

**GILCÉLIA APARECIDA CORDEIRO**

**DESENVOLVIMENTO DE MODELOS MULTIVARIADOS PARA QUANTIFICAÇÃO  
DE FÁRMACOS UTILIZANDO-SE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS**

TESE apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de DOUTORA EM QUÍMICA ANALÍTICA no Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

**Orientador: Prof. Dr. Patricio Peralta-Zamora.**

Co-Orientadora: Profa. Dra. Iara Messerschmidt

CURITIBA  
2011



## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, quero agradecer a Deus, pois acredito que é ele que coloca em nossas vidas as pessoas certas e nos dá as oportunidades de sermos quem somos, além do que, nos momentos mais difíceis foi nele que encontrei forças para continuar.

Em especial gostaria de agradecer aos meus pais Oilson e Sirlei, pelo amor, pelo apoio e dedicação incondicional, serei eternamente grata. “Sem vocês eu jamais teria conseguido”.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Patricio G. Peralta-Zamora, por ter dedicado horas do seu dia para me orientar e muitas vezes me incentivar, permitindo que “nós” conseguíssemos terminar este trabalho, além de sempre estar disposto a me ouvir, saiba que você teve um papel fundamental na minha formação, tanto como profissional, quanto pessoal e sempre será um exemplo de vida pra mim.

A minha amiga e professora Dra. Noemi Nagata, que sempre será minha inspiração para lecionar da melhor maneira possível. E que ainda compartilhou muito dos seus conhecimentos, tanto profissional, quanto pessoal. Você mora no meu coração.

A professora Dra. Iara Messerschmidt, por ter contribuído muito durante todo o desenvolvimento deste trabalho, sempre com observações pertinentes e co-orientando da melhor maneira possível.

A professora Dra. Letícia N. Carpentieri Rodrigues da UNIFESP, por ter dedicado parte do seu tempo para me ensinar ensaios de dissolução e pela paciência em me acompanhar nos dias de análise, meus eternos agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Gilberto Abate, do DQ-UFPR, por todas as observações e contribuições dadas a este trabalho, desde a avaliação do projeto, nas correções dos relatórios anuais, no exame de qualificação e por fim na TESE final. Agradeço todo o esforço e dedicação a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Lauro Camargo Dias Jr, do DQ-UFPR, que contribuiu de maneira singular para que este trabalho fosse finalizado da melhor maneira possível, sempre dando contribuições importantes, desde o exame de qualificação até a TESE final.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tânia Mari Bellé Bresolin da UNIVALI, por ter aceitado participar da Banca de Defesa, especialista na área de Controle de Qualidade e desenvolvimento de novas metodologias, nos trouxe conhecimentos novos, contribuindo de maneira muito importante para finalização deste trabalho.

Ao Prof Dr. Marcelo Martins de Sena da UFMG, por aceitar participar da Banca de Defesa, apesar do período ter sido turbulento e como especialista na área de Quimiometria fez contribuições ótimas para a finalização desta TESE.

A minha família, meu irmão Marcelo e minha cunhada Giselle, a minha irmã Gilmara e meu cunhado Anízio e a minha irmãzinha Gilciane, pelo apoio e compreensão das minhas ausências nos almoços de domingo.

Aos meus amados sobrinhos Murilo, Felipe e Maurício, que sem saber, tiveram um papel muito importante nesta etapa da minha vida, já que sempre trouxeram muita alegria e paz para mim.

Ao Grupo TECNOTRATER, Sérgio, Kely, Elaine, Adriane, Bárbara, Luciana, Elenise, Juliana, Marcus Vinicius, Marco Durigan, Caio, Ramon, Terezinha, Loraine, Belisa, Danielle e em especial as minhas companheiras Lutécia, Sandra Stets e Bruna P. Campos.

Não posso deixar de agradecer àqueles que foram e sempre serão meus eternos companheiros: Carla Sirtori, Elias Tauchert e Claudio R. Lima de Souza, por todos os momentos felizes que passamos juntos e por serem meus amigos de verdade.

Ao professor Dr. Roberto Pontarolo pelas contribuições no exame de qualificação.

Aos colegas do LabQAM, ao Prof. Dr. Marco T. Grassi e ao GQA. Ao Prof. Dr. Aldo J. G. Zarbin e ao GQM pela feliz convivência durante estes anos.

À professora Dra. Izaura H. Kuwabara (*in memoriam*), por todos os ensinamentos, tanto científicos quanto sociais, que foram importantes na minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Ao Prof. Cláudio Tonegutti por todas as boas sugestões dadas para este trabalho e pela feliz convivência na sala.

As minhas amigas Regina, Dani Martini, Alessandra Tonietto, Maisa, Lu Marchis, Giselle Calaça, Aline Dossa, Dani Gallas, Alana M. Renauld e Ana Paula Christakis, que participaram direta ou indiretamente deste trabalho, sempre me apoiando e acreditando no meu trabalho.

Aos todos os Professores e ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR.

À CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro do projeto.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho...

**Muito Obrigada!**

**SUMÁRIO**

<b>TERMO DE APROVAÇÃO</b>	ii
<b>AGRADECIMENTOS</b>	iii
<b>SUMÁRIO</b>	v
<b>LISTA DE QUADROS</b>	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xi
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	xv
<b>RESUMO</b>	xvi
<b>ABSTRACT</b>	xvii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA</b>	4
2.1. INDÚSTRIA FARMACÊUTICA	4
2.2. FÁRMACOS DE RELEVÂNCIA	6
2.2.1. Antirretrovirais	6
2.2.2. Antihipertensivos	9
2.3. CONTROLE DE QUALIDADE	11
2.3.1. Análise de antirretrovirais	11
2.3.2. Análise de antihipertensivos	12
2.4. ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO	13
2.5. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	17
2.5.1. PLSR	18
2.6. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	20
2.6.1. Especificidade e Seletividade	22
2.6.2. Linearidade	24
2.6.3. Intervalo	25
2.6.4. Precisão	26
2.6.5. Limite de detecção (sensibilidade)	27

2.6.6. Limite de quantificação	27
2.6.7. Exatidão	29
2.6.8. Robustez	30
2.7. ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA	31
2.8. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	33
<b>3. OBJETIVO GERAL</b>	36
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b>	37
4.1. MATERIAIS E REAGENTES	37
4.2. EQUIPAMENTOS	37
4.3. PROGRAMAS COMPUTACIONAIS	39
4.4. METODOLOGIA	40
4.4.1. Desenvolvimento de modelos de calibração por espectroscopia UV-Vis em solução	40
4.4.1.1. Modelos univariados convencionais	40
4.4.1.2. Modelos multivariados	40
4.4.1.3. Validação do Modelo multivariado	43
4.4.2. Desenvolvimento de modelos de calibração por espectroscopia infravermelho com refletância difusa	43
4.4.3. Ensaio de dissolução <i>in vitro</i>	46
4.4.3.1. Zidovudina e Lamivudina	46
4.4.4. Análises Cromatográficas	47
4.4.4.1. Zidovudina/Lamivudina	47
4.4.5. Tratamento dos Resíduos	47
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	48
5.1. ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA	48
5.1.1. Espectroscopia Eletrônica em Solução - Análise Convencional Univariada	56
5.1.2. Espectroscopia Eletrônica em Solução - Análise Multivariada	59

5.1.2.1. <i>Validação do modelo multivariado</i>	65
5.1.2.2. <i>Figuras de mérito do modelo multivariado</i>	68
5.1.2.3. <i>Ensaio de Perfil de Dissolução</i>	70
5.1.3. Espectroscopia no Infravermelho com Refletância Difusa – Análise Multivariada	72
5.2. CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA	90
5.2.1. Espectroscopia Eletrônica em Solução	90
5.2.2. Espectroscopia no Infravermelho com Refletância Difusa – Análise Multivariada	91
5.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MODELOS MULTIVARIADOS	104
<b>6. CONCLUSÕES</b>	105
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	106

**LISTA DE QUADROS**

<b>QUADRO 1</b>	CLASSES DOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRAIS, UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA AIDS, FORNECIDOS PELO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS).	9
<b>QUADRO 2</b>	CLASSIFICAÇÃO DOS TESTES DE VALIDAÇÃO, SEGUNDO SUA FINALIDADE	21
<b>QUADRO 3</b>	ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS, SEGUNDO SUA FINALIDADE	21
<b>QUADRO 4</b>	LIMITES PERCENTUAIS DO TEOR DO ANALITO QUE DEVEM ESTAR CONTIDOS NO INTERVALO DE LINEARIDADE PARA ALGUNS MÉTODOS ANALÍTICOS	25
<b>QUADRO 5</b>	FATORES QUE DEVEM SER CONSIDERADOS NA DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO	31
<b>QUADRO 6</b>	REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO	33
<b>QUADRO 7</b>	PARÂMETROS UTILIZADOS EM ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ZIDOVUDINA/LAMIVUDINA NA FORMA DE COMPRIMIDOS	46



## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES OBTIDAS PELO MÉTODO DE INTERPOLAÇÃO EM CURVAS ANALÍTICAS CONVENCIONAIS, NA ANÁLISE DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO	51
<b>TABELA 2</b>	RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES OBTIDAS PELO MÉTODO DE INTERPOLAÇÃO EM CURVAS ANALÍTICAS DO MODO DERIVATIVO, NA ANÁLISE DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO	54
<b>TABELA 3</b>	RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES OBTIDAS PELO MÉTODO DE INTERPOLAÇÃO EM CURVAS ANALÍTICAS DO MODO DERIVATIVO (COM ALISAMENTO), NA ANÁLISE DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO	54
<b>TABELA 4</b>	RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES OBTIDAS PELO MÉTODO DE VIERORDT, NA ANÁLISE DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO	55
<b>TABELA 5</b>	RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES OBTIDAS PELO MÉTODO DE INTERPOLAÇÃO EM CURVAS ANALÍTICAS DO MODO DERIVATIVO (COM ALISAMENTO), NA ANÁLISE DO MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA	56
<b>TABELA 6</b>	COMPOSIÇÃO DAS MISTURAS UTILIZADAS NAS ETAPAS DE CALIBRAÇÃO (NORMAL) E VALIDAÇÃO (NEGRITO) NO DESENVOLVIMENTO DE MODELOS MULTIVARIADOS UTILIZANDO-SE ESPECTROSCOPIA UV-VIS EM SOLUÇÃO	57
<b>TABELA 7</b>	RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS MISTURAS SINTÉTICAS DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO, UTILIZANDO MODELOS COM DIFERENTES NÚMEROS DE VARIÁVEIS LATENTES (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg L <sup>-1</sup> E ERRO RELATIVO EM %)	62
<b>TABELA 8</b>	RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA EM AMOSTRA DO MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA (R) E GENÉRICO (G), UTILIZANDO MODELOS COM 3 VARIÁVEIS LATENTES E ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg L <sup>-1</sup> E ERRO RELATIVO EM %)	65
<b>TABELA 9</b>	RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA NOS ENSAIOS DE PRECISÃO	66
<b>TABELA 10</b>	RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA NOS ENSAIOS DE ROBUSTEZ	68
<b>TABELA 11</b>	PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO DO MODELO MULTIVARIADO	69
<b>TABELA 12</b>	RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg g <sup>-1</sup> E ERRO RELATIVO EM %), UTILIZANDO-SE	78

	MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRIFT NA REGIÃO DE 6251 A 399 $\text{cm}^{-1}$ E DADOS CENTRADOS NA MÉDIA	
<b>TABELA 13</b>	RESULTADOS DA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE MEDICAMENTO, UTILIZANDO-SE MODELO COM ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (6231 A 399 $\text{cm}^{-1}$ ) COM DADOS AUTOESCALADOS E DUAS VARIÁVEIS LATENTES	81
<b>TABELA 14</b>	RESULTADOS DA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE MEDICAMENTO, UTILIZANDO-SE MODELO COM DADOS PRÉ-PROCESSADOS POR MSC E DUAS VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO ESPECTRAL DE 4000 – 399 $\text{cm}^{-1}$ )	83
<b>TABELA 15</b>	RESULTADOS DA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE MEDICAMENTO, UTILIZANDO-SE MODELO COM DADOS PRÉ-PROCESSADOS COM MSC E DUAS VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO ESPECTRAL NIR)	85
<b>TABELA 16</b>	ERRO MÉDIO DE PREVISÃO DO CONJUNTO DAS AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO PARA MODELOS DESENVOLVIDOS COM DIFERENTES TIPOS DE PRÉ-PROCESSAMENTOS E DIFERENTES NÚMEROS DE VARIÁVEIS LATENTES PARA REGIÃO ESPECTRAL DE 10000 – 4000 $\text{cm}^{-1}$	86
<b>TABELA 17</b>	ERRO MÉDIO DE PREVISÃO DAS AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS PARA O MODELO DESENVOLVIDO COM MSC E DUAS VARIÁVEIS LATENTES PARA REGIÃO ESPECTRAL DE 10000 – 4000 $\text{cm}^{-1}$	87
<b>TABELA 18</b>	RESULTADOS DA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE MEDICAMENTO, UTILIZANDO-SE MODELO COM DADOS AUTOESCALADOS E DUAS VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO ESPECTRAL SELECIONADA)	90
<b>TABELA 19</b>	RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS MISTURAS SINTÉTICAS (CAP + HIDRO) RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM $\text{mg g}^{-1}$ E ERRO RELATIVO EM %), UTILIZANDO-SE MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRIFT NA REGIÃO DE 10000 A 400 $\text{cm}^{-1}$ E DADOS CENTRADOS NA MÉDIA	95
<b>TABELA 20</b>	RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA DAS AMOSTRAS DE MEDICAMENTO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM $\text{mg g}^{-1}$ E ERRO RELATIVO EM %), UTILIZANDO-SE MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRIFT NA REGIÃO DE 4000 A 400 $\text{cm}^{-1}$ , DADOS AUTOESCALADOS E 6 VARIÁVEIS LATENTES	100
<b>TABELA 24</b>	RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA DAS AMOSTRAS DE MEDICAMENTO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM $\text{mg g}^{-1}$ E ERRO RELATIVO EM %), UTILIZANDO-SE MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRIFT NA REGIÃO DE 10000 A 4000 $\text{cm}^{-1}$ , DADOS CENTRADOS NA MÉDIA E 6 VARIÁVEIS LATENTES	103

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	EVOLUÇÃO DAS PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADAS COM ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA NO PERÍODO 1995-2010	2
<b>FIGURA 2</b>	EVOLUÇÃO DAS PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADAS COM CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA NO PERÍODO 1970-2010	3
<b>FIGURA 3</b>	NÚMERO DE ÓBITOS POR AIDS, POR REGIÃO DO BRASIL, NO DECORRER DOS ÚLTIMOS ANOS	7
<b>FIGURA 4</b>	FÓRMULAS ESTRUTURAIS DA ZIDOVUDINA (A) E DA LAMIVUDINA (B)	8
<b>FIGURA 5</b>	FÓRMULAS ESTRUTURAIS DO CAPTOPRIL (A) E DA HIDROCLOROTIAZIDA (B)	11
<b>FIGURA 6</b>	DETALHE DO SISTEMA DE DISSOLUÇÃO UTILIZANDO O APARATO CESTA	15
<b>FIGURA 7</b>	APARATO DA PÁ PARA ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO (REPRODUZIDO DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988)	16
<b>FIGURA 8</b>	ORGANIZAÇÃO DOS DADOS PARA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	18
<b>FIGURA 9</b>	REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DA PROPRIEDADE DE ORTOGONALIDADE DO NAS	22
<b>FIGURA 10</b>	ESPECTROGRAMA UV-VIS QUE DEMONSTRA A INTERFERÊNCIA ESPECTRAL ENCONTRADA NA DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL $20,41 \mu\text{g mL}^{-1}$ (.....); PROPIFENAZONA $19,85 \mu\text{g mL}^{-1}$ (——) E CAFEÍNA $2,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (-----);	32
<b>FIGURA 11</b>	REPRESENTAÇÃO DAS REFLEXÕES ESPECULAR E DIFUSA	34
<b>FIGURA 12</b>	EVOLUÇÃO DAS PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADAS COM PRODUTOS FARMACÊUTICOS, ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E ANÁLISE MULTIVARIADA (PLS) NO PERÍODO 1985-2010	35
<b>FIGURA 13</b>	VISTA FRONTAL E DETALHE DA UNIDADE DE REFLETÂNCIA DIFUSA DOS EQUIPAMENTOS BIO-RAD (A) E BRUKER (B)	38
<b>FIGURA 14</b>	DETALHES DO DISSOLUTOR HANSON UTILIZADO NOS ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO	39
<b>FIGURA 15</b>	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA DESENVOLVIMENTO DE MODELOS MULTIVARIADOS POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS (EM DESTAQUE, AMOSTRAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO)	41
<b>FIGURA 16</b>	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DAS MISTURAS DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA PARA O DESENVOLVIMENTO DE MODELOS MULTIVARIADOS POR ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA	43

	(AMOSTRAS EM DESTAQUE FORAM RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO EXTERNA)	
<b>FIGURA 17</b>	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DAS MISTURAS DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA PARA O DESENVOLVIMENTO DE MODELOS MULTIVARIADOS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA (AMOSTRAS EM DESTAQUE FORAM RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO EXTERNA)	45
<b>FIGURA 18</b>	ESPECTROS ELETRÔNICOS DE ZIDOVUDINA (24,0 mg L <sup>-1</sup> ) E LAMIVUDINA (12,0 mg L <sup>-1</sup> ) EM SOLUÇÃO AQUOSA	48
<b>FIGURA 19</b>	ESPECTROS ELETRÔNICOS DE SOLUÇÕES PADRÃO DE ZIDOVUDINA (10,0 A 35,0 mg L <sup>-1</sup> ) (A) E CURVA ANALÍTICA ( $\lambda = 266,0$ nm)(B)	49
<b>FIGURA 20</b>	ESPECTROS ELETRÔNICOS DE SOLUÇÕES PADRÃO DE LAMIVUDINA (5,0 A 20,0 mg L <sup>-1</sup> ) (A) E CURVA ANALÍTICA ( $\lambda = 197,0$ nm)(B)	50
<b>FIGURA 21</b>	PRIMEIRA DERIVADA DOS ESPECTROS DE ZIDOVUDINA (A) E LAMIVUDINA (B)	52
<b>FIGURA 22</b>	CURVAS ANALÍTICAS NO MODO DERIVATIVO PARA ZIDOVUDINA (A) E LAMIVUDINA (B)	53
<b>FIGURA 23</b>	ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS DAS MISTURAS DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO MULTIVARIADO	57
<b>FIGURA 24</b>	GRÁFICO DO RMSEC E RMSECV <i>VERSUS</i> NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES	58
<b>FIGURA 25</b>	GRÁFICO DOS <i>LOADINGS</i> DAS VL 1 E VL 2 EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA (A) E ESPECTROS ELETRÔNICOS DA ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA (B)	59
<b>FIGURA 26</b>	GRÁFICO DE RESÍDUOS DE STUDENT <i>VERSUS</i> "LEVERAGE" PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 3 VL	60
<b>FIGURA 27</b>	GRÁFICO DE VALORES REAIS <i>VERSUS</i> VALORES PREVISTOS PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 3 VL	61
<b>FIGURA 28</b>	REPRESENTAÇÃO DO ERRO MÉDIO DA PREVISÃO DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA, EM FUNÇÃO DO PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES	64
<b>FIGURA 29</b>	ESPECTROS DA MISTURA CONTENDO AZT (24,00 mg L <sup>-1</sup> ) E 3TC (12,00 mg L <sup>-1</sup> ) EM DIFERENTES VALORES DE pH	67
<b>FIGURA 30</b>	PERFIL DE DISSOLUÇÃO DA ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA	71

<b>FIGURA 31</b>	PERFIL DE DISSOLUÇÃO DA ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O MEDICAMENTO GENÉRICO	71
<b>FIGURA 32</b>	ESPECTROS DRIFT DAS ESPÉCIES ZIDOVUDINA (A) E LAMIVUDINA (B), COM ATRIBUIÇÃO DAS BANDAS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO E PRÓXIMO	73
<b>FIGURA 33</b>	ESPECTROS DRIFT DOS PADRÕES DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA, DA MISTURA SINTÉTICA E DO MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA	74
<b>FIGURA 34</b>	ESPECTROS INFRAVERMELHOS (DRIFT, 6251 a 399 $\text{cm}^{-1}$ ) DE MISTURAS DE AZT E 3TC UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DO MODELO MULTIVARIADO	75
<b>FIGURA 35</b>	GRÁFICO DE RMSEC E RMSECV (A) E VARIÂNCIA CAPTURADA PELAS VARIÁVEIS LATENTES (B) NO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO COM ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA E NA REGIÃO DE 6251 A 399 $\text{cm}^{-1}$	76
<b>FIGURA 36</b>	GRÁFICO DE RESÍDUOS DE “STUDENT” <i>VERSUS LEVERAGE</i> PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 2 VARIÁVEIS LATENTES	77
<b>FIGURA 37</b>	ERRO MÉDIO NA FASE DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA ZIDOVUDINA (A) E LAMIVUDINA (B), EM FUNÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO ESPECTRAL DE 6251 A 399 $\text{cm}^{-1}$ )	80
<b>FIGURA 38</b>	ERRO MÉDIO NA FASE DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA ZIDOVUDINA (A) E LAMIVUDINA (B), EM FUNÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (INFRAVERMELHO MÉDIO)	82
<b>FIGURA 39</b>	ERRO MÉDIO DE PREVISÃO NA FASE DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA ZIDOVUDINA (A) E LAMIVUDINA (B), EM FUNÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO DE 6251 – 4000 $\text{cm}^{-1}$ )	84
<b>FIGURA 40</b>	ESPECTROS INFRAVERMELHOS (DRIFT) DAS MISTURAS DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO MULTIVARIADO DA REGIÃO DE 10000 A 4000 $\text{cm}^{-1}$	85
<b>FIGURA 41</b>	GRÁFICO DA CORRELAÇÃO DO SINAL ESPECTRAL COM A CONCENTRAÇÃO DAS ESPÉCIES, EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE ONDA DOS ESPECTROS NO INFRAVERMELHO NA REGIÃO DE 6251 – 399 $\text{cm}^{-1}$	88
<b>FIGURA 42</b>	ERRO MÉDIO DE PREVISÃO NA FASE DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA ZIDOVUDINA (A) E LAMIVUDINA (B), EM FUNÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO ESPECTRAL SELECIONADA PELO MÉTODO DE SELEÇÃO DE VARIÁVEIS).	89
<b>FIGURA 43</b>	ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (DRIFT, 10000 A 399 $\text{CM}^{-1}$ )	91

DAS MISTURAS CONTENDO CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA, NAS CONCENTRAÇÕES LIMIARES QUE FORAM UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DO MODELO MULTIVARIADO

- FIGURA 44** GRÁFICO DE RMSEC E RMSECV (A) E VARIÂNCIA CAPTURADA PELAS VARIÁVEIS LATENTES (B) NO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO COM ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA E NA REGIÃO DE 10000 A 400  $\text{cm}^{-1}$  93
- FIGURA 45** GRÁFICO DE RESÍDUOS DE “STUDENT” *VERSUS LEVERAGE* PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 5 VARIÁVEIS LATENTES 94
- FIGURA 46** ERRO MÉDIO DE PREVISÃO NA FASE DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA CAPTOPRIL (A) E HIDROCLOROTIAZIDA (B), EM FUNÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO ESPECTRAL DE 10000 A 400  $\text{cm}^{-1}$ ) 97
- FIGURA 47** GRÁFICO DE RMSEC E RMSECV (A) E VARIÂNCIA CAPTURADA PELAS VARIÁVEIS LATENTES (B) NO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO COM ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA E NA REGIÃO DE 4000 A 400  $\text{cm}^{-1}$  98
- FIGURA 48** ERRO MÉDIO DE PREVISÃO NA FASE DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA CAPTOPRIL (A) E HIDROCLOROTIAZIDA (B), EM FUNÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO ESPECTRAL DE 4000 A 400  $\text{cm}^{-1}$ ) 99
- FIGURA 49** GRÁFICO DE RMSEC E RMSECV (A) E VARIÂNCIA CAPTURADA PELAS VARIÁVEIS LATENTES (B) NO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO COM ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA NA REGIÃO DE 10000 A 4000  $\text{cm}^{-1}$  101
- FIGURA 50** ERRO MÉDIO NA FASE DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA CAPTOPRIL(A) E HIDROCLOROTIAZIDA (B), EM FUNÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO ESPECTRAL DE 10000 A 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) 102

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>3TC:</b>	LAMIVUDINA
<b>AIDS:</b>	SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA
<b>ANVISA:</b>	AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA
<b>AZT:</b>	ZIDOVUDINA
<b>CAP:</b>	CAPTOPRIL
<b>CLAE:</b>	CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
<b>DPR:</b>	DESVIO PADRÃO RELATIVO
<b>DRIFTS:</b>	ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA E TRANSFORMADA DE FOURIER ( <i>DIFUSE REFLECTANCE INFRARED FOURIER TRANSFORMAT SPECTROSCOPY</i> )
<b>ECA</b>	ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA
<b>FIOCRUZ:</b>	FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
<b>HAS</b>	HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA
<b>HIDRO:</b>	HIDROCLOROTIAZIDA
<b>HIV:</b>	VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA ( <i>HUMAN IMMUNODIFICIENT VIRUS</i> )
<b>INMETRO:</b>	INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL.
<b>IV:</b>	INFRAVERMELHO
<b>MSC:</b>	CORREÇÃO DO SINAL MULTIPLICATIVO ( <i>MULTIPLICATIVE SIGNAL CORRECTION</i> )
<b>MID:</b>	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO
<b>NAS:</b>	SINAL ANALÍTICO LÍQUIDO ( <i>NET ANALYTE SIGNAL</i> )
<b>NIR:</b>	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO ( <i>NEAR INFRARED</i> )
<b>OPAS:</b>	ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE
<b>PA:</b>	PRÓ ANALISE
<b>PCA:</b>	ANALISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS ( <i>PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS</i> )
<b>PLSR:</b>	REGRESSÃO DE MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS ( <i>PARTIAL LEAST SQUARE REGRESSION</i> )
<b>RMSEC:</b>	RAIZ QUADRADA DO ERRO MÉDIO QUADRÁTICO PADRÃO DE CALIBRAÇÃO
<b>RMSECV:</b>	RAIZ QUADRADA DO ERRO MÉDIO QUADRÁTICO PADRÃO DE VALIDAÇÃO CRUZADA
<b>RMSEP:</b>	RAIZ QUADRADA DO ERRO MÉDIO QUADRÁTICO PADRÃO DE PREVISÃO
<b>USP:</b>	FARMACOPÉIA NORTE AMERICANA (UNITED STATES PHARMACOPEIA)
<b>UV-Vis:</b>	ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL
<b>VL:</b>	VARIÁVEIS LATENTES

## RESUMO

Na produção de medicamentos, a associação de dois ou mais fármacos é uma prática bastante freqüente, uma vez que pode aperfeiçoar o tratamento e melhorar a adesão do paciente à terapia prescrita. Nestes casos, a quantificação de uma espécie, na presença de excipientes e outros fármacos pode ser bastante complexa, o que geralmente leva à utilização de técnicas cromatográficas, reconhecidamente demoradas e dispendiosas.

Neste trabalho foram desenvolvidas metodologias espectroscópicas multivariadas para quantificação simultânea de fármacos presentes em duas formulações farmacêuticas de relevância - zidovudina (AZT)/lamivudina (3TC) e captopril (CAP)/hidroclorotiazida (HIDRO) - utilizando-se regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR), espectroscopia eletrônica (UV-Vis) e espectroscopia na região do infravermelho com refletância difusa (DRIFTS).

Na espectroscopia eletrônica em solução foi possível observar uma severa interferência espectral no sinal dos fármacos, o que, de maneira geral, impede o desenvolvimento de modelos de calibração convencionais. Por sua vez, o uso de ferramentas de calibração multivariada (PLSR) permite o desenvolvimento de modelos utilizando-se praticamente toda a região espectral monitorada (190-300 nm para AZT/3TC) e um reduzido número de variáveis latentes (VL). Em geral, os modelos permitem uma adequada análise dos medicamentos contendo a associação, com erros de previsão inferiores a 10%. Adicionalmente, o modelo multivariado pode ser utilizado com sucesso na avaliação de parâmetros de dissolução, proporcionando respostas compatíveis com as obtidas por aplicação de métodos cromatográficos farmacopéicos.

Nos estudos envolvendo DRIFTS foram desenvolvidos inúmeros modelos multivariados de calibração, envolvendo diferentes regiões espectrais, diversos tipos de pré-processamento de sinais e número de VL. Para a associação AZT/3TC os melhores resultados envolveram as regiões espectrais do infravermelho médio e próximo, separadamente, utilizando MSC como pré-processamento de sinais e 2 VL. Nestas condições, baixos erros de previsão foram observados na análise de medicamentos (AZT  $\approx$  9%, 3TC  $<$  2%). Para a associação CAP/HIDRO o modelo de melhor desempenho foi desenvolvido com 6 VL, dados autoescalados e região espectral do infravermelho médio. Neste caso, a previsão das amostras de medicamentos proporcionou erros de previsão da ordem de 5%, para ambos os fármacos em estudo.

Finalmente, é importante salientar que as técnicas espectroscópicas aqui estudadas apresentam importantes vantagens de ordem prática, permitindo a elaboração de sistemas automatizados de controle *on-line*. Trata-se de uma característica importante, reservada para poucas técnicas instrumentais de análise.



## ABSTRACT

In the production of medicines, the combination of two or more drugs represents a very common practice, since it can improve the treatment and the patient adherence to the prescribed therapy. In these cases, the quantification of a particular drug in the presence of excipients and other drugs can be very complex and usually leads to the use of expensive and time-consuming chromatographic techniques.

In this work, it was proposed the development of methodologies for the simultaneous quantification of drugs present in two relevant pharmaceutical formulations – zidovudine (AZT)/lamivudine (3TC) and captopril (CAP)/ hydrochlorothiazide (HIDRO) - using partial least squares regression (PLSR), electronic (UV-Vis) and infrared (DRIFTS) spectroscopy.

By using electronic spectroscopy it was possible to observe a severe spectral interference between the signals of the drugs, which usually hinders the use of conventional calibration methods. The use of multivariate calibration tools (PLSR) allowed the development of models using the almost complete monitored spectral region (190-300 nm for AZT/3TC) with a reduced number of latent variables (LV). In general, the models permitted an adequate analysis of drugs containing the respective association, with prediction errors lower than 10%. The multivariate models can be effectively used in the evaluation of dissolution parameters, providing results that are consistent with those obtained by standard chromatographic methods.

In studies involving DRIFTS many multivariate calibration models were developed, using different spectral regions, pre-processing methods and number of latent variables. The best result for AZT/3TC associations involved the mid and near-infrared spectral regions, the use of MSC preprocessing and two latent variables. At these conditions, low prediction errors were observed in the analysis of medicines (AZT $\approx$  9%, 3TC $<$ 2%).

For the CAP/HYDRO association, the better multivariate model was developed with 6 VL, autoscaled signals and mid-infrared spectral region. In this case, the prediction results of drug samples provided prediction errors near of 5% for both drugs.

Finally, it is important to remark that the spectroscopic techniques studied herein show important practical advantages, allowing the elaboration of automatic on-line control systems, characteristic that is reserved for few instrumental analytical techniques.

---

**INTRODUÇÃO****1. INTRODUÇÃO**

O Brasil tem muitas urgências, destacando as relativas à inovação e ao desenvolvimento tecnológico e, principalmente, à transformação do conhecimento produzido nos centros de ensino e pesquisa em valores econômicos e sociais. No meio industrial, caracterizado pela utilização de processos que permitem a transformação de matérias primas em produtos comercializáveis, esta interação com centros de pesquisa se mostra fundamental para garantir a competitividade. Sendo assim, ciência, tecnologia e inovação são peças-chaves que ligam conhecimento a desenvolvimento tecnológico e, conseqüentemente, ao crescimento econômico.

A Química Analítica é uma área que centraliza a responsabilidade pelo desenvolvimento de novas metodologias de análise, aplicáveis aos mais variados campos da pesquisa científica. Esta procura por novas alternativas tem propiciado o desenvolvimento de muitas técnicas analíticas instrumentais, grande parte das quais, além de representar um sólido avanço da própria química analítica, tem sido fundamental para o desenvolvimento de muitas outras áreas da ciência. Dentre as inúmeras áreas em que a química analítica participa, um importante destaque deve ser dado ao controle de qualidade de produtos industrializados, uma vez que, de maneira geral, é a aplicação de rotinas analíticas confiáveis que garante a qualidade e a segurança dos inúmeros produtos oferecidos à população.

Por motivos óbvios, o controle de qualidade se apresenta especialmente importante na fabricação de medicamentos. Desta forma, contar com metodologias confiáveis, rápidas e econômicas se mostra essencial, não apenas para avaliar a qualidade dos produtos oferecidos, mas principalmente para garantir a sua eficácia. Dentro deste contexto, o aperfeiçoamento e a simplificação das operações representam objetivos de grande importância, principalmente para minimizar a participação humana nas etapas da análise e, conseqüentemente, reduzir os custos associados ao controle de qualidade.

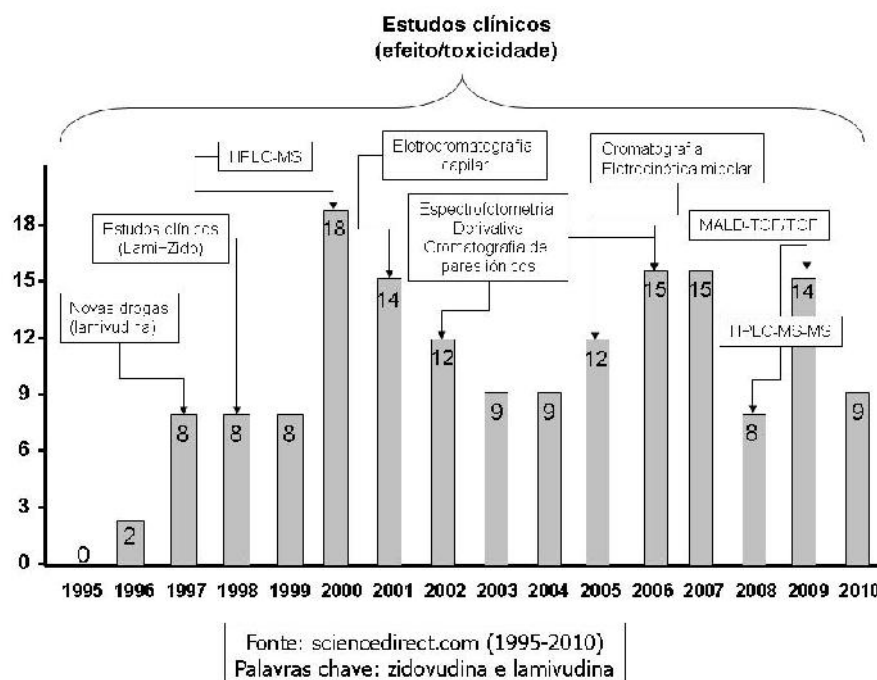
Na área de produção de medicamentos, a associação de dois ou mais fármacos é uma prática bastante frequente, uma vez que pode aperfeiçoar o tratamento e melhorar a adesão do paciente à terapia prescrita. Nestes casos, a quantificação de uma espécie, na presença de excipientes e de outros fármacos pode ser bastante complexa, o que geralmente obriga à utilização de técnicas cromatográficas, reconhecidamente demoradas e dispendiosas.

Neste trabalho está se propondo o uso de métodos de calibração multivariada para viabilizar a quantificação de fármacos em associações de relevância, utilizando-se métodos espectroscópicos. Dentre os objetos de estudo é possível salientar associações

## INTRODUÇÃO

de zidovudina-lamivudina e captopril-hidroclotiazida, importantes medicamentos orientados ao tratamento da AIDS e da hipertensão arterial, respectivamente.

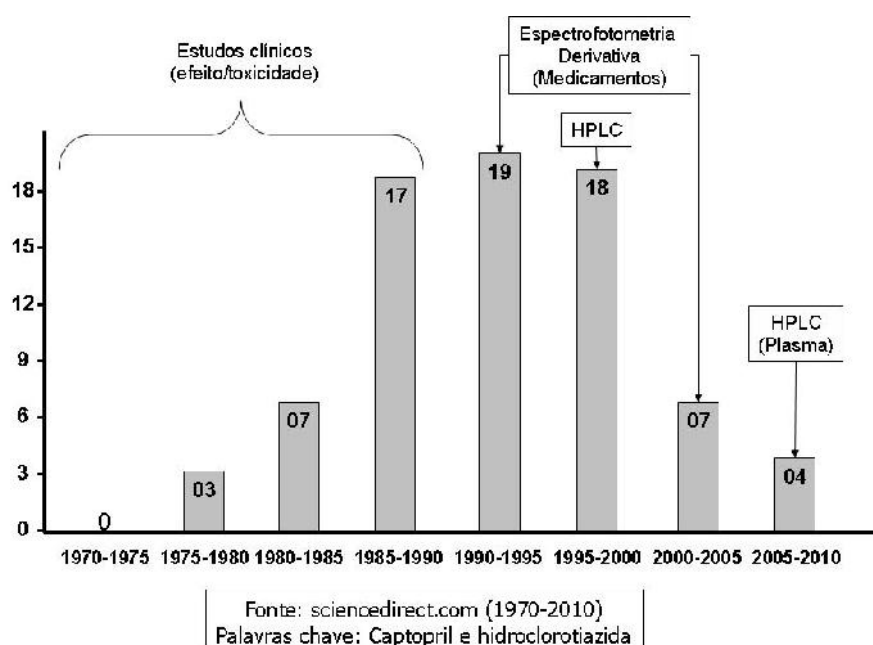
Estudos de revisão bibliográfica realizados em base de dados on-line (*Science Direct*) permitem verificar a evolução dos trabalhos envolvendo lamivudina e zidovudina (Figura 1). Referidos trabalhos se iniciam em 1996, ano em que ambos os fármacos em estudo foram propostos para o tratamento da AIDS. A partir deste ano, vários trabalhos reportam estudos clínicos orientados a avaliar o efeito e a toxicidade destes fármacos, ao mesmo tempo em que novas alternativas analíticas são propostas. Em geral, grande parte destas ferramentas se fundamenta em técnicas de cromatografia líquida, envolvendo sistemas detectores de diversa natureza. Em função do seu alto grau de sofisticação, destaque pode ser dado ao sistema MALD-TOF/TOF proposto recentemente, que é orientado quase que exclusivamente à análise de nucleosídeos. Até onde foi possível investigar, apenas em 2002 foi publicado um trabalho que relata a quantificação da mistura de interesse por espectroscopia eletrônica, utilizando-se métodos derivativos (USLU e ÖZKAN, 2002).



**FIGURA 1.** EVOLUÇÃO DAS PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADAS COM ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA NO PERÍODO 1995-2010.

## INTRODUÇÃO

Por sua vez, estudos envolvendo a associação captopril/hidroclorotiazida (Figura 2) são encontrados desde 1978, ano em que estudos clínicos demonstraram a eficiência da associação no controle da hipertensão arterial. Na década de 1980, 22 trabalhos foram publicados, principalmente discutindo a eficácia da associação. Na década de 1990, merecem destaque os trabalhos relacionados com a determinação cromatográfica de ambos os fármacos em medicamentos, assim como uma proposta para a determinação simultânea por espectrofotometria derivativa (PANDERI & PARISSI-POULOU,1992). Na última década, métodos cromatográficos são propostos para a determinação de ambos os fármacos em amostras de fluidos biológicos, especialmente plasma, enquanto que um trabalho relata a realização de ensaios de dissolução de medicamentos, recorrendo a espectrofotometria derivativa (TOMŠŮ *et. al.*, 2004).



**FIGURA 2.** EVOLUÇÃO DAS PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADAS COM CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA NO PERÍODO 1970-2010.

---

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA****2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA****2.1. INDÚSTRIA FARMACÊUTICA**

No Brasil, a indústria farmacêutica se desenvolveu no período compreendido entre 1890 e 1950, sendo favorecida pela instituição de políticas de saúde pública, de práticas sanitárias de prevenção e combate a doenças infecciosas e, principalmente, de instituições de pesquisa básica e aplicada. De acordo com RIBEIRO (2000), o estado brasileiro teve uma importante participação neste desenvolvimento, incentivando e fornecendo recursos para instalação dos primeiros laboratórios farmacêuticos. O Estado também contribuiu com a formação dos primeiros cientistas brasileiros, os quais, posteriormente, se tornaram responsáveis pelo desenvolvimento e produção de soros, vacinas e medicamentos, essenciais à saúde pública.

Atualmente, a indústria farmacêutica pode ser descrita como um conjunto de oligopólios com multiprodutos diferenciados em segmentos de classes terapêuticas específicas, cujo consumo é fortemente mediado pela necessidade de prescrição médica. Trata-se de um setor que tem como base a ciência, cuja principal fonte de inovação e diferenciação dos produtos resulta de novos conhecimentos gerados a partir da infraestrutura de ciência e tecnologia (C&T) e das atividades de pesquisa e desenvolvimento (P&D) das empresas.

Nos anos 80 iniciaram-se as fusões dos maiores laboratórios do mundo, que continuaram nos anos 90, tendo como principal objetivo aumentar a rentabilidade e fazer investimentos de maior porte, sendo que estas empresas atuam de forma globalizada em segmentos específicos (classes terapêuticas).

