dureza; Calibração Multivariada, Tuberculose.

ABSTRACT

This work used NIR spectroscopy and multivariate calibration to determine hardness content four active principles (isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamide) for treatment of pulmonary tuberculosis produced by UFRN. Current methods of tablet hardness testing are destructive in nature and may not always. NIR reflectance spectra (in triplicate) of 157 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 with resolution of 8 cm^{-1} . The same 147 tablets, the hardness were measured using the Hardness Tester Varian VK 200. This order of testing allowed direct correlation of data to a specific tablet sample. Spectra and calibration set, full cross-validation, tests were treated and correlated with the hardness results by using the Unscrambler 9.1 from Camo (Trondheim, Norway). The influence of various spectral pre-treatment [Savitzky Golay Smoothing, multiplicative scatter correction (MSC), first derivative (D1), second derivative (D2) separately and combined] and regression methods (PLS1 and PCR) on prediction error are compared. The squared correlation coefficients for the plots of hardness from the equipment laboratory (Varian VK 200) versus the predicted values (NIR), is 0.91. Prediction errors (RMSEP) use PLS1 models, which 1.17. These results indicating that the NIR diffuse reflectance spectroscopy method is an alternative, nondestructive tool for measurement of hardness from tablets.

Keywords: Near Infrared Spectroscopy; Hardness; Multivariate Calibration, Tuberculosis.

SUMÁRIO

	PAGINA
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xviii
PREFÁCIO	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. TUBERCULOSE E OS FÁRMACOS	3
1.1.1. NUPLAM	7
1.2. MÉTODOS ANALÍTICOS CLÁSSICOS NA DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICOS	8
1.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO	9
1.4. FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS	12
1.4.1. ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS	14
1.4.2. REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS	15
2. OBJETIVOS	16
3. EXPERIMENTAL	16
3.1. INSTRUMENTAÇÃO	16
3.2. COMPOSIÇÃO DOS COMPRIMIDOS	17
3.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	17

3.3.1. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS NIR	17
3.3.2. OBTENÇÃO DA DUREZA – MÉTODO DE REFERÊNCIA	17
3.4. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÕES	26
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	27
7. REFERÊNCIAS	28

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
APC	Análise de componentes principais
BK	Bacilo de <i>Koch</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
DNA	<i>Ácido desoxirribonucléico (deoxyribonucleic acid)</i>
EMB	Etambutol
FUNAM	Fundação Universitária do Alimento e do Medicamento
HIV	Vírus da imunodeficiência (<i>Immunodeficiency virus</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HPTLC	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (<i>high performance thin layer chromatography</i>)
INH	Isoniazida
LAFAPI	Laboratório Farmacêutico de Produção Industrial
MEKC	Cromatografia eletro cinética micelar capilar
MSC	Correção multiplicativa do 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
PLS	Regressão por mínimos quadrados parciais (<i>partial least squares</i>)
PZA	Pirazinamida
R ²	Coefficiente de correlação
RMSEP	Erro quadrático médio de previsão
RMSEC	Erro quadrático médio de calibração
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucléico (<i>ribonucleic acid</i>)
SM	Estreptomicina
TB	Tuberculose
WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)

LISTA DE FIGURAS

		PAGINA
Figura 01	Estruturas moleculares dos fármacos: (A) Etambutol, (B) Isoniazida, (C) Pirazinamida, e (D) Rifampicina.	6
Figura 02	Diagrama da energia potencial de oscilador: (1) harmônico e (2) anarmônico.	9
Figura 03	Espectrofotômetro de Infravermelho Próximo com acessório de refletância difusa.	16
Figura 04	Durômetro Varian VK 200 existente no NUPLAM - UFRN	18
Figura 05	Espectro NIR original de uma amostra de comprimido 4 em 1 para tratamento da TB.	20
Figura 06	Espectros originais NIR de 157 amostras de comprimidos 4 em 1 para tratamento da TB.	21
Figura 07	Espectros NIR de 157 amostras de comprimidos para TB depois de submetidos à pré-tratamentos de suavização, MSC.	22
Figura 08	Espectros NIR derivativos finais de 157 amostras de comprimidos depois de submetidos aos pré-tratamentos.	22

Figura 09	Análise dos Componentes Principais	23
Figura 10	Variância Explicada <i>versus</i> Componentes Principais	24
Figura 11	Valores preditos <i>versus</i> valores do durômetro	25

LISTA DE TABELAS

	PAGINA
Tabela 01 Resultados obtidos para modelos de calibração e previsão com relação à dureza em comprimidos 4 em 1 para tratamento da TB.	26

PREFÁCIO

As técnicas analíticas demoradas e conservadoras e procedimentos inespecíficos de controle estão sendo substituídas gradativamente por ferramentas analíticas mais específicas e compatíveis com o ambiente. Neste contexto, os diferentes métodos vibracionais, em especial a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), que emergiu nas últimas décadas em combinação com luz de fibra ótica e procedimentos quimiométricos de avaliação como uma ferramenta extremamente poderosa para o controle de qualidade industrial e acompanhamento do processo de produção.

As descobertas da pesquisa científica levam a solução dos problemas tecnológicos e industriais, bem como, os ambientais e sociais. A Química Analítica tem papel fundamental na construção do conhecimento dos processos químicos. É importante ressaltar que o desenvolvimento de ferramentas matemáticas e computacionais melhora a resposta para a crescente complexidade de dados analíticos.

Este trabalho foi realizado utilizando a espectroscopia no infravermelho próximo, uma técnica analítica que responde a necessidade de se ter uma análise rápida e não destrutiva, com baixo custo, aliada a ferramentas de calibração multivariada para o processo de controle de qualidade de formulações farmacêuticas usada no tratamento de tuberculose pulmonar.

1. INTRODUÇÃO

A Química Analítica é uma área da ciência Química que compreende o conjunto de técnicas e métodos visando a caracterizar, determinando assim, a natureza e a composição de amostras de diferentes origens, em termos de elementos, espécies ou agrupamentos de átomos ou moléculas. Isso significa que a Química Analítica é muito abrangente e inclui muitas técnicas e procedimentos manuais, químicos e instrumentais [1].

O desenvolvimento expressivo de métodos físicos de análise oferece uma gama de ferramentas para determinar, simultaneamente, um grande número de elementos e compostos em um nível de concentração em quantidades traços. A Química Analítica vem incorporando a evolução recente em alguns campos de conhecimento científico, como os da automação, quimiometria, separação e técnicas de medição, amostragem e preparo das amostras, no âmbito do processo analítico atua como uma unidade que deve integrar tais aspectos na compreensão de todos os processos que envolvem um sistema químico [2].

A Análise Química permite hoje um controle de qualidade rápido e confiável, sendo relevante em qualquer área de produção industrial. Na indústria farmacêutica esta evolução se mostra especialmente importante, principalmente para garantir o acesso da população a produtos de qualidade, com grande confiabilidade e segurança. Com este propósito, inúmeras metodologias de análise têm sido desenvolvidas, de maneira a satisfazer as crescentes necessidades na área farmacêutica. O que faz com que aplicações neste campo correspondam a uma fecunda fonte de trabalho.

Nos últimos anos, métodos de calibração multivariada têm sido utilizados com sucesso na resolução de problemas relacionados com técnicas onerosas, demoradas e destrutivas, baixa seletividade e complexidade do sinal. Fomentando o desenvolvimento de rotinas espectroscópicas [3].

Diferentes métodos vêm sendo aplicados anteriormente para a análise de misturas destes fármacos em preparações farmacêuticas, por exemplo, cromatografia eletro cinética micelar capilar (do inglês, MEKC) cromatografia

em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, HPLC), cromatografia líquido superficial (do inglês, SFC), cromatografia em camada delgada de alta eficiência (do inglês, HPTLC), espectrofotometria no Ultravioleta Visível e até mesmo a espectroscopia no Infravermelho Próximo (do inglês, Near Infrared, NIR). Esta última tem uma particularidade, representa uma das técnicas não destrutiva de análise [5-7].