Atualmente, o setor industrial farmacêutico brasileiro é constituído por aproximadamente 470 empresas e mais de oitenta distribuidores atacadista, sendo 17% delas de capital estrangeiro e 83 % de capital nacional. Concentram-se em sua grande maioria na região sudeste, gerando em torno de 50.000 empregos diretos e 250.000 indiretos (ABIQUIFI 2011). Hoje em dia cerca de 100 companhias de grande porte são responsáveis por cerca de 90% dos produtos farmacêuticos para consumo humano (OLIVEIRA *et. al.*, 2006).

De acordo com estatísticas recentes, o Brasil se destaca entre os cinco maiores consumidores de medicamentos no mundo, apresentando, ainda, o maior índice de farmácias por habitante. Em território nacional existem mais de 50 mil farmácias e drogarias (uma para cada 3.000 habitantes), o que representa mais do que o dobro do número recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OPAS, 2004), movimentando cerca de US\$ 10 bilhões por ano. Dentro deste contexto é importante salientar que, de acordo com LAPORTE (2010), muitos medicamentos inúteis são comercializados

---

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

diariamente, apenas para encobrir outros problemas complexos, muitos de origem social, ou graças a vigorosas campanhas publicitárias.

O Brasil tem mais de 90 substâncias antimicrobianas registradas, sendo quatro delas (amoxicilina, azitromicina, cefalexina e sulfametoxazol) as campeãs de venda. Em 2009, por exemplo, a venda de antibióticos movimentou cerca de R\$ 1,6 bilhão no país, mesmo quando dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que mais da metade das prescrições mundiais de antibióticos são inadequadas (ANVISA, 2010).

Uma outra peculiaridade do processo industrial no Brasil é o lugar que o Estado vem desempenhando no setor farmacêutico, merecendo destaque a sua atividade regulatória sobre os preços praticados, de maneira a garantir medicamentos a preços mais baixos e a redução nos custos dos programas públicos de saúde. Além disso, a produção de medicamentos pela rede pública contribui para minimizar problemas no suprimento de determinados medicamentos, sobretudo daqueles de menor interesse para o setor privado. Uma outra consequência do aumento da produção pública pode ser percebida com a redução dos preços de medicamentos, particularmente os antirretrovirais (OLIVEIRA *et. al.*, 2006).

Nos últimos anos, o surgimento de medicamentos genéricos representou um dos mais importantes avanços na consolidação da política nacional deste setor, permitindo a ampliação do acesso da população a este tipo de produtos. Além disto, o medicamento genérico trouxe novas perspectivas para o mercado farmacêutico brasileiro e para a população, oferecendo alternativas terapêuticas econômicas, reduzindo os gastos das famílias e racionalizando os gastos públicos na compra de medicamentos (BERMUDEZ, 1994; COM CIÊNCIA, 2010).

Em função do consumo excessivo e não orientado de medicamentos e do surgimento de produtos mais baratos, as vezes de qualidade duvidosa, a necessidade de um rigoroso controle de qualidade é bastante evidente (IVAMA *et al.*, 2005).

A legislação brasileira, editada pelo Ministério da Saúde e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece prioridades e estratégias para a inspeção dos produtos farmacêuticos. De acordo com a Lei nº 6360, art. 53, é de responsabilidade da indústria, manter um responsável técnico habilitado, para as diversas etapas de produção e distribuição de produtos farmacêuticos. Embora exista obrigatoriedade no envio de relatórios ao Ministério da Saúde, esta estratégia nem sempre garante a qualidade ideal dos produtos, pois a fiscalização é precária e ineficiente. Para garantir a verdadeira procedência das matérias-primas e a veracidade dos efeitos destes produtos faz-se necessário que os órgãos competentes de fiscalização, órgão federal de saúde (Ministério da Saúde) ou do órgão estadual de saúde (Secretaria Estadual de Saúde),

---

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

cumpram os seus objetivos, fiscalizando e punindo os laboratórios que não estiverem de acordo com as exigências do Ministério da Saúde (BRASIL, 1976).

## 2.2. FÁRMACOS DE RELEVÂNCIA

Em função do descontrolado consumo de produtos farmacêuticos, muitos grupos de medicamentos merecem especial atenção. Dentro deste contexto, é possível salientar medicamentos orientados ao combate da hipertensão arterial e de doenças infecciosas de origem viral, produtos que, em razão da relevância das patologias envolvidas, merecem a disponibilização de metodologias analíticas rápidas e confiáveis, de maneira a facilitar operações de controle de qualidade.

### 2.2.1. Antirretrovirais

Uma importante classe de medicamentos, dada pela gravidade da doença que é tratada, é a dos antirretrovirais. Estes medicamentos são destinados ao tratamento de pacientes portadores do vírus HIV (Human Immunodeficient Virus). Este vírus atua sobre as principais células do sistema imunológico, os linfócitos. Entre os linfócitos, o tipo mais atingido pelo vírus é o chamado linfócito TCD4, usado pelo HIV para gerar cópias de si mesmo.

Infectadas pelo vírus, essas células começam a funcionar com menos eficiência, até serem destruídas. Dessa forma, a habilidade do organismo para combater doenças comuns diminui, permitindo o aparecimento de doenças oportunistas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010)

O período médio de incubação é estimado em 3 a 6 semanas, entendendo-se por período de incubação o intervalo de tempo entre a exposição ao vírus e o surgimento de alguns sintomas, como febre e mal-estar (fase inicial). A produção de anticorpos inicia-se de 8 a 12 semanas após a infecção.

Denomina-se fase assintomática o estágio em que a pessoa infectada não apresenta qualquer sintoma. Esse período de latência do vírus é marcado pela forte interação entre o sistema imunológico e as constantes e rápidas mutações do vírus. Durante essa fase, os vírus amadurecem e morrem de forma equilibrada. A fase final corresponde à redução crítica de células T, tipo CD4, que chegam abaixo de 200 unidades por mm<sup>3</sup>, enquanto que em adultos saudáveis a contagem é da ordem de 800 a 1200 unidades. Nessa fase, surgem os sintomas típicos da AIDS (diarréia persistente, dores de cabeça, contrações abdominais, febre, falta de coordenação, náuseas, vômitos, fadiga extrema, perda de peso e doenças oportunistas) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

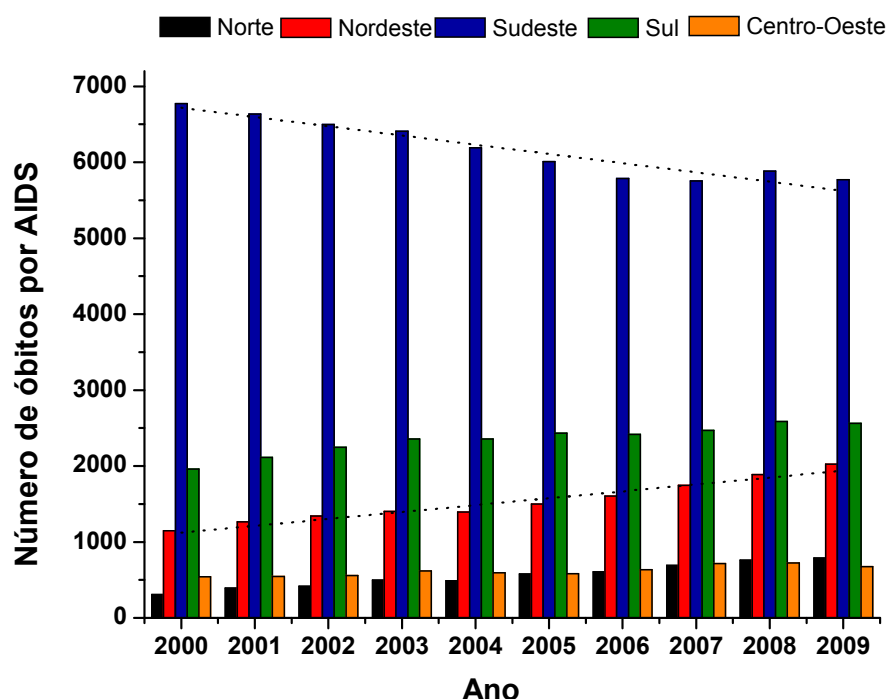
No Brasil, já foram identificados cerca de 590 mil casos de AIDS. Este número refere-se desde a identificação do primeiro caso de AIDS, em 1980, até junho de 2010. A

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

taxa de incidência foi crescente até metade da década de 90, alcançando, em 1998, cerca de 19 casos de AIDS por 100 mil habitantes. Do total de casos de AIDS, cerca de 80% concentram-se nas Regiões Sudeste e Sul. O Sudeste é a região mais atingida desde o início da epidemia e, apesar da alta taxa de incidência, mantém-se num processo de estabilização. Na região Sul observa-se aumento das taxas de incidência de casos até 2003, porém com uma provável desaceleração de crescimento nos anos mais recentes. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010b).

O país acumulou cerca de 229 mil óbitos por AIDS até dezembro de 2009. Até 1995, a curva de mortalidade acompanhava a de incidência de AIDS, quando atingiu a taxa de 9,7 óbitos por 100 mil habitantes. Após a introdução da política de acesso universal ao tratamento antirretroviral, observou-se queda na mortalidade. A partir de 2000, evidencia-se estabilização em cerca de 6 óbitos por 100 mil, embora essa tendência seja bem mais evidente na Região Sudeste e entre os homens. Além disso, entre 1993 e 2003, observou-se um aumento de cerca de cinco anos na idade mediana dos óbitos por AIDS, em ambos os sexos, refletindo um aumento na sobrevida dos pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010b).

A evolução no número de casos de óbito decorridos da doença nos últimos anos, por região do país, é apresentada na Figura 3.



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2010a).

**FIGURA 3.** NÚMERO DE ÓBITOS POR AIDS, POR REGIÃO DO BRASIL, NO DECORRER DOS ÚLTIMOS ANOS.

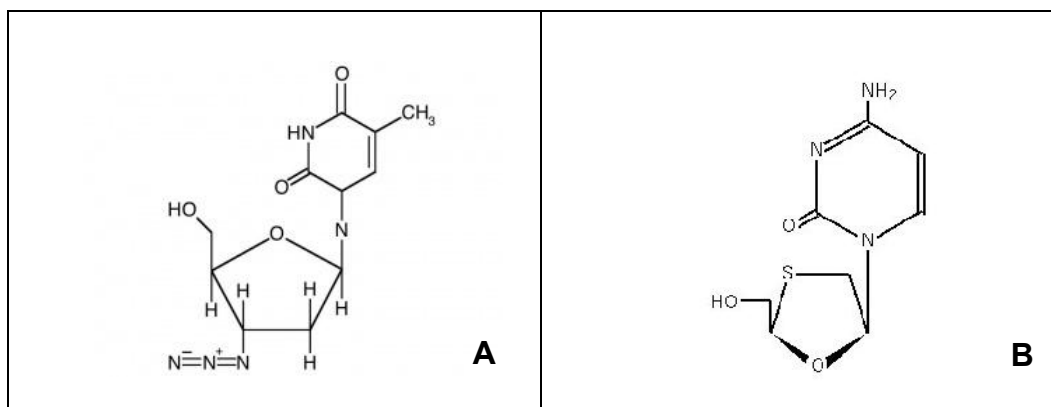


**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Normalmente os medicamentos utilizados no tratamento da AIDS são mais eficazes quando ministrados na forma de multi-associações. Este tipo de terapia, denominada TAAA (Terapêutica Antiretroviral Altamente Ativa), é altamente efetiva, em razão de cada fármaco agir em diferentes etapas do ciclo de reprodução do HIV.

Os principais representantes desta classe de medicamentos são a zidovudina (3'-azido-3'-desoxitimidina - AZT) e a lamivudina (2',3'-dideoxi-3'-ticitidina - 3TC), que podem ser administrados de forma isolada, mas que apresentam uma ação sinérgica mais eficaz quando na forma de associação. Ambos os princípios apresentam uma rápida absorção pelo organismo, incorporando-se ao DNA do HIV (PORCHE, 2001).

A estrutura química destes fármacos é apresentada na Figura 4.



**FIGURA 4.** FÓRMULAS ESTRUTURAIS DA ZIDOVUDINA (A) E DA LAMIVUDINA (B).

Desde 1996, o Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil distribui gratuitamente o coquetel antiaids para todos que necessitam do tratamento. Segundo dados do Ministério da Saúde, cerca de 200 mil pessoas recebem regularmente os medicamentos para o tratamento. Atualmente, existem 19 medicamentos para controle do HIV, os quais são divididos em cinco classes, conforme apresentado no Quadro 1.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**QUADRO 1.** CLASSES DOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRAIS, UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA AIDS, FORNECIDOS PELO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS).

<b>CLASSES DOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRAIS</b>
<b><u>Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa</u></b> – atuam na enzima transcriptase reversa, incorporando-se à cadeia do DNA que o vírus cria. Tornam essa cadeia defeituosa, impedindo que o vírus se reproduza. <i>Ex: Zidovudina, Lamivudina, Abacavir, Estavudina, Didanosina e Tenofovir.</i>
<b><u>Inibidores Não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa</u></b> – bloqueiam diretamente a ação da enzima e a multiplicação do vírus. <i>Ex: Efavirenz, Nevirapina e Etravirina.</i>
<b><u>Inibidores de Protease</u></b> – atuam na enzima protease, bloqueando sua ação e impedindo a produção de novas cópias de células infectadas com HIV. <i>Ex: Amprenavir, Arazanavir, Darunavir, Indinavir, Lopinavir/r, Nelfinavir, Ritonavir e Saquinavir.</i>
<b><u>Inibidores de Fusão</u></b> – impedem a entrada do vírus na célula evitando a sua reprodução. <i>Ex: Enfuvirtida.</i>
<b><u>Inibidores da Integrase</u></b> – bloqueiam a atividade da enzima integrase, responsável pela inserção do DNA do HIV ao DNA humano (código genético da célula). Assim, inibe a replicação do vírus e sua capacidade de infectar novas células. <i>Ex: Raltegravir.</i>

Fonte: MISTÉRIO DA SAÚDE, 2010.

### 2.2.2. Antihipertensivos

Outra classe de medicamentos que merece especial atenção, principalmente em função da patologia associada, são os antihipertensivos. O tratamento farmacológico com esta classe de medicamentos é indicado para pacientes com hipertensão arterial moderada, grave e com fatores de risco para doenças cardiovasculares e/ou lesão importante de órgãos-alvo da doença. No entanto, poucos hipertensos conseguem o controle ideal da pressão com um único agente terapêutico e, muitas vezes, faz-se necessária a terapia combinada (ZAITUNE *et al.*, 2006).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) configura-se como um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Estimativas indicam que sua prevalência está ascendente e seu impacto nas populações será ainda mais danoso nos próximos anos. Estima-se que em todo o mundo 7,1 milhões de pessoas morram anualmente por causa de pressão sanguínea elevada e que aproximadamente 4,5% de outras doenças sejam causadas pela HAS. As taxas de prevalência de valores pressóricos superiores à 140/90

---

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

mmHg na população urbana adulta brasileira variam de 22 % a 44 % (BOING & BOING, 2007).

Cerca de 70% dos pacientes hipertensos necessitam de duas ou mais medicações para obter um controle adequado de sua pressão arterial (PORTAL DO CORAÇÃO, 2009), portanto associações de fármacos antihipertensivos são comumente utilizados, principalmente em pacientes que apresentam estágio elevado de hipertensão.

São exemplos de associações reconhecidas como eficazes: diuréticos de diferentes mecanismos de ação; medicamentos de ação central e diuréticos; betabloqueadores e diuréticos; bloqueadores do receptor AT<sub>1</sub> e diuréticos; inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e diuréticos; bloqueadores dos canais de cálcio e betabloqueadores; bloqueadores dos canais de cálcio e inibidores da ECA; bloqueadores dos canais de cálcio e bloqueadores do receptor AT<sub>1</sub> (SOCIEDADE, 2006 – CAP. 6).

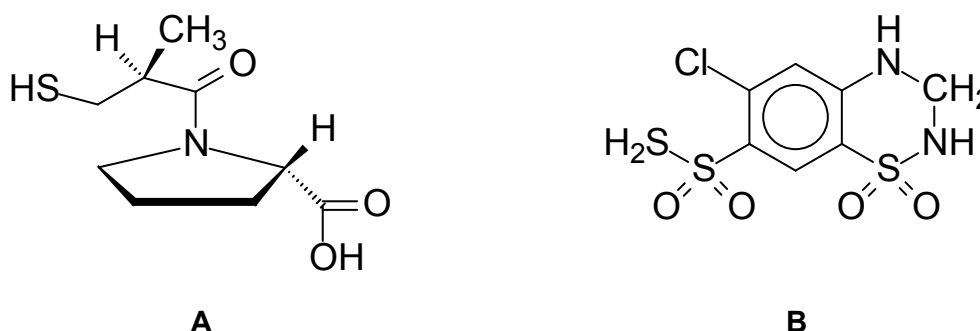
O captopril é um dos medicamentos mais vendidos para o controle da hipertensão arterial no Brasil e no mundo. Este fármaco (1-[(2S)-3-mercaptopropionil]-L-prolina, Figura 5-A) pertence à classe de inibidores da enzima conversora de angiotensina (inibidores da ECA) que atuam como potente vasoconstritor no controle da hipertensão arterial.

Um diurético amplamente utilizado em associação aos inibidores da ECA, como o captopril, é a hidroclorotiazida (1,1 dióxido de 6-cloro-3,4-diidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida, Figura 5-B), que atua diretamente nos rins, aumentando a excreção de cloreto de sódio, potássio e, conseqüentemente, da água. Esta classe de diuréticos é muito eficaz, podendo ser utilizada na forma de monoterapia ou em associação com outros antihipertensivos. Os diuréticos tiazídicos foram os primeiros antihipertensivos disponíveis para uso em larga escala. Lançados em meados dos anos 50 continuam a ser administrados, isolados ou em associação, para milhões de hipertensos em todo o mundo (SANTELLO & MION JR, 1998).

Captopril é um pó cristalino branco ou quase branco, facilmente solúvel em metanol e cloreto de metileno e também solúvel em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos. Possui faixa de fusão de 105 °C a 108 °C e valores de pka de 9,8 (tiol) e 3,7 (carboxila) (ANVISA, 2011-A).

Hidroclorotiazida é um pó cristalino branco ou quase branco, inodoro, muito pouco solúvel em água, pouco solúvel em etanol, solúvel em acetona e em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos. Possui faixa de fusão de 266-270 °C, com decomposição e valores de pka de 9,2 e 7,9 (aminas) (ANVISA, 2011-B).

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



**FIGURA 5.** FÓRMULAS ESTRUTURAIS DO CAPTOPRIL (A) E DA HIDROCLOROTIAZIDA (B).

### 2.3. CONTROLE DE QUALIDADE

Atualmente existe um consenso universal a respeito da necessidade de se monitorar de forma contínua a produção de medicamentos, produtos utilizados no tratamento de pessoas já debilitadas por uma doença ou sintoma particular e que requerem um rigoroso controle de qualidade.

Em função da seriedade que este tipo de controle reveste, grande parte das propostas analíticas está fundamentada em técnicas instrumentais modernas, muitas vezes demoradas e onerosas, dentre as quais se destacam a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (VERWEIJ-VAN WISSEN *et al.*, 2005; ASCENZI, *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2006), a cromatografia em fase líquida de ultra-eficiência (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2006; KRISHNAIAH, *et al.*, 2010), a cromatografia em fase gasosa (SAKA *et al.*, 2008; YAZDI *et al.*, 2008), a eletroforese capilar (ZHANG *et al.*, 2008; CIANCHINO *et al.*, 2008; FOTEEVA *et al.*, 2008; SUNTORNSUK, 2001) e a espectrometria de ressonância magnética nuclear (ACETTI *et al.*, 2008). Dada a própria natureza deste conjunto de técnicas instrumentais, as possibilidades de estabelecer um sistema de análise “on-line” são praticamente inexistentes, motivo pelo qual o controle de qualidade continua sendo universalmente aplicado a lotes do produto, selecionados de acordo com critérios estatísticos.

#### 2.3.1. Análise de Antirretrovirais

Segundo as monografias oficiais da Farmacopéia Americana (USP, 2009) e da Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010), o ensaio para controle de qualidade de zidovudina (AZT) e lamivudina (3TC) deve ser realizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), existindo poucas metodologias alternativas (STEWART & FAN, 2002).

---

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

KENNEY e colaboradores (2000) relatam a determinação simultânea de AZT e 3TC por CLAE-EM, enquanto que cromatografia eletro cinética micelar é proposta por SEKAR e AZHAGUVEL (2005). Mais recentemente, outros métodos cromatográficos foram desenvolvidos, envolvendo detecção ultravioleta (BECK *et al.*, 2007) e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HABTE *et al.*, 2009).

Em função da interferência espectral entre estes fármacos, poucas alternativas espectroscópicas têm sido propostas para esta determinação. Dentro deste contexto, destaque pode ser dado ao trabalho de USLU e OZKAN (2002), que propõem o uso de rotinas analíticas fundamentadas em espectroscopia derivativa. O método, fundamentado em determinações no ponto de anulação, permitiu exatidão e precisão comparável com a apresentada por um método cromatográfico em fase líquida, permitindo a análise de medicamentos com excelente aproximação.

Recentemente a voltametria de onda quadrada foi proposta para determinação de AZT na presença de oligonucleótidos e DNA cromossômico (TRNKOVÁ *et al.*, 2004).

Por sua vez, as análises por espectroscopia no infravermelho limitam-se a análise de um dos fármacos por vez, como relata ARAUJO *et al.* em 2003, que utiliza a técnica de infravermelho na quantificação de zidovudina em um estudo de compatibilidade com excipientes. Em outro estudo recente, realizado por LOPES *et al.* em 2009, a espectroscopia no infravermelho próximo por imagem foi associada a CLS (Classical Least Square) para determinação de lamivudina em amostras de um medicamento, buscando verificar alterações e possíveis falsificações.

Até onde pode-se investigar, não há relatos na literatura sobre a quantificação de misturas de lamivudina e zidovudina por metodologias que associem a espectroscopia eletrônica com ferramentas de calibração multivariada.

### 2.3.2. Análise de Antihipertensivos

Algumas técnicas para quantificação de captopril, em associações com outros fármacos ou não, estão descritas na literatura, dentre as quais se destacam: cromatografia em fase líquida de alta eficiência (SALEM *et al.*, 2005; EL-GINDY *et al.*, 2004; MIRZA & TAN, 2001), acoplada a espectroscopia de massas (REZENDE *et al.*, 2006), espectroscopia Raman (MAZUREK & SZOSTAK, 2006), espectrometria de absorção atômica (EL REIS *et al.*, 2000), espectroscopia infravermelho por refletância difusa (GOTARDO *et al.*, 2008), técnicas quimiluminescentes (PULGARÍN *et al.*, 2005), colorimétricas (SHAMA *et al.*, 2006; PIMENTA *et al.*, 2001), termoanalíticas (HUANG *et al.*, 2001), voltamétricas (REZAEI & DAMIRI, 2008; PARHAM & ZARGAR, 2005; SHAHROKHIAN *et al.*, 2005; IOANNIDES, 2003; SIANGPROH *et al.*, 2003), potenciométricas (RIBEIRO *et al.*, 2003) e sistema de injeção de fluxo com biosensores

---

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

amperométricos (STEFAN *et al*, 2000).

Para quantificação de hidroclorotiazida em associações farmacêuticas podemos destacar técnicas fundamentadas em cromatografia em fase líquida de alta eficiência (DINÇ & ÖZDEMIR, 2005; BELAL *et al*, 2001; EL WALILY *et al*, 1995), cromatografia de alta eficiência em camada delgada (BEBAWY *et al*, 2005), eletroforese capilar (PRIETO *et al*, 2001), técnicas voltamétricas (RAZAK, 2004; PRIETO *et al*, 2003), quimiluminescentes (PULGARÍN *et al*, 2004) e condutométricas (LOURENÇÃO *et al*, 2008).

Normalmente, quantificações simultâneas da associação captopril e hidroclorotiazida são relatadas pelo uso de técnicas cromatográficas (HUANG *et al*, 2006; IVANOVIC *et al*, 2004) e com a utilização de detectores de quimiluminescência (OUYANG *et al*, 1999).

#### 2.4. ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO

Dissolução pode ser definida de forma simplificada como o processo pelo qual um fármaco é liberado de sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo. Assim, o ensaio de dissolução nada mais é do que um teste físico de natureza destrutiva, no qual o fármaco passa para a forma solúvel a partir da forma farmacêutica sólida intacta ou de fragmentos e partículas formadas durante o ensaio (CHOWDARY, 1987).

O ensaio de dissolução baseia-se no princípio de que, à medida que uma forma farmacêutica se fragmenta em pequenos pedaços, aumenta a sua área superficial, facilitando a dissolução no meio, o que, portanto, está relacionado com a biodisponibilidade do fármaco no organismo.

A avaliação correta da liberação do fármaco a partir de várias formulações ou produtos é conseguida através da determinação da biodisponibilidade. Entretanto, o elevado custo dos estudos *in vivo* e a necessidade de técnicos qualificados e de seres humanos para investigação, ressaltam a importância dos testes de dissolução como medição indireta da biodisponibilidade do fármaco, especialmente em avaliações preliminares da formulação e em estudos da consistência da qualidade entre os diferentes lotes produzidos. Tal como qualquer teste *in vitro* é importante que os resultados do ensaio de dissolução possam ser correlacionados com os resultados dos testes de biodisponibilidade.

Os ensaios de dissolução correspondem a uma importante ferramenta de controle de qualidade em diferentes estágios do ciclo de vida do medicamento. Nos primeiros estágios do desenvolvimento farmacotécnico, eles são úteis para identificar variáveis críticas na produção, escolher entre diferentes formulações, otimizá-las e fazer

---

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

avaliações de risco, como no caso de formas de liberação controlada. Durante a fase de produção, estes ensaios são importantes para liberação dos lotes e para avaliação da sua estabilidade, uma vez que, dentro de certos limites, as características de dissolução de um produto devem manter-se constantes durante todo o período de validade do mesmo. Os ensaios de dissolução também são muito úteis para avaliar o impacto que certas mudanças, como equipamento ou local de fabricação, podem ter sobre o produto (MARCOLONGO, 2003; BRASIL, 2003a, MANADAS *et al*, 2002).

Atualmente, outra importante aplicação dos estudos de dissolução envolve a avaliação da equivalência farmacêutica e da biodisponibilidade relativa (ou bioequivalência) para algumas dosagens de um mesmo fármaco. Os estudos de equivalência farmacêutica e bioequivalência são necessários, principalmente para o registro de medicamentos genéricos. Quando se comprova que todas as dosagens de determinado produto apresentam perfis de dissolução semelhantes, e existe um estudo de bioequivalência que a comprova em relação a um produto de referência, as demais podem ser registradas também, sem que haja a realização de novos estudos *in vivo* (GIBALDI, 1991; BRASIL, 2003b).

No Brasil os ensaios de dissolução passaram a ser exigidos para o registro de medicamentos a partir de 1999, com a introdução dos medicamentos genéricos. Durante os anos 90 foram elaborados diversos guias pela FDA (*Food and Drug Administration*), FIP (*Federação Internacional de Farmacêuticos*) e EMEA (*European Medicines Agency*) abrangendo a maioria dos aspectos dos ensaios de dissolução (MANADAS, 2002). Dentro deste contexto, os ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata, tais como comprimidos e cápsulas, são utilizados como parâmetro para avaliar a qualidade dos lotes de medicamentos, para orientar o desenvolvimento de novas formulações e para assegurar o desempenho do medicamento após as alterações (ANVISA, 2002).

Inúmeras são as variáveis que podem modificar os resultados de um ensaio de dissolução. Todas devem ser consideradas, mas algumas devem ser rigorosamente monitoradas para obtenção de resultados confiáveis. Dentro deste contexto, destacam-se algumas características da amostra (ex. solubilidade, tamanho da partícula, natureza química, forma farmacêutica, excipientes, tecnologia de fabricação), parâmetros relacionados ao equipamento (ex. velocidade de agitação, meio de dissolução, posição da haste e método de amostragem), além de parâmetros relacionados com o meio de dissolução (ex. volume, presença de gases, pH, temperatura, viscosidade, dentre outros). (MARCOLONGO, 2003).

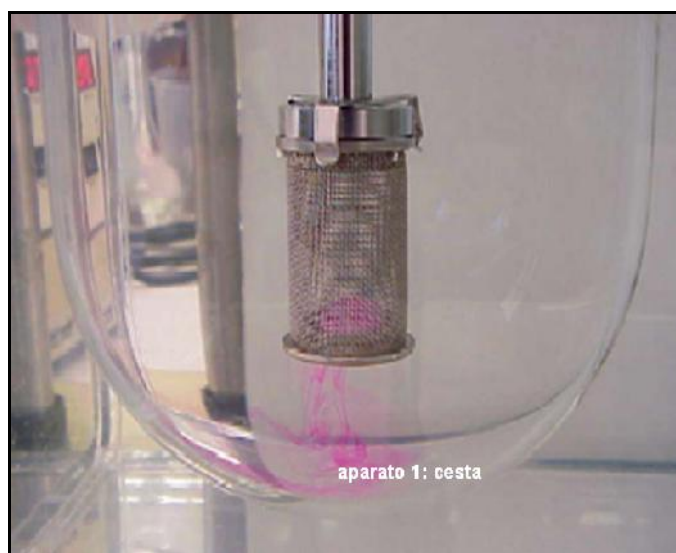
O primeiro aparato de dissolução adotado oficialmente foi o da cesta (*rotating basket*) pela Farmacopéia Americana em 1970 (Figura 6). Este sistema está previsto em

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

todas as farmacopéias (brasileira, britânica, européia, japonesa e americana), apresentando pequenas variações quanto às especificações (dimensões, capacidade, etc). Esse aparato tem a vantagem de confinar a forma farmacêutica a uma área limitada, enquanto a mantém imersa no meio. Isso é essencial para conseguir uma melhor reprodutibilidade do método. Esse aspecto também é vantajoso para cápsulas que tendem a flutuar e podem ter a redução da superfície de contato com o meio (ABDOU, 1989).

Os estudos realizados pela Comissão de Revisão da Farmacopéia Americana levaram a introdução e oficialização, em 1977, do aparato nº 2, em que a cesta (aparato nº 1) é substituída pela pá (Figura 7), hoje amplamente utilizado na realização de ensaios de dissolução para diferentes formas farmacêuticas (MARCOLONGO, 2003; MANADAS, 2002).

A Farmacopéia Americana estabelece, ainda, ensaios de adequação a serem conduzidos nos aparatos, utilizando comprimidos calibradores de prednisona (desintegrantes) e ácido salicílico (não desintegrantes), sendo que eles são considerados adequados se os resultados obtidos estiverem dentro dos limites especificados para cada calibrador (USP, 2009).

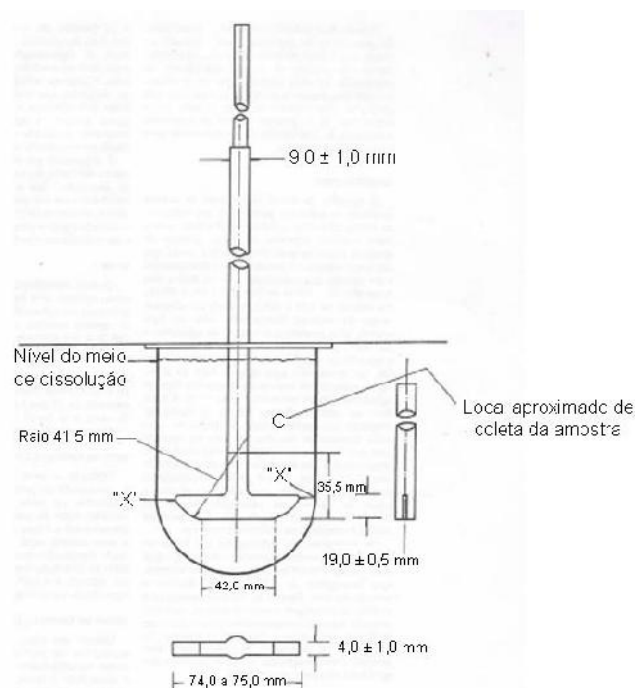


*Fonte:* SANTOS, 2009

**FIGURA 6.** DETALHE DO SISTEMA DE DISSOLUÇÃO UTILIZANDO O APARATO CESTA.



## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



**FIGURA 7.** APARATO DA PÁ PARA ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO (REPRODUZIDO DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

O método de dissolução é específico para cada medicamento, estando ele em associação ou não. Os testes de dissolução fazem parte das monografias de quase todas as formas farmacêuticas sólidas. Além das especificações de cada monografia, as farmacopéias trazem também especificações em diferentes estágios deste processo.

Normalmente, as técnicas analíticas utilizadas na avaliação dos parâmetros obtidos pelo ensaio de dissolução são as mesmas utilizadas no controle de qualidade das matérias primas e dos produtos acabados. Para a análise dos medicamentos dissolvidos são utilizados métodos cromatográficos (JANTRATID *et al*, 2009; GARBACZ *et al*, 2008; IYER *et al*, 2007; MENEGOLA *et al*, 2007; ROSSI *et al*, 2007), espectrofotométricos (JOSHI *et al*, 2008; FREITAS *et al*, 2005), utilizando métodos de derivação espectral (DINÇ *et al*, 2007) ou equipados com sensor de fibra ótica para medidas de refletância (FILIK *et al*, 2008; JOHANSSON *et al*, 2002; GEMPERLINE *et al*, 1997), espectroscopia de luminescência (SOTOMAYOR *et al*, 2008), potenciométricos (PEETERS *et al*, 2008; BOHETS *et al*, 2007), titulométricos (BRANDÃO, 2001), difração de raios-x e espectroscopia Raman (ALLESØ *et al*, 2009).

Recentemente, sistemas de calibração multivariada têm sido propostos para a realização de ensaios de dissolução, utilizando-se, principalmente, espectroscopia no infravermelho próximo (REVELLE *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2005).

---

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Até onde foi possível investigar, apenas um trabalho relata a realização de ensaios de dissolução com produtos farmacêuticos contendo lamivudina (FERNANDES *et al.*, 2006).

## 2.5. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Um dos principais objetivos da calibração multivariada consiste em explorar toda a informação fornecida pela técnica instrumental utilizada, condição que favorece a previsão de uma resposta de interesse com discrepância mínima, mesmo em condições de severa interferência entre as espécies que fazem parte da matriz.

Métodos de calibração multivariada têm sido cada vez mais utilizados em química analítica, principalmente quando os componentes presentes numa mistura necessitam ser determinados, mas a informação analítica disponível não apresenta seletividade (BRO, 2003; HOPKE, 2003). Ou seja, quando em uma mistura não é possível identificar os componentes individuais, a partir da resposta instrumental.

O procedimento geral da análise química é composto de duas etapas fundamentais. Na primeira, alguns tratamentos químicos e/ou físicos são utilizados com o objetivo de transformar a amostra levando-a a um estado físico compatível com a técnica analítica disponível. Na segunda, modelos de calibração são desenvolvidos, obtendo-se uma função de regressão que permite prever uma quantidade química esperada, a partir de um parâmetro físico medido.

Normalmente, os modelos de calibração são desenvolvidos utilizando-se aproximações univariadas. No caso particular da espectroscopia UV-Vis, por exemplo, o sinal processado costuma corresponder à absorvância registrada no comprimento de onda de absorção máxima. Obviamente que, se houver interferentes ou espécies que absorvam na mesma região ou próximo, a utilização de apenas este parâmetro dificulta (e as vezes inviabiliza completamente) a determinação de amostras em que os componentes apresentam severa interferência espectral (ANDRADE *et al.*, 2003).

A base da calibração multivariada é estabelecer uma relação entre duas matrizes (ou blocos) de dados químicos, quando houver uma dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas.

A calibração multivariada consiste basicamente de duas fases (MARTENS, 1989; FERREIRA *et al.*, 1999): a calibração e a previsão. Na fase de calibração, “n” espectros para um conjunto de amostras com composição conhecida são obtidos em “p” valores de energia (ou comprimento de onda) diferentes, formando uma matriz **Xcal**, com “n” linhas e “p” colunas. Também uma matriz **Ycal** com os valores de concentração pode ser

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

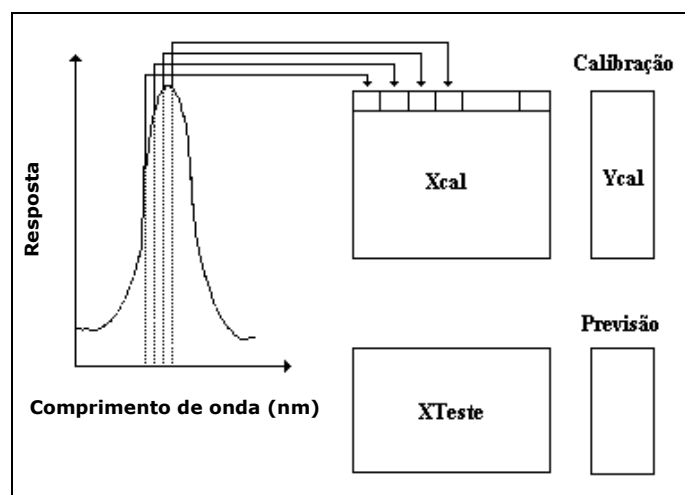
formada contendo “n” linhas, correspondendo às diferentes amostras, e “q” colunas, indicando o número de diferentes compostos presentes nas amostras.

O próximo passo é desenvolver um modelo matemático apropriado (determinando-se um vetor dos coeficientes de regressão – **b**) que melhor possa reproduzir **Ycal** a partir dos dados da matriz **Xcal** (Eq. 01). Esse modelo é utilizado na fase de previsão (com um conjunto teste) para estimar as concentrações (**Yprev**) dos constituintes de novas amostras, a partir de seus espectros (**Xteste**) (Eq. 02). Como estas metodologias trabalham com matrizes de dados, o processo de estimar o vetor **b** da Eq. 01 para a obtenção da Eq.02, implica a utilização da matriz transposta de **X**, ou seja, (**Xteste**)<sup>t</sup>.

$$\mathbf{Xcal} = \mathbf{b} * \mathbf{Ycal} \quad (\text{Eq.01})$$

$$\mathbf{Yprev} = (\mathbf{Xteste})^t * \mathbf{b} \quad (\text{Eq.02})$$

Os dados para a calibração multivariada podem ser organizados conforme mostrado na Figura 8. Os valores de absorvância (ou transmitância) dos espectros, a cada valor de energia (ou comprimento de onda), são as variáveis independentes, e as concentrações das espécies e interesse nas amostras, as variáveis dependentes.



Fonte: NAGATA, 2001.

**FIGURA 8.** ORGANIZAÇÃO DOS DADOS PARA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.

### 2.5.1. PLSR

A Calibração Multivariada, fundamentada em técnicas de regressão dos mínimos quadrados parciais, corresponde a uma ferramenta poderosa para a química analítica, de interessante potencial de aplicação em muitos problemas de análise farmacêutica (ARANCIBIA *et al.*, 2000; SENA *et al.*, 2000; MEDINA *et al.*, 1999). Em geral, este

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

recurso permite a determinação de um componente de interesse em matrizes complexas ou a análise de multicomponentes em sistemas mais simples.

A base do método dos mínimos quadrados parciais (PLS) está na decomposição de uma matriz de dados  $\mathbf{X}$ , em termos da soma de várias matrizes  $\mathbf{M}_i$ , que não podem mais ser expandidas, mais uma matriz de erros (que corresponde a parte não modelada de  $\mathbf{X}$ ). As matrizes  $\mathbf{M}_i$  constituem os chamados componentes principais ou variáveis latentes, que resultam das combinações lineares das variáveis originais, no qual a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões, e são formadas pelo produto de dois vetores,  $\mathbf{t}$  (os *scores*) e  $\mathbf{p}$  (os *loadings*) (ABDI, 2003):

$$\mathbf{X} = \mathbf{M}_1 + \mathbf{M}_2 + \dots + \mathbf{M}_a + \mathbf{E} \text{ ou,} \quad (\text{Eq.03})$$

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1\mathbf{p}_1 + \mathbf{t}_2\mathbf{p}_2 + \dots + \mathbf{t}_a\mathbf{p}_a + \mathbf{E} \text{ ou,} \quad (\text{Eq.04})$$

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \quad (\text{Eq.05})$$

A dimensionalidade do espaço original é igual ao número de colunas em  $\mathbf{X}$ , ou seja, o número de variáveis originais. No novo modelo, a dimensionalidade é descrita pelo número de matrizes  $\mathbf{M}_i$  necessárias para descrever  $\mathbf{X}$ . Assim, se for possível descrever uma matriz  $\mathbf{X}$  que tenha muitas variáveis, por um número pequeno dessas matrizes  $\mathbf{M}_i$ , haverá um decréscimo na dimensionalidade, sem perda de informação.

No PLS, tanto a matriz das variáveis independentes  $\mathbf{X}$ , como a das variáveis dependentes  $\mathbf{Y}$ , são representadas pelos *scores* e *loadings*:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \quad (\text{Eq.06})$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}' + \mathbf{F} \quad (\text{Eq.07})$$

Uma relação entre as duas matrizes de dados  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  pode ser construída, correlacionando-se os *scores* de cada bloco, utilizando um modelo linear:

$$\mathbf{u}_a = \mathbf{b}_a\mathbf{t}_a \text{ ou,} \quad (\text{Eq.08})$$

$$\mathbf{U} = \mathbf{bT} \quad (\text{Eq.09})$$

Métodos de calibração multivariada têm sido utilizados com bastante frequência na resolução de problemas de interferência espectral. No caso da espectrofotometria UV-Vis, os exemplos são abundantes e atestam o grande potencial dos processos de calibração multivariada para a resolução deste tipo de problemas, sem a necessidade de recorrer a metodologias químicas de separação, frequentemente associadas a contaminação ou perda da amostra de interesse. Neste sentido, merecem destaque os

---

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

bons resultados conseguidos na determinação espectrofotométrica de fármacos (BOERIS *et al.*, 2000; CRIADO *et al.*, 2000; BENAMOR *et al.*, 2000, HADAD, *et. al.*, 2008).