1.1. TUBERCULOSE E OS FÁRMACOS

A tuberculose (TB) é uma doença contagiosa grave, considerada uma das mais antigas, historiadores encontraram relatos de médicos na Grécia e na Roma antiga e, atualmente, acredita-se que esta doença já era conhecida também no antigo Egito e em sociedades pré-colombianas, já que pesquisadores encontraram lesões de tuberculose em múmias [3,4].

Os séculos XVII e XVIII foram marcados pela “peste branca” ou como conhecida na época por “doença romântica”, a tuberculose atingiu altos índices de mortalidade no continente europeu, principalmente em função de deficiências nas condições de higiene, nutrição e habitação.

O termo tuberculose só começou a ser utilizado em 1839, sendo derivado do latim *tubercula* (protuberância pequena), que faz referência as pequenas cicatrizes observada em órgãos de indivíduos infectados. Esse tipo de diagnóstico só foi possível a partir de 1824, após as invenções do estetoscópio e dos raios-X, no final do Século XIX, permitindo a produção (visualização) das imagens das partes internas do corpo, facilitando ainda mais a identificação da tuberculose. Em 1882, o bacteriologista inglês Robert Koch identificou o agente causador da enfermidade, a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), também chamada de Bacilo de Koch (BK) em homenagem ao seu descobridor [3,4]. Ainda hoje, a tuberculose continua sendo um grave problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento, voltando a ocupar papel de destaque entre as principais doenças infecto-contagiosas. Sendo alvo de constantes campanhas de prevenção e tratamento.

Muitos foram os fatores que contribuíram para isso, podendo-se destacar a desigualdade social, os aglomerados populacionais, os movimentos migratórios, o envelhecimento da população, o aparecimento cada vez mais comum de cepas de bacilos resistentes aos fármacos conhecidos e o surgimento, na década de 80, da “AIDS” (do inglês AIDS, *Acquired Immuno Deficiency Syndrome*), doença que afeta o sistema imunológico permitindo o avanço da tuberculose.

Na última década, 300 milhões de pessoas foram infectadas, 90 milhões de novos casos da doença foram notificados e cerca de 30 milhões morreram. Em 1993, a tuberculose foi declarada emergência global pela Organização Mundial da Saúde - WHO (do inglês, *World Health Organization*).

Atualmente a tuberculose mata no mundo aproximadamente 3,0 milhões de pessoas por ano, incluindo mais adultos que a AIDS, a malária e as doenças tropicais combinadas. Estima-se que cerca 70 % da população pobre esteja infectada pelo bacilo de Koch, onde também se concentra o maior índice de mortes. Já nos países ricos esse número é menor que 10%, com uma estatística anual de mais de 400.000 novos casos e cerca de 40.000 mortes.

Em 2005 o Brasil ocupava o 13º lugar no *ranking* dos 22 países que concentram 80% dos casos de tuberculose no mundo. O estado do Rio de Janeiro apresenta o maior número de casos registrados. Segundo dados recentes publicados pelo Ministério da Saúde, em seu portal de notícias, os casos de Tuberculose Pulmonar na Favela da Rocinha já são superiores ao registrados em países como o Paquistão ou regiões da Índia.

A TB é transmitida basicamente pelo ar e pode atingir todos os órgãos do corpo, existindo várias formas de tuberculose (pulmonar, meníngea, biliar, óssea, renal, cutânea, genital, etc.). O pulmão é o principal órgão atingido pela doença. O sintoma mais freqüente da TB pulmonar no adulto é o Sintomático Respiratório correspondem à tosse por mais de três semanas.

Os exames usados na tentativa do diagnóstico são a baciloscopia do escarro, a radiologia do tórax e o teste tuberculínico, que evidencia o contato prévio com o bacilo. A descoberta dos fármacos no combate a tuberculose

pode ser associada ao primeiro antibiótico a que o homem teve acesso, a penicilina, descoberta acidentalmente em 1928 por Alexander Fleming numa cultura do fungo *Penicillium*. No entanto, apenas em 1941 apareceu no mercado a primeira forma injetável para uso terapêutico. Apesar de a penicilina, ser um fármaco extremamente eficaz contra diversas doenças, e a primeira defesa real contra infecções causadas por bactérias, mostrou-se curiosamente ineficaz contra a tuberculose [3,4].

Foram necessários quinze anos após a importante descoberta de Fleming para que Selman Waksman descobrisse, em 1944, a estreptomicina (SM). Produzida por um microrganismo encontrado na garganta da galinha (*Streptomyces griseus*), a estreptomicina (SM) foi o primeiro antibiótico capaz de atuar de maneira eficaz no combate a tuberculose [3,4].

O tratamento convencional da tuberculose no Brasil separa os fármacos em duas categorias principais: agentes de primeira linha, que incluem a isoniazida (INH), sintetizada em 1952; a rifampicina (RIF), sintetizada em 1965; o etambutol (EMB), ((2S,2'S)-2,2'-(etano-1,2-diilbis(azanodiil))dibutan-1-ol), cuja estrutura pode ser visualizada na Figura 01, sintetizada em 1960 e a Pirazinamida (PZA), sintetizada em 1936; e de segunda linha, como ofloxacinas, claritoromicina, etionamida e ácidos aminossalicílicos [3,4].

Rifampicina (3 - [4 metilpiperaziniliminometil] - rifamicina SV), isoniazida (hidrazida do ácido isonicotínico) e pirazinamida (pirazinacarboxamida), vistos na Figura 01, são usados durante o tratamento inicial da tuberculose pulmonar. Esta combinação é mais eficaz do que cada um dos fármacos isoladamente, por conta da conhecida resistência às drogas do bacilo [5,7].

A rifampicina é um dos mais efetivos agentes de combate ao bacilo disponível. Inibe a síntese do RNA bacteriano, interferindo com a polimerase DNA. Ela é absorvida de forma rápida e quase total [4].

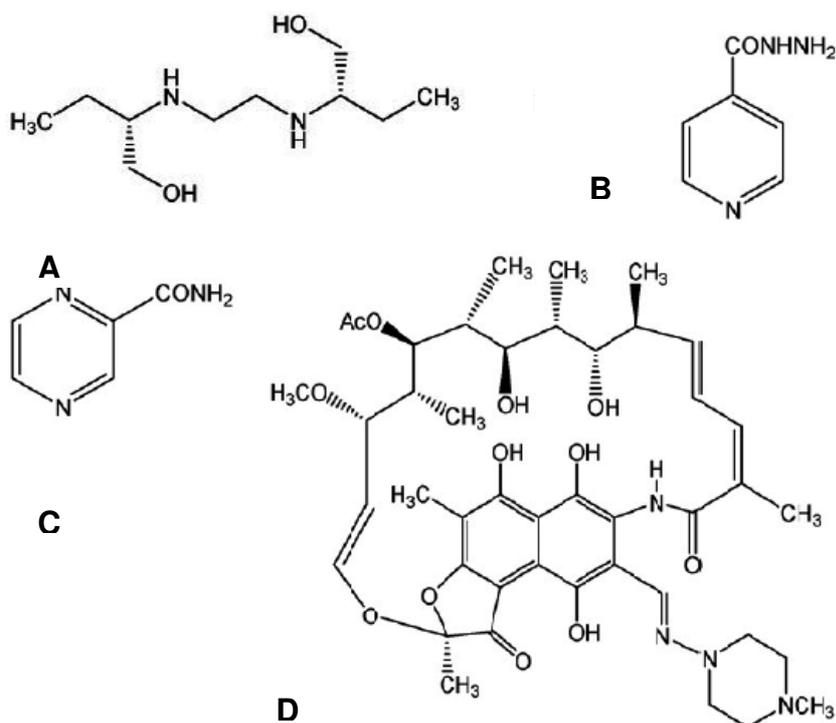


Figura 01. Estruturas moleculares dos fármacos: (A) Etambutol, (B) Isoniazida, (C) Pirazinamida, e (D) Rifampicina.

Isoniazida é utilizada no tratamento e na profilaxia da tuberculose (em combinação com outros agentes). Considera-se que a sua ação bactericida reflete-se tanto sobre os bacilos na etapa de repouso quanto aqueles estão em fase de divisão rápida [4].

Rifampicina (RIF) que é administrado juntamente com isoniazida (INH) pirazinamida (PZA) também é usado no combate a infecções por bactérias de maior resistência. Formulações combinadas foram introduzidas para melhorar aceitabilidade e conformidade, enquanto que a terapia de curto curso intermitente foi usada para reduzir as reações adversas e melhorar a qualidade de vida do paciente. Entretanto, este é um grande problema na utilização destes fármacos, tem-se um elevado número de doses e efeitos colaterais. Outro grande problema na utilização de tais fármacos são os pacientes portadores de bacilos multi resistentes. O problema da toxicidade da droga durante o tratamento afeta pacientes com vírus da imunodeficiência (HIV) [5,6] Por não estarem mais protegidos por patentes, os fármacos de primeira escolha, INH, RIF, PZA e EMB apresentam baixo custo [4-7].

O etambutol é bacteriostático contra a Tuberculose que atua ativamente no crescendo dos bacilos. Ele funciona por obstruir a formação da parede celular e interrompe a síntese arabinogalactana por inibir a enzima transferase arabinose. Inibe a formação deste complexo e leva ao aumento da permeabilidade da parede celular.

A pirazinamida é um quimioterápico derivado da pirazina, com efeito bactericida sobre o *Mycobacterium tuberculosis*, empregado como medicamento de primeira escolha para acompanhar em casos de resistência ou intolerância à isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomicina. Sua característica clínica mais destacada é sua ação em meio ácido (lesões caseosas cavitárias) e intracelular em macrófagos, contra bactérias em crescimento lento; por isso integra o grupo (isoniazida + rifampicina + estreptomicina + pirazinamida) de antibióticos empregados atualmente para esquemas de tratamento abreviado durante os primeiros dois meses. Seu mecanismo de ação ainda não foi esclarecido, mas se comprovou que reduz a captação de oxigênio pelo bacilo tuberculoso que dessa forma é afetado pelas defesas biológicas do paciente.

1.1.1. NUPLAM

Para o tratamento da tuberculose pulmonar tem-se iniciado no Brasil com o suporte do Ministério da Saúde o uso de medicamentos chamados 4 em 1, INH, RIF, PZA e EMB, de forma a ter uma dose única combinada. Dos poucos laboratórios a pesquisarem esta formulação atualmente, tem-se o NUPLAM (da sigla, Núcleo de Pesquisas em alimentos e Medicamentos) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

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 [40].

Através da Resolução n° 49/77 CONSUNI, de 1° de Novembro de 1977, o NIQUIFAR tornou-se fundação, passando a se chamar Fundação Universitária do Alimento e do Medicamento (FUNAM). Com a Portaria n° 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 [41].

Após um período de paralisação de suas atividades, o NUPLAM reabriu com projetos inovadores em que o ensino, a pesquisa e a extensão estão indissociados. Assim, o NUPLAM hoje é um espaço acadêmico privilegiado, onde o conhecimento é produzido e difundido em função e através das atividades de fabricação e distribuição de medicamentos [40].

1.2. MÉTODOS ANALÍTICOS CLÁSSICOS NA DETERMINAÇÃO DA DUREZA EM FORMULAÇÕES FARMACEUTICAS PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PULMONAR

A indústria farmacêutica realiza diferentes ensaios para determinar a qualidade e a eficácia em medicamentos, para atender uma legislação cada vez mais rigorosa, mesmo depois destes medicamentos chegarem às farmácias. Existem parâmetros físico-químicos (solubilidade, dissolução, pH), físicos (friabilidade, dureza e desintegração) e biológicos, chamados de bio equivalências [21].

Dureza é a resistência do comprimido ao esmagamento ou a ruptura sob pressão radial, e é proporcional ao logaritmo da força de compressão e inversamente proporcional a porosidade. O teste consiste em submeter o comprimido à ação de um aparelho que meça a força aplicada diametralmente, necessária para esmagá-lo. Para testes de comprimidos a dureza mínima aceitável é de 30N (aproximadamente 3kgf). Os comprimidos devem ser suficientemente duros de modo a resistir à quebra durante a embalagem, o transporte ou a manipulação convencional, sendo, contudo, habilitados para dissolver ou desintegrar apropriadamente depois de administrados, ou para serem partidos com os dedos, quando se fizer necessário tomar uma dose

parcial. Há vários tipos de durômetros, o eletrônico que a compressão é feita por uma bomba de ar e o durômetro manual [26-28].

A respeito da dureza apenas a farmacopéia brasileira cita, a força mínima necessária é de 3 Kgf abaixo disso o comprimido é impróprio para consumo.

Para parâmetros físicos como a dureza tem como método de referencia, também usado neste caso, o durômetro eletrônico feito por compressão com a bomba de ar, existente no NUPLAM.

1.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

A radiação no Infravermelho Próximo compreende a região usualmente delimitada entre os comprimentos de onda de 800 a 2500 nm do espectro eletromagnético, situada entre a região de luz visível e o infravermelho médio [11].

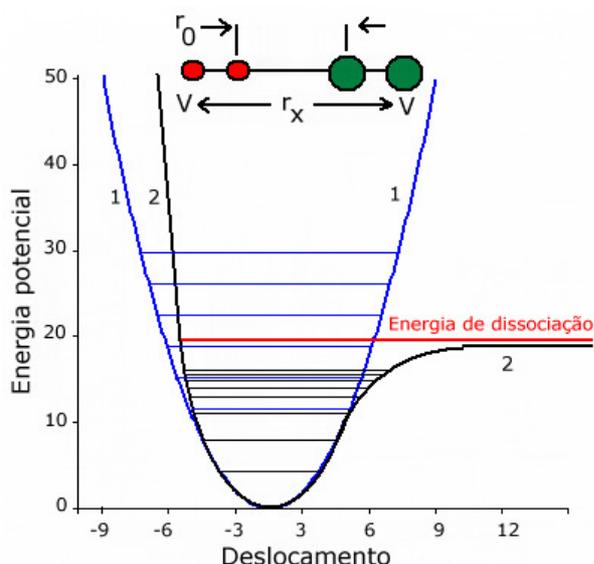


Figura 02 - Diagrama da energia potencial de oscilador: (1) harmônico e (2) anarmônico. (Fonte: SKOOG et al, 2006, p,686)

Assumindo o modelo de oscilador harmônico conforme Figura 02 e levando em consideração a teoria sobre a vibração das moléculas leva a compreensão de que a radiação de uma determinada frequência, capaz de

fornecer exatamente a energia entre dois níveis vibracionais ou de seus tons ou combinações de duas ou mais vibrações, pode ser absorvido pela molécula e pode produzir excitação para um maior nível de energia vibracional [31].

A existência de energia de radiação com a diferença de energia entre dois níveis vibracionais provoca uma resposta seletiva do sistema molecular com a radiação incidente. Isso significa que em um determinado comprimento de onda, algumas frequências serão absorvidas, os outros (que não corresponde a nenhuma das diferenças de energia possível para que a molécula) não serão absorvidos, enquanto alguns vão ser parcialmente absorvidos [8,10-12,25]

Somente a energia entre fótons e níveis de vibração, não é suficiente para a absorção de radiação. Para uma vibração vir a ser ativa, é necessário que a oscilação no campo elétrico da onda eletromagnética (luz) possa interagir com a molécula. Isso só pode ocorrer se o deslocamento dos átomos em um modo vibracional produza uma mudança no momento dipolar da molécula ou do grupo local de átomos vibrantes. Embora isto seja verdade, considerando um modo fundamental, é importante ressaltar que, para as bandas de combinação permitidas pela anarmonicidade, seria necessário que apenas uma das vibrações que combina estar ativo (causando mudanças dipolo). Esta característica pode causar algumas vibrações, o que não pode ser observada no infravermelho médio, passa a ser exibido por um espectro NIR [8,10,25].