Na espectroscopia por infravermelho, destaque pode ser dado a trabalhos recentes que tratam sobre a determinação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima (SILVA, *et. al.*, 2009), condroitina e glucosamina (ROSSIGNOLI, *et. al.*, 2008) e associações contendo aspirina (DOU, *et. al.*, 2007), recorrendo ao uso de técnicas espectroscópicas fundamentadas em medidas de reflectância no infravermelho e ferramentas de calibração multivariada.

## 2.6. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou a implementação de método conhecido, envolve um processo de avaliação que demonstre sua eficiência na rotina de análises de produtos industrializados, especialmente na indústria farmacêutica. Esse processo costuma ser denominado de validação. Um método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA (ANVISA 2003; BRITO *et al.*, 2003, RIBANI, *et al.*, 2004).

A validação de métodos analíticos é um aspecto vital da garantia da qualidade de medicamentos e deve assegurar, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, garantindo a confiabilidade dos resultados.

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de duas características: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, durante a etapa de validação (VALDERRAMA, 2005).

As características típicas utilizadas na validação de métodos analíticos são: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão (VALENTINI *et al.*, 2007; ANVISA 2003; BARROS, 2002).

No caso de metodologia analítica não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, a validação deverá envolver a avaliação de uma série de parâmetros, os quais dependem da finalidade do teste. Os testes necessários são classificados em 4 categorias, conforme apresentado no Quadro 2. Para cada categoria será exigido um conjunto de testes, os quais estão relacionados no Quadro 3.

A forma com que as figuras de mérito serão determinadas é estabelecida pelos órgãos de fiscalização, descritas em normas específicas, guias de validação e trabalhos

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

científicos. A maioria dos guias, normas e trabalhos científicos apresentam a validação de maneira univariada. Conseqüentemente, poucos trabalhos relatam a validação de modelos multivariados (BRAGA E POPPI, 2004; VALDERRAMA, *et.al.*, 2009).

No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Instrumental (INMETRO).

**QUADRO 2.** CLASSIFICAÇÃO DOS TESTES DE VALIDAÇÃO, SEGUNDO SUA FINALIDADE.

<b>Categoria</b>	<b>Finalidade do teste</b>
<b>I</b>	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
<b>II</b>	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
<b>III</b>	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
<b>IV</b>	Testes de identificação

Fonte: ANVISA, 2003

**QUADRO 3.** ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS, SEGUNDO SUA FINALIDADE.

<b>Parâmetro</b>	<b>Categoria I</b>	<b>Categoria II</b>		<b>Categoria III</b>	<b>Categoria IV</b>	
		<i>Quantitativo</i>	<i>Ensaio Limite</i>			
Especificidade	SIM	SIM	SIM	*	SIM	
Linearidade	SIM	SIM	NÃO	*	NÃO	
Intervalo	SIM	SIM	*	*	NÃO	
Precisão	<i>Repetibilidade</i>	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO
	<i>Intermediária</i>	**	**	NÃO	**	NÃO
Limite de detecção	NÃO	NÃO	SIM	*	NÃO	
Limite de quantificação	NÃO	SIM	NÃO	*	NÃO	
Exatidão	SIM	SIM	*	*	NÃO	
Robustez	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	

\* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

\*\* se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Fonte: ANVISA, 2003

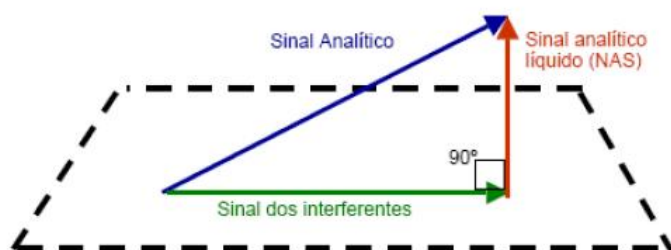
## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.6.1. Especificidade e Seletividade

Especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes, e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais (VALENTINI *et al*, 2007; ANVISA, 2003).

Os termos seletividade e especificidade são muitas vezes utilizados indistintamente ou com interpretações diversas, mas, de acordo com o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) (2003), seletividade e especificidade não são sinônimos. Um método específico é aquele capaz de determinar apenas um analito presente na matriz, e seletivo é aquele capaz de determinar e distinguir cada um dos vários analitos presentes.

Em calibração multivariada, a seletividade pode ser correlacionada com o conceito de Sinal Analítico Líquido (NAS, do inglês *Net Analyte Signal*), o qual exerce uma importante função na determinação de figuras de mérito. O método para o cálculo do NAS para modelos multivariados de calibração inversa foi proposto por LORBER (1986). O NAS é definido, para uma propriedade de interesse  $k$ , como sendo a parte do sinal analítico que é ortogonal às contribuições de possíveis interferentes presentes na amostra. Sua propriedade de ortogonalidade pode ser observada pela representação geométrica da Figura 9.



Fonte: VALDERRAMA, 2005.

**FIGURA 9.** REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DA PROPRIEDADE DE ORTOGONALIDADE DO NAS.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No cálculo do *NAS*, primeiramente a matriz  $\ddot{X}$  é reconstruída com  $A$  variáveis latentes gerando a matriz  $\ddot{X}_A$  (decomposta em escores e *loadings*), em seguida é determinada a matriz  $\ddot{X}_{A,-k}$ , que é a matriz que contém a informação de todas as espécies presentes na amostra exceto da espécie de interesse  $k$ , descrito na equação 10.

$$\ddot{X}_{A,-k} = [I - \hat{y}_{A,k} \hat{y}_{A,k}^+] \ddot{X} \quad (\text{Eq. 10})$$

Em que  $\hat{y}$  é o vetor de concentrações da espécie de interesse  $k$  estimado com  $A$  variáveis latentes,  $\ddot{X}_A$  é o vetor de respostas instrumentais de uma amostra estimado com  $A$  variáveis latentes e o índice “+” sobrescrito indica a pseudoinversa da matriz em questão. Isso faz com que a matriz  $\ddot{X}_{A,-k}$ , fique livre de qualquer contribuição da espécie  $k$ .

O vetor *NAS* é então obtido como:

$$\ddot{X}_{A,k}^{\text{nas}} = [I - \ddot{X}_{A,-k}^T (\ddot{X}_{A,-k}^T)^+] \ddot{X}_A \quad (\text{Eq. 11})$$

Uma vez que  $\ddot{X}_{A,k}^{\text{nas}}$  é livre de interferentes, é possível substituí-lo por uma representação escalar sem perda de informação. Assim temos:

$$\hat{n}as = \|\ddot{X}_{A,k}^{\text{nas}}\| \quad (\text{Eq. 12})$$

Em que  $\|\ \|\$  representa a norma Euclidiana do vetor  $\ddot{X}_{A,k}^{\text{nas}}$ .

Com a possibilidade de calcular um valor escalar livre de interferentes, a partir de um vetor contendo contribuições de constituintes desconhecidos, torna-se possível a construção de uma nova forma de calibração multivariada, em que o modelo pode ser representado em uma forma univariada. Primeiro, o cálculo do *NAS* é feito para as  $i$  amostras de calibração, em seguida o coeficiente de regressão é determinado por mínimos quadrados entre o vetor  $\hat{n}as$  e o vetor de concentrações  $y$ :

$$\hat{b}_{nas} = (\hat{n}as^T \hat{n}as)^{-1} \hat{n}as^T y \quad (\text{Eq. 13})$$

E o modelo de regressão pode, então, ser representado por:



## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

$$\hat{y} = \hat{b}_{nas} \mathbf{nas} \quad (\text{Eq. 14})$$

Se os dados foram centrados na média, antes da determinação do coeficiente de regressão  $\hat{b}_{nas}$ , o vetor  $\mathbf{nas}$  precisa ser corrigido de forma a evitar um erro de sinal que é introduzido pelo uso da norma Euclidiana. Esta correção pode ser feita pela multiplicação de cada elemento do vetor  $\mathbf{nas}$  pelo seu sinal correspondente no vetor  $(\mathbf{y} - \bar{y})$ , onde  $\bar{y}$  é a média do vetor  $\mathbf{y}$  que contém os valores de referência.

A seletividade é a medida do grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e os interferentes presentes na amostra e indica a parte do sinal que é perdida por essa sobreposição. Para modelos de calibração multivariada esse parâmetro é definido como:

$$SEL = \frac{n\hat{s}_i}{\|\mathbf{x}_i\|} \quad (\text{Eq.15})$$

Em que  $n\hat{s}_i$  é o escalar NAS estimado para amostra 'i' e  $\mathbf{x}_i$  o vetor de dados originais. O valor de seletividade estimado a partir da expressão 15 informa quanto do sinal original é usado na calibração por não ser ortogonal à propriedade de interesse. Dessa forma, a seletividade calculada a partir dessa equação não se refere ao sentido geralmente empregado para o termo em química analítica, com modelos univariados, e sim a uma forma de estimar quanto do sinal é perdido por ortogonalidade (VALDERRAMA, 2005).

### 2.6.2. Linearidade

Entende-se por linearidade a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes, de acordo com os intervalos apresentados no Quadro 4 (ANVISA, 2003).

Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo  $\mathbf{Y}$ , coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser = 0,99 (VALENTINI *et al*, 2007; ANVISA, 2003).

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Em modelos de calibração multivariada uma medida quantitativa da linearidade não é uma tarefa simples, ou mesmo possível. Qualitativamente, gráficos de resíduos *versus* concentração devem ter um comportamento aleatório, já o gráfico de scores pela concentração deve ter um comportamento linear, assim sendo o comportamento é linear, caso contrário não há linearidade no modelo desenvolvido (LAASONEN, 2003).

## 2.6.3. Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (Quadro 4). É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicadas a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (ANVISA, 2003).

**QUADRO 4.** LIMITES PERCENTUAIS DO TEOR DO ANALITO QUE DEVEM ESTAR CONTIDOS NO INTERVALO DE LINEARIDADE PARA ALGUNS MÉTODOS ANALITICOS.

<b>ENSAIO</b>	<b>ALCANCE</b>
<b>Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas</b>	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
<b>Determinação de impurezas</b>	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
<b>Uniformidade de conteúdo</b>	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
<b>Ensaio de dissolução</b>	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir $-20\%$ sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor

Fonte: ANVISA, 2003

---

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA****2.6.4. Precisão**

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão é considerada em três níveis (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003):

- Repetibilidade (precisão intra-corrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste;
- Precisão intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.
- Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (**DPR**) ou coeficiente de variação (**CV%**), segundo a fórmula,

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Onde: **DP** é o desvio padrão e **CMD**, a concentração média determinada.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% de **DPR** (ANVISA, 2003).

---

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA****2.6.5. Limite de detecção (sensibilidade)**

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (ANVISA, 2003).

No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, conforme equação apresentada a seguir:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

Onde: **IC** é a inclinação da curva e **DP<sub>a</sub>** é o desvio padrão do intercepto com o eixo do **Y** de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva analítica proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco (ANVISA, 2003).

**2.6.6. Limite de quantificação**

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito na amostra (ANVISA, 2003).

O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação,

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

Onde: **IC** é a inclinação da curva e **DP<sub>a</sub>** é o desvio padrão do intercepto com o eixo do **Y** de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco (ANVISA, 2003).

Em calibração multivariada a sensibilidade corresponde à fração do sinal analítico que é devido ao aumento da concentração de um analito em particular, em unidade de concentração. A sensibilidade é definida como o inverso da norma do vetor coeficientes de regressão ( $\mathbf{b}_k$ ) do modelo de calibração.

$$SEN = \frac{1}{\|\mathbf{b}_k\|} \quad (\text{Eq. 16})$$

Em que  $\mathbf{b}_k$  é o vetor dos coeficientes de regressão estimados pelo PLS.

Quando o NAS é determinado, o vetor de sensibilidade líquida  $s_k^{nas}$  para cada amostra do conjunto de calibração pode ser determinado a partir do vetor  $x_{A,k}^{nas}$  como:

$$\mathbf{s}_k^{nas} = \left\| \frac{\mathbf{x}_{A,k}^{nas}}{y} \right\| \quad (\text{Eq. 17})$$

Em que, o vetor de  $s_k^{nas}$  deve ser igual para todas as amostras de calibração,  $x_{A,k}^{nas}$  é o vetor de sinal analítico líquido para a espécie  $k$ ,  $y$  é o vetor que contém os valores de referência.

O escalar  $\hat{SEN}$ , pode ser determinado por:

$$\hat{SEN} = \|\mathbf{s}_k^{nas}\| \quad (\text{Eq. 18})$$

A sensibilidade analítica ( $\gamma$ ) não é abordada em normas ou guias de validação. No entanto, esse parâmetro apresenta a sensibilidade do método em termos da unidade de concentração que é utilizada, sendo definida como a razão entre a sensibilidade e o desvio padrão do sinal de referência ( $\delta x$ ) (VALDERRAMA, 2005):

$$\gamma = \frac{\hat{SEN}}{\|\delta x\|} \quad (\text{Eq. 19})$$

Em que,  $\hat{SEN}$  é obtido através das equações 16 ou 18 e  $\delta x$  é o desvio padrão do sinal de referência estimado através do desvio de replicatas do branco ou dos resíduos do modelo PLS.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O inverso desse parâmetro, ou seja, ( $\delta^{-1}$ ), permite estabelecer a menor diferença de concentração entre amostras que pode ser distinguida pelo método, considerando o ruído instrumental aleatório como única fonte de erro.

Para um conjunto de dados que apresenta um comportamento, onde há uma variância constante ao longo da faixa de trabalho, erros com previsão não correlacionados e que seguem uma distribuição normal, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) podem ser calculados de acordo com as expressões apresentadas a seguir:

$$LD = 3\delta x \|\mathbf{b}_k\| = 3\delta x \frac{1}{S\hat{E}N} \quad (\text{Eq. 20})$$

$$LQ = 10\delta x \|\mathbf{b}_k\| = 10\delta x \frac{1}{S\hat{E}N} \quad (\text{Eq. 21})$$

Em que,  $\delta x$  é o desvio padrão do sinal de referência,  $\mathbf{b}_k$  é o vetor dos coeficientes de regressão do modelo PLS para a espécie k,  $S\hat{E}N$  corresponde ao valor de sensibilidade obtido através das equações 16 ou 18.

#### 2.6.7. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis:

- Fármaco: aplicando-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida;
- Forma Farmacêutica: na análise de uma amostra, em que a quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, aceita-se a análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento.
- Impurezas: análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco.

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença porcentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica (real)}} \times 100$$

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada (ANVISA, 2003).

Em calibração multivariada, a exatidão refere-se à proximidade entre os valores de referência e os valores encontrados pelo modelo de calibração, e relaciona-se com o erro absoluto de uma medida. Em quimiometria este parâmetro é geralmente expressado como a raiz quadrada do erro quadrático médio de previsão (RMSEP, do inglês *root mean square error of prediction*) conforme é descrito na equação 22:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y - \bar{y})^2}{N}} \quad (\text{Eq. 22})$$

Onde: N representa o número de amostras utilizadas na previsão,  $y$  e  $\bar{y}$  representam os valores de referência e os valores preditos pelo modelo de calibração.

#### 2.6.8. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. O Quadro 5 relaciona os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**QUADRO 5.** FATORES QUE DEVEM SER CONSIDERADOS NA DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO.

<b>Preparo das amostras</b>	· Estabilidade das soluções analíticas · Tempo de extração
<b>Espectrofotometria</b>	· Variação do pH da solução · Temperatura · Diferentes fabricantes de solventes
<b>Cromatografia em fase líquida</b>	· Variação do pH da fase móvel · Variação na composição da fase móvel · Diferentes lotes ou fabricantes de colunas · Temperatura · Fluxo da fase móvel
<b>Cromatografia em fase gasosa</b>	· Diferentes lotes ou fabricantes de colunas · Temperatura · Velocidade do gás de arraste

Fonte: ANVISA, 2003

## 2.7. ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA

A espectroscopia eletrônica apresenta um conjunto de características favoráveis, as quais deveriam garantir a sua condição de ferramenta analítica de primeira importância. Trata-se de uma técnica consolidada, de fácil implementação, baixo custo e sensibilidade compatível com muitas das necessidades analíticas citadas anteriormente (SKOOG *et al*, 2006). Infelizmente, a baixa seletividade faz com que a sua aplicabilidade fique seriamente comprometida, quando há necessidade de se analisar matrizes complexas.

Para contornar os problemas que surgem por esta falta de seletividade, muitas alternativas têm sido propostas. No entanto, grande parte delas está fundamentada na aplicação de processos de separação prévia (FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA *et al*, 2003; AKAY & OZKAN, 2002), os quais acrescentam etapas que podem prejudicar a reprodutibilidade da determinação.

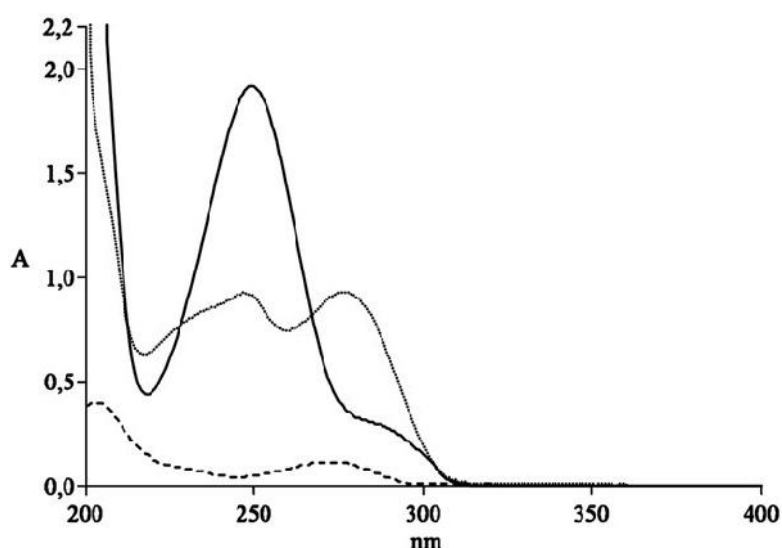
Grande parte dos fármacos apresenta um sinal bastante intenso na região ultravioleta, o que faz com que a sua determinação *via* espectroscopia UV-Vis seja viável, mesmo em concentrações traço. Adicionalmente, a sua validação costuma ser mais simples e efetiva, em relação, por exemplo, a métodos fundamentados em cromatografia em fase líquida de alta eficiência (MADAN *et al*, 2005). Porém, muitos compostos absorvem na mesma região espectral, motivo pelo qual os métodos espectroscópicos apresentam baixa seletividade, como pode ser observado na Figura 10, (DE LUCA, *et al*, 2009).



## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para contornar estes inconvenientes e viabilizar a determinação por espectroscopia UV-Vis, algumas propostas têm sido recentemente realizadas, dentre elas destacam-se a utilização de espectroscopia derivativa (ROJAS & OJEDA, 2009; LÓPEZ-MARTÍNEZ *et al*, 2002; MORENO GÁLVEZ *et al*, 2002) e mais recentemente o uso de procedimentos de calibração multivariada (WU *et al*, 2009; GENDRIN *et al*, 2008; MALUF *et al*, 2008; METWALLY, 2008; SENA *et al*, 2007).

A introdução de processos multivariados veio a beneficiar a espectrofotometria, tendo sido amplamente aplicados na análise de formas farmacêuticas contendo vários fármacos e excipientes absorvendo nas mesmas regiões do espectro (RAGNO *et al*, 2004). A calibração multivariada tem sido aplicada, por exemplo, na análise por espectroscopia derivativa em ensaios de dissolução (CUTRIGNELLI *et al*, 2008; MARKOPOULOU *et al*, 2005; MARKOPOULOU *et al*, 2004).



Fonte: DE LUCA *et al.*, 2009.

**FIGURA 10.** ESPECTROGRAMA UV-VIS QUE DEMONSTRA A INTERFERÊNCIA ESPECTRAL ENCONTRADA NA DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL  $20,41 \mu\text{g mL}^{-1}$  (.....); PROPIFENAZONA  $19,85 \mu\text{g mL}^{-1}$  (—) E CAFEÍNA  $2,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  (- - - - -) EM SOLUÇÃO ETANÓLICA;

Com relação à espectroscopia UV-Vis, é importante salientar que a análise de associações farmacêuticas costuma ser seriamente comprometida pelas diversas interferências espectrais observadas, sendo, portanto, mais frequentemente encontrados trabalhos que utilizam métodos espectrofotométricos para apenas um fármaco.

Uma forma de tentar contornar os problemas de interferência espectral, que

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

prejudicam a quantificação dos fármacos em associação utilizando técnicas espectrofotométricas, está na utilização de processos de calibração multivariada, uma poderosa ferramenta na análise de multicomponentes.

**2.8. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO**

A região espectral do infravermelho compreende radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 12800 a 10  $\text{cm}^{-1}$ . O espectro infravermelho é dividido em infravermelho próximo, médio e distante, conforme descrito no Quadro 6. Os métodos quantitativos no infravermelho diferem dos métodos espectroscópicos no ultravioleta/visível, devido à maior complexidade do sinal espectral, à menor largura das bandas e às limitações instrumentais dos aparelhos de infravermelho (SKOOG *et al.*, 2002).

**QUADRO 6. REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO**

<b>Região</b>	<b>Número de onda (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>Comprimento de Onda (nm)</b>
Próximo	12800 a 4000	780 - 2500
Médio	4000 a 200	2500 - 50000
Distante	200 a 10	50000 - 1000000

A espectroscopia no infravermelho, principalmente no infravermelho próximo, tem sido utilizada com frequência pela indústria farmacêutica, no controle de qualidade de produtos e no monitoramento de processos de produção (REICH, 2005; ÖZDEMIR & OZTURK, 2004).

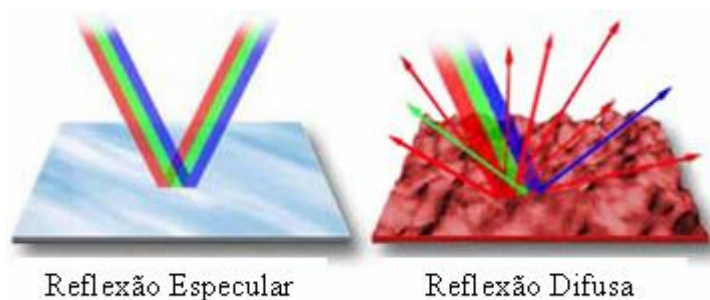
A técnica que utiliza a reflexão difusa é conhecida como DRIFTS (Diffuse Reflection Infrared Fourier Transform Spectroscopy) (FULLER & GRIFFITHS, 1978), ocorrendo em superfícies não totalmente planas, podendo o substrato ser contínuo ou fragmentado (moído). A energia radiante incidente penetra na amostra, interagindo com as substâncias e retornando à superfície após absorção parcial e múltiplos espalhamentos. Na reflexão difusa, a energia é atenuada depois de entrar em contato diversas vezes com as partículas da amostra, fornecendo muitas informações analíticas sobre a mesma.

A radiação difusa dá um espectro similar ao espectro de transmissão comum. Uma importante diferença entre a transmissão e a reflexão é devida ao diferente caminho ótico da radiação. Enquanto na transmissão o caminho ótico é constante para todo comprimento de onda, na reflexão o caminho pode ser variável. Portanto, ao se comparar

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

o espectro obtido por transmissão (pastilhas de KBr) com o obtido por reflexão, as intensidades relativas das bandas serão diferentes (SKOOG *et al.*, 2002).

Num experimento de reflexão difusa será também observado a reflexão especular, que ocorre na interface ar/superfície da matriz. A reflexão especular é de maior intensidade na região onde a amostra apresenta forte absorção, e neste caso, podem ocorrer severas distorções nos espectros obtidos (FERRÃO, 2001). Um esquema que representa os fenômenos de reflexão difusa e especular é apresentado na Figura 11.



**FIGURA 11.** REPRESENTAÇÃO DAS REFLEXÕES ESPECULAR E DIFUSA.

*FONTE:* DAVISON *et al.*, 2005.

As informações qualitativas estão relacionadas às energias absorvidas pelas moléculas, em comprimentos de onda específicos, enquanto que a intensidade espectral não é completamente proporcional à concentração dos compostos em estudo. Para a retirada de informações quantitativas é preciso trabalhar matematicamente, seguindo funções e fórmulas complexas para esse fim.

Uma dessas funções, denominada de função de Kubelka Munk (equação 23), relaciona os espectros de refletância com a concentração de cada molécula presente na amostra, transformando o espectro de refletância difusa em formato semelhante ao espectro de absorbância. A equação de Kubelka Munk é usada para definir uma afinidade linear entre a intensidade da banda e a concentração da amostra na espectroscopia por refletância difusa (FERRÃO, 2001).

$$f(R_d) = (1 - R_d)^2 / 2 R_d \quad (\text{Eq. 23})$$

Onde:  $R_d$  é a refletância difusa.

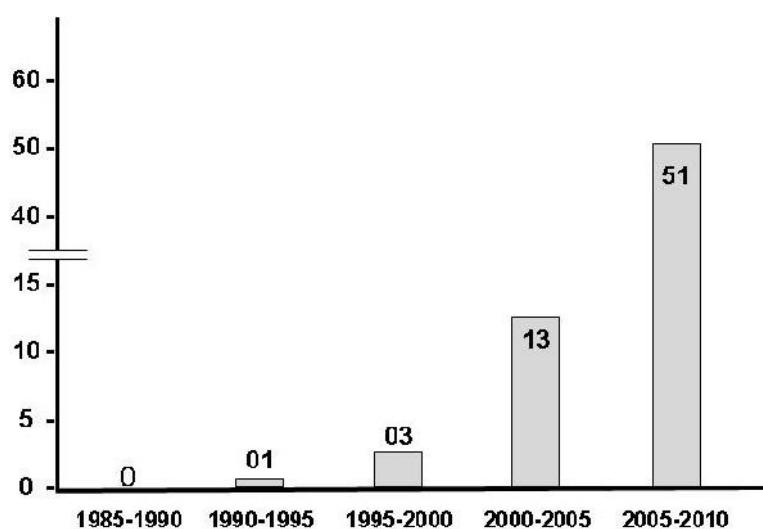
De acordo com a teoria,  $f(R_d)$  está relacionada com o coeficiente de absorção (K) e com o coeficiente de dispersão da superfície da amostra (S), expressa conforma a equação 24.

$$f(R_d) = K / S \quad (\text{Eq. 24})$$

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O efeito do tamanho da partícula causa deslocamento da linha de base e se torna muito pronunciado em comprimentos de ondas de grande absorção pela amostra. Por exemplo, em duas amostras com mesma composição, mas diferente granulometria, há maior reflexão difusa nas partículas menores (MESSERSCHMIDT, 1999).

Na última década, a grande evolução verificada nos sistemas instrumentais disponíveis para caracterização de amostras por espectroscopia infravermelho, particularmente envolvendo o uso de fibras óticas, tem propiciado muitas aplicações de relevância na área de produtos farmacêuticos, principalmente recorrendo ao uso de ferramentas de calibração multivariada (Figura 12). Dentro deste contexto, especial destaque deve ser dado à espectroscopia NIR (infravermelho próximo), que tem a sua aplicabilidade bastante estendida pelo uso de sistemas multivariados de calibração (ROOGO et al., 2007; LUYPAERT et al., 2007).



Fonte: sciencedirect.com (1985-2010)  
Palavras chave: Infrared + PLS e Pharmaceuticals

**FIGURA 12.** EVOLUÇÃO DAS PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADAS COM PRODUTOS FARMACÊUTICOS, ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E ANÁLISE MULTIVARIADA (PLS) NO PERÍODO 1985-2010.

---

**OBJETIVOS****3. OBJETIVO GERAL**

A presente TESE tem como objetivo principal estudar a potencialidade dos processos de calibração multivariada, especialmente regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR), no desenvolvimento de rotinas analíticas orientadas ao controle de qualidade e à determinação do perfil de dissolução de produtos farmacêuticos de relevância, recorrendo-se a técnicas espectroscópicas (eletrônica e infravermelho).

Como substratos modelo foram selecionadas associações de antihipertensivos (captopril-hidroclorotiazida) e antirretrovirais (zidovudina-lamivudina), produtos estes de reconhecida relevância no âmbito nacional.

**3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

As etapas envolvidas neste trabalho tratam do desenvolvimento de modelos de calibração multivariada para misturas de zidovudina e lamivudina, utilizando-se técnicas espectroscópicas (UV-Vis e infravermelho), além de modelos de calibração multivariada para misturas de captopril e hidroclorotiazida, utilizando-se técnica espectroscópica na região do infravermelho. Posteriormente foi feita a seleção dos modelos de melhor desempenho, os quais foram aplicados em operações de controle de qualidade e ensaios de dissolução dos medicamentos de referência. Em seguida foram realizados ensaios de validação das metodologias propostas de acordo com os critérios estabelecidos pela legislação em vigor (ANVISA).

---

**PARTE EXPERIMENTAL****4. PARTE EXPERIMENTAL****4.1. MATERIAIS E REAGENTES**

Zidovudina (**AZT**: 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazolil)benzenossulfonamida) e Lamivudina (**3TC**: 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-2,4-pirimidinodiamina), ambos do Laboratório Cristália (99% de pureza), foram fornecidos pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia N. Carpentieri Rodrigues. As especialidades estudadas foram: Biovir® (Medicamento de referência, Laboratório GlaxoSmithKline) e Zidovudina + Lamivudina (Medicamento genérico, Laboratório FarManguinhos), ambos contendo 300 mg de zidovudina e 150 mg de lamivudina por comprimido.

Captopril (1-[(2S)-3-mercapto-2-metilpropionil]-L-prolina, 99,6% de pureza) e hidroclorotizida (1,1 dióxido de 6-cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida, 99,7% de pureza), foram fornecidos pelo Laboratório Farmos (Rio de Janeiro). As especialidades estudadas foram: Lopril-D (Medicamento de referência, Bristol-Myers Squibb Brasil), captopril + hidroclorotiazida (Medicamento genérico, Medley S/A Ind. Farm.) e Captotec HCT (Medicamento similar, Hexal do Brasil), todos contendo 50 mg de captopril e 25 mg de hidroclorotiazida por comprimido.

Os solventes utilizados para determinação cromatográfica dos fármacos em estudo (Acetonitrila, metanol e ácido fosfórico) foram de grau HPLC de pureza (JT BAKER, México), enquanto que a água deionizada foi de qualidade ultra-pura (qualidade Milli-Q<sup>®</sup>).

O brometo de potássio (KBr, VETEC), utilizado para diluir as amostras analisadas por DRIFTS, foi de grau espectroscópico de pureza, sendo utilizado após secagem em estufa (100 °C, 4 h).

Outros reagentes (ácido, bases, solventes e sais) foram de grau analítico PA.

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se vidraria analítica, incluindo balões, buretas e pipetas volumétricas previamente calibradas.

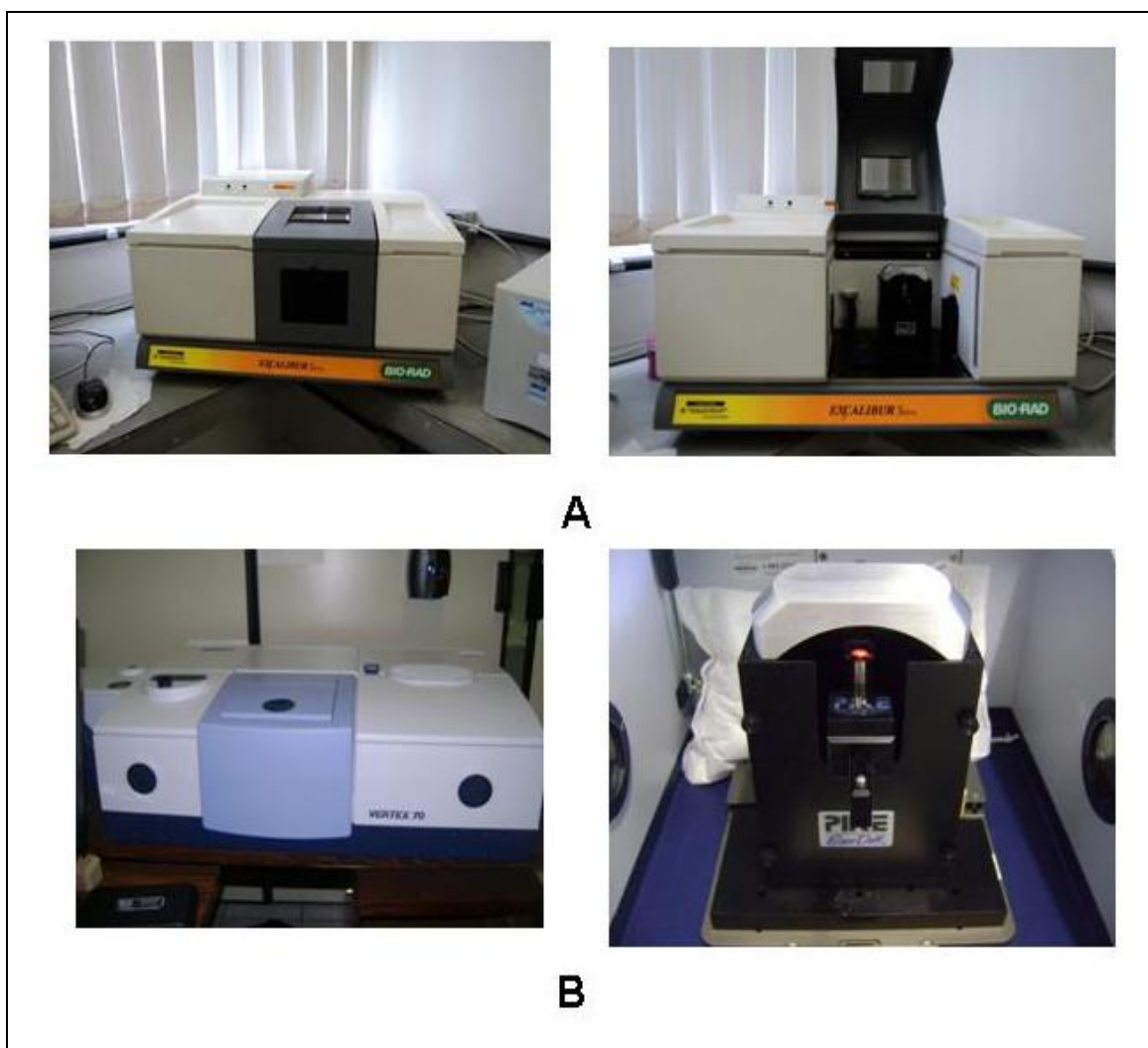
**4.2. EQUIPAMENTOS**

Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica digital BioPrecisa FA2104N ( $\pm 0,0001$  g).

Espectros de absorção UV-Vis foram adquiridos em um espectrofotômetro Shimadzu (2410 PC), utilizando-se o software UVPC v.3.91 (Shimadzu) e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Para as análises envolvendo DRIFTS, utilizou-se um espectrofotômetro Bio-Rad, Série Excalibur, modelo FTS-4000 (Figura 13A) e um espectrofotômetro Bruker, Série VERTEX 70 (Figura 13B), ambos equipados com acessório para medidas por refletância difusa.

## PARTE EXPERIMENTAL



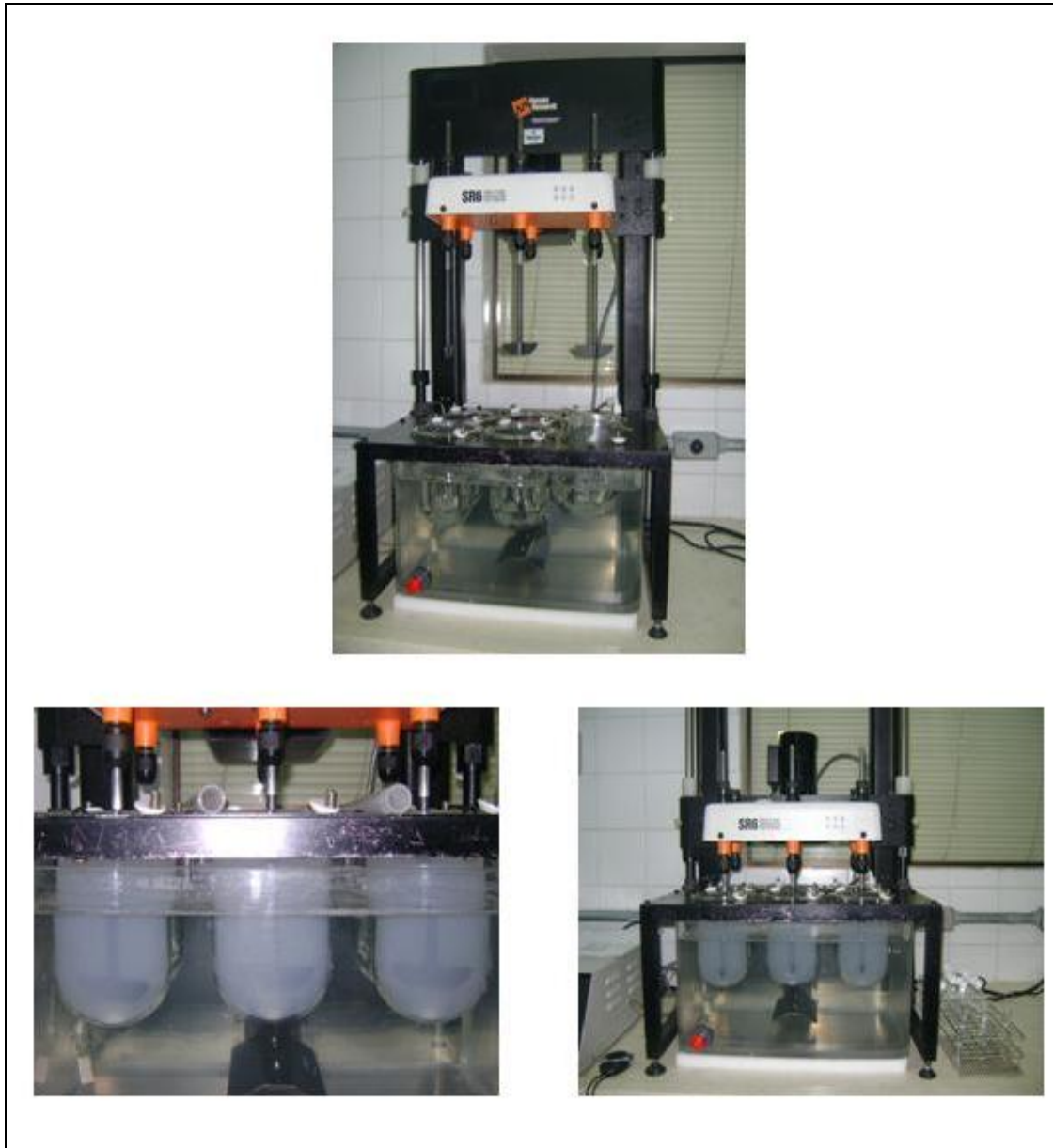
**FIGURA 13.** VISTA FRONTAL E DETALHE DA UNIDADE DE REFLETÂNCIA DIFUSA DOS EQUIPAMENTOS BIO-RAD (A) E BRUKER (B).

As primeiras análises por Cromatografia Em Fase Líquida de Alta Eficiência foram realizadas em um Cromatógrafo Varian Pró-Star (Departamento de Farmácia da UFPR), equipado com coluna C18 (CHROMPACK) e detector UV (265 nm). Como fase móvel foi utilizada uma mistura de acetonitrila (70 mL), água deionizada (440 mL) e metanol (490 mL), com vazão de  $0,9 \text{ mL min}^{-1}$ .

As análises restantes foram realizadas em Cromatógrafo Varian 920LC, equipado com coluna C18 Varian (MICROSORB 100-5,  $250 \times 4,6 \text{ mm} \times \frac{1}{4}''$ ) e detector com arranjo de diodos (DAD), utilizando os mesmos parâmetros descritos anteriormente.

Para a associação zidovudina-lamivudina os ensaios de dissolução foram realizados utilizando-se o aparato nº 2 (pá) em um dissolutor HANSON® SR6 com Validata Controle (Chatsworth, CA, USA), composto de 6 cubas de 900 mL (Figura14).

## PARTE EXPERIMENTAL



**FIGURA 14.** DETALHES DO DISSOLUTOR HANSON UTILIZADO NOS ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO.

#### 4.3. PROGRAMAS COMPUTACIONAIS

Para a montagem de matrizes de dados utilizou-se o software Origin Pro 6.1<sup>®</sup> (OriginLab), enquanto que para a elaboração dos modelos empregou-se o pacote PLS-toolbox 3.0 (Eigenvector Research, Inc.) que opera em ambiente Matlab<sup>®</sup> v.6.5 (Math Work Inc.).



---

**PARTE EXPERIMENTAL****4.4. METODOLOGIA****4.4.1. Desenvolvimento de modelos de calibração por espectroscopia UV-Vis em solução****4.4.1.1. Modelos univariados convencionais**

Para o desenvolvimento de modelos univariados convencionais foram elaboradas curvas analíticas individuais, no comprimento de onda de máxima absorção apresentado por cada fármaco ( $\lambda = 266,0$  nm para zidovudina e  $\lambda = 197,0$  nm para lamivudina). Cada curva analítica foi composta de seis valores de concentração, cobrindo-se a faixa de 10,0 a 35,0 mg L<sup>-1</sup> para zidovudina, e de 5,0 a 20,0 mg L<sup>-1</sup> para o lamivudina.