A intensidade de uma banda de absorção está associada com a magnitude da mudança dipolo durante o deslocamento de átomos em uma vibração e com seu grau de anarmonicidade. Ambos os fenômenos estão presentes em grande intensidade e associados com ligações envolvendo o átomo de hidrogênio e outros mais pesados e alguns outros elementos, tais como, nitrogênio, carbono e enxofre. As ligações OH, CH, NH e SH tendem a apresentar anarmonicidade alta e alta energia de ligação fundamental com transições vibracionais na região de 3000 - 4000 nm. Portanto, permite prever o sobretons e combinações de vibrações fundamentais desses tipos para ocorrer na região de energia associada com fótons NIR [8,25].

Ocorrências espectrais na região NIR são dominadas por sobretons e combinação de bandas de absorção. No entanto, alguns outros efeitos podem ser observados e contribuir para a complexidade do espectro NIR (acoplamento ou ressonância entre as vibrações diferentes do mesmo grupo funcional) [25].

As bandas de absorção NIR são tipicamente largas. Essa característica restringe severamente sensibilidade no sentido clássico da espectroscopia, mas pode ser usada no processamento de informações relacionadas às propriedades espectrais da amostra por meio de dados quimiométricos. O baixo coeficiente de absorção, entretanto, permite alta profundidade e, portanto, um ajuste da espessura da amostra. Este aspecto é realmente uma vantagem analítica, uma vez que permite a análise direta da forte absorção e mesmo altamente amostras de espalhamento, tais como líquidos turvos ou sólidos em qualquer modo de transmitância ou refletância, sem que a amostra receba pré-tratamentos complementares [10,11,23,25].

A dupla dependência do sinal analítico sobre as propriedades químicas e físicas da amostra, resultante de efeitos de dispersão e absorção, também podem ser úteis para realizar análise de uma única medição de propriedades químicas e físicas como a dureza ou dissolução de comprimidos [10,26-28].

Os espectros NIR são tipicamente compostos por ampla sobreposição e, assim, definida a bandas absorção contem informações químicas e físicas de todos os componentes da amostra, as informações de análise multivariada, é na natureza da amostra e, portanto, é seletiva. Para realizar a análise quantitativa ou qualitativa em NIR, ou seja, relacionar às variáveis espectrais as propriedades da substância, métodos matemáticos e estatísticos (quimiometria, por exemplo) são necessários para extrair informações relevantes e reduzir os interferentes, as informações importantes, ou seja, os parâmetros de referência, neste trabalho, a dureza em comprimidos [10,11,21,23].

De fato, o desenvolvimento de qualquer método analítico com base no NIR deve ser precedido por um exercício exaustivo como objetivo correlacionar o conhecimento químico sobre da amostra, normalmente disponível de

antemão, e recursos espectroscópicos ou vice-versa. Os resultados deste exercício poderão antecipar ocorrências espectrais, sua intensidade, e os possíveis efeitos de parâmetros, como temperatura, no espectro infravermelho próximo e das melhores regiões de comprimento de onda para procurar qualitativa ou quantitativamente as informações relevantes [10,23,25].

1.4. FERRAMENTAS QUIMIOMETRICAS

Quimiometria é uma nova disciplina que se refere ao tratamento estatístico e computacional dos dados químicos e, nos últimos 30 anos vem se desenvolvendo aliada com a crescente sofisticação da instrumentação e processos químicos. Assim proporcionando novas ferramentas para melhorar o *design* experimental e a otimização de processos na finalidade de melhorar as estratégias de calibração multivariada. A capacidade de técnicas de análise para a produção de informações e a necessidade de integrar não apenas dados físicos e químicos, mas também dados adicionais para obter uma boa imagem dos elementos envolvidos na resolução de problemas exigem o desenvolvimento e a utilização de ferramentas de cálculo poderosas para a avaliação de dados (como dados de análise de variância, calibração e estratégias) e também para a otimização das variáveis de análise e planejamento [2,18,19,37].

A Quimiometria usa a matemática, estatística e lógica formal (a) para projetar ou selecionar melhor os procedimentos experimentais, (b) para fornecer o máximo de informações químicas relevantes por meio da análise de dados químicos, (c) para obter conhecimento sobre sistemas químicos, (d) adequação de modelos estatísticos para o tamanho das populações de dados analíticos, (e) tratamento do problema com precisão, (f) planejamento de amostragem em função das variáveis que poderiam afetar os dados, (g) otimização de parâmetros de calibração dos analíticos, a calibração multivariada, (h) integração principalmente em dados obtidos de diferentes fontes de desenvolvimento de modelos de comportamento e modelos de

previsão de automação completa de medição e controle de processos [2,18, 19,37].

O processo de calibração pode ser definido como uma série de operações que estabelecem, sob condições específicas, uma relação entre medidas instrumentais e os valores correspondentes à propriedade de interesse realizada em padrões. Entre os métodos de calibração existentes, sem dúvida, os mais difundidos são os métodos univariados, onde se tem apenas uma medida instrumental para cada uma das amostras de calibração. Esses métodos são relativamente fáceis de serem aplicados, validados e se encontram descritos na literatura em vários trabalhos. Porém, a aplicação de modelos univariados é restrita a situações em que a grandeza que é medida diretamente no sistema (ex.: absorvância de um composto) é livre de interferentes que possam provocar desvios entre sua relação linear com a propriedade de interesse [13 – 20].

Em métodos de Calibração Multivariada duas ou mais respostas instrumentais são relacionadas com a propriedade de interesse. Esses métodos possibilitam análises mesmo na presença de interferentes, desde que estejam presentes nas amostras de calibração, determinações simultâneas, análises sem resolução etc. Isso faz com que, modelos de Calibração Multivariada sejam uma alternativa quando métodos univariados não podem ser aplicados [13 – 20].

Os métodos de calibração existentes podem ser divididos quanto à complexidade ou dimensionalidade dos dados, em calibração de ordem zero, primeira e segunda ordem. Métodos de calibração de primeira ordem fazem uso de um vetor de medidas instrumentais para cada amostra. Dentre os modelos de calibração multivariada de primeira ordem os mais empregados são a Regressão por Componentes Principais (do inglês, PCR - *Principal Component Regression*) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, PLS – *Partial Least Squares*) [14,20].

1.4.1. ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise de componentes principais tem por objetivo descrever os dados contidos num quadro indivíduos-variáveis numéricos: p variáveis serão mediadas com n indivíduos. Esta é considerada um método fatorial, pois a redução do número de variáveis não se faz por uma simples seleção de algumas variáveis, mas pela construção de novas variáveis sintéticas, obtidas pela combinação linear das variáveis iniciais, por meio dos fatores [15].

A ACP é uma técnica matemática da análise multivariada, que possibilita investigações com um grande número de dados disponíveis. Possibilita, também, a identificação das medidas responsáveis pelas maiores variações entre os resultados, sem perdas significativas de informações. Além disso, transforma um conjunto original de variáveis em outro conjunto: os componentes principais (CP) de dimensões equivalentes. Essa transformação, em outro conjunto de variáveis, ocorre com a menor perda de informação possível, sendo que esta também busca eliminar algumas variáveis originais que possuam pouca informação. Essa redução de variáveis só será possível se as p variáveis iniciais não forem independentes e possuírem coeficientes de correlação não-nulos [13,15].

O primeiro componente principal PC1, é definida na direção da máxima variância dos dados de todo o conjunto. PC2 é a direção que descreve a variação máxima no subespaço ortogonal a PC1. Os componentes seguintes são tomadas ortogonais aos previamente escolhidos e descrever o máximo da variância restante [23]. Uma vez que os demais são removidos, apenas os primeiros componentes principais são necessários para descrever a maioria das informações contidas no conjunto de dados original. Os dados da matriz X ($I \times J$) correspondente a I moléculas e descritores J , é decomposta em duas matrizes, T e L , tal que

$$\mathbf{X} = \mathbf{TL}^T \quad \text{equação 1}$$

A matriz T , conhecido como o "score" da matriz, representa as posições dos compostos no sistema de novas coordenadas. Considerando que os PC

são os eixos. L é o "loading" matriz cujas colunas descrevem como o novo eixo [8,13,15]

1.4.2. REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS

Regressão por Mínimos quadrados parciais (PLS) é o método normalmente utilizado em análises de calibração multivariada. Para a construção do modelo de calibração, os dados são dispostos na forma de matrizes: Matriz **X** e Matriz **Y** que contêm os dados de variáveis independentes x e dependentes y, respectivamente. Estas matrizes são decompostas em uma soma de produtos de dois vetores, os *scores* e os *loadings*, obtendo-se os seguintes modelos:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^t + \mathbf{E} \quad \text{equação 2}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{TQ}^t + \mathbf{F} \quad \text{equação 3}$$

onde T corresponde à matriz de *scores*, P e Q são os *loadings* para X e Y, respectivamente e E, F representam matriz de resíduos espectrais e matriz dos resíduos de propriedade.

O sobrescrito *t* indica a matriz transposta. 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. Para que se encontre melhor correlação possível, torna-se importante manipular a informação desses dois blocos simultaneamente. No PLS isto é feito por uma leve rotação das componentes principais (devido a esta rotação, são chamadas agora de variáveis latentes), com conseqüente mudança nos valores dos *scores*. O número de variáveis latentes utilizado no processo de calibração é obtido por meio de validação cruzada, que é uma metodologia baseada na magnitude dos erros de previsão de um dado modelo de calibração. Depois de estabelecidos o número de variáveis latentes e o modelo, este pode ser destinado à previsão dos parâmetros de novas amostras. As propriedades de novas amostras pode ser estimada a partir dos novos *scores* T* e dos *loadings* Q do modelo de calibração, que podem ser substituídos na equação 2 , obtendo-se a equação 3 [16].

$$Y_n = T \cdot Q^t$$

equação 4

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo investigar a possibilidade de utilizar a técnica da Espectroscopia no Infravermelho Próximo juntamente com as ferramentas de calibração multivariada na determinação de dureza em formulações farmacêuticas voltadas ao tratamento da tuberculose pulmonar produzidos pelo NUPLAM - UFRN.

3. EXPERIMENTAL

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Neste trabalho foi utilizado Espectrofotômetro no Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier da marca Bomem, modelo MB 160 SERIES, com acessório de refletância difusa, Figura 03, localizado no NEPPGN (Núcleo de Estudos e Pesquisas em Petróleo e Gás Natural), Departamento de Química. Para auxiliar na obtenção dos espectros tem-se a utilização de um aparato confeccionado em formato cilíndrico com cavidade apropriada ao comprimido.

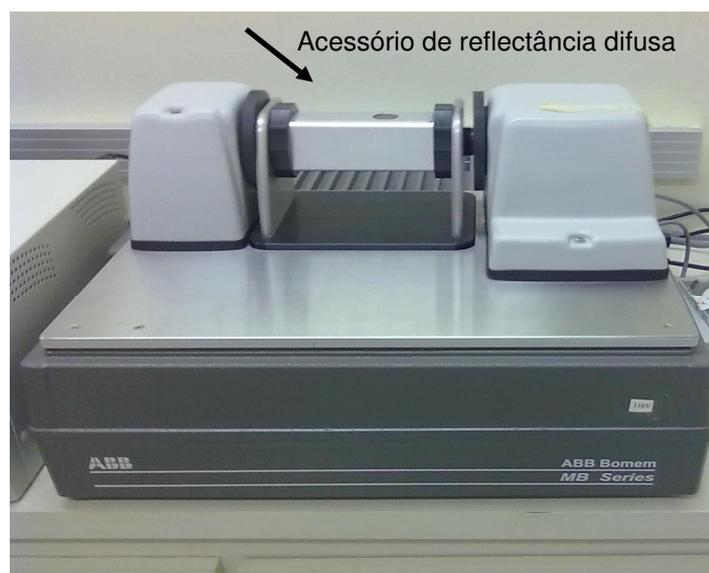


Figura 03 - Espectrofotômetro de Infravermelho Próximo com acessório de refletância difusa.

O durômetro eletrônico feito por compressão com a bomba de ar, existente no NUPLAM, para o controle de qualidade é da marca Varian VK200, Figura 03, e imprime os resultados em Kgf. – Quilograma força.

3.2. COMPOSIÇÃO DOS COMPRIMIDOS

A formulação farmacêutica utilizada para estudo da dureza foi o chamado 4 em 1, composto por INH, RIF, PZA e EMB, excipientes contendo amido, glicolato de sódio, estearato de magnésio, talco e celulose, em forma de comprimidos ainda não revestidos, gentilmente cedidos pelo NUPLAM.

3.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS

Tanto dureza dos comprimidos e variações no posicionamento da amostra pode afetar a linha de base espectral. Para minimizar o deslocamento da linha de base devido ao posicionamento da amostra, todos os espectros foram coletados em triplicata. Após a coleta dos espectros, as amostras foram submetidas ao ensaio destrutivo [20,26, 36-39].

Cada espectro foi obtido como uma média de 50 varreduras, com o intervalo de comprimento de onda entre 700 e 2500 nm, e em Absorbância *versus* comprimento de onda, registrando-se um espectro como branco a cada análise de cerca de 50 amostras de comprimidos. Os espectros foram arquivados em formato SPC, para terem seus dados transferidos para o UNSCRAMBLER 9.1 [22].

3.3.2. OBTENÇÃO DA DUREZA – MÉTODO DE REFERÊNCIA

As 157 amostras dos comprimidos submetidos à varredura no Espectrofotômetro no Infravermelho Próximo foram levadas ao setor de controle de qualidade do NUPLAM para o ensaio destrutivo de dureza.



Figura 04 - Durômetro Varian VK 200 existente no NUPLAM – UFRN.

Em qualquer estudo envolvendo determinações de dureza em comprimido via resistência à compressão, deve ser lembrado que o teste de dureza é uma ciência inexata, e é influenciado por uma série de fatores físicos e mecânicos das amostras e do analista [26, 27].

Dentre estes fatores encontra-se a granulação, esta aumenta o tamanho de partícula do produto a fim de facilitar a alimentação uniforme para as máquinas de prensagem e reprodutível preenchimento de matriz do comprimido. Isso resulta em compactação uniforme das partículas do produto e garante a uniformidade de peso do comprimido e constância nas propriedades físico-mecânicas (dureza, friabilidade) do produto [8,26,28, 29].

3.4. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Os dados dos espectros obtidos foram importados para o *software* Unscrambler 9.1 da Camo S.A. para realizar as etapas de pré-tratamento e construção dos modelos de calibração multivariada.

Determinados fatores interferem nos parâmetros espectrais, tais como espalhamento de luz, variações de caminho ótico e ruído aleatório, resultante da variação de propriedades físicas da amostra ou efeitos instrumentais, para correção desses fatores têm-se o uso de operações matemáticas, chamada de

pré-tratamentos de dados, assim, antes de modelagem multivariada, a fim de reduzir, eliminar ou padronizar seus impactos sobre os espectros. Esta cuidadosa seleção de pré-tratamentos de dados pode melhorar significativamente a robustez de um modelo de calibração. Uma ferramenta comum para pré-processamento inclui a correção do espalhamento multiplicativo (MSC) e alisamento por Savitzky-Golay [22-24].

O Savitzky-Golay é o mais comumente usado em sinal de nivelamento e de diferenciação em quimiometria. O algoritmo SG envolve a realização de um ajuste de regressão linear de mínimos quadrados de um polinômio de grau n sobre uma janela de pelo menos $n + 1$ pontos de dados ao redor de cada ponto do espectro para suavizar os dados. O valor adequado para o ponto na posição substitui o valor medido. Após esta operação, a janela é deslocada de um ponto e o processo é repetido até que a última janela é atingida [32].