As soluções (misturas sintéticas) foram preparadas por dissolução direta dos substratos, em água deionizada.

Modelos univariados foram também elaborados no modo derivativo, utilizando-se sistema fundamentado no ponto de anulação. Neste caso, curvas analíticas para zidovudina foram elaboradas nos comprimentos de onda em que a lamivudina apresenta uma derivada da absorvância igual a zero ( $\lambda = 248,8$  nm). O mesmo procedimento foi utilizado para a elaboração das curvas analíticas da lamivudina ( $\lambda = 266,2$  nm).

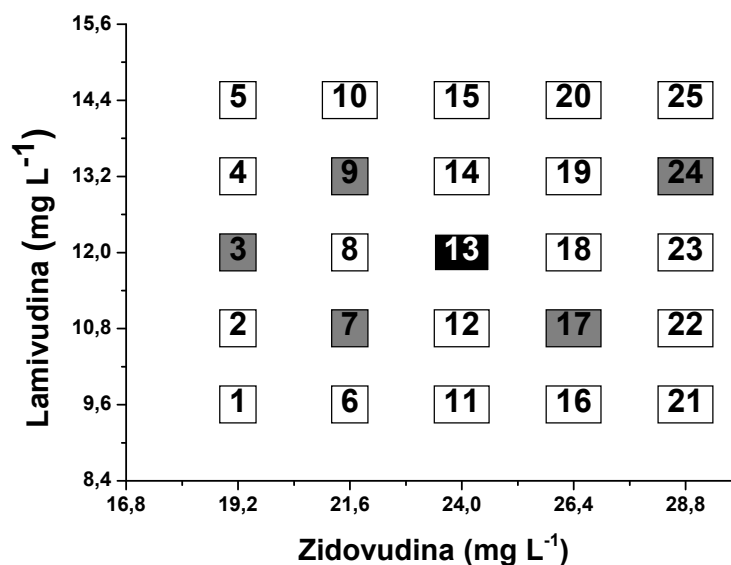
Para finalizar e completar as análises ditas “convencionais” empregou-se o método do Princípio da Aditividade de Absorvâncias (Método de Vierordt) que se baseia na Lei de Lambert-Beer e é frequentemente utilizado para resolver problemas de sobreposição de bandas.

**4.4.1.2. Modelos multivariados**

Para o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada foram produzidas 25 misturas, contendo de 19,00 a 29,00 mg L<sup>-1</sup> de zidovudina e de 10,00 a 14,00 mg L<sup>-1</sup> de lamivudina, dissolvidas em água, conforme o planejamento de experimentos apresentado na Figura 15. Esta faixa de trabalho foi definida levando-se em consideração o teor nominal dos fármacos presentes no medicamento comercialmente disponível e uma variação máxima permitida de  $\pm 20\%$ . O modelo multivariado foi desenvolvido utilizando-se 20 misturas, sendo que as 5 misturas restantes (em destaque na Figura 15), selecionadas de maneira que estejam dentro do intervalo de concentração estudado, foram reservadas para a fase de validação, além de uma duplicata do ponto central.

Os espectros foram registrados entre 190 e 400 nm, com resolução de 0,5 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, sendo processados integralmente, eliminando-se, apenas, regiões sem informação relevante.

## PARTE EXPERIMENTAL



**FIGURA 15.** PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA DESENVOLVIMENTO DE MODELOS MULTIVARIADOS POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS (EM DESTAQUE, AMOSTRAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO).

Para elaboração dos modelos multivariados, os dados espectrais foram centrados na média (translação do sistema de origem até o centro do conjunto de dados), visando facilitar a visualização, bem como reduzir a dimensão do modelo construído. Este tipo de pré-processamento consiste, basicamente, na subtração do valor de cada elemento da coluna ( $x_{ij}$ ) pelo valor médio dos elementos dessa coluna ( $x_{m_j}$ ), obtendo-se como resultado uma matriz onde toda a coluna tem média zero (THOMAS, 1994).

Para melhorar a eficiência dos modelos multivariados envolvendo espectroscopia UV-Vis, alguns procedimentos de transformação de dados foram utilizados, são estes:

- i) Primeira derivada: processada com o software Origin Pro 6.1., principalmente para melhorar a separação de sinais não totalmente sobrepostos. Também foram processados utilizando pacote PLS-Toolbox 3.0 em ambiente Matlab 6.5.
- ii) Alisamento: processado com o pacote PLS-Toolbox 3.0 em ambiente Matlab 6.5, pelo algoritmo de SAVITZKY-GOLAY (SAVITZKY & GOLLAY, 1964) para diminuição de ruídos espectrais.
- iii) Autoescalamento: processado com o pacote PLS-Toolbox 3.0 em ambiente Matlab 6.5, usado quando as variáveis possuem diferentes distribuições, com o objetivo de dar o mesmo “peso” a todas as variáveis.

---

**PARTE EXPERIMENTAL**

O primeiro critério utilizado para seleção do número de variáveis latentes (VL) correspondeu à minimização do RMSECV (*Root Mean Standard Error of Cross Validation* – Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Validação Cruzada), parâmetro resultante do procedimento de validação cruzada (sistema *leave-one-out*). Neste procedimento, uma das amostras do conjunto de calibração é excluída da fase de desenvolvimento do modelo, sendo reservada como elemento de previsão. Este processo é repetido  $n$  vezes, de maneira a permitir que todos os padrões de calibração ( $n$ ) participem como elementos de previsão. Finalmente, o erro de previsão é obtido comparando-se a concentração prevista para cada padrão com o seu valor verdadeiro, indicado na matriz de concentração. Os erros na etapa de calibração (RMSEC) e validação interna (RMSECV) são calculados de acordo com as expressões apresentadas a seguir (Equações 25 e 26):

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-1}} \quad (\text{Eq. 25})$$

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (\text{Eq. 26})$$

Onde:  $y_i$  é o valor conhecido,  $\hat{y}_i$  é o valor calculado ou previsto e  $n-1$  é o grau de liberdade para dados centrados na média.

Adicionalmente, e objetivando-se evitar o desenvolvimento de modelos superestimados, utilizou-se o critério do menor número possível de variáveis latentes, excluindo-se aquelas responsáveis por parcelas pouco significativas da variância total.

Após uma seleção preliminar, fundamentada nos critérios acima mencionados, modelos foram desenvolvidos com 2, 3, 4 e 6 VL, utilizando-se como critério final de seleção a capacidade de previsão, expressa na forma de erro médio de previsão.

Após elaboração dos modelos, a presença de anomalias (*outliers*) no conjunto de calibração foi avaliada utilizando-se os critérios de Resíduos de “Students” e “Leverage”. Os resíduos de “Student” indicam se as amostras estão incluídas na distribuição normal, considerando-se um intervalo de confiança de 95%, enquanto que o leverage representa a distância entre cada espectro e o centróide do conjunto de espectros. No primeiro caso observa-se um valor limite de 2,5, enquanto que no segundo, o valor limite é dado pela expressão:  $\frac{3(VL)}{n}$ , em que VL corresponde ao número de variáveis latentes utilizadas no desenvolvimento do modelo e  $n$  ao número de amostras utilizadas.

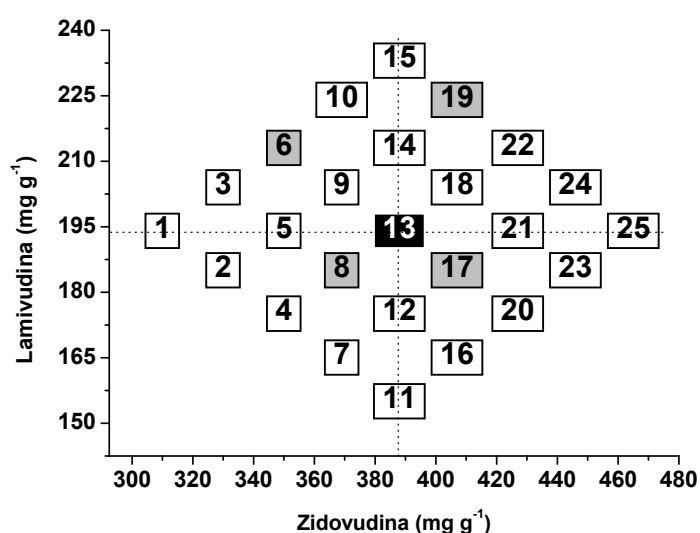
## PARTE EXPERIMENTAL

## 4.4.1.3. Validação do Modelo multivariado

A validação do modelo espectroscópico multivariado foi realizada de acordo com as diretrizes da ANVISA (2003), que inclui avaliações de precisão, exatidão e robustez. A precisão foi avaliada em dois níveis diferentes (repetibilidade intra-dia e inter-dias) por meio de análise em triplicata de três misturas sintéticas contendo alta (AZT: 29,0 mg L<sup>-1</sup>, 3TC: 14,0 mg L<sup>-1</sup>), média (AZT: 24,0 mg L<sup>-1</sup>, 3TC: 12,0 mg L<sup>-1</sup>) e baixa (AZT: 19,0 mg L<sup>-1</sup>, 3TC: 10,0 mg L<sup>-1</sup>) concentração dos analitos. A exatidão foi avaliada através de estudos de recuperação com as mesmas três misturas sintéticas. Por fim, a robustez do método foi avaliada através da análise de uma mistura sintética contendo 24,0 mg L<sup>-1</sup> de AZT e 12,0 mg L<sup>-1</sup> de 3TC em diferentes condições de pH (3,2 até 10,1), temperatura (5 a 60 °C) e tempo de leitura (0 até 90 h).

## 4.4.2. Desenvolvimento de modelos de calibração por espectroscopia infravermelho com refletância difusa

Para o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada foram produzidas 25 misturas, contendo 310 a 465 mg g<sup>-1</sup> de zidovudina e 155 a 233 mg g<sup>-1</sup> de lamivudina (ver planejamento na Figura 16), utilizando-se KBr como diluente, em quantidade suficiente para 1,0000 g. Para a etapa de calibração foram utilizadas 21 misturas, enquanto que as 4 restantes (em destaque na Figura 16) foram reservadas para a fase de validação externa, sendo estas misturas analisadas em triplicata (juntamente com uma duplicata do ponto central).



**FIGURA 16.** PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DAS MISTURAS DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA PARA O DESENVOLVIMENTO DE MODELOS MULTIVARIADOS POR ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA (AMOSTRAS EM DESTAQUE FORAM RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO EXTERNA).

---

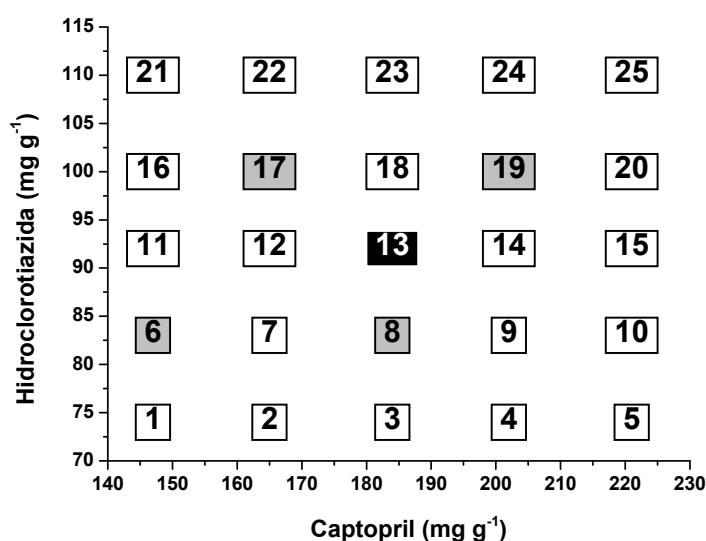
**PARTE EXPERIMENTAL**

Os espectros foram registrados entre 7000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e acumulando-se 128 varreduras. Para processamento, os espectros foram separados em espectro integral (7000-400  $\text{cm}^{-1}$ ), infravermelho médio (4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ) e infravermelho próximo (7000 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ). Buscando-se o aprimoramento dos modelos, regiões espectrais específicas foram selecionadas por um processo de seleção de variáveis. O referido processo leva à obtenção de um correlograma (MORGANO *et. al.*,2007), que relaciona o coeficiente de correlação linear ( $r$ ) entre as variáveis independentes (matriz espectral contendo valores de refletância) e cada uma das variáveis dependentes (matriz de concentração dos fármacos de interesse). A partir destes antecedentes foi selecionada a região espectral, incluindo-se sinais com coeficiente de correlação maior do que 0,20 (para zidovudina) e maior do que 0,08 (para lamivudina), que correspondiam aos valores de maior significância para cada espécie.

Para o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada das espécies captopril e hidroclorotiazida foram produzidas 25 misturas, contendo 147 a 221  $\text{mg g}^{-1}$  de captopril e 74 a 110  $\text{mg g}^{-1}$  de hidroclorotiazida (ver planejamento na Figura 17), utilizando-se KBr como diluente, em quantidade suficiente para 1,0000 g. Para a etapa de calibração foram utilizadas 21 misturas, enquanto que as 4 restantes (em destaque na Figura 17) foram reservadas para a fase de validação externa, sendo estas misturas analisadas em triplicata (juntamente com uma duplicata do ponto central).

Os espectros foram registrados entre 10000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e acumulando-se 64 varreduras. Para processamento, os espectros foram separados em espectro integral (10000-400  $\text{cm}^{-1}$ ), infravermelho médio (4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ) e infravermelho próximo (10000 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ). Buscando-se o aprimoramento dos modelos, regiões espectrais específicas foram selecionadas por um processo de seleção de variáveis.

## PARTE EXPERIMENTAL



**FIGURA 17.** PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DAS MISTURAS DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA PARA O DESENVOLVIMENTO DE MODELOS MULTIVARIADOS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA (AMOSTRAS EM DESTAQUE FORAM RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO EXTERNA).

Para melhorar a eficiência dos modelos multivariados, pré-processamentos fundamentados em derivação, alisamento e autoescalamento foram aplicados. Destaque especial deve ser dado ao pré-processamento por Correção do Espalhamento Multiplicativo (MSC), originalmente desenvolvido para corrigir as variações do espalhamento de luz, em medidas de refletância difusa no infravermelho próximo. Para cada amostra o espectro é corrigido em relação ao de uma amostra de referência, neste caso, o espectro obtido pela média dos 21 padrões de calibração. Cada espectro é corrigido de forma que todas as amostras tenham o mesmo nível de espalhamento da amostra de referência. Essa correção assume que o coeficiente de espalhamento é o mesmo para todos os comprimentos de onda, ignorando-se variações devidas a variações químicas, servindo também para corrigir desvios de linha-base não lineares (DRIFTS).

A versão MSC é baseada em um simples modelo linear, conforme apresentado na equação 27. Para cada amostra,  $a$  e  $b$  são estimados pela regressão dos mínimos quadrados e o espectro corrigido,  $x_c$ , para cada comprimento de onda é calculado de acordo com a equação 28 (FERRARINI, 2004).

$$x = a + bx' + e \quad (\text{Eq. 27})$$

$$x_c = (x - a) / b \quad (\text{Eq. 28})$$

Onde:  $x$  representa o espectro da amostra,  $x'$  o espectro da amostra de referência, “ $a$ ” representa as informações químicas em  $x$  e “ $e$ ” são os resíduos.

**PARTE EXPERIMENTAL**

O critério utilizado para seleção do número de variáveis latentes (VL), bem como para detecção de amostras anômalas, foi o mesmo utilizado nos estudos envolvendo espectroscopia UV-Vis.

**4.4.3. Ensaio de dissolução *in vitro*****4.4.3.1. Zidovudina e Lamivudina (300mg / 150mg)**

Os ensaios de dissolução envolveram 2 medicamentos disponíveis no mercado (Referência e Genérico). Para a realização do teste de dissolução foi utilizado o aparato USP 2 (pá). O estudo foi feito em quintuplicata, sob agitação à velocidade de 50 rpm, utilizando como meio de dissolução água purificada e degaseificada. O volume do meio de dissolução testado foi de 900 mL. O ensaio foi realizado a temperatura de 37°C com variação de 0,5°C (ver Quadro 7).

De acordo com especificações do ensaio, deve-se obter no mínimo 5 pontos de amostragem, dos quais, 3 devem corresponder a valores de dissolução menores que 65% e o último a um tempo de coleta de no mínimo o dobro do tempo anterior (ANVISA, 2004). Com o propósito de atender esta condição, estabeleceram-se coletas de alíquotas de 10,0 mL de cada uma das 5 cubas de dissolução, com reposição do meio, nos tempos: 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 e 30 min. As alíquotas foram coletadas, filtradas e analisadas por cromatografia em fase líquida (CLAE) com detector UV e por espectroscopia na região do ultravioleta e visível na faixa de 190 a 400 nm.

**QUADRO 7. PARÂMETROS UTILIZADOS EM ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ZIDOVUDINA/LAMIVUDINA NA FORMA DE COMPRIMIDOS.**

<b>PARÂMETRO</b>	<b>CONDIÇÃO</b>
<b>Meio</b>	Água
<b>Temperatura</b>	37 ± 0,5 °C
<b>Velocidade</b>	50 rpm
<b>Volume do meio</b>	900 mL
<b>Aparato</b>	2 (pá)
<b>Quantificação</b>	CLAE
<b>Tempo de Ensaio</b>	60 minutos
<b>Tolerância</b>	Não menos que 80% (Q) da quantidade declarada de zidovudina e lamivudina se dissolvem em 60 minutos.

Fonte: FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010.

---

**PARTE EXPERIMENTAL****4.4.4. Análises Cromatográficas****4.4.4.1. Zidovudina/Lamivudina**

As especialidades estudadas foram: Biovir® (Medicamento de referência, Laboratório GlaxoSmithKline) e Zidovudina + Lamivudina (Medicamento genérico, Laboratório FarManguinhos), ambos contendo 300 mg de zidovudina e 150 mg de lamivudina por comprimido.

As soluções padrão foram preparadas com padrões de alto grau de pureza, em concentrações de 1,00 mg mL<sup>-1</sup> (AZT) e 1,00 mg mL<sup>-1</sup> (3TC) dissolvidos em metanol. A curva analítica foi elaborada a partir destas soluções, em concentrações entre 10,00 e 60,00 µg mL<sup>-1</sup> para zidovudina e entre 5,00 e 30,00 µg mL<sup>-1</sup> para lamivudina, sendo as diluições feitas com a fase móvel (Metanol/Água/Acetonitrila/ 49:44:7) e o número de amostras igual a 9. Após as diluições, as amostras foram filtradas em membrana com cobertura de poro de 0,45 µm e injetadas automaticamente, sendo o volume de injeção de 10 µL.

As amostras de medicamentos e as provenientes dos ensaios de dissolução foram filtradas, diluídas e posteriormente analisadas.

Na análise dos medicamentos, os comprimidos foram triturados em almofariz e, após pesagem de acordo com a massa média de 20 comprimidos (774,6 mg), foram dissolvidos em metanol. Após as necessárias diluições, com fase móvel, as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,45 µm e acondicionadas em frascos *vial* para serem analisadas (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

**4.4.5. Tratamento dos Resíduos**

Os resíduos gerados durante a execução deste trabalho foram tratados por Processos Oxidativos Avançados (sistema Foto-Fenton), utilizando-se unidade de tratamento contínuo desenvolvida pelo grupo TECNOTRATER-UFPR.



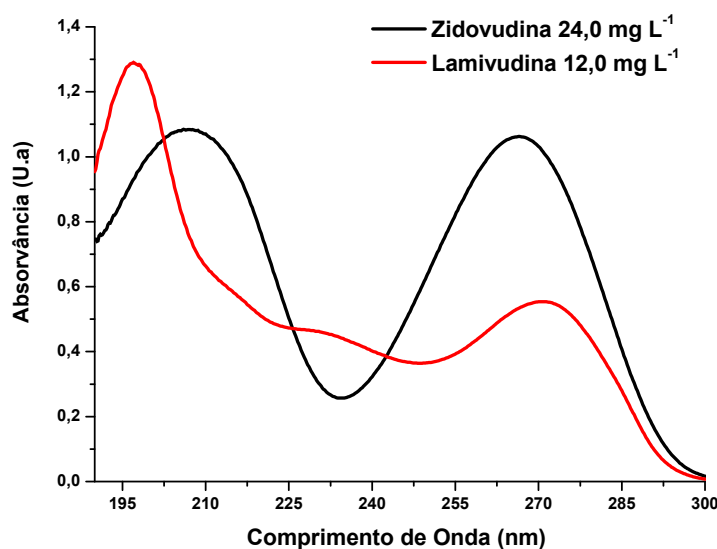
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1. ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA

## 5.1.1. Espectroscopia Eletrônica em Solução - Análise Convencional Univariada

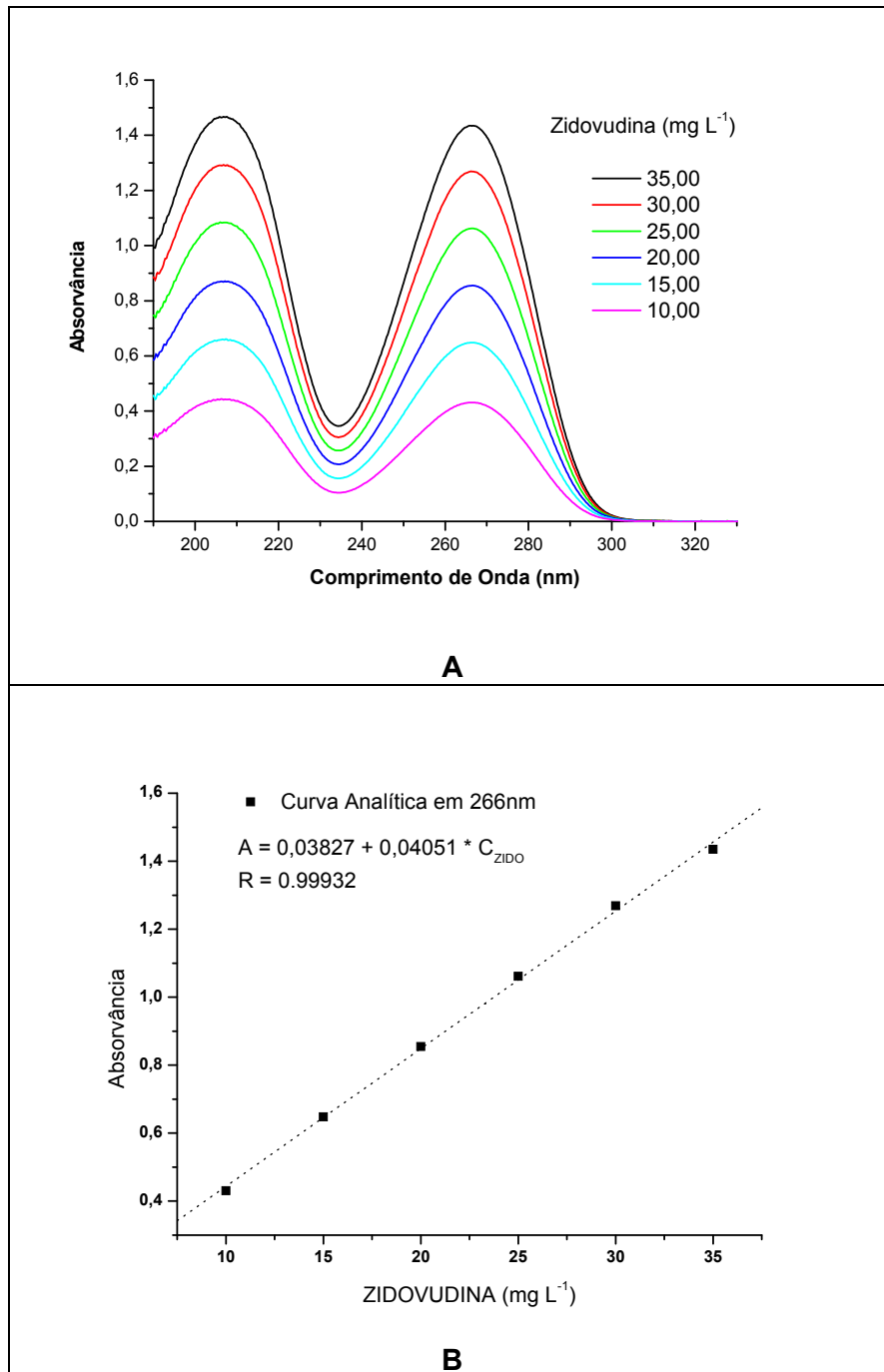
Zidovudina (AZT) e Lamivudina (3TC) apresentam forte absorção na região ultravioleta, absorção esta que é caracterizada por dois máximos bem definidos (Figura 18). A interferência espectral entre estas espécies é bastante evidente, o que, em primeira análise, sugere inviabilidade da sua análise recorrendo-se a sistemas convencionais de calibração. Trata-se de um argumento relevante, uma vez que justifica o estudo de sistemas alternativos de calibração.



**FIGURA 18.** ESPECTROS ELETRÔNICOS DE ZIDOVUDINA (24,0 mg L<sup>-1</sup>) E LAMIVUDINA (12,0 mg L<sup>-1</sup>) EM SOLUÇÃO AQUOSA.

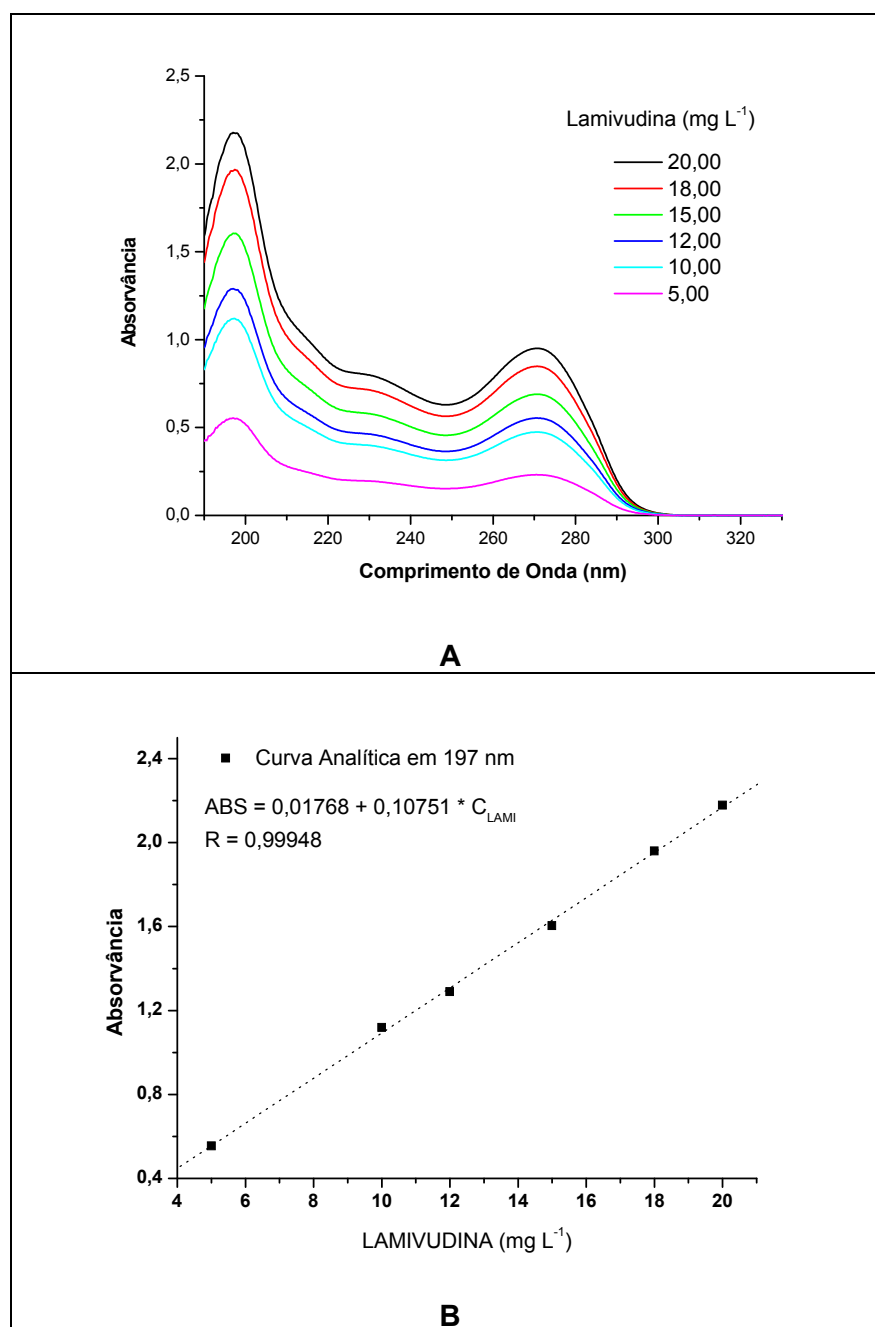
A primeira calibração ensaiada foi fundamentada em curvas analíticas convencionais, elaboradas nos máximos de absorção apresentada por cada fármaco. Para zidovudina, a curva foi elaborada com valores de absorvância registrados em 260 nm (Figura 19), enquanto que para lamivudina foi utilizada a banda centrada em 197 nm (Figura 20). Ambas as curvas analíticas apresentaram excelente grau de correlação, com coeficientes superiores a 0,999.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**FIGURA 19.** ESPECTROS ELETRÔNICOS DE SOLUÇÕES PADRÃO DE ZIDOVUDINA (10,0 A 35,0 mg L<sup>-1</sup>) (A) E CURVA ANALÍTICA ( $\lambda = 266,0$  nm)(B).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**FIGURA 20.** ESPECTROS ELETRÔNICOS DE SOLUÇÕES PADRÃO DE LAMIVUDINA (5,0 A 20,0 mg L<sup>-1</sup>) (A) E CURVA ANALÍTICA ( $\lambda = 197,0$  nm)(B).

A capacidade de previsão destes modelos foi avaliada analisando-se as sete misturas sintéticas reservadas para validação. Os resultados (Tabela 1) indicam que, tal como esperado, a forte interferência espectral inviabiliza o uso deste procedimento, o que faz com que erros de previsão superiores a 50% sejam observados em praticamente todos os casos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**TABELA 1.** RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES OBTIDAS PELO MÉTODO DE INTERPOLAÇÃO EM CURVAS ANALÍTICAS CONVENCIONAIS, NA ANÁLISE DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO.

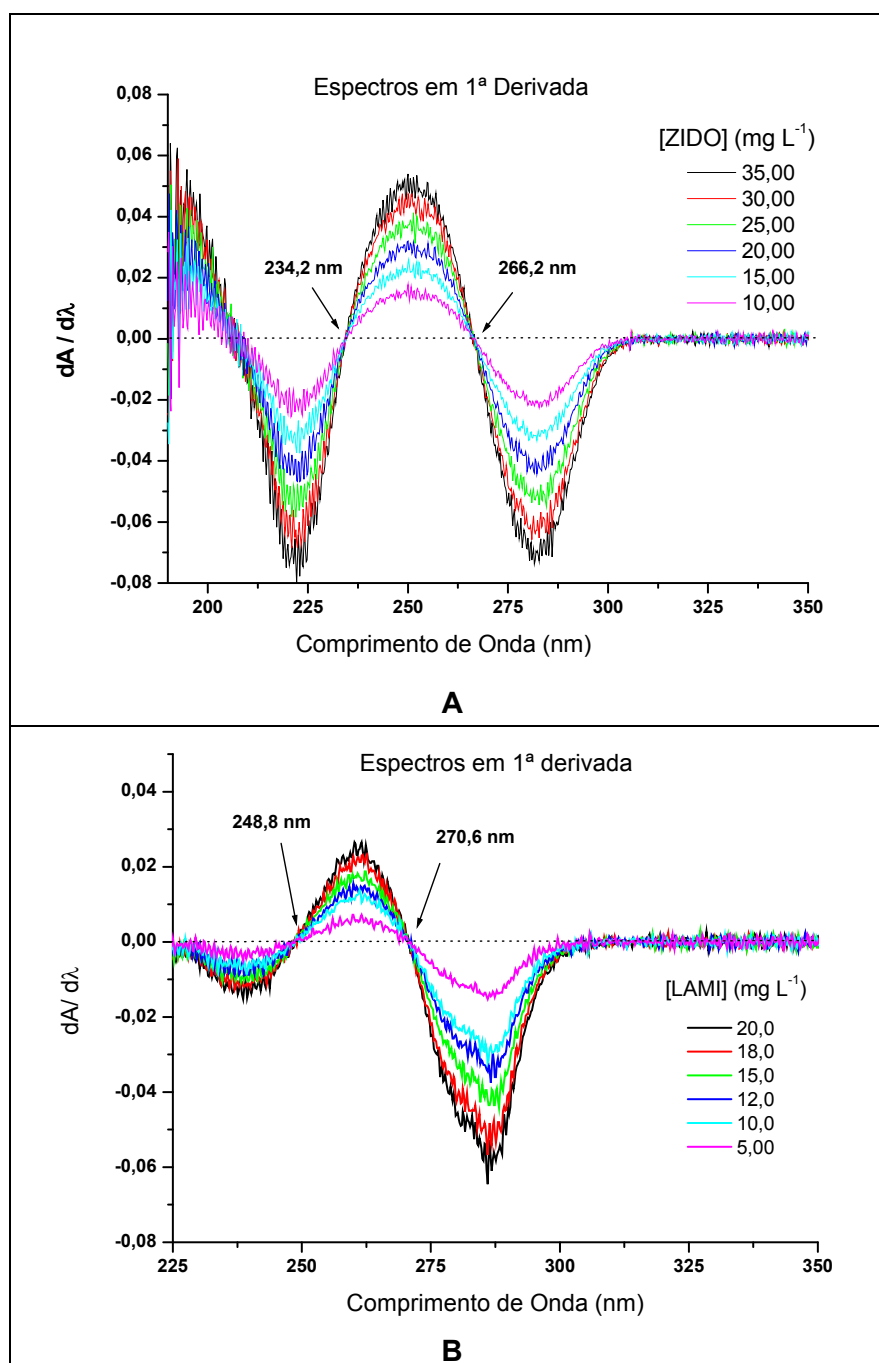
Amostra	Concentração Real (mg L <sup>-1</sup> )		Concentração Prevista (mg L <sup>-1</sup> )		Erro (%)	
	AZT	3TC	AZT (266nm)	3TC (197nm)	AZT	3TC
ZL03	19,0	12,0	31,6	18,3	66,3	52,9
ZL07	22,0	11,0	33,4	18,7	51,8	70,1
ZL09	22,0	13,0	36,3	20,4	65,2	57,1
ZL17	26,0	11,0	37,7	19,5	45,0	77,7
ZL24	29,0	13,0	42,9	22,5	48,0	73,0
ZL13d	24,0	12,0	37,2	20,2	54,9	68,3
<b>Erro Médio (%)</b>					<b>55,2</b>	<b>66,5</b>

De maneira geral, a espectrofotometria derivativa permite minimizar muitos problemas de interferência espectral, em razão da derivação permitir a separação de sinais e a ênfase de sinais pouco evidentes.

Quando se calcula a primeira derivada dos dados espectrais, os máximos de absorção se transformam em pontos de inflexão, com derivada zero para qualquer valor de concentração (método do ponto de anulação ou *zero crossing*). Assim, curvas analíticas podem ser elaboradas para cada fármaco, com pouca ou nenhuma interferência do outro.

Nos espectros derivados de zidovudina (Figura 21A) é possível observar dois pontos de derivada zero, em 234,2 e 266,2 nm. Para lamivudina (Figura 21B), estes pontos se localizam em 248,8 e 270,6 nm. Adicionalmente, é possível verificar nesta figura a exacerbação do ruído instrumental por conta da derivação. Trata-se de um importante efeito colateral do sistema derivativo, o qual muitas vezes diminui a aplicabilidade do sistema.

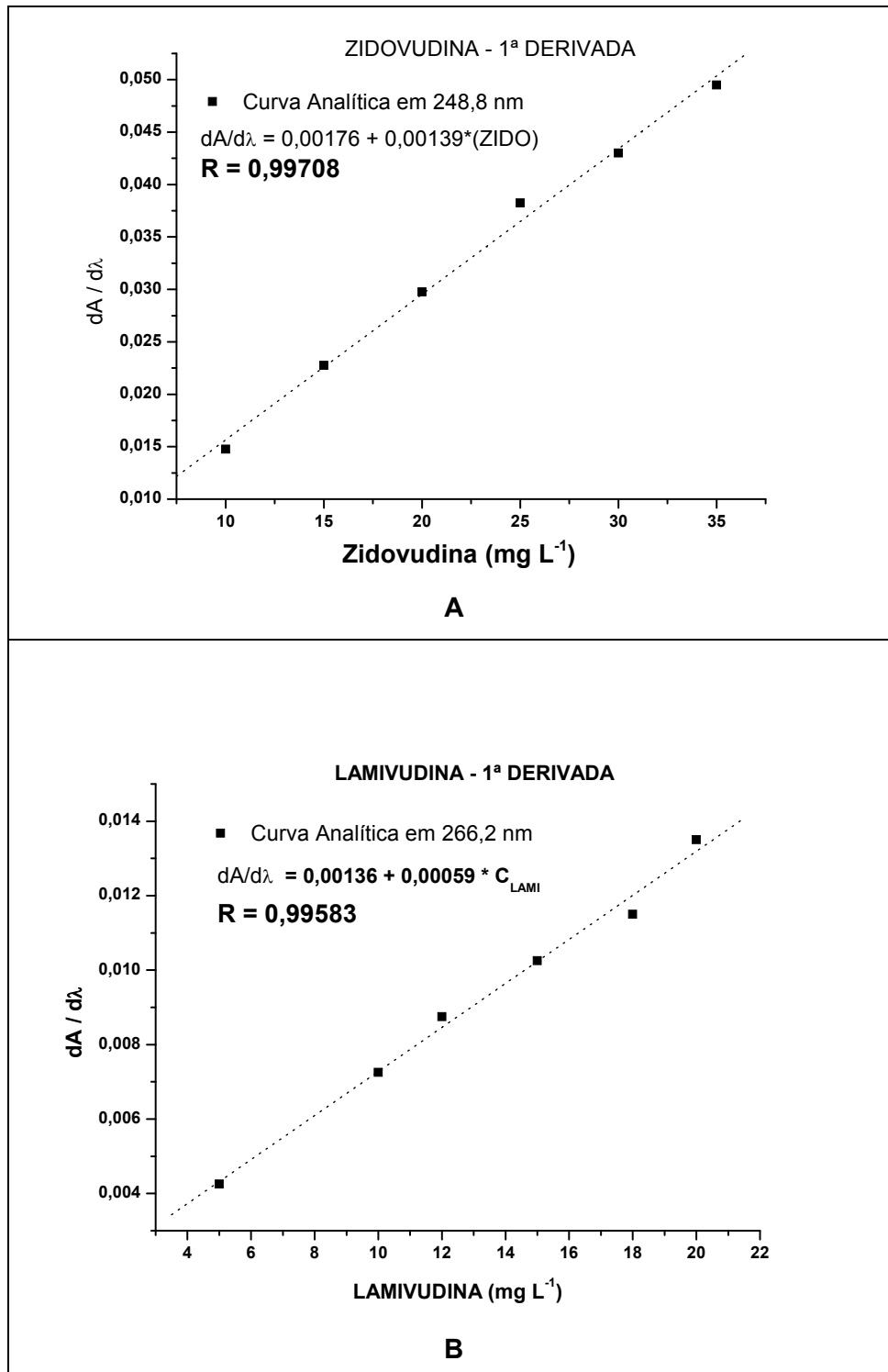
## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**FIGURA 21.** PRIMEIRA DERIVADA DOS ESPECTROS DE ZIDOVUDINA (A) E LAMIVUDINA (B).

Assim, a Figura 22 mostra as curvas analíticas elaboradas em 248,8 nm (zidovudina) e 266,2 nm (lamivudina), obtendo-se excelente linearidade ( $r > 0,99$ ). A capacidade de previsão deste sistema foi avaliada analisando-se misturas sintéticas, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 2. Embora melhorados, os resultados ainda são insatisfatórios para a determinação de lamivudina, permitindo a obtenção de erros médios superiores a 25%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**FIGURA 22.** CURVAS ANALÍTICAS NO MODO DERIVATIVO PARA ZIDOVUDINA (A) E LAMIVUDINA (B).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Para tentar minimizar os erros induzidos pelo aumento do ruído espectral, novas curvas foram elaboradas após a aplicação de procedimentos de alisamento (Savitsky-Golay, janela de 15 pontos, modelagem polinomial de ordem 2). Nestas condições os resultados foram significativamente melhorados (Tabela 3), propiciando erros de previsão médios da ordem de 2%.

**TABELA 2.** RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES OBTIDAS PELO MÉTODO DE INTERPOLAÇÃO EM CURVAS ANALÍTICAS DO MODO DERIVATIVO, NA ANÁLISE DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO.

Amostra	Concentração Real (mg L <sup>-1</sup> )		Concentração encontrada (mg L <sup>-1</sup> )		Erro (%)	
	AZT	3TC	AZT (248,8nm)	3TC (266,2nm)	AZT	3TC
ZL03	19,0	12,0	19,4	18,9	2,2	57,3
ZL07	22,0	11,0	21,8	16,3	-1,1	48,5
ZL09	22,0	13,0	22,1	12,5	0,5	-3,6
ZL17	26,0	11,0	24,6	10,8	-5,3	-1,5
ZL24	29,0	13,0	28,9	7,0	-0,2	-46,0
ZL13d	24,0	12,0	24,6	12,9	2,6	7,9
<b>Erro Médio (%)</b>					<b>2,0</b>	<b>27,5</b>

**TABELA 3.** RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES OBTIDAS PELO MÉTODO DE INTERPOLAÇÃO EM CURVAS ANALÍTICAS DO MODO DERIVATIVO (COM ALISAMENTO), NA ANÁLISE DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO.

Amostra	Concentração Real (mg L <sup>-1</sup> )		Concentração encontrada (mg L <sup>-1</sup> )		Erro (%)	
	AZT	3TC	AZT (248,8nm)	3TC (266,2nm)	AZT	3TC
ZL03	19,0	12,0	18,6	12,4	-2,3	3,5
ZL07	22,0	11,0	21,0	10,8	-4,4	-1,3
ZL09	22,0	13,0	21,8	13,1	-0,8	1,0
ZL17	26,0	11,0	25,3	11,4	-2,6	4,0
ZL24	29,0	13,0	28,7	12,5	-1,0	-3,8
ZL13d	24,0	12,0	23,6	12,0	-1,4	0,3
<b>Erro Médio (%)</b>					<b>2,1</b>	<b>2,3</b>

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Finalmente, para complementar os procedimentos ditos “convencionais” e contornar os já comentados problemas de interferência espectral, sistemas fundamentados no princípio da aditividade de absorvâncias (Método de Vierordt) foram também desenvolvidos, de acordo com a sequência de expressões apresentadas a seguir:

$$A(266\text{ nm}) = A(\text{ZIDO}_{266\text{ nm}}) + A(\text{LAMI}_{266\text{ nm}})$$

$$A(271\text{ nm}) = A(\text{ZIDO}_{271\text{ nm}}) + A(\text{LAMI}_{271\text{ nm}})$$

Ou:

$$A(266\text{ nm}) = (a_{\text{ZIDO}, 266\text{ nm}} \times C_{\text{ZIDO}}) + (a_{\text{LAMI}, 266\text{ nm}} \times C_{\text{LAMI}})$$

$$A(271\text{ nm}) = (a_{\text{ZIDO}, 271\text{ nm}} \times C_{\text{ZIDO}}) + (a_{\text{LAMI}, 271\text{ nm}} \times C_{\text{LAMI}})$$

Onde:

A = Absorvância, a = absortividade ( $\text{L mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), C = concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

Registrando-se os valores de absorvância para a mistura de fármacos, em ambos comprimentos de onda, e conhecendo-se os valores de absortividade, é possível calcular as concentrações, resolvendo-se um sistema de duas equações.

Os resultados apresentados na Tabela 4 demonstram que o referido sistema permite a correção de uma importante parcela da interferência observada. Entretanto, a exatidão proporcionada pelo método é inferior à do sistema derivativo apresentado anteriormente. Neste caso, erros médios superiores a 10% foram observados na determinação de lamivudina, valores estes que superam largamente os limites de recuperação sugeridos pelo manual de validação de métodos analíticos editado pela *Global on-line Resource for Validation and Compliance* (LABCOMPLIANCE, 2001)

**TABELA 4.** RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES OBTIDAS PELO MÉTODO DE VIERORDT, NA ANÁLISE DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO.

Amostra	Concentração Real ( $\text{mgL}^{-1}$ )		Concentração encontrada ( $\text{mg L}^{-1}$ )		Erro (%)	
	AZT	3TC	AZT	3TC	AZT	3TC
ZL03	19,0	12,0	18,8	11,6	-0,8	-3,4
ZL07	22,0	11,0	22,2	10,0	0,9	-8,8
ZL09	22,0	13,0	24,6	10,5	11,8	-19,1
ZL17	26,0	11,0	26,3	10,0	1,3	-9,1
ZL24	29,0	13,0	30,4	10,9	4,7	-16,0
ZL13d	24,0	12,0	24,8	11,0	3,2	-8,2
<b>Erro Médio (%)</b>					<b>3,8</b>	<b>10,8</b>



**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Em função dos bons resultados prévios proporcionados pelo sistema de calibração em modo derivativo (com alisamento), decidiu-se avaliar o seu desempenho na análise do medicamento de referência. Os resultados apresentados na Tabela 5 indicam que, tomando-se como referência o valor de concentração declarado na bula, os erros de previsão se apresentam superiores ao limite imposto pela legislação (10%). Em princípio, referida falta de exatidão pode estar relacionada com a presença de excipientes que absorvem na região espectral considerada na modelagem, espécies que podem ter o seu sinal acentuado no modo derivativo.

**TABELA 5.** RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES OBTIDAS PELO MÉTODO DE INTERPOLAÇÃO EM CURVAS ANALÍTICAS DO MODO DERIVATIVO (COM ALISAMENTO), NA ANÁLISE DO MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA.

Amostra	Concentração Nominal* (mg L <sup>-1</sup> )		Concentração encontrada (mg L <sup>-1</sup> )		Erro (%)	
	AZT	3TC	AZT (248,8nm)	3TC (266,2nm)	AZT	3TC
1			20,4	13,2	14,8	9,8
2	24,0	12,0	20,6	13,1	14,2	9,3
3			20,5	13,0	14,4	8,3
<b>Erro Médio (%)</b>					<b>14,5</b>	<b>9,1</b>

\* Concentração Nominal = Concentração declarada na bula do medicamento, levando em consideração as diluições realizadas.

### 5.1.2. Espectroscopia Eletrônica em Solução - Análise Multivariada

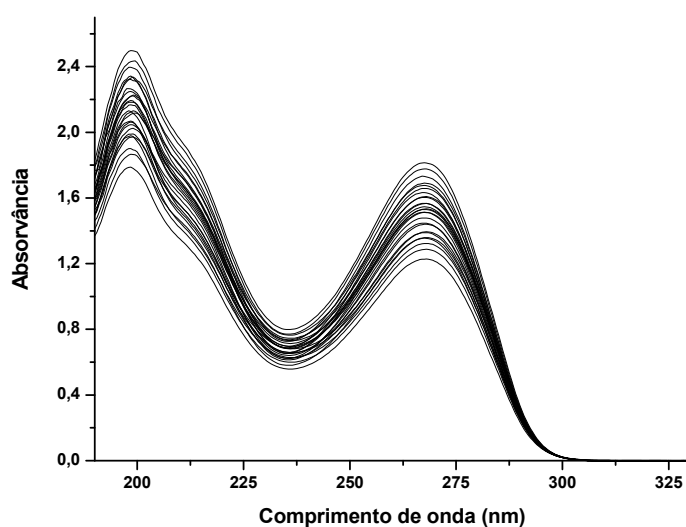
O modelo multivariado de calibração foi preliminarmente estabelecido a partir de 20 misturas sintéticas (Tabela 6), utilizando-se os sinais espectrais centrados na média (190 a 300 nm) com passo de 0,5 nm. Outras 6 misturas foram reservadas para a fase de validação, incluindo-se uma duplicata do ponto central do planejamento (amostra ZL13d).

A extrema semelhança existente entre os espectros das misturas sintéticas utilizadas na fase de calibração e validação pode ser observada na sequência de espectros apresentada na Figura 23.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**TABELA 6.** COMPOSIÇÃO DAS MISTURAS UTILIZADAS NAS ETAPAS DE CALIBRAÇÃO (NORMAL) E VALIDAÇÃO (NEGRITO) NO DESENVOLVIMENTO DE MODELOS MULTIVARIADOS UTILIZANDO-SE ESPECTROSCOPIA UV-VIS EM SOLUÇÃO.

MISTURAS	ZIDO (mg L <sup>-1</sup> )	LAMI (mg L <sup>-1</sup> )
1	19,00	10,00
2	19,00	11,00
<b>3</b>	<b>19,00</b>	<b>12,00</b>
4	19,00	13,00
5	19,00	14,00
6	22,00	10,00
<b>7</b>	<b>22,00</b>	<b>11,00</b>
8	22,00	12,00
<b>9</b>	<b>22,00</b>	<b>13,00</b>
10	22,00	14,00
11	24,00	10,00
12	24,00	11,00
13*	24,00	12,00
14	24,00	13,00
15	24,00	14,00
16	26,00	10,00
<b>17</b>	<b>26,00</b>	<b>11,00</b>
18	26,00	12,00
19	26,00	13,00
20	26,00	14,00
21	29,00	10,00
22	29,00	11,00
23	29,00	12,00
<b>24</b>	<b>29,00</b>	<b>13,00</b>
25	29,00	14,00



**FIGURA 23.** ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS DAS MISTURAS DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO MULTIVARIADO.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para definir o melhor número de variáveis latentes (VL), utilizou-se o método de validação cruzada interna, particularmente a rotina denominada "Leave one out". Os erros que surgem desta previsão são apresentados como RMSECV, enquanto que os erros da etapa de calibração são expressos na forma do RMSEC, ambos em função do número de VL (Figura 24). A partir destes resultados, é possível observar que 6 variáveis latentes são necessárias para descrever o modelo que leva aos menores erros de previsão. Entretanto, percebe-se que o erro de previsão não diminui significativamente a partir da 3ª VL, ao mesmo tempo em que grande parte da variância dos dados de concentração pode ser representada por apenas 2 a 3 VL. Sendo assim, modelos foram construídos com 2, 3, 4 e 6 VL.

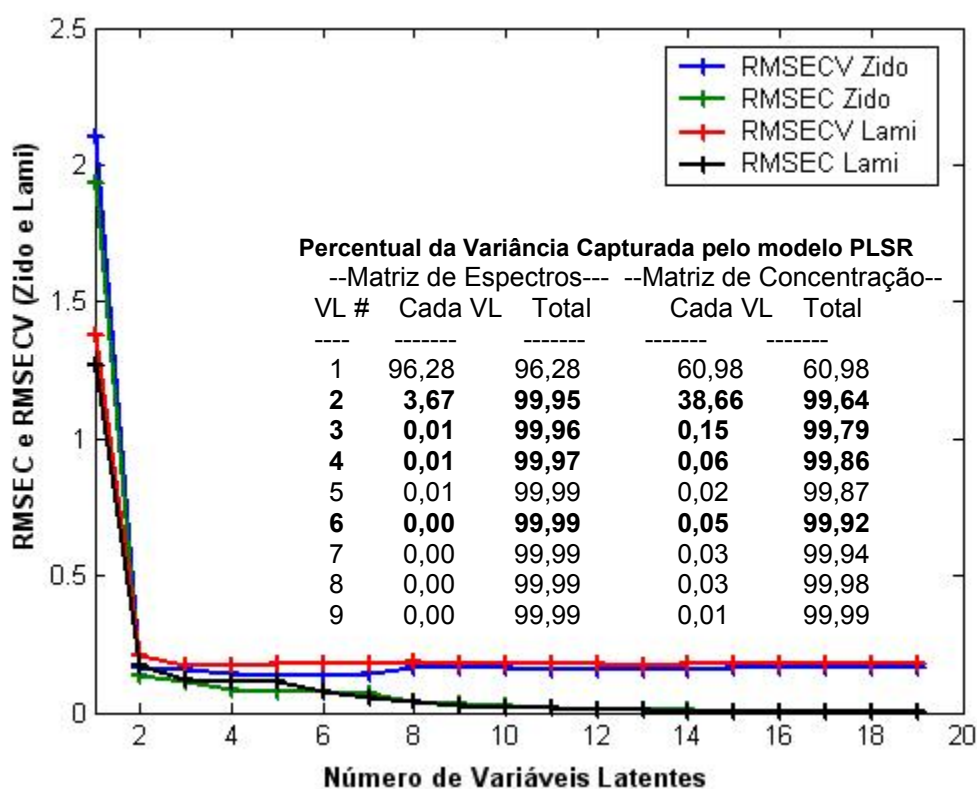


FIGURA 24. GRÁFICO DO RMSEC E RMSECV *VERSUS* NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES.

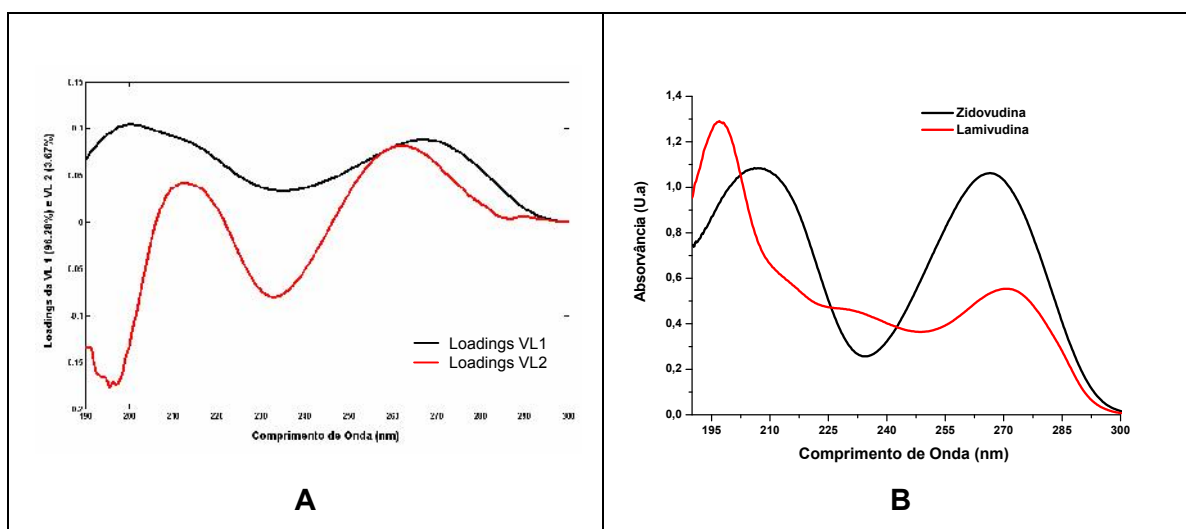
Os resultados da fase de previsão, obtidos para cada número de VL ensaiado, são apresentados na Tabela 7. Estes resultados indicam que, tal como esperado, um número reduzido de VL leva à elaboração de um modelo com capacidade de previsão similar àquele desenvolvido com um número maior de VL, o que representa uma vantagem que confere robustez ao modelo desenvolvido. Dentro deste contexto, cabe salientar que o uso de um elevado número de VL costuma provocar sobreajustes do

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

modelo, o que faz com que pequenas variações de tipo instrumental possam provocar significativa perda na capacidade de previsão.

É interessante salientar que cada amostra do conjunto de calibração é representada por aproximadamente 220 valores de absorvância, registrados em igual número de comprimentos de onda. A primeira etapa do procedimento multivariado demonstra que grande parte da variância dos dados pode ser representada por um pequeno número de novas variáveis (VL), as quais surgem da combinação linear das variáveis originais. Se um pequeno número de VL é utilizado para representar a variância registrada nos espectros, o desenvolvimento de um modelo de calibração fica extremamente facilitado.

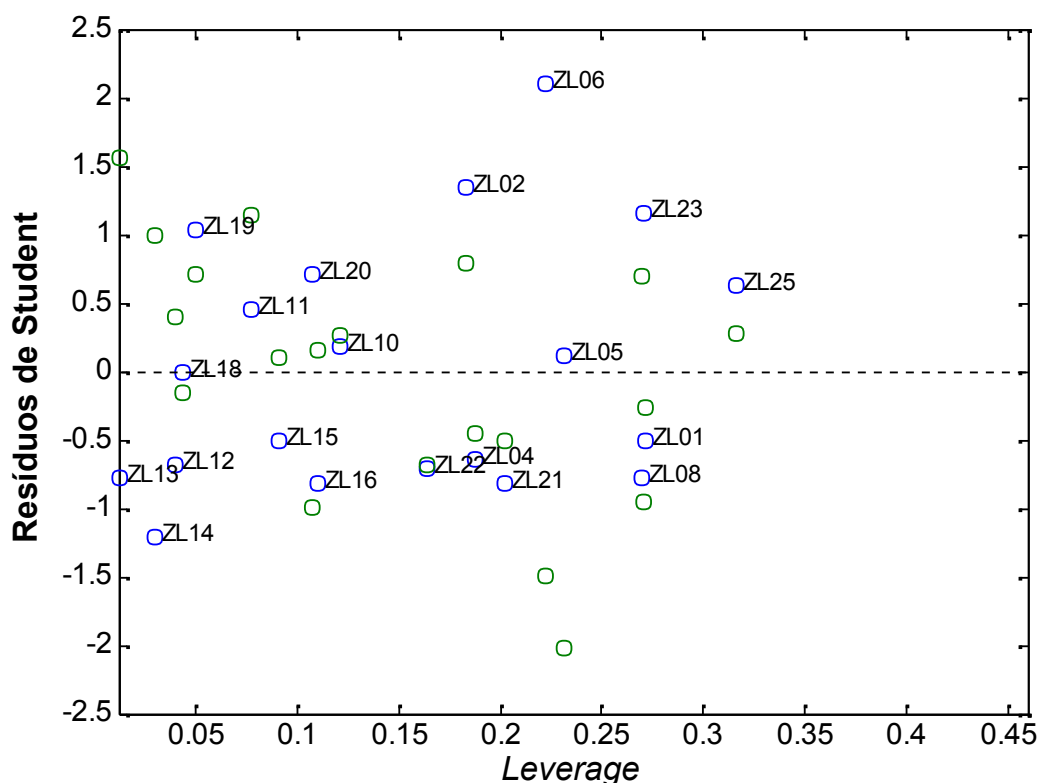
Analisando-se o peso (*loadings*) que cada variável original teve na elaboração das variáveis latentes (Figura 25A) é possível observar uma grande semelhança entre o perfil deste parâmetro e os espectros individuais apresentados na Figura 25B. Trata-se de uma observação de extrema relevância, uma vez que demonstra a complementaridade de ambas variáveis latentes, assim como a correspondência existente entre a primeira variável latente e o sinal espectral da zidovudina e entre a segunda variável latente e o sinal da lamivudina.



**FIGURA 25.** GRÁFICO DOS *LOADINGS* DAS VL 1 E VL 2 EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA (A) E ESPECTROS ELETRÔNICOS DA ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA (B).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

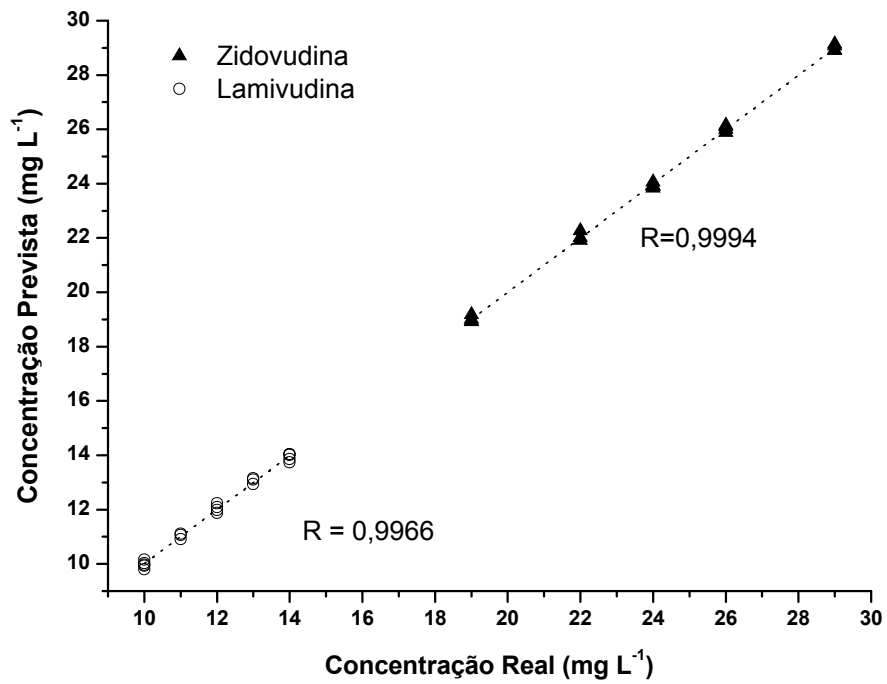
Na Figura 26 são apresentados os dois critérios de maior importância para a verificação de anomalias no conjunto de calibração, os resíduos de Student e os valores de *Leverage*. Por definição, os valores máximos permitidos para estes parâmetros são 2,5 e 0,45 (3 VL/N), respectivamente (FERREIRA *et. al.*,1999). Utilizando-se estes argumentos, observa-se que nenhuma anomalia existe no conjunto utilizado para a elaboração do modelo.



**FIGURA 26.** GRÁFICO DE RESÍDUOS DE STUDENT *VERSUS* "LEVERAGE" PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 3 VL.

Finalmente, na Figura 27 apresenta-se o gráfico que relaciona valores reais com valores previstos pelo modelo, para cada espécie estudada nos padrões de calibração. Observa-se neste gráfico que existe uma coerência perfeita entre ambos os valores, o que, pelo menos antecipadamente, permite prever uma boa capacidade de previsão do modelo multivariado desenvolvido. Entretanto, uma validação verdadeira deve ser feita com misturas sintéticas que não foram utilizadas na etapa de calibração. Quando esta prova é realizada (ver Tabela 7), percebe-se que a capacidade de previsão do modelo que utiliza 3 VL é excelente, permitindo erros relativos máximos da ordem de 1,2% para zidovudina e 0,9% para lamivudina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**FIGURA 27.** GRÁFICO DE VALORES REAIS *VERSUS* VALORES PREVISTOS PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 3 VL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**TABELA 7.** RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS MISTURAS SINTÉTICAS DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO, UTILIZANDO MODELOS COM DIFERENTES NÚMEROS DE VARIÁVEIS LATENTES (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg L<sup>-1</sup> E ERRO RELATIVO EM %).

CONCENTRAÇÃO REAL		CONCENTRAÇÃO PREVISTA															
		6 VL			4 VL				3 VL			2 VL					
ZIDO	LAMI	Zido	Lami	ERRO	Zido	Lami	ERRO	Zido	Lami	ERRO	Zido	Lami	ERRO				
19,0	12,0	19,0	12,1	0,0	0,5	19,0	12,1	0,1	1,1	19,0	12,1	-0,2	1,2	19,0	12,0	0,1	0,4
22,0	11,0	21,6	11,1	1,9	1,1	21,6	11,1	-1,9	1,1	21,7	11,0	-1,3	0,4	21,6	11,2	-1,8	1,9
22,0	13,0	22,7	13,0	3,3	0,4	22,7	13,0	3,1	0,1	22,6	13,1	2,7	0,6	22,6	13,0	2,9	-0,2
26,0	11,0	26,3	11,0	1,2	0,2	26,3	10,9	1,1	-1,2	26,3	10,9	1,0	-1,0	26,2	11,0	0,8	-0,1
29,0	13,0	28,9	13,1	0,3	1,0	28,9	13,2	-0,4	1,6	28,9	13,2	-0,3	1,4	28,9	13,3	-0,4	2,0
24,0	12,0	24,5	12,2	2,2	2,0	24,5	12,1	2,0	0,7	24,5	12,1	2,0	0,6	24,3	12,3	1,4	2,6
<b>Erro Médio (%)</b>				<b>1,5</b>	<b>0,9</b>			<b>1,4</b>	<b>1,0</b>			<b>1,2</b>	<b>0,9</b>			<b>1,3</b>	<b>2,0</b>

---

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Visando melhorar a capacidade preditiva dos modelos, diversos sistemas de pré-processamento de sinais foram utilizados, destacando-se sistemas derivados e autoescalados.

Para cada sistema de pré-processamento foi aplicada uma rotina de trabalho similar à descrita no item anterior, envolvendo, principalmente, o estudo do efeito do número de variáveis latentes. Estes resultados são resumidamente apresentados na Figura 28, que correlaciona o erro médio de previsão em função do número de variáveis latentes e tipo de pré-processamento (1:Centrado na Média, 2: Autoescalado e 3: Primeira Derivada).

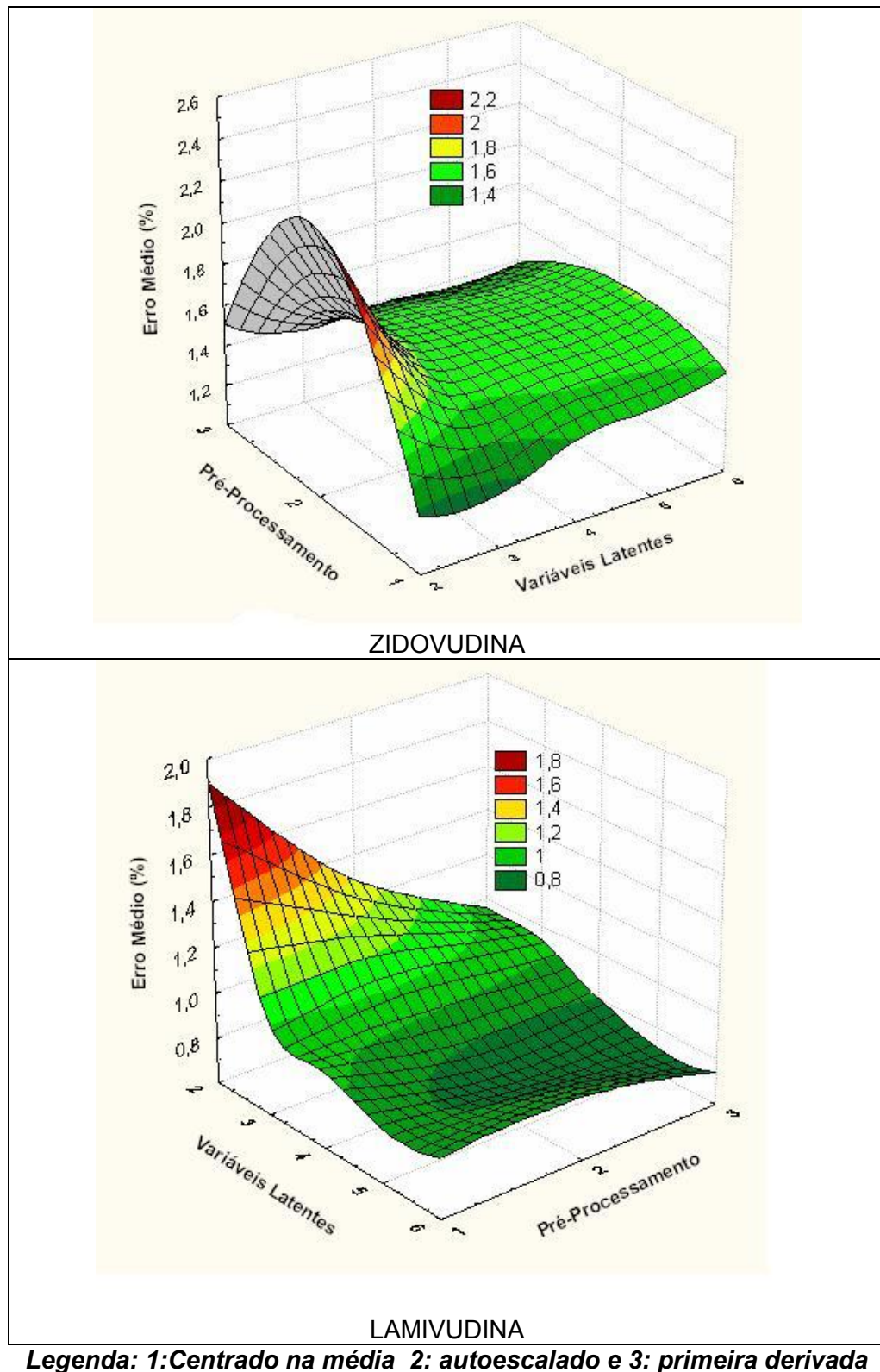
Para zidovudina, os menores erros de previsão são propiciados pelo uso de 3 variáveis latentes e espectros centrados na média. Nesta condição, erros médios de previsão da ordem de 1,2% são observados.

Para Lamivudina, os menores erros de previsão são conseguidos com 4VL e espectros derivados. Entretanto, utilizando-se 3 VL e dados centrados na média se observam resultados igualmente adequados, com erros médios de previsão da ordem de 1%.

Em função destes argumentos, o modelo com 3 VL e dados centrado na média foi selecionado para a análise de medicamentos, cujos resultados são apresentados na Tabela 8. Estes resultados confirmam a boa capacidade do sistema multivariado para previsão de lamivudina e zidovudina em associação, fornecendo erros médios inferiores a 10%.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**FIGURA 28.** REPRESENTAÇÃO DO ERRO MÉDIO DA PREVISÃO DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA, EM FUNÇÃO DO PRÉ-PROCESSAMENTO (1, 2 E 3) E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO****TABELA 8.** RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA EM AMOSTRA DO MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA (R) E GENÉRICO (G), UTILIZANDO MODELOS COM 3 VARIÁVEIS LATENTES E ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg L<sup>-1</sup> E ERRO RELATIVO EM %).

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO REAL* (mg L <sup>-1</sup> )		CONCENTRAÇÃO PREVISTA (mg L <sup>-1</sup> )		ERRO (%)	
	AZT	3TC	AZT	3TC	AZT	3TC
R1	20,47	11,48	21,54	11,23	5,23	-2,18
R2	20,37	11,65	21,04	11,53	3,29	-1,03
R3	22,48	13,26	22,19	11,43	-1,29	-13,80
<b>Média</b>	<b>21,11</b>	<b>12,13</b>	<b>21,59</b>	<b>11,40</b>	<b>2,27</b>	<b>5,67</b>
<b>Desvio (%)</b>	<b>5,64</b>	<b>8,10</b>	<b>2,67</b>	<b>1,34</b>	-	-
G1	21,62	11,10	20,98	10,61	-2,95	-4,41
G2	22,11	11,33	20,62	10,03	-6,74	-11,47
G3	22,13	11,37	21,18	10,52	-4,30	-7,48
<b>Média</b>	<b>21,95</b>	<b>11,27</b>	<b>20,93</b>	<b>10,39</b>	<b>4,66</b>	<b>7,79</b>
<b>Desvio (%)</b>	<b>1,32</b>	<b>1,29</b>	<b>1,36</b>	<b>3,00</b>	-	-

\* Concentração obtida pelo método cromatográfico padrão.

**5.1.2.1. Validação do modelo multivariado**

Em função dos bons resultados precedentes, a metodologia espectroscópica multivariada foi validada segundo critérios estabelecidos pela ANVISA (Resolução-RE nº899 de 2003), principalmente com a finalidade de comprovar a sua robustez frente a diferentes condições de aplicação e, conseqüentemente, a sua aplicabilidade nas diversas etapas do controle de qualidade dos medicamentos.

Assim, o modelo de melhor desempenho, desenvolvido com 3 variáveis latentes e espectros centrados na média, foi avaliado em termos de precisão, exatidão e robustez, esta última frente a mudanças de pH, temperatura e tempo de leitura.

**Precisão e Exatidão**

A precisão foi avaliada em dois níveis diferentes (repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias), por meio de análise em triplicata de três misturas sintéticas contendo alta (AZT: 29,0 mg L<sup>-1</sup>, 3TC: 14,0 mg L<sup>-1</sup>), média (AZT: 24,0 mg L<sup>-1</sup>, 3TC: 12,0 mg L<sup>-1</sup>) e baixa (AZT: 19,0 mg L<sup>-1</sup>, 3TC: 10,0 mg L<sup>-1</sup>) concentração dos analitos. A exatidão foi avaliada através de estudos de recuperação, utilizando-se as mesmas três misturas sintéticas.

Os resultados desta avaliação (Tabela 9) demonstram uma excelente precisão da metodologia analítica em avaliação, com desvios padrão relativos entre 0,07 e 0,42 %, portanto dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA (5%).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Adicionalmente, os resultados apresentados na Tabela 10 permitem avaliar a exatidão da metodologia proposta, em função da recuperação das concentrações utilizadas no ensaio. Neste caso, a recuperação alcança valores médios da ordem de 101% para zidovudina e de 98% para lamivudina, portanto dentro do limite sugerido pela Labcompliance (100+/- 2%).

**TABELA 9.** RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA NOS ENSAIOS DE PRECISÃO.

	REPETIBILIDADE							
	ZIDOVUDINA				LAMIVUDINA			
	Real (mg L <sup>-1</sup> )	Previsto (média, n=3)	DPR (%)	Recuperação (%)	Real (mg L <sup>-1</sup> )	Previsto (média, n=3)	DPR (%)	Recuperação (%)
1	19,00	19,54	0,06	102,84	10,00	9,91	0,31	99,10
2	24,00	23,87	0,07	99,46	12,00	11,70	0,24	97,50
3	29,00	28,83	0,08	99,41	14,00	13,70	0,07	97,86
	<b>Média</b>		<b>0,07</b>	<b>100,57</b>	<b>Média</b>		<b>0,21</b>	<b>98,15</b>

	PRECISÃO INTERMEDIÁRIA							
	ZIDOVUDINA				LAMIVUDINA			
	Real (mg L <sup>-1</sup> )	Previsto (média, n=6)	DPR (%)	Recuperação (%)	Real (mg L <sup>-1</sup> )	Previsto (média, n=6)	DPR (%)	Recuperação (%)
1	19,00	19,79	0,28	104,18	10,00	9,93	0,20	99,30
2	24,00	24,43	0,64	101,79	12,00	11,64	0,39	97,00
3	29,00	29,11	0,33	100,38	14,00	13,69	0,10	97,79
	<b>Média</b>		<b>0,42</b>	<b>102,12</b>	<b>Média</b>		<b>0,23</b>	<b>98,03</b>

**Robustez**

A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento do método, constatando-se suscetibilidade a variações nas condições analíticas, as quais deverão ser adequadamente controladas ou incluídas como precauções no procedimento.

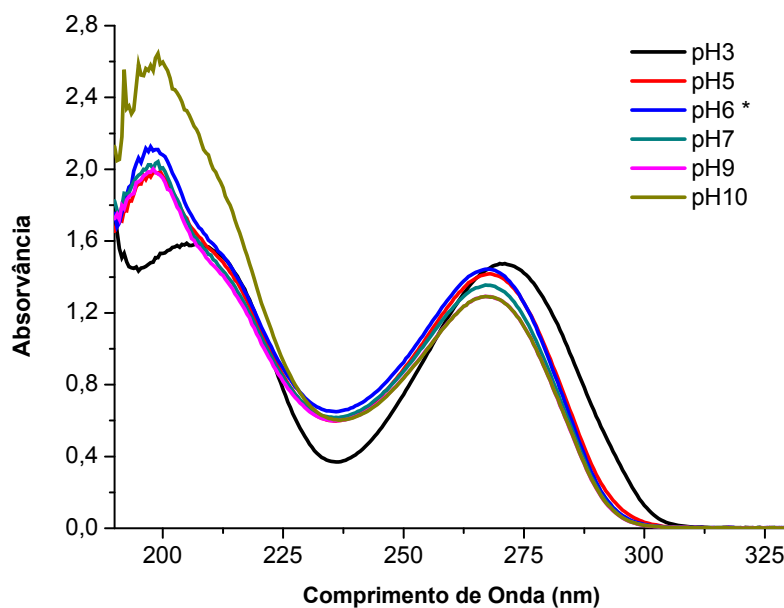
A etapa mais importante na construção do modelo é a obtenção dos espectros das espécies de interesse. Portanto, a principal observação a ser feita está representada pelas condições experimentais que podem alterar a resposta instrumental e, conseqüentemente, os resultados de previsão.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A robustez do método foi avaliada através da análise de uma mistura sintética contendo 24,0 mg L<sup>-1</sup> de AZT e 12,0 mg L<sup>-1</sup> de 3TC em condições de diferentes valores de pH (3,2 até 10,1), temperatura (5 a 60 °C) e tempo de leitura (0 até 90 h).

Os resultados (Tabela 10) indicam que mudanças na temperatura ou no tempo de leitura não provocam significativas modificações do sinal espectral, e que, conseqüentemente, não prejudicam a capacidade de previsão do modelo. Neste estudo, desvios médios inferiores a 3% e erros de previsão médios inferiores a 4% foram observados, valores que se encontram dentro dos limites estabelecidos para este tipo de método.

Diferentemente, mudanças no pH das amostras levam à obtenção de elevados erros de previsão, principalmente em razão das significativas mudanças provocadas no perfil espectral dos substratos (Figura 29). Zidovudina e lamivudina apresentam valores de pKa de 9,8 e 4,3, respectivamente, o que faz com que o equilíbrio de protonação seja sensivelmente modificado em valores de pH superiores a 9,8 e inferiores a 4,3 (SOUZA & STORPIRTIS, 2004). Desta forma, a capacidade de previsão do modelo é seriamente comprometida em meio ácido (pH 3) ou básico (pH 10), o que leva à obtenção de erros de previsão da ordem de 30%. Trabalhando-se em pH entre 5 e 7 uma boa capacidade de previsão é observada (erros de previsão da ordem de 7%), enquanto que trabalhando-se no mesmo pH em que o modelo foi desenvolvido (pH 6), os erros de previsão são significativamente reduzidos (<1%). Estas observações salientam a necessidade de um controle de pH utilizando-se, por exemplo, soluções tampão.



**FIGURA 29.** ESPECTROS DA MISTURA CONTENDO AZT (24,00 mg L<sup>-1</sup>) E 3TC (12,00 mg L<sup>-1</sup>) EM DIFERENTES VALORES DE pH.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO****TABELA 10.** RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA NOS ENSAIOS DE ROBUSTEZ.

<b>EFEITO DA TEMPERATURA</b>				
	<b>Zidovudina</b>		<b>Lamivudina</b>	
Faixa de Temperatura Estudada (°C)	5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 60			
Concentração Real (mg L <sup>-1</sup> )	24,00		12,00	
Concentração Média Prevista (mg L <sup>-1</sup> )	23,17		11,98	
Erro Médio (%)	3,46		0,17	
DPR Médio (%)	1,54		2,77	
<b>EFEITO DO TEMPO DE LEITURA</b>				
Tempo (h)	0, 17, 56 e 90			
Concentração Real (mg L <sup>-1</sup> )	24,00		12,00	
Concentração Média Prevista (mg L <sup>-1</sup> )	23,40		11,71	
Erro Médio (%)	2,49		2,42	
DPR Médio (%)	0,46		0,27	
<b>EFEITO DO pH</b>				
Concentração Real (mg L <sup>-1</sup> )	24,00		12,00	
Concentração Prevista (mg L <sup>-1</sup> ), Erro (%)				
pH 3	32,23	(34,29)	7,31	(-39,09)
pH 5	24,72	(2,99)	11,33	(-5,62)
pH 6	24,15	(0,62)	12,11	(0,93)
pH 7	22,36	(-6,82)	11,28	(-5,98)
pH 9	21,28	(-11,35)	10,94	(-8,81)
pH 10	23,07	(-3,86)	7,90	(-34,13)

**5.1.2.2. Figuras de mérito do modelo multivariado**

Sempre que um procedimento analítico é proposto, surge a necessidade de se averiguar se o método apresenta um desempenho adequado nas condições em que será aplicado. Esta validação pode ser atestada por meio da determinação de algumas figuras de mérito, calculadas de acordo com procedimentos recentemente desenvolvidos (VALDERRAMA et al., 2009).

Os principais parâmetros que fazem parte do elenco de Figuras de mérito foram calculados, encontrando-se os resultados apresentados na Tabela 11. Os valores de exatidão são representados pela raiz quadrada do erro quadrático médio de calibração (RMSEC) e de previsão (RMSEP), apresentando valores da ordem de 1% em relação ao teor nominal dos fármacos nas misturas de calibração e validação.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A precisão (repetibilidade) foi calculada a partir da análise em triplicata de amostras em três níveis de concentração, encontrando-se desvios absolutos que correspondem a menos de 1% do conteúdo médio dos fármacos nas misturas utilizadas no ensaio. Estes resultados se mostram compatíveis com as exigências da ANVISA, que estabelece desvios máximos de 5%.

**TABELA 11. PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO DO MODELO MULTIVARIADO.**

<b>FIGURAS DE MÉRITO</b>		<b>ZIDOVUDINA</b>	<b>LAMIVUDINA</b>
<b>Exatidão</b>	RMSEC	0,11477	0,12256
	RMSEP	0,3527	0,1168
<b>Precisão</b>		0,041	0,1338
<b>Sensibilidade</b> (mg L <sup>-1</sup> )		0,135	0,132
<b>Sensibilidade analítica</b> (mg L <sup>-1</sup> )		0,071	0,240
<b>Ajuste</b>	<b>Inclinação</b>	0,999	0,994
	<b>Intercepto</b>	0,02267	0,07615
	<b>Coef. Correl(R<sup>2</sup>)</b>	0,9988	0,99318
<b>Ajuste NAS</b>	<b>Inclinação</b>	7,40031	7,58269
	<b>Intercepto</b>	1,44121	-1,06816
	<b>Coef. Correl (R<sup>2</sup>)</b>	0,999	0,993

A sensibilidade do modelo, que é dada em termos de unidades de concentração, apresenta bons resultados para ambos os fármacos (0,135 para zidovudina e 0,132 para lamivudina), levando-se em consideração que o valor calculado corresponde a menos de 1% dos valores de concentração utilizados na modelagem. Quando se calcula o inverso desse parâmetro, permite-se estabelecer a menor diferença de concentração entre as amostras que pode ser distinguida pelo método proposto.

O ajuste do modelo construído foi avaliado com base nos gráficos dos valores de concentração estimados pelo modelo PLS contra os valores de referência. Outra maneira de avaliar o ajuste de modelos de calibração multivariada é através dos gráficos dos valores escalares do sinal analítico líquido (NAS), determinado pela norma do vetor de sinal analítico líquido em função do valor de referência de concentração de cada amostra. Esta última refere-se à representação pseudo-univariada dos modelos de calibração multivariada.

---

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A inclinação, o intercepto e o coeficiente de correlação para os modelos são mostrados na Tabela 9. Os valores dão um indicativo que há uma relação linear entre as concentrações estimadas e os dados espectrais.