Para executar uma operação de nivelamento utilizando o método SG, é necessário selecionar a ordem do polinômio e tamanho da janela. Uma desvantagem do uso de derivativos é que eles diminuem a relação sinal / ruído, aumentando o ruído. Por esta razão alisamento é necessário antes de diferenciação. Em SG método de alisamento é feito antes da diferenciação, e a operação é comumente aplicada em matemática ou vários softwares de processamento de sinal [32].

Neste trabalho fez-se a seleção do melhor intervalo de comprimento de onda, no qual se pode eliminar boa parte do ruído, em seguida tem-se a fase de pré-tratamento e construção do modelo por meio da análise de componentes principais e PLS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio destrutivo de dureza em 157 amostras foram obtidos valores entre 10,80 Kgf. e 20,50 Kgf. Estes valores reais foram utilizados para a construção de modelos de calibração multivariada [26].

As bandas absorção mais proeminentes que ocorrem na região NIR são relacionadas com sobretons e combinações de vibrações fundamentais dos grupos funcionais C-H, N-H e O-H, conforme se pode visualizar na Figura 05.

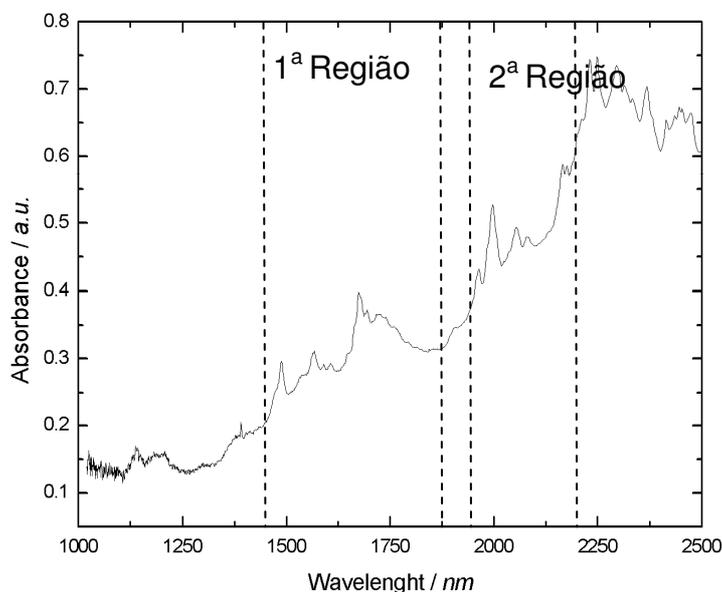


Figura 05 - Espectro NIR original de uma amostra de comprimido 4 em 1 para tratamento da TB.

Podem-se visualizar duas faixas espectrais: 1440-1800 nm e 1925-2185 nm, que são devidas principalmente aos 1º e 3º sobretons de ligações N-H em amidas, 1º sobretom de ligações C-H na primeira região e 2º sobretom de ligações N-H em amidas, 2º sobretom de ligações C=O em amidas, bandas de combinação de ligações O-H (água) e N-H de amins na segunda região.

Os espectros obtidos no infravermelho próximo apresentaram um acentuado desvio de linha base, o que pode ser visualizado na Figura 06. As principais causas desse desvio de linha de base são espalhamentos aditivos, que provocam o deslocamento do espectro na vertical e espalhamentos multiplicativos, que provocam uma inclinação da linha base do espectro [20,23].

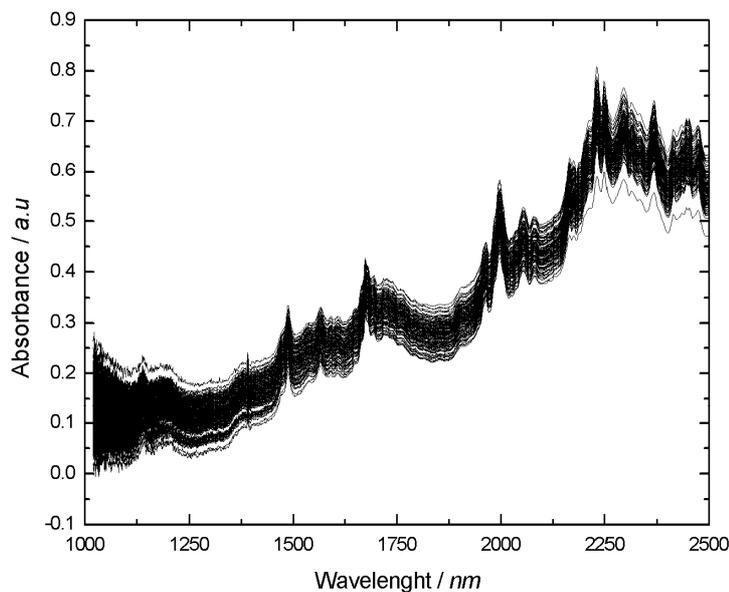


Figura 06 - Espectros originais NIR de 157 amostras de comprimidos 4 em 1 para tratamento da TB.

Realizaram-se os seguintes pré – tratamentos para o conjunto de espectros originais em busca do melhor modelo de classificação e regressão para esta matriz de dados: Correção de Espalhamento Multiplicativo de luz (MSC), alisamento e 1ª Savitzky-Golay. Construiu-se um conjunto de dados com 157 espectros (amostras) e 1541 variáveis (comprimentos de onda), representado por uma matriz (157 x 1541), extraído da Figura 06.

Neste estudo, após a realização do método de alisamento Savitzky-Golay, com número de janelas variando entre 5 e 15 pontos e polinômio de primeira e segunda ordem, os espectros foram submetidos à correção de espalhamento multiplicativo de luz, cuja finalidade foi minimizar os efeitos de luz que ocorrem durante a aquisição dos espectros, devido a algumas diferenças nas partículas das amostras tais como granulometria, morfologia e geometria [31].

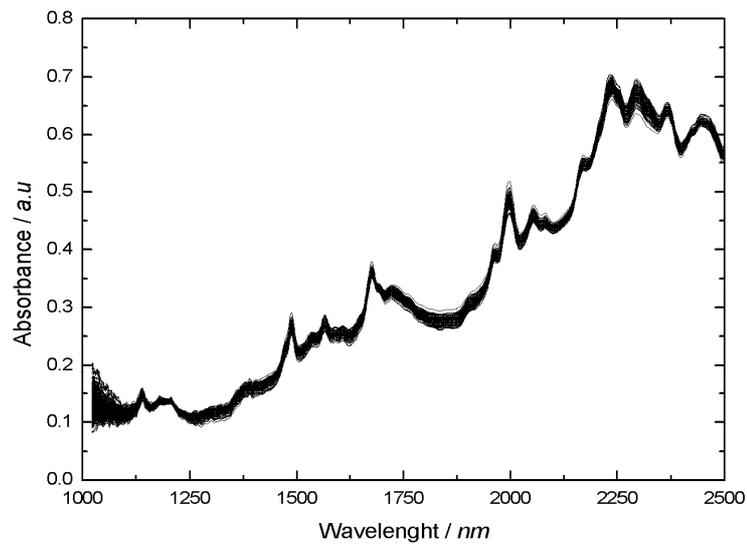


Figura 07 – Espectros NIR de 157 amostras de comprimidos para TB depois de submetidos à pré-tratamentos de suavização, MSC.

O MSC é empregado como um pré-tratamento dos dados antes da aplicação de qualquer técnica quimiométricas, seu resultado é observado na figura 08. Realizando nova suavização para correção de linha base, conforme o método de Savitzky-Golay.