#### *5.1.2.3. Ensaios de Perfil de Dissolução*

O estudo do perfil de dissolução envolveu o medicamento de referência para a associação em questão (Biovir®) e um medicamento genérico, produzido no laboratório Farmanguinhos. A quantificação de cada um dos fármacos foi realizada pelo método cromatográfico padrão e pelo método espectrofotométrico multivariado, este último envolvendo o modelo de melhor desempenho, elaborado com 3 VL e dados centrados na média.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 30, o medicamento avaliado pode ser considerado de pronta liberação, alcançando aproximadamente 75% da sua concentração nominal nos primeiros 5 minutos do teste. De acordo com especificações da Farmacopéia Brasileira 2010, a dissolução de zidovudina e lamivudina deve ser superior a 80% em 60 min de ensaio, valor que é confirmado pelas duas metodologias de controle.

De maneira geral, os resultados permitem observar uma boa correlação entre ambas as metodologias de controle, o que sugere um bom potencial de aplicação do método proposto no estabelecimento de rotinas analíticas orientadas ao controle de qualidade destes medicamentos. Maiores discrepâncias são observadas nos primeiros tempos monitorados, provavelmente em razão de imprecisões na coleta de amostras, a qual se mostra crítica nos primeiros momentos do ensaio, em função da rápida dissolução dos medicamentos.

Resultados igualmente coerentes foram observados em ensaios de dissolução envolvendo medicamentos genéricos, apresentados na Figura 31.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

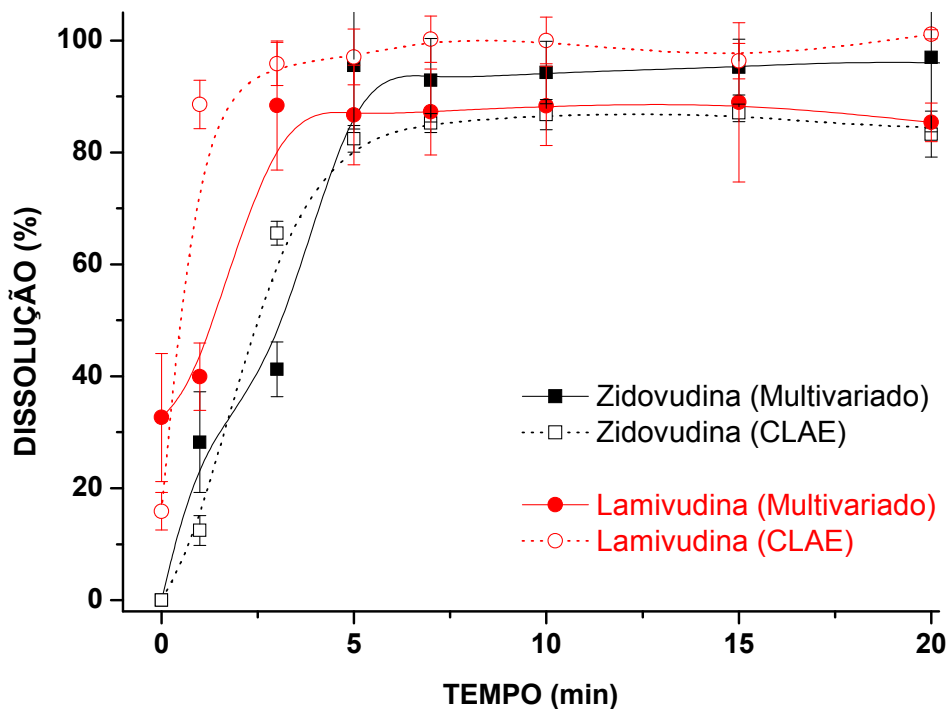


FIGURA 30. PERFIL DE DISSOLUÇÃO DA ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA.

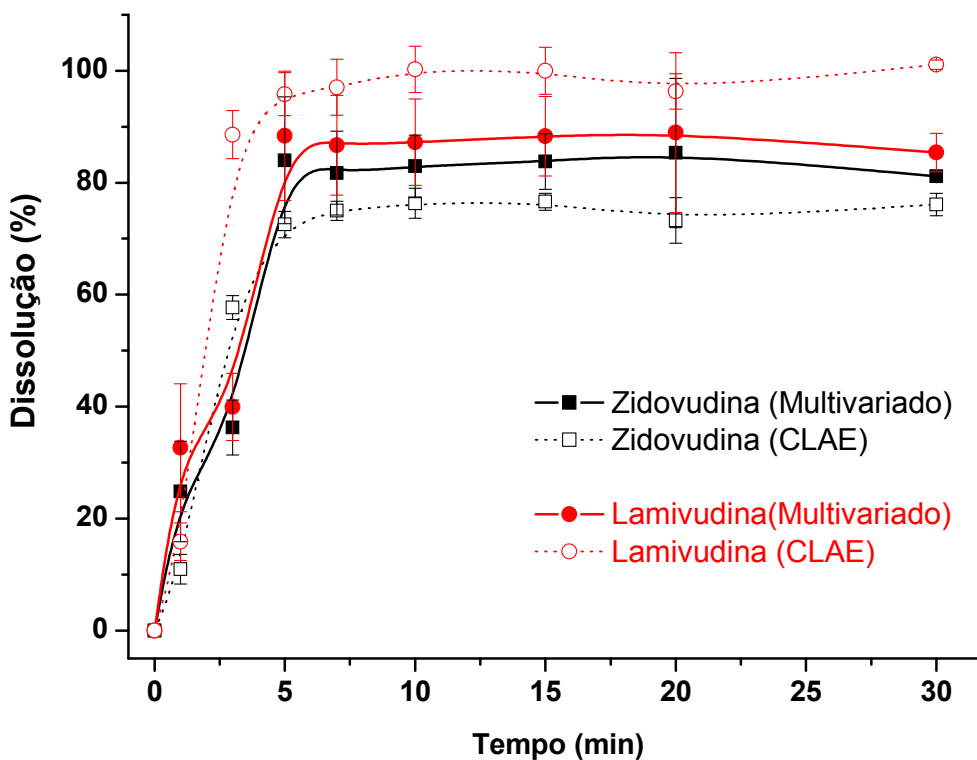


FIGURA 31. PERFIL DE DISSOLUÇÃO DA ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O MEDICAMENTO GENÉRICO.



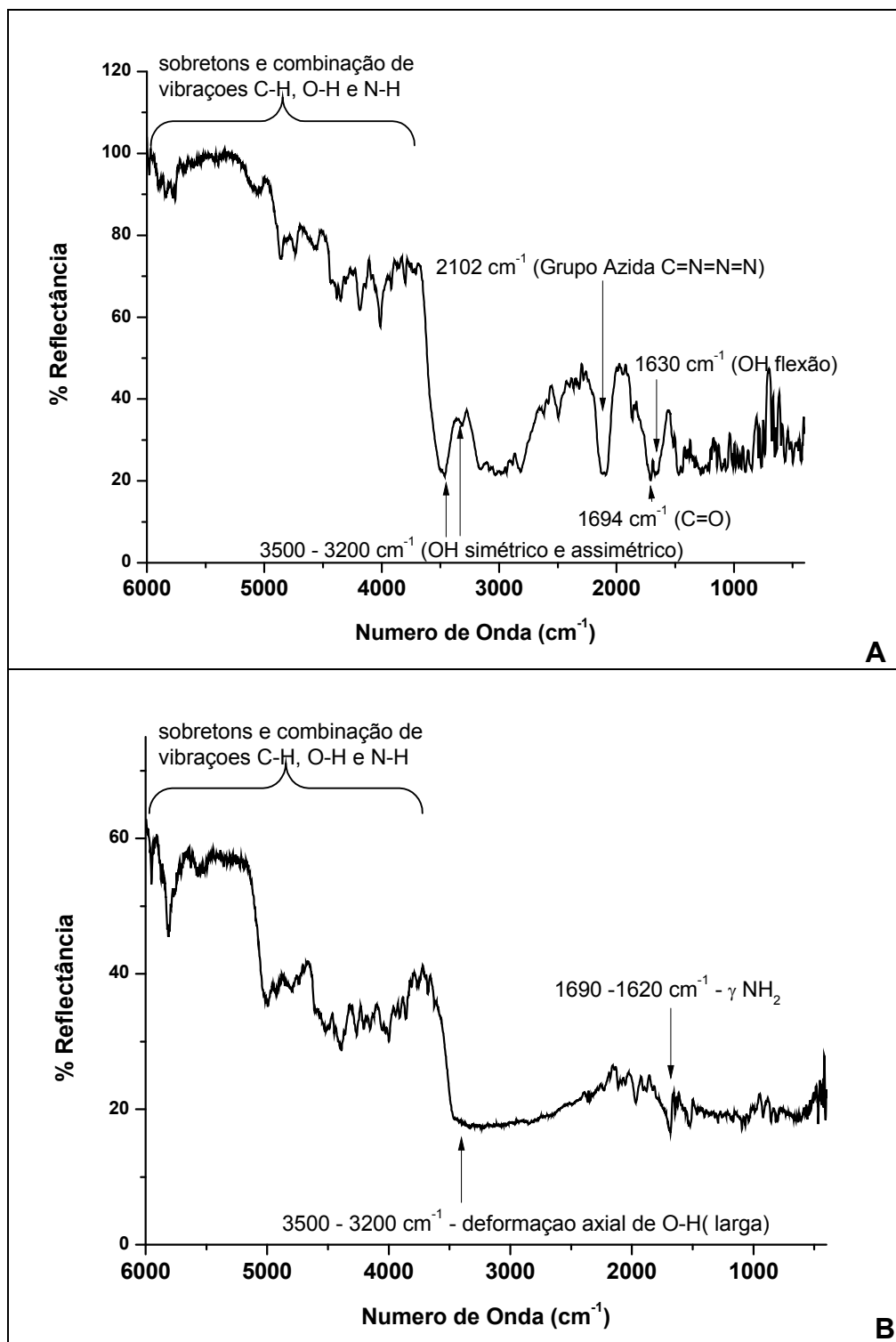
---

**RESULTADOS E DISCUSSÃO****5.1.3. Espectroscopia no Infravermelho com Refletância Difusa – Análise Multivariada**

Os espectros de zidovudina e lamivudina na região do infravermelho são apresentados nas Figuras 32A e 32B, respectivamente. Em função de existirem semelhanças estruturais entre as duas substâncias, existem várias regiões em que as atribuições de bandas são análogas. Na região do infravermelho médio é possível observar bandas características de grupos nitrogenados e hidroxilados, enquanto que na região do infravermelho próximo (NIR) a atribuição de bandas se dá pelos sobretons e combinações das vibrações fundamentais, dentre as que destacam as dos grupos C-H, N-H e O-H.

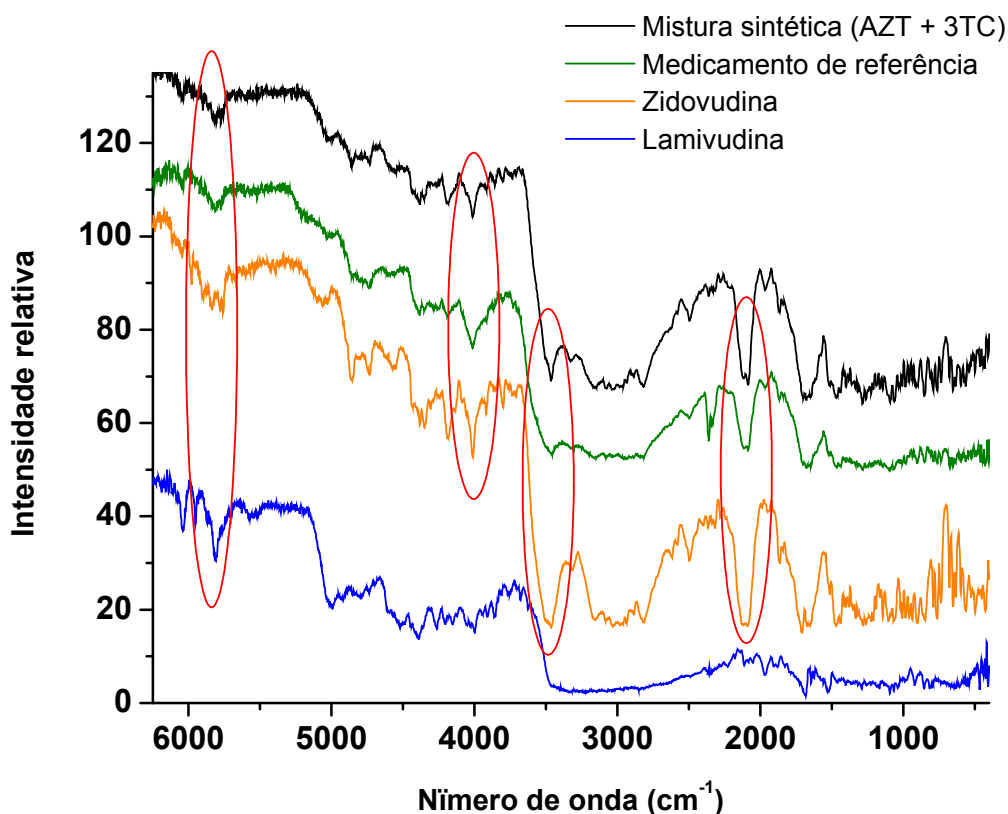
Na Figura 33 são apresentados, para fins comparativos, os espectros na região do infravermelho dos fármacos isolados, da mistura sintética deles e do medicamento de referência (Biovir). Em primeiro lugar, é importante salientar que a complexidade do sinal destes espectros dificulta a visualização de regiões espectrais que possam ser utilizadas na elaboração de modelos univariados de calibração, o que justifica o desenvolvimento de modelos multivariados. Mesmo assim, é possível constatar uma boa semelhança entre os espectros do medicamento e da mistura sintética, o que, pelo menos em princípio, sugere pouca interferência por parte dos excipientes utilizados na elaboração dos comprimidos. Adicionalmente, é possível verificar que sinais que caracterizam cada um dos fármacos em estudo podem ser reconhecidos nos espectros da mistura sintética e do medicamento, o que, também em princípio, garante a existência de sinais passíveis de modelagem.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**FIGURA 32.** ESPECTROS DRIFT DAS ESPÉCIES ZIDOVUDINA (A) E LAMIVUDINA (B), COM ATRIBUIÇÃO DAS BANDAS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO E PRÓXIMO.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

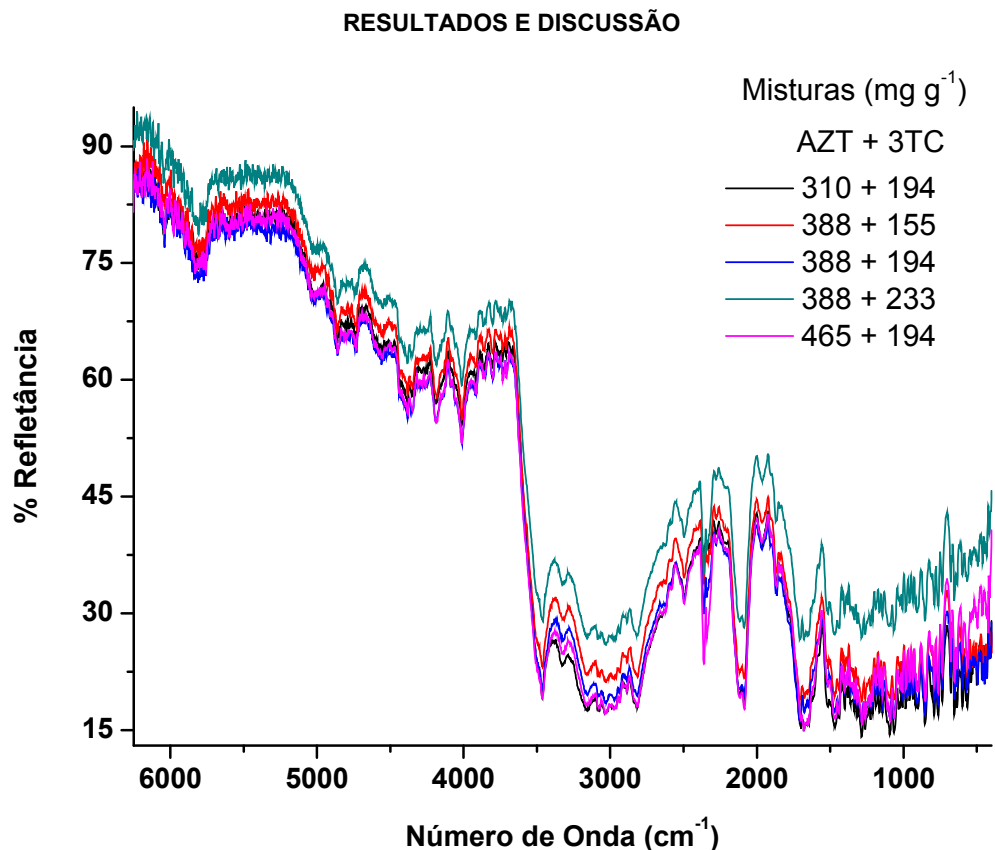


**FIGURA 33.** ESPECTROS DRIFT DOS PADRÕES DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA, DA MISTURA SINTÉTICA E DO MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA.

Nesta etapa, quatro modelos multivariados foram elaborados. Um envolvendo toda a faixa espectral monitorada ( $6251$  a  $399$   $\text{cm}^{-1}$ ), um envolvendo apenas a região do infravermelho médio ( $4000$  a  $399$   $\text{cm}^{-1}$ ), um utilizando somente a região do infravermelho próximo ( $6251$  a  $4000$   $\text{cm}^{-1}$ ) e, por último, um utilizando-se uma região espectral escolhida por aplicação de um processo de seleção de variáveis, o qual leva em consideração as regiões com a melhor correlação entre os sinais espectrais e a concentração do analito.

A primeira série de modelos foi desenvolvida com 21 espectros contendo toda a região espectral monitorada ( $6251$  a  $399$   $\text{cm}^{-1}$ ). Na Figura 34 são apresentados alguns espectros das misturas de calibração, particularmente aquelas que apresentam concentrações extremas de AZT e 3TC.

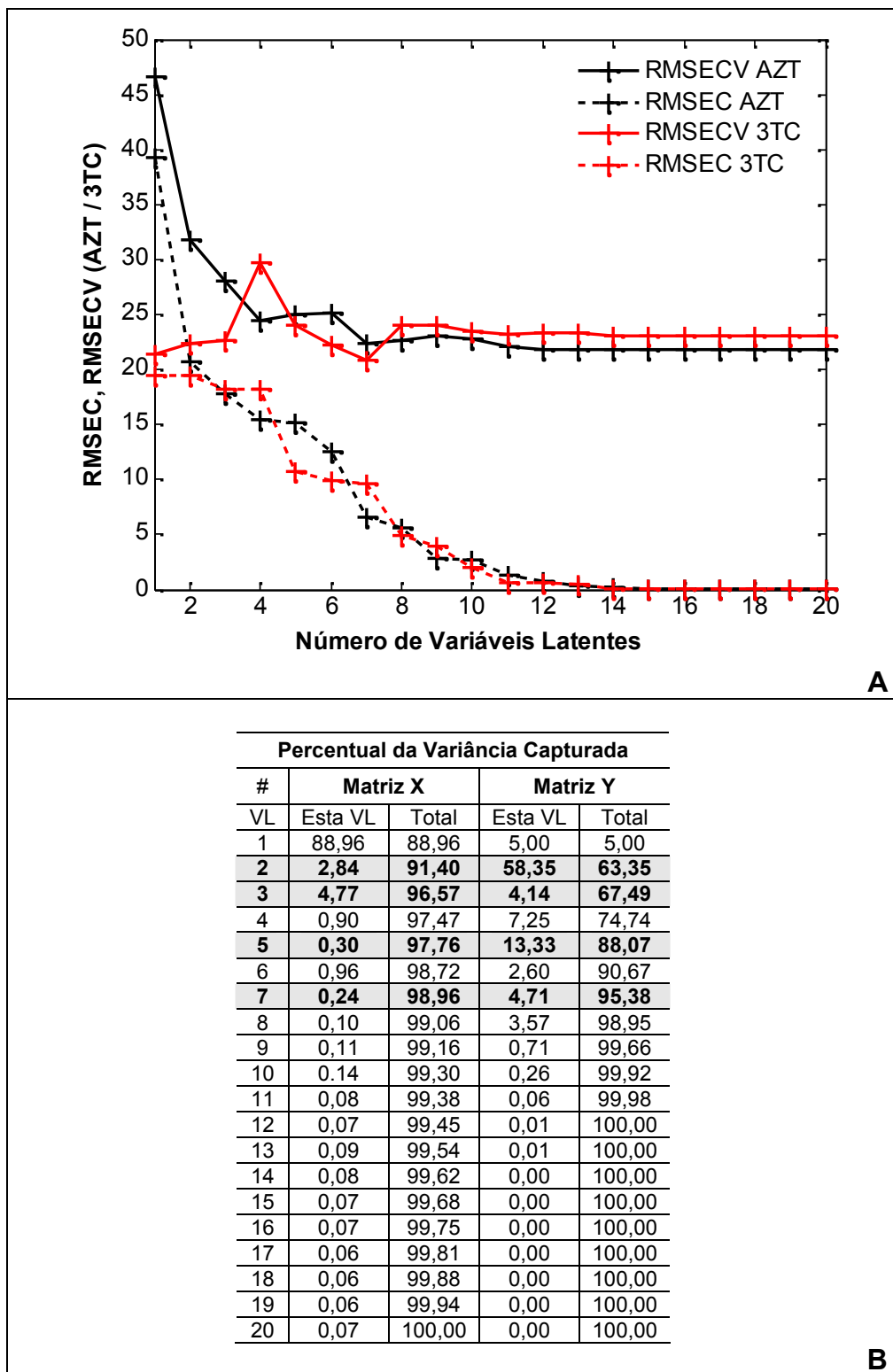
Os modelos foram desenvolvidos utilizando-se diferentes tipos de pré-processamento de sinais e diferentes números de variáveis latentes.



**FIGURA 34.** ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHOS (DRIFT, 6251 a  $399 \text{ cm}^{-1}$ ) DE MISTURAS DE AZT E 3TC UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DO MODELO MULTIVARIADO.

A primeira avaliação envolveu o uso de espectros centrados na média, que corresponde praticamente ao procedimento padrão adotado em estudos que envolvem o processamento de sinais espectrais. A seleção do número de variáveis latentes (VL) foi fundamentada na avaliação do RMSEC e RMSECV, cuja evolução, em função do número de variáveis latentes, é apresentada na Figura 35A. Os valores de RMSEC diminuem sistematicamente conforme se aumenta o número de VL, alcançando valores mínimos a partir da décima segunda VL. O comportamento do RMSECV se mostra diferente, indicando erros de previsão que são minimizados a partir da introdução da quarta (para zidovudina) e da sétima variável latente (para lamivudina). Adicionalmente, observa-se que 7 variáveis latentes permitem representar uma grande parcela da variância (95,38%) dos dados de concentração (matriz Y, Figura 35B), utilizando praticamente 99% da variância apresentada pelos dados espectrais (matriz X, Figura 35B). Para se evitar a criação de modelos super-ajustados, fundamentados em detalhes instrumentais sujeitos ao efeito do ruído instrumental, 7 VL foram selecionadas como limite para modelagem. Assim, modelos foram desenvolvidos com 2, 3, 5 e 7 VL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO



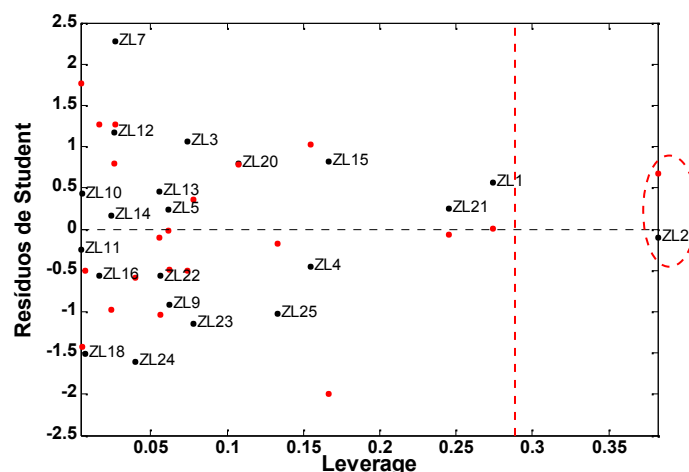
**FIGURA 35.** GRÁFICO DE RMSEC E RMSECV (A) E VARIÂNCIA CAPTURADA PELAS VARIÁVEIS LATENTES (B) NO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO COM ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA E NA REGIÃO DE 6251 A 399  $\text{cm}^{-1}$ .

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Avaliando-se a capacidade de previsão dos modelos desenvolvidos, em relação às 13 misturas sintéticas reservadas para validação (4 misturas em triplicata mais uma duplicata do ponto central), foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 12. Em primeiro lugar, constata-se que os erros médios de previsão são bastante similares, não importando o número de variáveis latentes utilizado na elaboração do modelo. Para se evitar o superajuste do modelo e a sua conseqüente falta de robustez, duas variáveis latentes foram selecionadas para o desenvolvimento dos modelos. Nestas condições, erros médios de previsão de 5 e 7% são observados para zidovudina e lamivudina, respectivamente.

É interessante salientar que cada amostra do conjunto de calibração é representada por aproximadamente 3000 valores de refletância, registrados em igual número de números de onda. A primeira etapa do procedimento multivariado demonstra que grande parte da variância dos dados pode ser representada por um pequeno número de novas variáveis (VL), as quais surgem da combinação linear das variáveis originais. Se um pequeno número de VL é utilizado para representar a variância registrada nos espectros, o desenvolvimento de um modelo de calibração fica extremamente facilitado.

Na Figura 36, apresentam-se os dois critérios de maior importância para a verificação de anomalias ou disparidades no conjunto de amostras utilizado na fase de calibração, os resíduos de *Student* e o *leverage*. Por definição, os valores máximos permitidos para estes parâmetros são 2,5 e 0,29 (3 VL/N), respectivamente (FERREIRA *et. al.*, 1999). Utilizando-se estes argumentos, observa-se que a mistura ZL02 apresenta uma anomalia associada a um elevado valor de leverage. Normalmente, anomalias deste tipo sugerem diferenças no comportamento espectral, usualmente associado a problemas instrumentais. Uma vez que esta anomalia somente se apresenta em relação ao modelo desenvolvido com duas VL, a mistura foi mantida no conjunto de calibração.



**FIGURA 36.** GRÁFICO DE RESÍDUOS DE “STUDENT” *VERSUS LEVERAGE* PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 2 VARIÁVEIS LATENTES.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**TABELA 12.** RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM  $\text{mg g}^{-1}$  E ERRO RELATIVO EM %), UTILIZANDO-SE MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRIFT NA REGIÃO DE 6251 A 399  $\text{cm}^{-1}$  E DADOS CENTRADOS NA MÉDIA.

CONCENTRAÇÃO REAL		CONCENTRAÇÃO PREVISTA															
		7VL			5 VL				3 VL			2 VL					
AZT	3TC	AZT	3TC	ERRO	AZT	3TC	ERRO	AZT	3TC	ERRO	AZT	3TC	ERRO				
350	213	356,9	188,7	2,0	-11,4	367,1	185,2	4,9	-13,0	344,1	195,7	-1,7	-8,1	345,3	193,5	-1,3	-9,1
350	213	366,3	199,7	4,6	-6,3	368,0	200,7	5,1	-5,8	354,8	196,0	1,4	-8,0	356,5	193,0	1,8	-9,4
350	213	407,1	198,9	16,3	-6,6	414,4	197,2	18,4	-7,4	378,4	195,2	8,1	-8,4	379,6	193,0	8,5	-9,4
369	185	385,8	187,8	4,5	1,5	386,0	189,8	4,6	2,6	374,8	198,3	1,6	7,2	377,5	193,3	2,3	4,5
369	185	404,5	186,4	9,6	0,7	397,7	192,0	7,8	3,8	404,8	199,5	9,7	7,8	409,0	191,7	10,8	3,6
369	185	438,0	206,6	18,7	11,7	448,5	207,0	21,5	11,9	432,0	199,9	17,1	8,1	437,0	190,9	18,4	3,2
388	194	407,4	186,0	5,0	-4,1	413,3	182,5	6,5	-5,9	383,7	187,8	-1,1	-3,2	380,8	193,1	-1,9	-0,5
407	185	436,5	182,0	7,2	-1,6	441,6	180,8	8,5	-2,2	422,0	192,3	3,7	3,9	422,7	191,0	3,9	3,2
407	185	416,6	196,3	2,4	6,1	414,3	199,6	1,8	7,9	414,7	206,2	1,9	11,5	423,2	190,6	4,0	3,0
407	185	399,8	183,0	-1,8	-1,1	384,0	186,9	-5,7	1,0	388,1	198,2	-4,7	7,1	390,8	193,1	-4,0	4,4
407	224	442,0	216,8	8,6	-3,2	455,9	209,9	12,0	-6,3	414,4	188,0	1,8	-16,1	412,2	192,1	1,3	-14,3
407	224	383,6	203,2	-5,7	-9,3	394,7	198,1	-3,0	-11,6	394,5	186,5	-3,1	-16,7	391,2	192,5	-3,9	-14,1
407	224	434,7	212,6	6,8	-5,1	446,3	206,1	9,7	-8,0	421,5	185,4	3,6	-17,2	417,5	192,7	2,6	-14,0
<b>Erro Médio (%)</b>				<b>7,2</b>	<b>5,3</b>			<b>8,4</b>	<b>6,7</b>			<b>4,6</b>	<b>9,5</b>			<b>5,0</b>	<b>7,1</b>

---

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Estudos similares ao anteriormente descrito foram realizados com 5 pré-processamentos diferentes:

Pré-processamento 1: dados espectrais centrados na média (CM)

Pré-processamento 2: dados autoescalados (AU)

Pré-processamento 3: dados em primeira derivada (1ªDER)

Pré-processamento 4: dados em primeira derivada com alisamento (1ªDERALIS)

Pré-processamento 5: dados submetidos a correção multiplicativa do sinal (MSC).

Os resultados são resumidamente apresentados na Figura 37, na forma de uma superfície de resposta que correlaciona o erro médio da fase de validação externa com o número de VL e o tipo de pré-processamento.

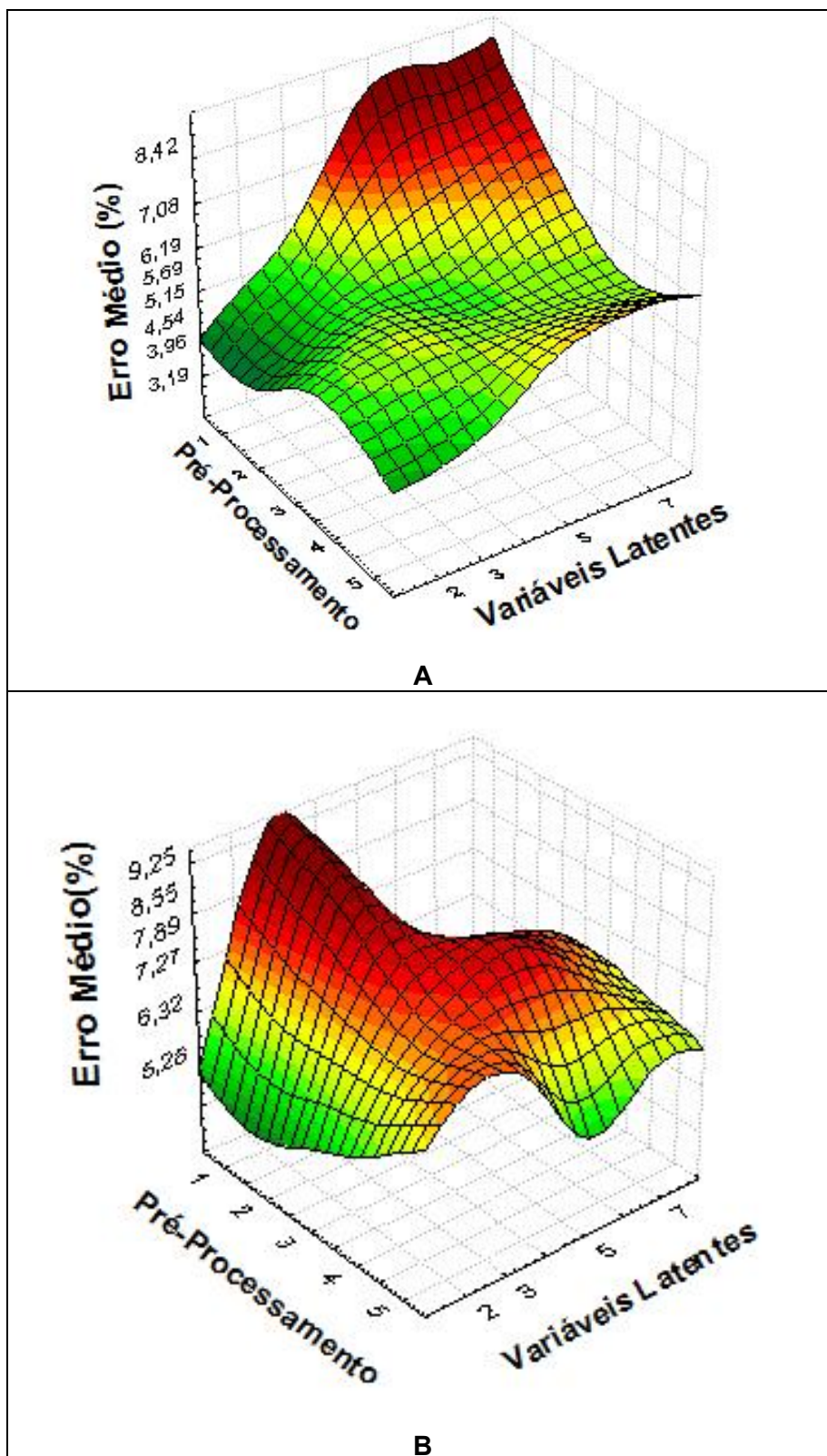
Em primeiro lugar, é interessante salientar que todos os modelos desenvolvidos com 2 ou 3 VL proporcionaram erros médios de previsão inferiores a 5%, o que, pelo menos em primeira análise, pode ser considerado satisfatório.

Para a análise simultânea de zidovudina e lamivudina, o modelo de melhor desempenho foi elaborado com dados espectrais autoescalados (pré-processamento 2), utilizando-se 2 variáveis latentes. Nestas condições, erros médios da ordem de 4% foram observados, para ambos os fármacos na previsão das misturas sintéticas. É importante se salientar que a legislação brasileira é praticamente omissa em relação a limites permitidos em estudos de recuperação ou exatidão. Entretanto, algumas orientações internacionais costumam ser aceitas (ex. Labcompliance, 2001), as quais sugerem limites máximos entre 98 e 102% de recuperação. Seguindo estes argumentos, observa-se que o modelo multivariado desenvolvido proporciona resultados levemente discrepantes, provavelmente em função de modificações espectrais provocadas, por exemplo, por deficiente homogeneização das misturas de calibração e validação.

Utilizando-se esse modelo na análise de amostras de medicamento (Med1 e Med2), obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 13. Tomando-se como referência o valor indicado na bula do medicamento, erros inferiores a 10% foram observados na determinação de zidovudina e da ordem de 2% na determinação de lamivudina. Infelizmente, a análise cromatográfica destes medicamentos não foi possível, o que impede uma análise mais aprofundada do desempenho da metodologia proposta.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**FIGURA 37.** ERRO MÉDIO NA FASE DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA ZIDOVUDINA (A) E LAMIVUDINA (B), EM FUNÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO ESPECTRAL DE 6251 A 399  $\text{cm}^{-1}$ ).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO****TABELA 13.** RESULTADOS DA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE MEDICAMENTO, UTILIZANDO-SE MODELO COM ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (6231 A 399  $\text{cm}^{-1}$ ) COM DADOS AUTOESCALADOS E DUAS VARIÁVEIS LATENTES.

Amostras	Concentração Nominal* ( $\text{mg g}^{-1}$ )		Concentração Prevista ( $\text{mg g}^{-1}$ )		Erro (%)	
	AZT	3TC	AZT	3TC	AZT	3TC
Med1	388,0	195,7	424,85	189,75	9,50	-2,19
Med2			425,58	190,18	9,69	-1,97
<b>ERRO MÉDIO (%)</b>					<b>9,59</b>	<b>2,08</b>

\* Concentração Nominal = Concentração declarada na bula do medicamento.

Seguidamente, modelos multivariados foram desenvolvidos utilizando-se a região do infravermelho médio, seguindo-se uma sequência análoga à descrita no caso anterior.

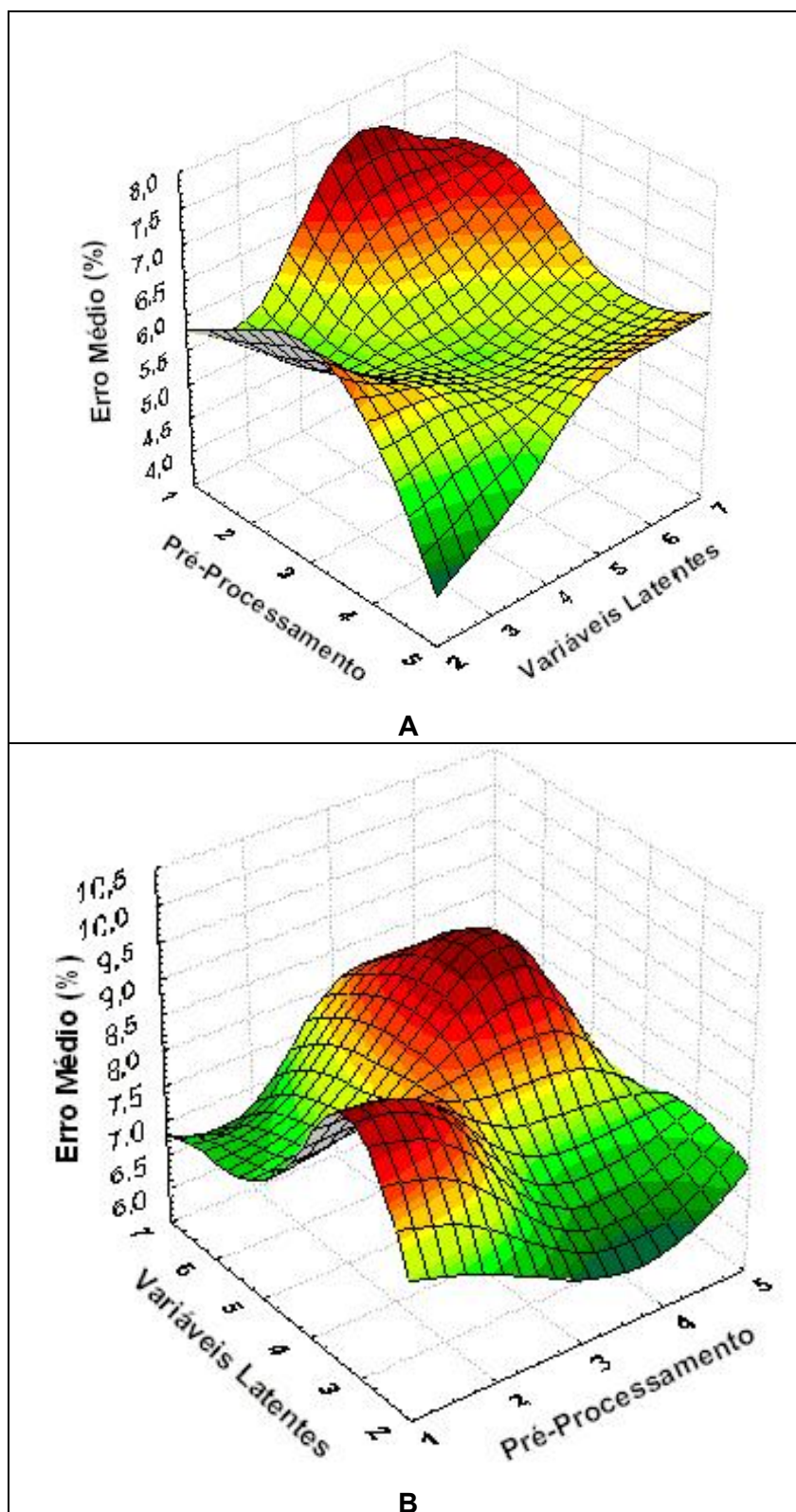
Os resultados são resumidamente apresentados na Figuras 38, que mostra superfícies de resposta que relacionam o erro médio de previsão da fase de validação externa com o número de variáveis latentes e o tipo de pré-processamento.

Na região do infravermelho médio, os modelos de melhor desempenho foram elaborados com sinais pré-processados por MSC (pré-processamento 5) e derivação e alisamento (pré-processamento 4), utilizando-se 2 variáveis latentes. Nestas condições, erros médios entre 4 e 5% foram observados, para ambos os fármacos em estudo.

Para estudos subsequentes foi selecionado o modelo elaborado com duas variáveis latentes e dados espectrais processados por MSC, que permitiu a obtenção dos resultados apresentados na Tabela 14.

Os resultados obtidos para a região do infravermelho médio sugerem uma melhora na previsão do modelo multivariado, quando comparado com os resultados obtidos pelo modelo que utilizou a região espectral completa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**FIGURA 38.** ERRO MÉDIO NA FASE DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA ZIDOVUDINA (A) E LAMIVUDINA (B), EM FUNÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (INFRAVERMELHO MÉDIO).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO****TABELA 14.** RESULTADOS DA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE MEDICAMENTO, UTILIZANDO-SE MODELO COM DADOS PRÉ-PROCESSADOS POR MSC E DUAS VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO ESPECTRAL DE 4000 – 399  $\text{cm}^{-1}$ ).