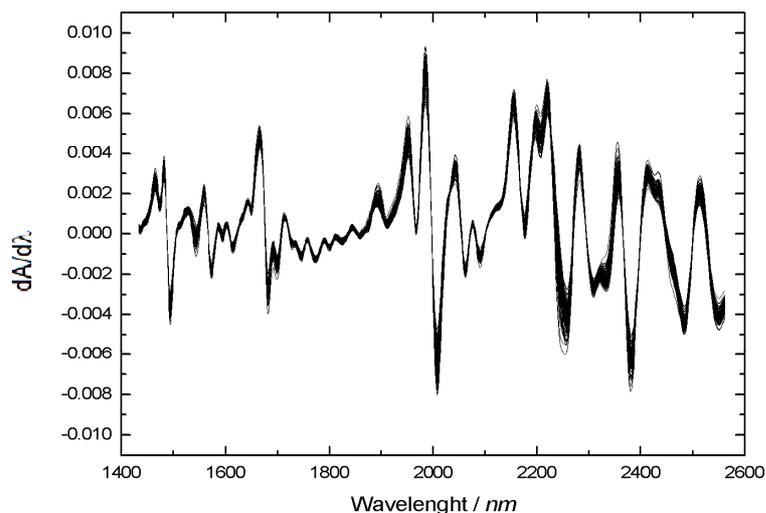


Figura 08 - Espectros NIR derivativos finais de 157 amostras de comprimidos depois de submetidos aos pré-tratamentos.

A Figura 08 demonstra que se aplicando aos espectros a primeira derivada e polinômio de primeira ordem, utilizando-se janela com cinco pontos, obtém-se um melhor modelo para classificação.

Após a realização das etapas de pré-tratamento, a matriz de dados dos espectros versus os valores de dureza dado pelo método de referência, aplicou-se a ACP em um intervalo de 1433 a 2561 nm.

Na análise farmacêutica por NIR, muitas vezes é possível comprimir mais a variabilidade espectral para apenas uma entidade de alguns componentes, fatores, ou seja, com pequena perda de informação. Um número de amostras de calibração e métodos de classificação, portanto, dependem de dados obtidos na ACP [9-13,25].

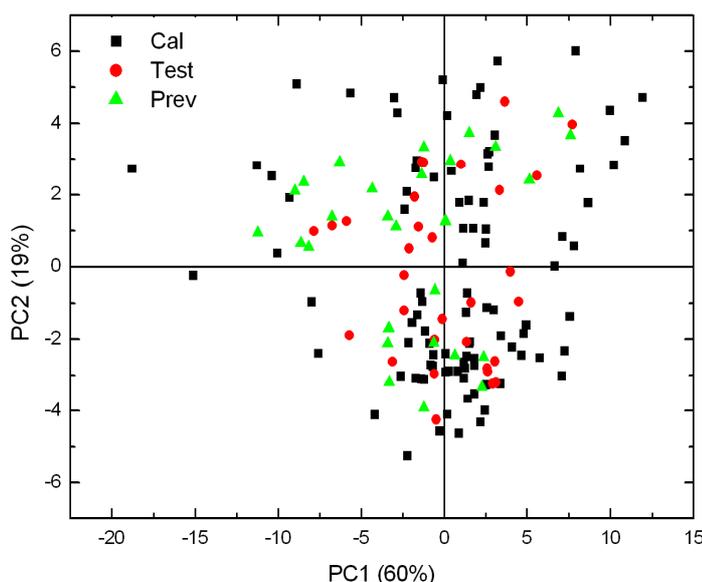


Figura 09 - Análise dos Componentes Principais.

A Figura 09 mostra o gráfico dos escores da ACP para o resultado com 1ª derivada e suavização de 5 pontos. Nessa etapa, cada amostra é tratada de forma independente, sem nenhum tipo de colinearidade. Tem-se que a CP1 (60%) é definida na direção de máxima variância dos dados de todo o conjunto de amostras, já CP2 (19%) está descrita na direção que descreve a variação máxima no subespaço ortogonal a CP1.

O objetivo aqui é escolher o modelo de calibração mais preciso possível e para estimar quanto ele irá realizar em amostras de futuro. Como uma quantidade suficiente de amostras de calibração está disponível, o melhor método para selecionar e validar um modelo é dividir o conjunto de calibração em três subgrupos. Um conjunto é empregado para a construção de todos os modelos a serem considerados. O segundo conjunto é usado para escolher o melhor modelo em termos de exatidão e precisão. O terceiro conjunto é empregado para estimar o desempenho do modelo escolhido em dados futuros [8].

Assim, o conjunto de dados foi dividido em conjuntos de calibração, validação e previsão, depois de ter todas as medidas coletadas. Esta divisão foi baseada na análise de componentes principais (ACP) [23]. O conjunto de calibração consistiu em 95 amostras medidas. O conjunto de validação e previsão consistiu em 31 amostras cada um, para a construção de modelos confiáveis, já que para um ajuste satisfatório do modelo espectral se faz necessário que se tenha a mesma quantidade de amostras a serem usadas em validação e previsão [9-13,19,22] sendo visualizado na Figura 09.

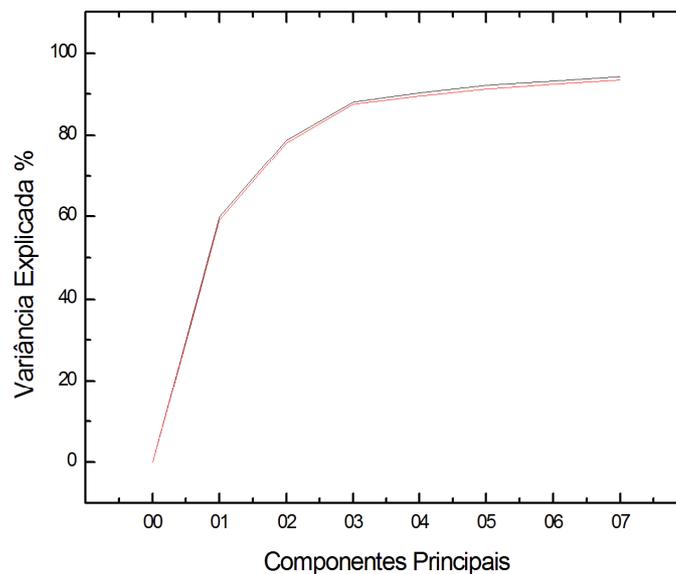


Figura 10 - Variância Explicada *versus* Componentes Principais.

Pelo gráfico da variância explicada, Figura 10, é possível observar quais e quantos CP são significativos para descrever o conjunto de dados, estes contemplam o máximo de informação útil ao modelo, com o mínimo de influência causada pelos ruídos, neste caso, tem-se o número ótimo de sete componentes principais. Ultrapassando este valor, as componentes passam a contemplar também os ruídos ou sinais que não são de interesse.

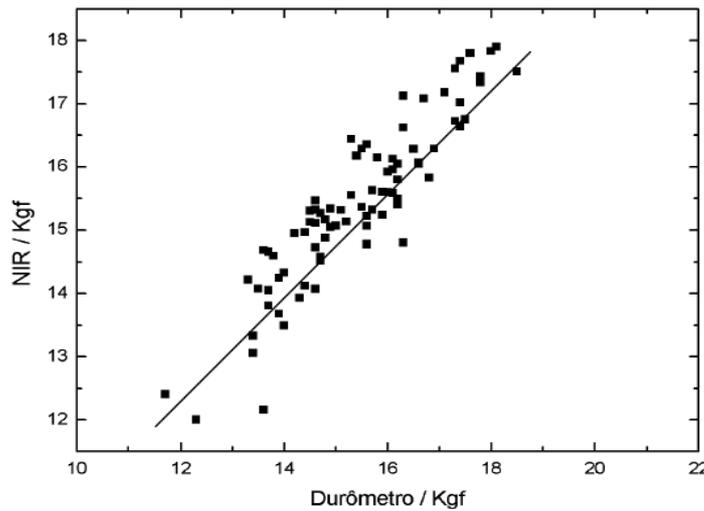


Figura 11 - Valores preditos *versus* valores do método de referência (durômetro).

O modelo adotado, o de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), foi construído com os dados obtidos a partir dos espectros na região do infravermelho próximo (ensaio não destrutivo) e valores obtidos pelo método de referência (ensaio destrutivo) em comprimidos 4 em 1 para TB utilizando o durômetro visto na Figura 04.