Amostras	Concentração Nominal* ( $\text{mg g}^{-1}$ )		Concentração Prevista ( $\text{mg g}^{-1}$ )		Erro (%)	
	AZT	3TC	AZT	3TC	AZT	3TC
Med1	388,0	194,0	422,49	190,24	8,89	-1,94
Med2			362,21	194,86	-6,65	0,45
<b>ERRO MÉDIO (%)</b>					<b>7,77</b>	<b>1,19</b>

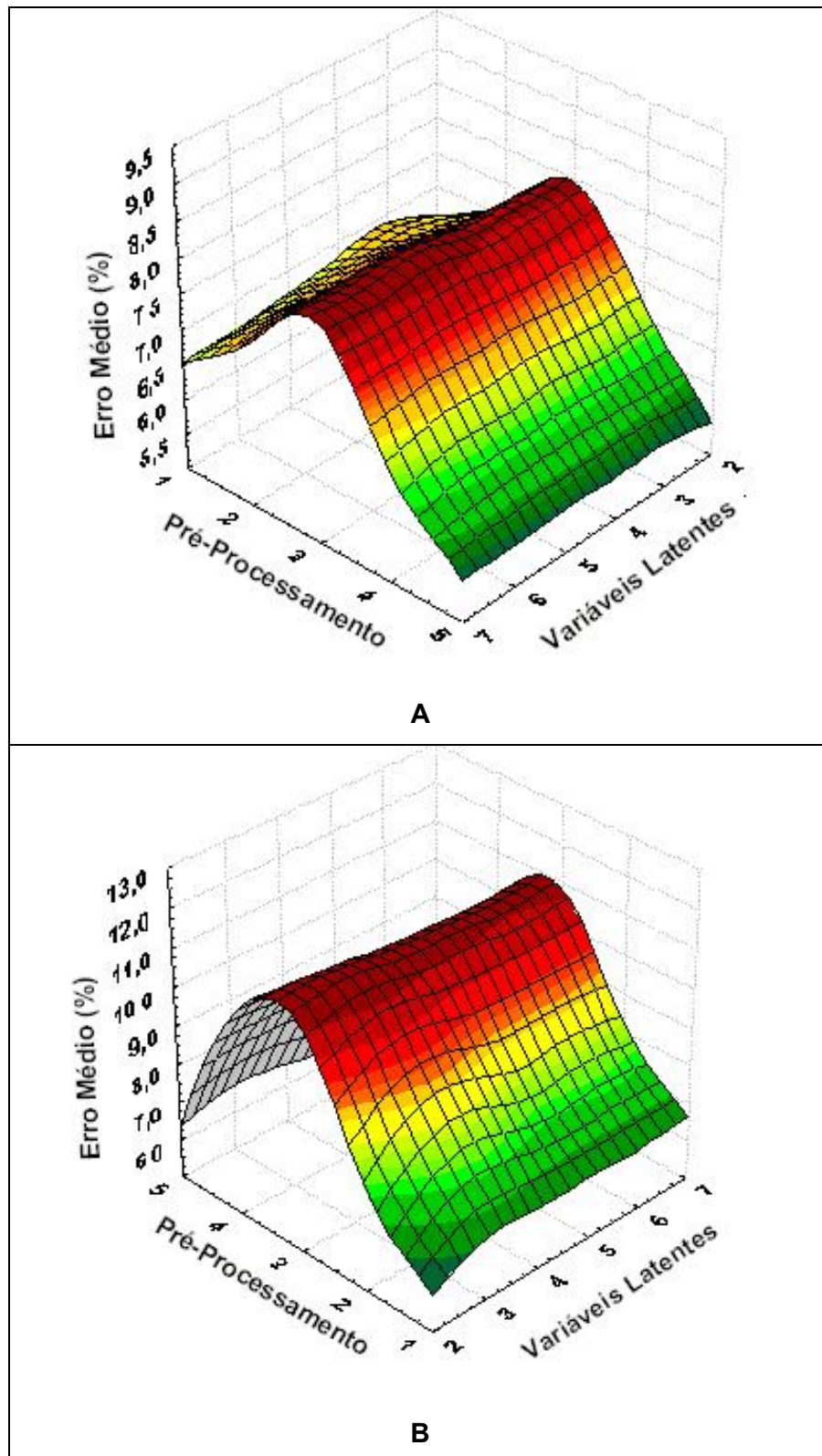
\* Concentração Nominal = Concentração declarada na bula do medicamento.

Modelos similares aos anteriores foram desenvolvidos utilizando-se a região espectral do infravermelho próximo (6251 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ), obtendo-se os resultados resumidamente apresentados na Figura 39. Levando em consideração o erro médio de previsão das amostras de validação externa, é possível observar que os modelos de melhor desempenho foram elaborados com sinais pré-processados por MSC (zidovudina) e dados centrados na média (lamivudina), em ambos os casos recorrendo-se ao uso de duas variáveis latentes. Nestas condições, erros médios da ordem de 6% foram observados, para ambos os fármacos em estudo.

Para análise de medicamentos foi selecionado o modelo elaborado com 2 variáveis latentes e dados espectrais processados por MSC, em função do melhor resultado proporcionado na previsão de ambas as espécies em estudo.

Os resultados (Tabela 15) sugerem uma melhor capacidade de previsão em relação ao modelo com região espectral completa, com erros médios da ordem de 7% na determinação de zidovudina e inferiores a 4% na determinação de lamivudina. Os resultados apresentam-se coerentes e dentro do limite estabelecido pela legislação vigente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**FIGURA 39.** ERRO MÉDIO DE PREVISÃO NA FASE DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA ZIDOVUDINA (A) E LAMIVUDINA (B), EM FUNÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO DE 6251 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ ).

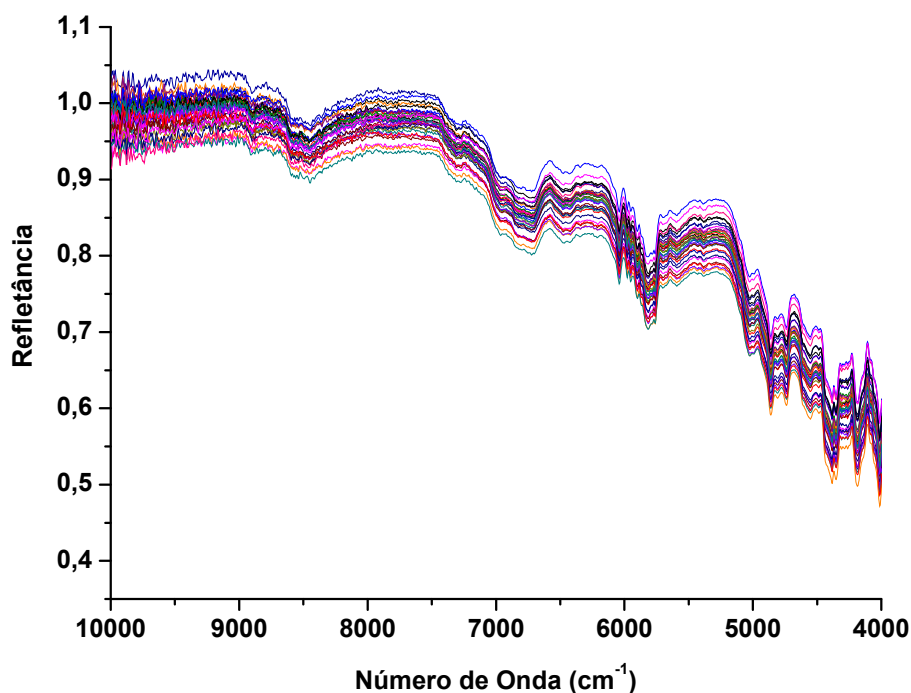
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**TABELA 15.** RESULTADOS DA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE MEDICAMENTO, UTILIZANDO-SE MODELO COM DADOS PRÉ-PROCESSADOS COM MSC E DUAS VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO ESPECTRAL NIR).

Amostras	Concentração Nominal* (mg g <sup>-1</sup> )		Concentração Prevista (mg g <sup>-1</sup> )		Erro (%)	
	AZT	3TC	AZT	3TC	AZT	3TC
Med1	388,0	194,0	408,44	188,46	5,27	-2,86
Med2			422,78	185,25	8,96	-4,51
<b>ERRO MÉDIO (%)</b>					<b>7,12</b>	<b>3,68</b>

\* Concentração Nominal = Concentração declarada na bula do medicamento.

Em virtude da chegada de um novo equipamento para análise de infravermelho (Bruker, VERTEX70), novos modelos multivariados foram desenvolvidos processando-se a região do infravermelho próximo, desta vez ampliando a faixa monitorada e contemplando-se a região de 10000 a 4000 cm<sup>-1</sup>. Os espectros são muitos similares aos anteriormente apresentados, porém nota-se que há menos ruído instrumental, como pode ser observado na Figura 40, em relação a Figura 34.



**FIGURA 40.** ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (DRIFT) DAS MISTURAS DE ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO MULTIVARIADO DA REGIÃO DE 10000 A 4000 cm<sup>-1</sup>.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

De maneira análoga aos estudos anteriores, foram desenvolvidos diversos modelos multivariados, com diferentes tipos de pré-processamentos e diferentes números de variáveis latentes. Os resultados de previsão para o conjunto de validação externa (Tabela 16) indicam um melhor desempenho dos modelos desenvolvidos com pré-processamento por MSC e utilizando-se 2 a 7 variáveis latentes.

**TABELA 16.** ERRO MÉDIO DE PREVISÃO DO CONJUNTO DAS AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO PARA MODELOS DESENVOLVIDOS COM DIFERENTES TIPOS DE PRÉ-PROCESSAMENTOS E DIFERENTES NÚMEROS DE VARIÁVEIS LATENTES PARA REGIÃO ESPECTRAL DE 10000 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

VL	CENTRADO NA MÉDIA		AUTOESCALADO		ALISADO COM 1ª DERIVADA		1ª DERIVADA		MSC	
	AZT	3TC	AZT	3TC	AZT	3TC	AZT	3TC	AZT	3TC
<b>2</b>	5,83	7,72	5,69	7,66	7,48	7,51	7,00	10,11	<b>6,50</b>	<b>6,79</b>
<b>3</b>	4,94	7,15	4,71	6,63	7,92	8,96	7,31	10,03	<b>4,61</b>	<b>5,14</b>
<b>5</b>	5,38	6,46	5,51	6,30	7,65	7,14	7,57	10,06	<b>5,35</b>	<b>4,91</b>
<b>7</b>	5,53	5,38	5,42	5,03	7,59	7,22	7,62	9,79	<b>5,66</b>	<b>4,95</b>

Para análise de medicamentos foi selecionado o modelo que envolveu o uso de 2 variáveis latentes e sinais espectrais processados por MSC, modelo este que permitiu a obtenção de erros médios de previsão da ordem de 10% para zidovudina e de 4% para lamivudina (Tabela 17).

Avaliando-se individualmente os resultados obtidos para as duas classes de medicamentos estudadas, é possível observar uma notória discrepância no teor de zidovudina para o medicamento genérico, provavelmente em função da presença de algum excipiente que, apresentado sinal na região espectral monitorada, influencia negativamente a capacidade de previsão do modelo multivariado.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO****TABELA 17.** ERRO MÉDIO DE PREVISÃO DAS AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS PARA O MODELO DESENVOLVIDO COM MSC E DUAS VARIÁVEIS LATENTES PARA REGIÃO ESPECTRAL DE 10000 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

Amostras	Concentração Real ( $\text{mg g}^{-1}$ )		Concentração Prevista ( $\text{mg g}^{-1}$ )		Erro (%)	
	AZT	3TC	AZT	3TC	AZT	3TC
Ref.1	338,49	195,71	368,56	199,99	8,88	2,19
Ref.2			342,19	209,25	1,09	6,92
Ref.3			349,95	206,53	3,39	5,53
<b>ERRO MÉDIO (%)</b>					<b>4,45</b>	<b>4,85</b>
Gen.1	414,90	210,19	361,6	202,44	-12,85	-3,69
Gen.2			353,71	205,21	-14,75	-2,37
Gen.3			341,42	209,52	-17,71	-0,32
<b>ERRO MÉDIO (%)</b>					<b>15,10</b>	<b>2,12</b>

Ref. = Medicamento de Referência / Gen.=Medicamento Genérico

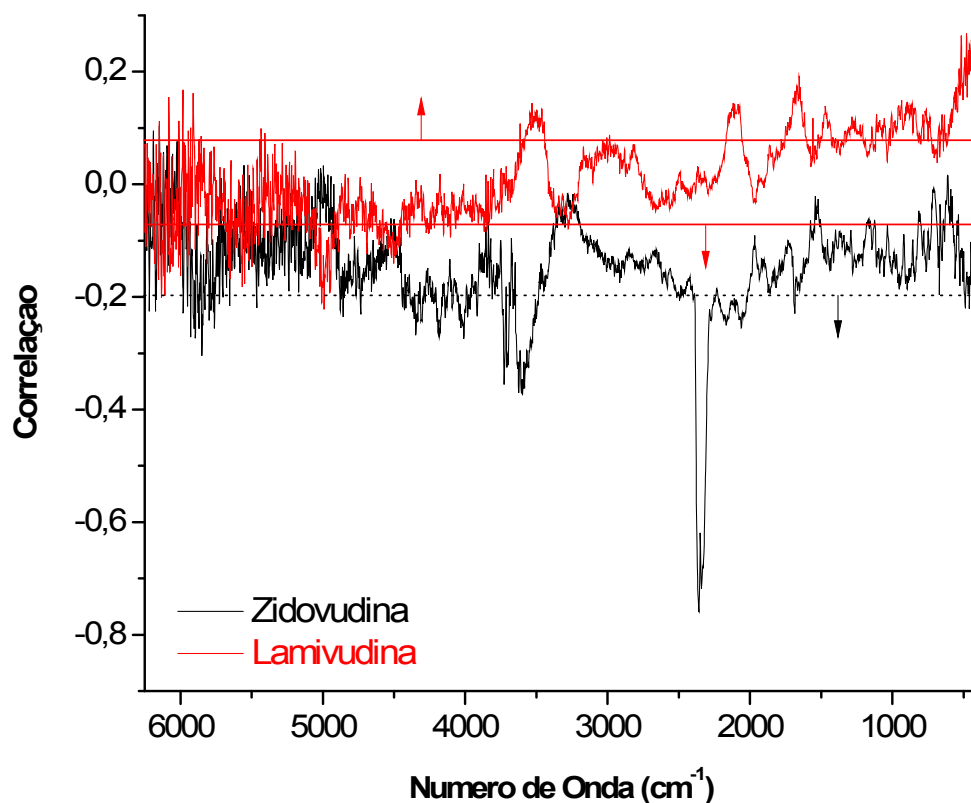
Finalmente, e objetivando-se melhorar a capacidade de previsão dos modelos multivariados, foram desenvolvidos modelos utilizando-se regiões espectrais escolhidas por meio de um processo de seleção de variáveis, o qual permite identificar as regiões de melhor correlação com a concentração das espécies em estudo (Figura 41).

Para zidovudina, observam-se coeficientes de regressão negativos de elevado valor. Assim, a região selecionada correspondeu àquela que apresentou coeficientes de correlação inferiores a -0,2. Para lamivudina, os coeficientes de regressão apresentam valores significativamente menores, tanto positivos quanto negativos. Neste caso, a região espectral foi selecionada contemplando coeficientes de regressão maiores que 0,08 ou inferiores a -0,08, conforme representado na Figura 41.

Utilizando-se estes limites, os sinais ficam reduzidos à informação espectral de relevância para ambas as espécies. Posteriormente, modelos foram desenvolvidos da maneira usual, utilizando-se as diversas alternativas de pré-processamento e diferentes números de variáveis latentes.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

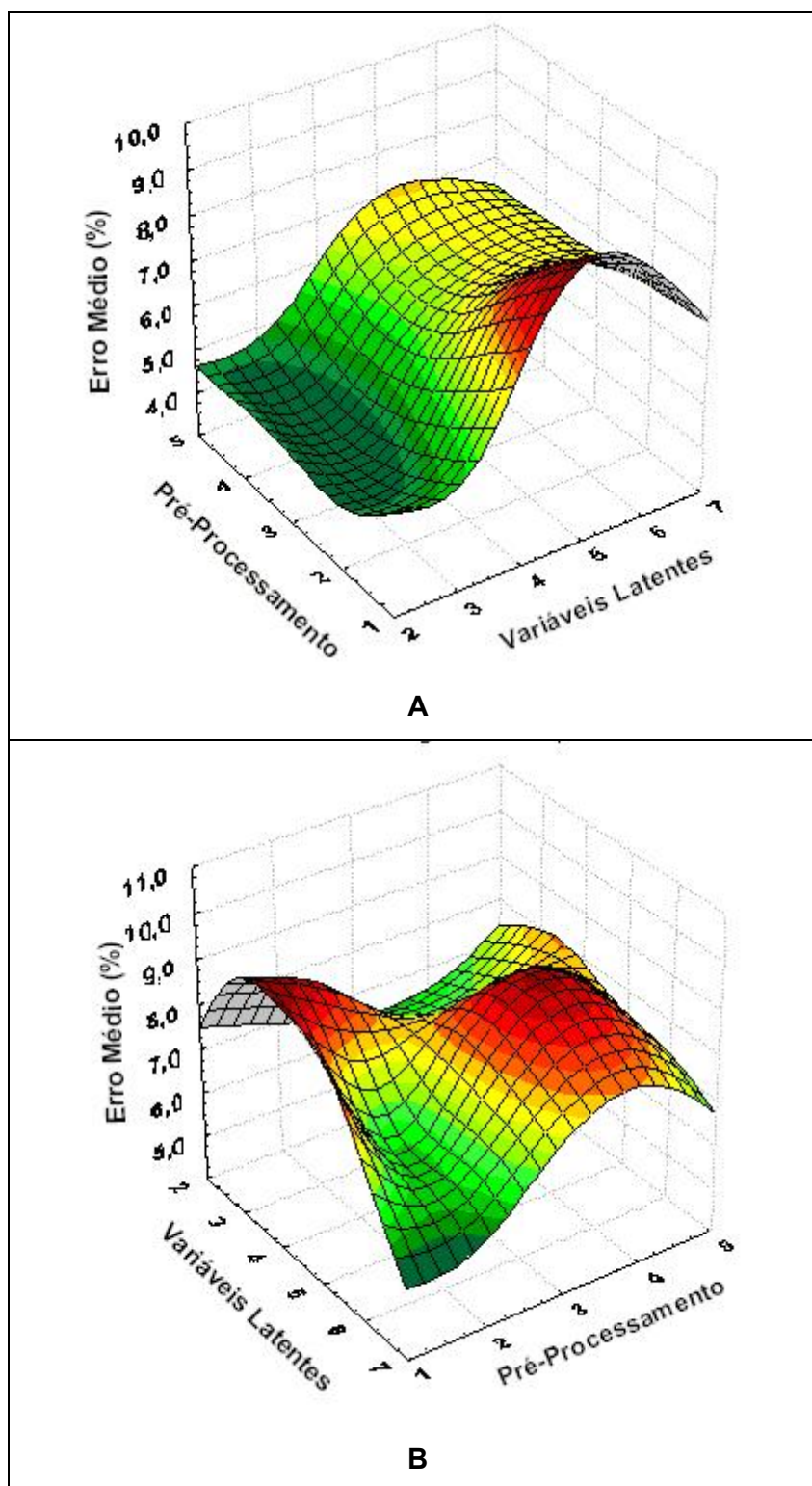


**FIGURA 41.** GRÁFICO DA CORRELAÇÃO DO SINAL ESPECTRAL COM A CONCENTRAÇÃO DAS ESPÉCIES, EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE ONDA DOS ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO ENTRE 6251 – 399 cm<sup>-1</sup>.

Com base nos resultados de previsão das amostras de validação externa, os quais são resumidamente apresentados na Figura 42, é possível observar que modelos diferentes permitem a melhor previsão das espécies em estudo. Para zidovudina, qualquer pré-processamento leva à obtenção de erros de previsão da ordem de 5%, quando duas variáveis latentes são utilizadas na elaboração do modelo. Para lamivudina, os melhores pré-processamentos correspondem a dados centrados na média (pré-processamento 1) e autoescalados (pré-processamento 2), com erros da ordem de 5%.

Para análise de medicamentos foi selecionado o modelo com dados centrados na média (pré-processamento 1), utilizando-se duas variáveis latentes. Os resultados (Tabelas 18) indicam uma melhora na capacidade de previsão de lamivudina (erro médio inferior a 2%), assim como uma piora considerável na determinação de zidovudina (erro médio da ordem de 25%).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**FIGURA 42.** ERRO MÉDIO DE PREVISÃO NA FASE DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA ZIDOVUDINA (A) E LAMIVUDINA (B), EM FUNÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO ESPECTRAL SELECIONADA PELO MÉTODO DE SELEÇÃO DE VARIÁVEIS).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO****TABELA 18.** RESULTADOS DA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE MEDICAMENTO, UTILIZANDO-SE MODELO COM DADOS AUTOESCALADOS E DUAS VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO ESPECTRAL SELECIONADA).

Amostras	Concentração Nominal* (mg g <sup>-1</sup> )		Concentração Prevista (mg g <sup>-1</sup> )		Erro (%)	
	AZT	3TC	AZT	3TC	AZT	3TC
Med1	388,0	194,0	489,09	190,73	26,05	-1,69
Med2			478,5	189,53	23,32	-2,30
<b>ERRO MÉDIO (%)</b>					<b>24,69</b>	<b>1,99</b>

\* Concentração Nominal = Concentração declarada na bula do medicamento.

## 5.2. CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA

### 5.2.1. Espectroscopia eletrônica em solução

O trabalho envolvendo a associação Captopril/Hidroclorotiazida foi desenvolvido em conjunto com a Mestranda Juliana do Santos (Programa de Pós-Graduação em Química), que defendeu sua dissertação de Mestrado em agosto de 2009.

Praticamente todos os resultados relacionados com espectroscopia eletrônica em solução foram relatados e discutidos na sua dissertação de mestrado, motivo pelo qual serão brevemente relatados aqui, apenas para servir de preâmbulo à segunda parte do trabalho, que trata sobre o desenvolvimento de modelos multivariados por espectroscopia na região do infravermelho.

Como de costume, inúmeros modelos multivariados foram desenvolvidos com diversos tipos de pré-processamento de sinais e diferentes números de VL. Em geral, todos os modelos desenvolvidos apresentaram capacidade de previsão comparável, fornecendo erros médios inferiores a 2% na fase de validação externa.

Para aplicação na análise de medicamentos foi selecionado o modelo elaborado com espectros centrados na média e duas variáveis latentes, o qual foi preliminarmente validado de acordo com os critérios estabelecidos pela ANVISA. Nesta etapa, a precisão, exatidão e robustez foram avaliadas, com resultados compatíveis com as exigências legais.

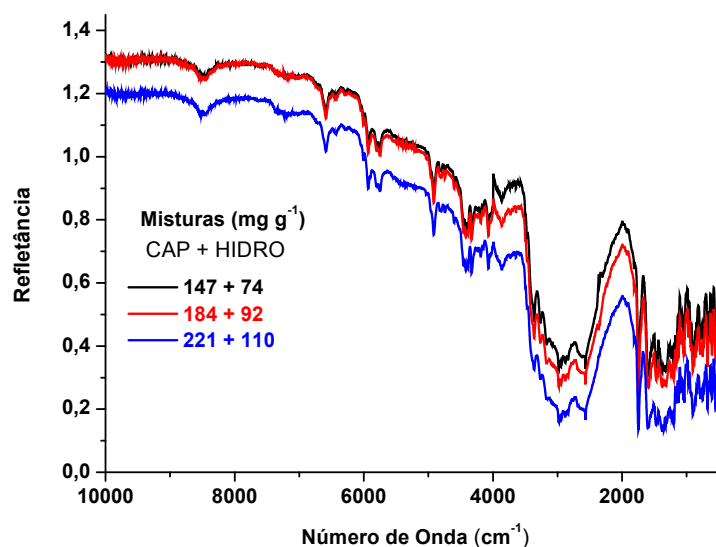
Na análise de medicamentos e nos ensaios de dissolução, o modelo multivariado permitiu a obtenção de resultados coerentes em relação aos proporcionados pela técnica cromatográfica padrão. Neste último caso, pequenas discrepâncias foram observadas nos primeiros tempos monitorados, em função da rápida dissolução dos medicamentos.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO****5.2.2. Espectroscopia no Infravermelho com Refletância Difusa – Análise Multivariada**

Nas últimas décadas, vários trabalhos científicos vêm sendo desenvolvidos visando aplicações da espectrometria NIR (DOU *et.al.*, 2007; REICH, 2005). Atualmente, por exemplo, esta técnica tem ganhado aceitação pela indústria farmacêutica, como meio de identificação (SCAFI e PASQUINI, 2001), quantificação (LOPES *et.al.*, 2009; SARRAGUÇA E LOPES, 2009) e controle de parâmetros físicos e químicos (OTSUKA, 2006), seja da matéria-prima ou do produto final (SILVA *et. al.*, 2009). Muitas agências reguladoras, como a Agência Européia para Avaliação de Produtos Médicos (EMA/CVMP/961/01), e farmacopéias, como a Farmacopéia Européia (EP) e a dos Estados Unidos (USP), vêm recomendando as metodologias baseadas na espectroscopia NIR como uma boa alternativa analítica para controle de qualidade dos produtos farmacêuticos, devido as suas características vantajosas em relação aos métodos tradicionais. De acordo com SIMOES (2008), a aceitação e implementação na indústria farmacêutica, assim como em outros setores industriais, tem algumas restrições, principalmente em função das exigências para a validação do método multivariado.

Nesta etapa, foram desenvolvidos modelos multivariados utilizando-se três regiões espectrais. Uma envolvendo toda a faixa espectral monitorada (10000 a 399  $\text{cm}^{-1}$ ), outra envolvendo apenas a região do infravermelho médio (4000 a 399  $\text{cm}^{-1}$ ) e uma terceira utilizando somente a região do infravermelho próximo (10000 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ).

A primeira série de modelos foi desenvolvida a partir de espectros de 21 misturas sintéticas, contendo toda a região espectral monitorada (10000 a 399  $\text{cm}^{-1}$ ). Os espectros típicos destas misturas são apresentados na Figura 43.



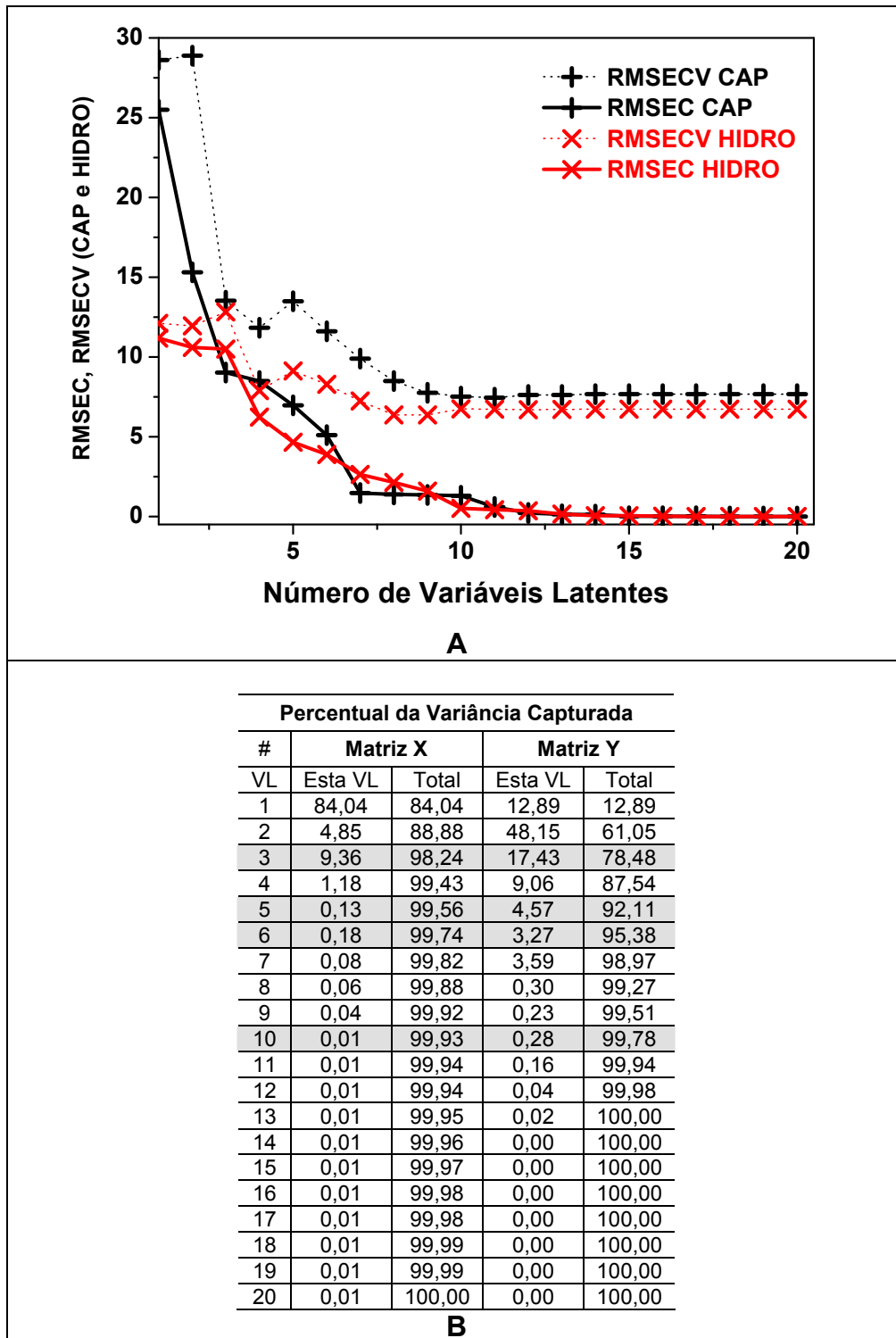
**FIGURA 43.** ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (DRIFT, 10000 a 399  $\text{cm}^{-1}$ ) DAS MISTURAS CONTENDO CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA, NAS CONCENTRAÇÕES LIMIARES QUE FORAM UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DO MODELO MULTIVARIADO.

---

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O desenvolvimento dos modelos foi realizado de maneira análoga à dos estudos anteriores, fazendo-se uma primeira avaliação com dados espectrais centrados na média. A seleção do melhor número de variáveis latentes (VL) foi fundamentada na avaliação do RMSEC e RMSECV, cuja evolução, em função do número de variáveis latentes, é apresentada na Figura 44A. De acordo com esta figura, os valores de RMSEC diminuem sistematicamente conforme se aumenta o número de VL, alcançando valores mínimos praticamente a partir da décima VL. O comportamento do RMSECV se mostra diferente, indicando erros de previsão que são minimizados a partir da introdução da nona VL (para captopril) e da oitava variável latente (para hidroclorotiazida). Adicionalmente, observa-se que 6 variáveis latentes permitem representar uma grande parcela da variância (95,38%) dos dados de concentração (matriz Y, Figura 44B), utilizando praticamente 99% da variância apresentada pelos dados espectrais (matriz X, Figura 44B). Para se evitar a criação de modelos super-ajustados, fundamentados em detalhes instrumentais sujeitos ao efeito do ruído instrumental, 10 VL foram selecionadas como limite para modelagem. Assim, modelos foram desenvolvidos com 3, 5, 6 e 10 VL.

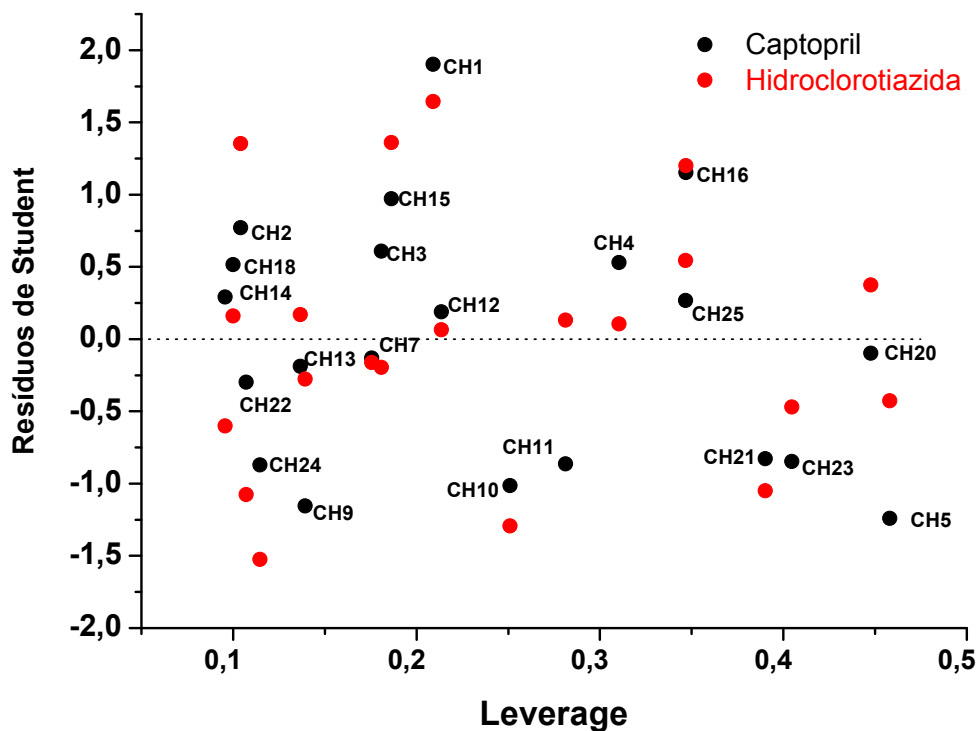
## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**FIGURA 44.** GRÁFICO DE RMSEC E RMSECV (A) E VARIÂNCIA CAPTURADA PELAS VARIÁVEIS LATENTES (B) NO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO COM ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA E NA REGIÃO DE 10000 A 400  $\text{cm}^{-1}$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 45, são apresentados os dois critérios de maior importância para a verificação de anomalias ou disparidades no conjunto de amostras de calibração, os resíduos de *Student* ( $\pm 2,5$ ) e o *leverage* (0,71). Considerando um modelo desenvolvido com 5 variáveis latentes, nenhuma anomalia foi constatada.



**FIGURA 45.** GRÁFICO DE RESÍDUOS DE “STUDENT” *VERSUS LEVERAGE* PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 5 VARIÁVEIS LATENTES.

Utilizando-se os modelos desenvolvidos para avaliar as 13 misturas sintéticas reservadas para validação, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 19. Em primeiro lugar, constata-se que os erros médios de previsão são bastante similares, não importando o número de variáveis latentes utilizado na elaboração do modelo. Outra observação importante está representada pela obtenção de erros médios de previsão inferiores a 8%, com pequenas discrepâncias envolvendo algumas amostras em particular.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**TABELA 19.** RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS MISTURAS SINTÉTICAS (CAP + HIDRO) RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg g<sup>-1</sup> E ERRO RELATIVO EM %), UTILIZANDO-SE MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRIFT NA REGIÃO DE 10000 A 400 cm<sup>-1</sup> E DADOS CENTRADOS NA MÉDIA.

CONCENTRAÇÃO REAL		CONCENTRAÇÃO PREVISTA															
		10VL				6 VL				5 VL				3VL			
CAP	HIDRO	CAP	HIDRO	ERRO		CAP	HIDRO	ERRO		CAP	HIDRO	ERRO		CAP	HIDRO	ERRO	
147,0	83,0	173,4	91,1	18,0	9,7	172,8	88,2	17,6	6,3	171,6	87,5	16,7	5,4	176,9	91,8	20,4	10,6
147,0	83,0	154,4	91,2	5,0	9,9	152,5	88,8	3,7	7,0	148,3	86,5	0,9	4,3	150,6	93,8	2,5	13,1
147,0	83,0	169,8	89,6	15,5	8,0	172,0	91,1	17,0	9,8	170,5	90,3	16,0	8,9	173,8	94,1	18,3	13,4
184,0	83,0	184,6	83,7	0,3	0,8	182,6	83,3	-0,7	0,3	179,8	81,7	-2,3	-1,5	184,7	94,2	0,4	13,5
184,0	83,0	188,3	84,3	2,3	1,6	186,1	83,5	1,1	0,6	194,8	88,2	5,9	6,2	191,3	85,5	4,0	3,0
184,0	83,0	208,4	96,2	13,3	15,9	201,9	89,7	9,7	8,1	202,7	90,1	10,2	8,6	208,4	89,6	13,3	8,0
184,0	92,0	183,5	91,5	-0,3	-0,5	182,4	91,9	-0,9	-0,1	177,0	89,0	-3,8	-3,3	180,2	96,5	-2,0	4,9
165,0	100,0	173,4	106,5	5,1	6,5	177,1	108,7	7,3	8,7	170,8	105,3	3,5	5,3	181,6	98,3	10,0	-1,7
165,0	100,0	159,1	96,4	-3,6	-3,6	154,8	90,6	-6,2	-9,4	161,5	94,2	-2,1	-5,8	158,6	92,8	-3,9	-7,2
165,0	100,0	185,1	106,7	12,2	6,7	185,5	104,1	12,4	4,1	180,8	101,6	9,6	1,6	188,7	95,9	14,4	-4,1
202,0	100,0	198,0	100,8	-2,0	0,8	192,5	94,3	-4,7	-5,7	194,3	95,3	-3,8	-4,7	199,0	96,0	-1,5	-4,0
202,0	100,0	195,3	92,4	-3,3	-7,6	197,8	95,9	-2,1	-4,1	194,0	93,9	-4,0	-6,1	194,1	88,5	-3,9	-11,5
202,0	100,0	212,6	102,9	5,2	2,9	217,6	105,5	7,7	5,5	215,6	104,4	6,7	4,4	212,8	95,9	5,3	-4,1
<b>Erro Médio (%)</b>				<b>6,6</b>	<b>5,7</b>			<b>7,0</b>	<b>5,4</b>			<b>6,6</b>	<b>5,1</b>			<b>7,7</b>	<b>7,6</b>



---

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Estudos similares ao anteriormente descrito foram realizados com 5 pré-processamentos diferentes:

Pré-processamento 1: dados espectrais centrados na média (CM)

Pré-processamento 2: dados autoescalados (AU)

Pré-processamento 3: dados em primeira derivada (1ªDER)

Pré-processamento 4: dados em primeira derivada com alisamento (1ªDERALIS)

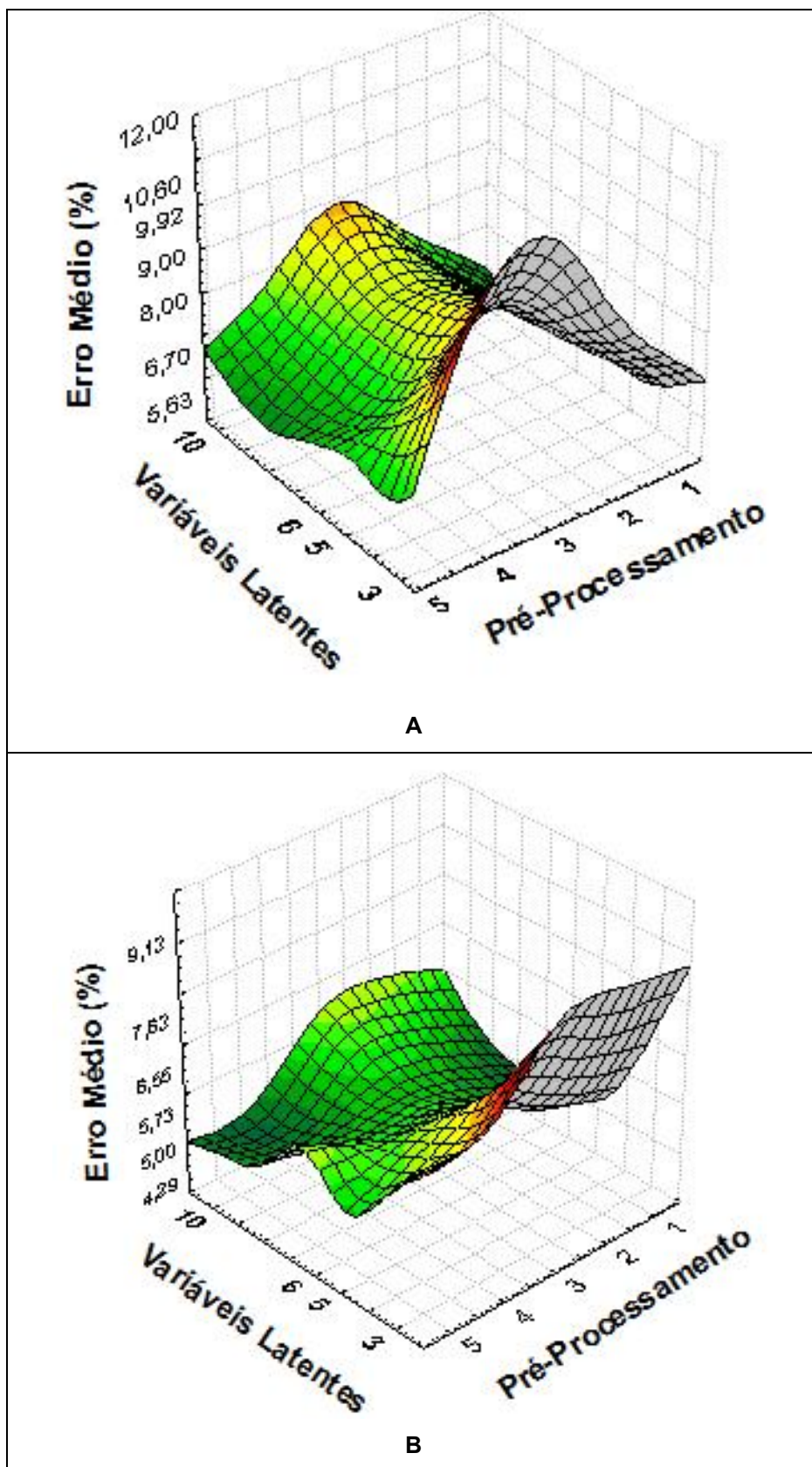
Pré-processamento 5: dados submetidos a correção multiplicativa do sinal (MSC).