Para a avaliação dos modelos de calibrações obtidos, foram empregados cálculos de erro quadrático médio de previsão (RMSEP) representado pela Equação abaixo:

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

equação 5

Onde y_{real} são os valores reais de dureza e para y , y_{prev} são os valores encontrados pelo modelo construído e n é o número de amostras utilizadas, que neste trabalho são 31 amostras [20,25]. O PLS encontra as direções de maior variabilidade, comparando espectrais e propriedade da informação alvo, dureza, com os novos eixos, chamado componentes PLS ou fatores PLS [10]. Representando, assim, as variações mais relevantes, mostrando a melhor correlação com os valores de dureza obtidos e preditos [16,19].

No gráfico de escores, Figura 11, os pontos que apresentam maior desvio do comportamento linear não devem ser encarados como indício de falta de linearidade dos dados, uma vez que o modelo PLS1 utiliza duas variáveis latentes (NIR e dureza) e não apenas uma, o coeficiente de correlação (R^2) dos escores contra os valores de referência (ensaio destrutivo) calculados é 0,91. Os indicadores de exatidão, mostrados na Tabela 01, apresentam um nível aceitável de dispersão e uma boa concordância entre si, implicando que o valor de RMSEC é uma boa estimativa do desvio padrão dos erros de previsão observados no conjunto de validação, 0,57.

Tabela 01 - Resultados obtidos para modelos de calibração e previsão com relação a dureza em comprimidos 4 em 1 para tratamento da TB.

R^2	RMSEC	R^2	RMSEP	RMSEP (RELATIVO)
0,91	0,57	0,53	1,17	7,60

5. CONCLUSÕES

Em ensaio destrutivo de dureza com 157 amostras obtiveram-se valores entre 10,80 e 20,50 Kgf. Este teste é influenciado por uma série de fatores físicos e mecânicos das amostras e do analista.

A Espectroscopia NIR tem diferentes aplicações na indústria farmacêutica, uma delas é a determinação de parâmetros físicos e químicos

em comprimidos, de forma rápida, ambientalmente compatível e não destrutiva. Neste trabalho tem-se a avaliação da espectroscopia no infravermelho próximo e ferramentas de calibração multivariada na determinação da dureza em comprimidos para tratamento da tuberculose pulmonar.

Realizaram-se os pré – tratamentos para o conjunto de espectros originais em busca do melhor modelo de classificação e regressão para uma matriz de dados com 157 amostras versus 1541 variáveis (comprimentos de onda). Este resultou em um intervalo de 1433 a 2561 nm, utilizado para a análise de componentes principais, com um número ótimo de sete CP, nos quais a CP1 conserva 60 % da variabilidade da informação contra a CP2 com 19 % da informação restante.

Desta análise obteve-se três conjuntos de dados, 95 amostras para calibração, 31 de validação e 31 de previsão. Aplicando o PLS1 têm-se valores de correlação para a calibração de 0,91 com RMSEC de 0,57 %. A previsão obteve 0,53 para a correlação com 1,17 % de RMSEP. O erro relativo para este modelo foi de 7,60 %.

Os valores encontrados são satisfatórios para predição de valores de dureza em comprimidos para tratamento da tuberculose pulmonar em amostras futuras, consistindo em um uso de sua determinação não destrutiva.

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: Investigação de modelos multivariados não lineares; Seleção de variáveis ou menor faixa espectral; Maior variabilidade dos valores de dureza nos comprimidos 4 em para tratamento da TB.

7. REFERÊNCIAS

- [1] Mendham, J.; Denney, R.C.; Barnes, J.D.; Thomas, M.J.K.; *Análise Química Quantitativa*, 6^a ed., Rio de Janeiro: RJ, 2002.
- [2] La Guardia, M. *J. Braz. Chem. Soc.*, **1999**, 10, 429.
- [3] Silva, B.D. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2008.
- [4] Souza, M.V.N. de; Vasconcelos, T.R. A. *Quím. Nova*, **2005**, 28, 678.
- [5] Goicoechea, H.C.; Olivieri, A.C. *J. Pharm. Biom. Anal.*, **1999**, 20, 681.
- [6] Maher, H.M.; Youssef, R.M.. *Chem. Intell. Lab. Syst.*, **2008**, 94, 95.
- [7] Argekar, A.P.; Kunjir, S.S.; Purandare, K.S. *J. Pharm. Biom. Anal.*, **1996**, 14, 1645.
- [8] Burns, D. A.; Ciurczak, E.W.; *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 3th ed., Boca Ratom: New York, 2008.
- [9] Ciurczak, E.W; Drennen III, J.K.; *Pharmaceutical and Medical Applications of Near – Infrared Spectroscopy*, 3th ed. New York, Basel, 2002.
- [10] Reich, G. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2005**, 57, 1109.
- [11] Luypaert, J; Massart; D.L.; Heyden, Y. V. *Talanta*, **2000**, 72, 865.
- [12] Borer, M.W.; Zhou, X.; Hays, D.M.; Hofer, J.D.; White, K.C. *J. Pharm. Biom. Anal*, **1998**, 17, 641.
- [13] Ferreira, M.M.C. *J. Braz. Chem. Soc.*, Campinas, **2002**,13, 742.
- [14] Valderrama, P.; Braga, J.W.B.; Poppi, R.J. *Quím. Nova*, **2009**, 32, 1278.
- [15] Vicini, L. *Monografia de Especialização*, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2005.
- [16] Barthus, R.C.; Mazo, L.H.; Poppi, R.J. *Quim. Nova*, **2007**, 30, 1638.

- [17] <http://www.ms.gov.br> acessado em outubro de 2010.
- [18] Neto, B.B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R.E. *Quim. Nova*, **2006**, 29, 1401.
- [19] Hopke, P.K. *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 500, 365.
- [20] Braga, J.W.B.; Poppi, R.J. *Quim. Nova*, **2004**, 27, 1004.
- [21] Li, W.; B., A.; Ballard, J.; J., M.; Agresta, M.; Rasmussen, H.; Hu, S., Cunningham, J.; Winstead, D. *Int. J. Pharm.*, **2007**, 340, 97.
- [22] Li, W.; Bagnolb, L.; Bermana, M.; Chiarella, R. A.; Gerberb, M. *Int. J. Pharm.*, **2009**, 380, 49.
- [23] Alvarenga, L.; Ferreira, D.; Altekruise, D.; Menezes, J.C.; Lochmann, D. *J. Pharm. Biom. Anal.*, **2008**, 48, 62.
- [24] Blanco, M.; Peguero, A. *J. Pharm. Biom. Anal.*, **2010**, 52, 59.
- [25] Pasquini, C. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2003**, 14, 198.
- [26] Kirsch, J.D.; Drennen, J.K. *J. Pharm. Biom. Anal.*, **1999**, 19, 351.
- [27] Blanco, M.; Alcalá, M. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 557, 353.
- [28] Kirsch, J.D.; Drennen, J.K. *J. Pharm. Biom. Anal.*, **1995**, 13, 1273.
- [29] Blanco, M.; Cueva-mestanza, R.; Peguero, A. *J. Pharm. Biom. Anal.*, **2010**, 51, 797.
- [30] Faria, A.F.; Souza, M.V.N. de; Bruns, R.E.; Oliveira, M.A.L. *Talanta*, **2010**, 82, 333.
- [31] Inácio, M.R.C. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil, 2010.
- [32] Madan, J.; Dwivedi, A.K.; Singh, S. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 538, 345.
- [33] Sanches, F.A.C. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal da Paraíba, Brasil, 2009.

- [34] Espinosa-mansilla, A.; Valenzuela, M.I.A.; Peña, A. M.; Salinas, F.; Cañada, F.C. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 427, 129.
- [35] Parreira, T.F., *Dissertação de mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003.
- [36] Filho, H.A.D., *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2007.
- [37] Ferreira, M.M.C.; Antunes, A.M.; Melgo, M.S.; Volpe, P.L.O. *Quim. Nova*, **1999**, 22, 724.
- [38] Zeni, D. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2005.
- [39] Oliveira, R.R. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Goiás, Brasil, 2010.
- [40] <http://www.nuplan.ufrn.br> acessado em novembro de 2010.
- [41] <http://www.ufrn.br> acessado em novembro de 2010.