Os resultados são resumidamente apresentados na Figura 46, na forma de uma superfície de resposta que correlaciona o erro médio da fase de validação externa com o número de variáveis latentes e o tipo de pré-processamento.

Verifica-se que o modelo com o menor erro de previsão na quantificação de Captopril corresponde àquele desenvolvido com 6 variáveis latentes e dados espectrais alisados (Savitzky-Golay, janela móvel de 15 pontos) e derivados. Nestas condições, erros médios de previsão da ordem de 6% foram observados. Na quantificação de hidroclorotiazida o melhor modelo foi elaborado com o mesmo tipo de pré-processamento, porém recorrendo-se ao uso de 10 variáveis latentes.

Infelizmente, nenhum modelo multivariado de calibração proporcionou erros aceitáveis na análise de medicamentos, provavelmente em função de interferências espectrais provocadas pela presença de excipientes. Sendo assim, optou-se por elaborar modelos separando-se as regiões do infravermelho médio e próximo, objetivando-se encontrar uma região espectral menos sujeita a este tipo de interferência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

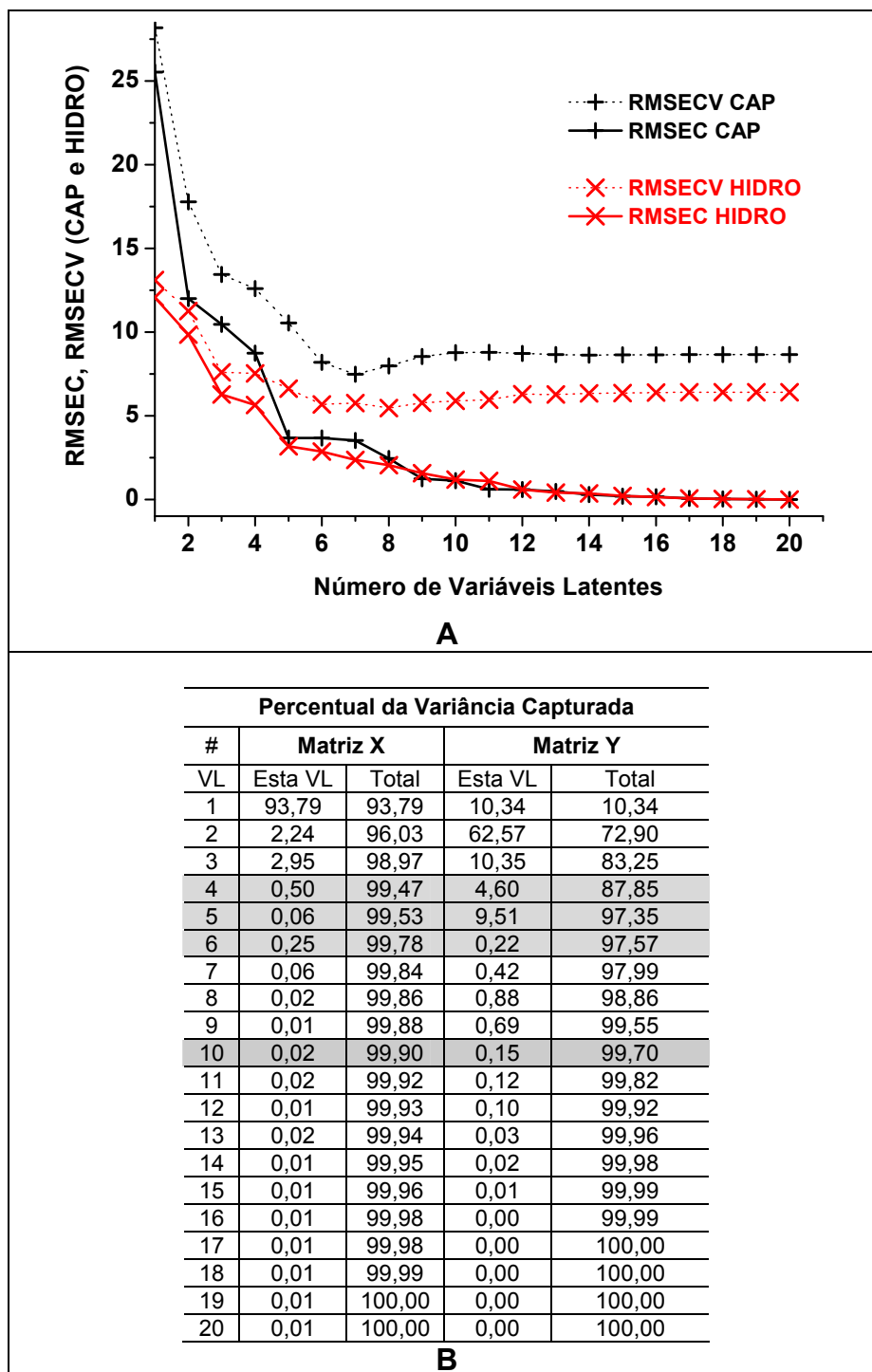


**FIGURA 46.** ERRO MÉDIO DE PREVISÃO NA FASE DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA CAPTOPRIL (A) E HIDROCLOROTIAZIDA (B), EM FUNÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO ESPECTRAL DE 10000 A 400  $\text{cm}^{-1}$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os modelos fundamentados no processamento de sinais do infravermelho médio (4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ) foram elaborados de maneira análoga, envolvendo o uso de 21 misturas de calibração e 13 de validação externa.

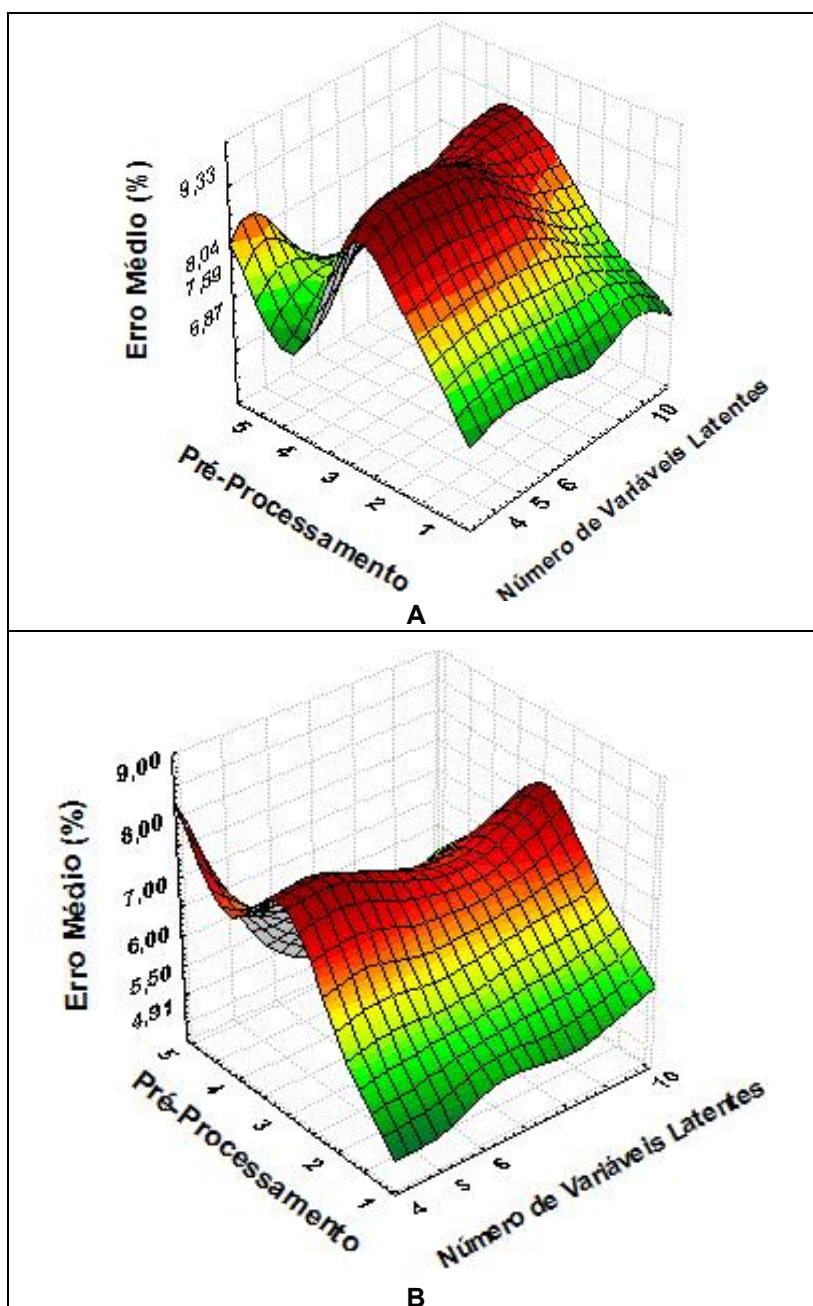
Para espectros centrados na média, a evolução do RMSEC e RMSECV sugere o uso de 4 a 10 variáveis latentes (Figura 47).



**FIGURA 47.** GRÁFICO DE RMSEC E RMSECV (A) E VARIÂNCIA CAPTURADA PELAS VARIÁVEIS LATENTES (B) NO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO COM ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA E NA REGIÃO DE 4000 A 400  $\text{cm}^{-1}$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da mesma maneira que nos modelos desenvolvidos nos casos anteriores, foram realizados estudos envolvendo diferentes tipos de pré-processamento de sinais, dando origem a dados que foram utilizados na construção da superfície de resposta apresentada na Figura 48. De acordo com estes antecedentes, o melhor modelo para avaliação conjunta de captopril e hidroclorotiazida corresponde àquele desenvolvido com dados autoescalados, utilizando-se 6 VL.



**FIGURA 48.** ERRO MÉDIO DE PREVISÃO NA FASE DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA CAPTOPRIL (A) E HIDROCLOROTIAZIDA (B), EM FUNÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO ESPECTRAL DE 4000 A 400  $\text{cm}^{-1}$ ).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Utilizando-se este modelo na análise de medicamentos, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 20, que indicam erros de previsão médios da ordem de 5% para ambos os fármacos.

**TABELA 20.** RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA DAS AMOSTRAS DE MEDICAMENTO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM  $\text{mg g}^{-1}$  E ERRO RELATIVO EM %), UTILIZANDO-SE MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRIFT NA REGIÃO DE 4000 A 400  $\text{cm}^{-1}$ , DADOS AUTOESCALADOS E 6 VARIÁVEIS LATENTES.

MEDICAMENTO	CONCENTRAÇÃO NOMINAL ( $\text{mg g}^{-1}$ ) *		CONCENTRAÇÃO PREVISTA ( $\text{mg g}^{-1}$ )		ERRO (%)	
	CAP	HIDRO	CAP	HIDRO	CAP	HIDRO
MED1	184,00	92,00	184,56	91,23	0,30	-0,84
MED2			189,13	93,15	2,79	1,25
MED3			206,26	101,17	12,10	9,97
MED4			199,44	96,60	8,39	5,00
<b>ERRO MÉDIO(%)</b>					<b>5,90</b>	<b>4,26</b>

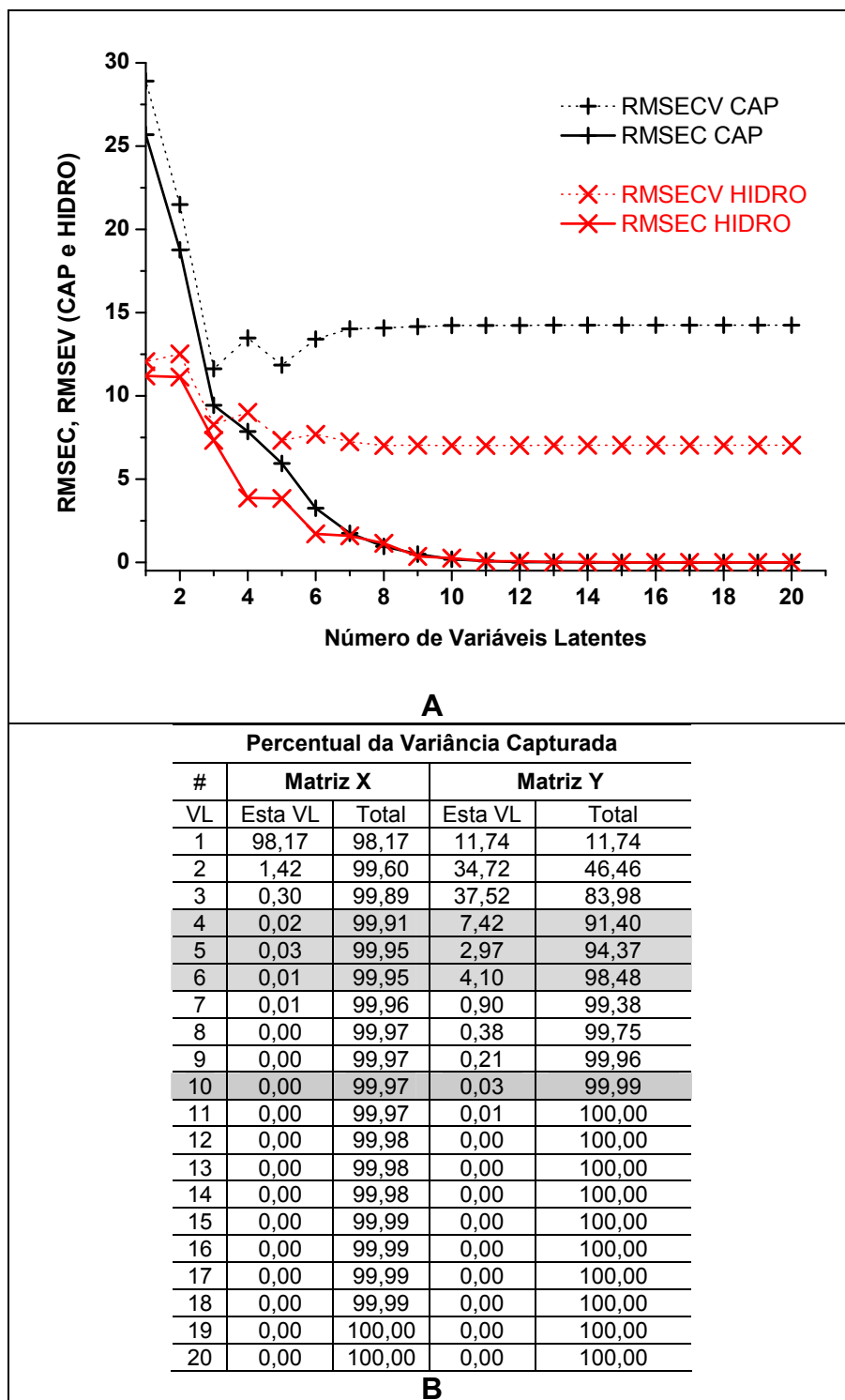
\*Concentração Nominal= Concentração indicada na bula do medicamento.

Finalmente, modelos multivariados foram desenvolvidos a partir dos dados espectrais adquiridos no infravermelho próximo (10000 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ).

Levando-se em consideração a evolução dos valores de RMSEC e RMSECV (Figura 49) para dados espectrais centrados na média, é possível admitir menores erros de previsão para modelos desenvolvidos com 4 a 10 variáveis latentes. Por sua vez, o uso de 10 VL representa praticamente a totalidade da variância dos dados de concentração, valendo-se praticamente de toda a informação espectral.

Os modelos foram desenvolvidos conforme a metodologia anterior.

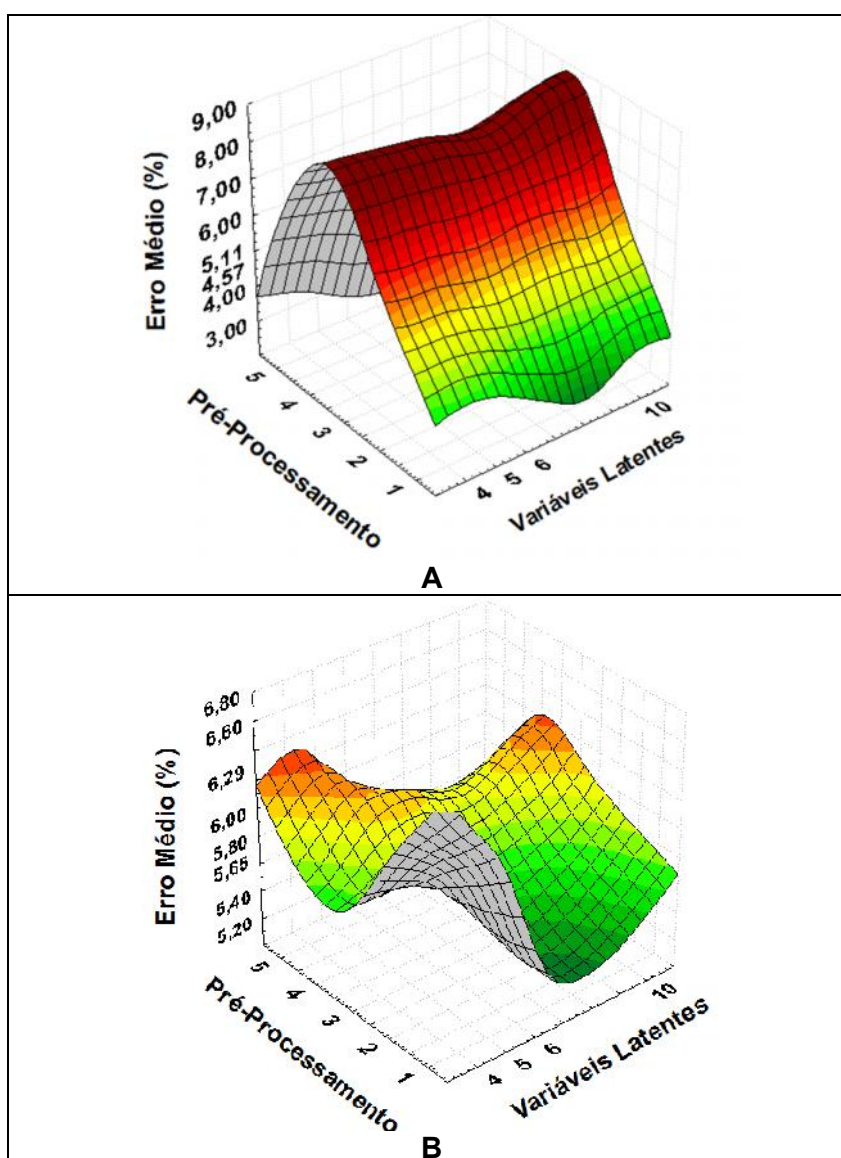
## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**FIGURA 49.** GRÁFICO DE RMSEC E RMSECV (A) E VARIÂNCIA CAPTURADA PELAS VARIÁVEIS LATENTES (B) NO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO COM ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA E NA REGIÃO DE 10000 A 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados, resumidamente apresentados na Figura 50, permitem observar que todos os modelos desenvolvidos proporcionam erros médios de previsão inferiores a 10%, o que pode ser considerado satisfatório, em relação aos limites estabelecidos pela legislação vigente (10%). Analisando de maneira conjunta captopril e hidroclorotiazida, o modelo de melhor desempenho foi elaborado com dados centrados na média (pré-processamento 1) e 6 variáveis latentes. Nestas condições foram observados erros inferiores a 6% para ambas as espécies em estudo.



Legenda - 1 : Centrado na Média; 2 : Autoescalado; 3: 1ª Derivada; 4: 1ª Derivada com alisamento; 5: MSC.

**FIGURA 50.** ERRO MÉDIO NA FASE DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA CAPTOPRIL(A) E HIDROCLOROTIAZIDA (B), EM FUNÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES (REGIÃO ESPECTRAL DE 10000 A 4000  $\text{cm}^{-1}$ ).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Utilizando-se o modelo de melhor desempenho na análise de amostras de medicamento (Med1a Med4), foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 21. Tomando-se como referência o valor indicado na bula do medicamento, verifica-se que os erros de previsão estão acima de 70% para hidroclorotiazida e acima de 160% para captopril. Em função dos valores previstos gerarem erros negativos para ambas as espécies avaliadas é possível presumir a existência de erros sistemáticos, principalmente associados à presença de excipientes.

Na região do infravermelho próximo, os sinais correspondem a sobretons e combinações de níveis vibracionais, de baixa intensidade. Assim, a presença de dezenas de substâncias utilizadas na fabricação dos comprimidos pode ocasionar importante interferência espectral, inviabilizando a modelagem.

**TABELA 21.** RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CAPTOPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA DAS AMOSTRAS DE MEDICAMENTO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM  $\text{mg g}^{-1}$  E ERRO RELATIVO EM %), UTILIZANDO-SE MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRIFT NA REGIÃO DE 10000 A 4000  $\text{cm}^{-1}$ , DADOS CENTRADOS NA MÉDIA E 6 VARIÁVEIS LATENTES.

MEDICAMENTO	CONCENTRAÇÃO NOMINAL ( $\text{mg g}^{-1}$ ) *		CONCENTRAÇÃO PREVISTA ( $\text{mg g}^{-1}$ )		ERRO (%)	
	CAP	HIDRO	CAP	HIDRO	CAP	HIDRO
MED1	184,00	92,00	-109,09	26,112	-159,29	-71,62
MED2			-124,86	21,245	-167,86	-76,91
MED3			-111,77	23,759	-160,74	-74,18
MED4			-115,24	23,705	-162,63	-74,23
<b>ERRO MÉDIO(%)</b>					<b>162,63</b>	<b>74,23</b>

\*Concentração Nominal= Concentração indicada na bula do medicamento.

De acordo com SIMÕES (2008), a capacidade preditiva dos modelos multivariados pode ser sensivelmente melhorada pelo uso de padrões de calibração que contenham os principais excipientes utilizados no preparo de cápsulas e comprimidos. Procedendo desta forma, o autor desenvolveu modelos multivariados fundamentados em espectroscopia no infravermelho próximo, para quantificação de captopril em amostras de medicamentos, com resultados satisfatórios que atendem às normas de validação.



---

**RESULTADOS E DISCUSSÃO****5.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MODELOS MULTIVARIADOS**

A espectroscopia eletrônica e no infravermelho apresentam um conjunto de características que favorecem a sua utilização no desenvolvimento de rotinas de análise farmacêutica, sendo que, dentro deste contexto, é possível salientar características como simplicidade operacional, rapidez e, principalmente, extrema versatilidade, na medida em que praticamente todas as espécies de interesse apresentam sinal característico nas regiões espectrais monitoradas por cada técnica.

Interferências espectrais, que são comuns na espectroscopia eletrônica, e problemas associados à complexidade espectral, que são características na espectroscopia no infravermelho, podem ser adequadamente contornadas com a utilização de ferramentas de calibração multivariada, as quais, ao reduzirem a dimensionalidade do espaço espectral, facilitam o desenvolvimento de modelos de calibração, mesmo em sistemas com forte sobreposição espectral ou de elevada complexidade.

Neste trabalho, inúmeros modelos multivariados foram desenvolvidos, recorrendo-se a diversas regiões espectrais, distintos tipos de pré-processamento de sinais e diferentes números de variáveis latentes. Em geral, todos os modelos desenvolvidos permitiram uma adequada análise de misturas sintéticas contendo zidovudina e lamivudina, normalmente fornecendo erros de previsão que estão em conformidade com as exigências legais.

Quando aplicados na análise de medicamentos, os modelos multivariados costumam perder capacidade de previsão, principalmente em razão de interferência provocada pelo grande número de espécies químicas utilizadas como aditivos na elaboração de cápsulas e comprimidos. Embora este tipo de interferência não seja empecilho para se alcançar erros de previsão compatíveis com a legislação vigente, duas alternativas podem ser utilizadas para a sua minimização. A primeira envolve o uso de regiões espectrais não interferidas, muitas vezes não é possível obter esta condição, enquanto que a segunda envolve o desenvolvimento de modelos a partir de misturas sintéticas que contenham os principais excipientes presentes no medicamento.

Finalmente, é importante salientar que as técnicas espectroscópicas aqui estudadas apresentam uma importante vantagem adicional, relacionada com a relativa facilidade encontrada na elaboração de sistemas automatizados de controle *on-line*. Trata-se de uma característica reservada para poucas técnicas de análise, a qual permite o controle de processos em tempo real.

---

**CONCLUSÕES****6. CONCLUSÕES**

A significativa interferência espectral verificada na espectroscopia eletrônica dificulta a análise de associações contendo zidovudina/lamivudina e captopril/hidroclorotiazida, inviabilizando o uso de métodos convencionais de calibração. Os erros de previsão associados a esta interferência podem ser contornados pelo uso de espectrofotometria derivativa (zidovudina/lamivudina) ou de métodos fundamentados no princípio de aditividade de absorvâncias (captopril/hidroclorotiazida), o que viabiliza a determinação dos fármacos em misturas sintéticas. Infelizmente, referidos sistemas de calibração dificilmente são aplicáveis na análise de medicamentos, em função do efeito interferente de muitos excipientes, o que obriga ao desenvolvimento de métodos menos convencionais de calibração.

Praticamente toda a informação contida nos espectros eletrônicos pode ser representada por um pequeno número de variáveis latentes, o que permite a elaboração de modelos multivariados que viabilizam a determinação dos fármacos em estudo em misturas sintéticas e medicamentos, com boa aproximação em relação aos valores obtidos pela técnica cromatográfica padrão. O modelo multivariado de melhor desempenho foi validado de acordo com os critérios exigidos pela ANVISA, observando-se precisão, exatidão e robustez compatíveis com as exigências legais. Referido modelo se mostrou bastante eficiente na previsão de amostras resultantes dos ensaios de dissolução, permitindo a observação de taxas de dissolução compatíveis com os limites impostos pela legislação.

Nos estudos envolvendo espectroscopia infravermelho por refletância difusa (DRIFTS) foram desenvolvidos modelos multivariados de boa capacidade de previsão, principalmente utilizando-se as regiões do infravermelho médio e próximo, para quantificação de zidovudina/lamivudina. Em geral, erros médios de previsão inferiores a 10% foram observados na análise de medicamentos.

Para captopril/hidroclorotiazida, entretanto, as análises por espectroscopia infravermelho se mostraram eficientes apenas na quantificação dos fármacos em misturas sintéticas. Na análise de medicamentos não foram encontrados modelos de bom desempenho, basicamente em função de interferências por parte da matriz.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI, H.; Partial Least Squares (PLS) Regression. In M. Lewis-Beck, A. Bryman, T. Futing (Eds); *Encyclopedia for Research Methods for the Social Sciences*. **2003**.
- ABDOU, H.M. Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence. *Easton: Mack Publishing Company*, **1989**.
- ABIQUIFI - Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica e de Insumos Farmacêuticos. Sem data de publicação. Disponível em: [http://www.abiquifi.org.br/psi/crescimento\\_1.html](http://www.abiquifi.org.br/psi/crescimento_1.html), acesso em 21 de março de **2011**.
- ACETTI, D.; BRENNAN, E.; FRONZA, G.; FUGANTI, C.; Monitoring the synthetic procedures of commercial drugs by <sup>2</sup>H NMR spectroscopy: The case of ibuprofen and naproxen. *Talanta*, **76**, **2008**, 651.
- AKAY, C.; OZKAN, S.A. Simultaneous LC determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**, **2002**, 1207.
- ALLESØ, M.; CHIENG, N.; REHDER, S.; RANTANEN, J.; RADES, T.; AALTONEN, J. Enhanced dissolution rate and synchronized release of drugs in binary systems through formulation: Amorphous naproxen–cimetidine mixtures prepared by mechanical activation. *J. Controlled Release*, **2009**.
- ANDRADE, S. R. C.; SCARMINIO, I. S.; NERY, M. M. F.; OLIVEIRA, A. C.; Comparison of multivariate calibration methods to determine simultaneously mebendazole-cambendazole and mebendazole-thiabendazole in pharmaceutical preparations by UV-visible spectrophotometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **33**, **2003**, 655.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI) - 1/2002. Resolução - RE nº 483, de 19 de março, **2002**. Disponível em: [http://anvisa.gov.br/legis/resol/2002/483\\_02re.htm](http://anvisa.gov.br/legis/resol/2002/483_02re.htm), acesso em 21 de março de 2011.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio, **2003**. Acesso pelo site: [http://anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm), em 13 de julho de 2010.
- ANVISA. Resolução nº 310 de 1º de setembro de 2004 que determina a publicação do Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

farmacêutica e perfil de dissolução. Brasília: Diário Oficial da União, 03 de set. **2004**.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Disponível em:[http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/ouvidoria!/ut/p/c4/04\\_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hnd0cPE3MfAwN\\_Dz8DA09\\_c19vrwAXAwNDE\\_2CbEdFADPcr4A!/?WCM\\_PORTLET=PC\\_7\\_CGAH47L00OHN00IO7MKJPD00H4\\_WCM&WCM\\_GLOBAL\\_CONTEXT=/wps/wcm/connect/anvisa/anvisa/sala+de+imprensa/noticias/anvisa+recebe+sugestoes+para+proposta+que+aumenta+controle+sobre+venda+de+antibioticos](http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/ouvidoria!/ut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hnd0cPE3MfAwN_Dz8DA09_c19vrwAXAwNDE_2CbEdFADPcr4A!/?WCM_PORTLET=PC_7_CGAH47L00OHN00IO7MKJPD00H4_WCM&WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/anvisa/anvisa/sala+de+imprensa/noticias/anvisa+recebe+sugestoes+para+proposta+que+aumenta+controle+sobre+venda+de+antibioticos), acessado em 13 de julho de **2010**.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografia Farmacopeica Captopril. Disponível em:

[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/arquivos/cp\\_materia\\_prima/CAPTOPRIL\\_CP.doc](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/arquivos/cp_materia_prima/CAPTOPRIL_CP.doc), acesso em 21 de março de **2011 A**.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografia Farmacopeica: Hidroclorotiazida. Disponível em:

[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/arquivos/cp\\_materia\\_prima/HIDROCLOROTIAZIDA\\_CP.doc](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/arquivos/cp_materia_prima/HIDROCLOROTIAZIDA_CP.doc), acesso em 21 de março de **2011 B**.

ARANCIBIA, J. A.; NEPOTE, A. J.; ESCANDAR, G. M.; OLIVIERI A. C.; Spectrofluorimetric determination of phenylephrine in the presence of a large excess of paracetamol. *Anal. Chim. Acta*, 419, **2000**, 159.

ARAÚJO, A.A.S.; STORPIRTIS, S.; MERCURI, L.P.; CARVALHO, F. M. S.; SANTOS FILHO, M.; MATOS, J.R.; Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. *Intern. J. Pharmac*, 260, **2003**, 303.

ASCENZI, P.; NOTARI, S.; BOCEDI, A.; IPPOLITO, G.; NARCISO, P.; PUCILLO, L.P.; TOSSINI, G.; DONNORSO, R. P.; GASPARRINI, F.; Simultaneous determination of 16 anti-HIV drugs in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 831, **2006**, 258.

BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. *Biológico* 64, **2002**, 175.

BEBAWY, L.I.; ABBAS, S.S.; FATTAH, L.A.; REFAAT, H.H. Application of first-derivative, ratio derivative spectrophotometry, TLC-densitometry and spectrofluorimetry for the simultaneous determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms and plasma. *IL Fármaco* 60, **2005**, 859.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECK, R.C.R.; CARDOSO, S.G.; ATHAYDE, M.L.; CODEVILLA, C.; DE OLIVEIRA, F.K.; DALMORA, S.L.; Validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da lamivudina e zidovudina em comprimidos. *Quím. Nova*, 30, **2007**, 1225.
- BELAL, F.; AL-ZAAGI, I.A.; GADKARIEM, E.A.; ABOUNASSIF, M.A. A stability-indicating LC method for the simultaneous determination of ramipril and hydrochlorothiazide in dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24, **2001**, 335.
- BENAMOR, M.; BELHAMEL, K.; DRAA, M. T.; Use of xylenol orange and cetylpyridinium chloride in rapid spectrophotometric determination of zinc in pharmaceutical products; *J. Pharm. Biomed. Anal.* , 23, **2000**, 1033.
- BERMUDEZ, J.; Medicamentos Genéricos: Uma alternativa para o mercado brasileiro; *Cad. Saúde Públ.*, 10, jul/set, **1994**, 368.
- BOERIS, M. S.; LUCO, J. M.; OLSINA R. A.; Simultaneous spectrophotometric determination of phenobarbital, phenytoin and methylphenobarbital in pharmaceutical preparations by using partial least-squares and principal component regression multivariate calibration. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24, **2000**, 259.
- BOHETS, H.; VANHOUTTE, K.; DE MAESSCHALCK, R.; COCKAERTS, P.; VISSERS, B.; NAGELS, L.J. Development of in situ ion selective sensors for dissolution. *Anal. Chim. Acta* 581, **2007**, 181.
- BOING, A.C.; BOING, A.F.; Hipertensão arterial sistêmica: o que nos dizem os sistemas brasileiros de cadastramentos e informações em saúde. *Rev. Bras. Hipertensão* 14(2), **2007**, 84.
- BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação da determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. *Quim. Nova*, 27, **2004**, 1004.
- BRANDÃO, A.C.C. *Ensaio para laboratório de controle de qualidade e controle da produção de medicamentos*. Rio de Janeiro. Outubro de **2001**.
- BRASIL. Lei nº 6360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, **1976**.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE no 893, de 29 de maio de 2003. Guia para realização de alterações, inclusões e notificações pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. **2003a**.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE no 901, de 29 de maio de 2003. Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata(FFSOLI). **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. **2003b**.
- BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Rev. Ecotox. Meio Amb.* 13, **2003**
- BRO, R.; Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemist?. *Anal. Chim. Acta*, 500, **2003**, 185.
- CHOWDARY, K.P.R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. *East Pharm.*, 30, (350), **1987**, 51.
- CIANCHINO, V.; ACOSTA, G.; ORTEGA, C.; MARTINEZ, L.D.; GOMEZ, M.R.; Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, 108, **2008**, 1075.
- COM CIÊNCIA, Revista eletrônica de jornalismo científico (SBPC/Labjor Brasil). <http://www.comciencia.br/reportagens/farmacos/farma02.htm>, acessada em 13 de julho de **2010**.
- CRIADO, A.; CÁRDENAS, S.; GALLEGO, M.; VALCÁRCEL, M.; Continuous flow spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceuticals following continuous microwave assisted alkaline hydrolysis. *Talanta*, 53, **2000**, 417.
- CUTRIGNELLI, A.; LOPEDOTA, A.; TRAPANI, A.; BOGHETICH, G.; FRANCO, M.; DENORA, N.; LAQUINTANA, V.; TRAPANI, G. Relationship between dissolution efficiency of Oxazepam/carrier blends and drug and carrier molecular descriptors using multivariate regression analysis. *Int. J. Pharm.* 358, **2008**, 60.
- DAVIDSON, M.W., PARRY-HILL, M. J., SUTTER, R. T., 2005. Reflection of Light. Disponível em:<http://micro.magnet.fsu.edu/optics/lightandcolor/reflection.html>, acesso em 21 de março de **2011**.
- DE LUCA, M.; OLIVERIO, F.; IOELE, G.; RAGNO, G.; Multivariate calibration techniques applied to derivative spectroscopy data for the analysis of pharmaceutical mixtures. *Chem. Intellig. Lab. Systems*, 96, (1), **2009**, 14-21.
- DINÇ, E.; ÖZDEMİR, A. Linear regression analysis and its application to multivariate chromatographic calibration for the quantitative analysis of two-component mixtures. *IL Farmaco* 60, **2005**, 591.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DINÇ, D.; KAYA, S.; DOGANAY, T.; BALEANU, D. Continuous wavelet and derivative transforms for the simultaneous quantitative analysis and dissolution test of levodopa–benserazide tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, **2007**, 991.
- DOU, Y.; QU, N.; WANG, B.; CHI, Y.Z.; REN, Y.L. Simultaneous determination of two active components in compound aspirin tablets using principal component artificial neural networks (PC-ANNs) on NIR spectroscopy. *Euro. J. Pharm. Sci.* 32, **2007**, 193
- EL-GINDY, A.; EMARA, S.; HADAD, G. M. Determination of certain drugs in binary mixtures formulations by second derivative ratio spectrophotometry and LC. *IL Farmaco* 59, **2004**, 703.
- EL REIS, M.A.; ATTIA, F.M.A.; KENAWY, I.M.M. Indirect determination of captopril by AAS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23, **2000**, 249.
- EL WALILY, A.F.M.; BELAL, S.F.; HEABA, E.A.; EL KERSH, A. Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide by first-derivative ultraviolet spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13, **1995**, 851.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA, Quarta Edição, São Paulo, Atheneu Editora, **1988**.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5ª Edição, Brasília, Edição ANVISA, **2010**, 1381.
- FERNANDES, C.; JUNQUEIRA, R. G.; CAMPOS, L. M. M.; PIANETTI, G.A.; Dissolution test for lamivudine tablets: Optimization and statistical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 42 (5), **2006**, 601.
- FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, M. L.; ORTEGA BARRALES, P.; RODRÍGUEZ TORNÉ G.; MOLINA DÍAZ, A. A flow injection sensor for simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by using Sephadex SP C-25 for continuous on-line separation and solid phase UV transduction. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31, **2003**, 669.
- FERRÃO, M.F.; Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. *Tecno-lógica*, 5, **2001**, 63.
- FERRARINI, H. Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada. *Dissertação de Mestrado*, DQ-UFPR, **2004**.
- FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O.; Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. *Quim. Nova*, 22, **1999**, 724.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FILIK, H.; HAYVALI, M.; KILIÇ, E.; APAK, R.; AKSU, D.; YANAZ, Z.; ÇENGEL, T. Development of an optical fibre reflectance sensor for *p*-aminophenol detection based on immobilised bis-8-hydroxyquinoline. *Talanta* 77, **2008**, 103.
- FOTEEVA, L. S.; STOLYAROVA, N. V.; TIMERBAEV, A. R.; KEPPLER, B. K.; Capillary electrophoretic assay for the stability of tris(8-quinolinolato)gallium(III) in tablet formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 48, 1, **2008**, 218.
- FREITAS, M. P.; SABADIN, A.; SILVA, L. M.; GIANNOTTI, F. M.; DO COUTO, D. A.; TONHI, E.; MEDEIROS, R.S.; COCO, G. L.; RUSSOAND, V. F.T.; MARTINS, J. A. Prediction of drug dissolution profiles from tablets using NIR diffuse reflectance spectroscopy: A rapid and nondestructive method. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 39, (1-2), **2005**, 17.
- FULLER, M.P.E; GRIFFITHS, P.R. Diffuse Reflectance Measurements by Infrared Fourier Transform Spectroscopy. *Anal Chem*, 50, **1978**, 1906.
- GARBACZ, G.; WEDEMEYER, R.S.; NAGEL, S.; GIESSMANN, T.; MÖNNIKES, H.; WILSON, C.G; SIEGMUND, W.; WEITSCHIES, W. Irregular absorption profiles observed from diclofenac extended release tablets can be predicted using a dissolution test apparatus that mimics in vivo physical stresses. *Euro. J. Pharm. Biopharm.* 70, **2008**, 421.
- GEMPERLINE, P.J.; CHO, J.H.; BAKER, B.; BATCHELOR, B.; WALKER, D.S. Determination of multicomponent dissolution profiles of pharmaceutical products by in situ fiber-optic UV measurements. *Anal. Chim. Acta* 345, **1997**, 155.
- GENDRIN, C.; ROGGO, Y.; COLLET, C. Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: A review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48, **2008**, 533.
- GIBALDI, M. *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, **1991**, 406.
- GOTARDO, M.A.; TOGNOLLI, J.O.; PEZZA, H.R.; PEZZA, L. Detection of propranolol in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part A* 69, **2008**, 1103.
- HABTE, G.; HYMETE, A.; MOHAMED, A.M.I.; Simultaneous separation and determination of lamivudine and zidovudine in pharmaceutical formulations using the HPTLC method. *Anal lett.*, 42, **2009**, 1552.
- HADAD, G.M.; EL-GINDY, A.; MAHMOUD, W.M.M.; HPLC and chemometrics-assisted UV-spectroscopy methods for the simultaneous determination of ambroxol and



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- doxycycline in capsule. *Spectroch. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 70 (3), 2008, 655-663.
- HOPKE, P. K.; The evolution of chemometrics. *Anal. Chim. Acta*, 500, **2003**, 365.
- HUANG, Y.; CHENG, Y.; ALEXANDER, K.; DOLLIMORE D. The thermal analysis study of the drug captopril. *Thermochim. Acta* 367, **2001**, 43.
- HUANG, T.; HE, Z.; YANG, B.; SHAO, L.; ZHENG, X.; DUAN, G.; Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide in human plasma by reverse-phase HPLC from linear gradient elution. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 2, **2006**, 644.
- INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008, **2003**.
- IOANNIDES, X.; ECONOMOU, A.; VOULGAROPOULOS, A. A study of the determination of the hypertensive drug captopril by square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33(2), **2003**, 309.
- IVAMA, A. M.; RAUBER, T. L.; GOMES, S. M. T.; HOFMEISTER, M. G. S.; JARAMILLO, N. M.; CORDEIRO, F.; Prevenção e combate à falsificação e fraude de medicamentos: uma responsabilidade compartilhada. *Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, **2005**. Disponível em: [http://www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArq/HSE\\_PRE\\_FAL\\_0305.pdf](http://www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArq/HSE_PRE_FAL_0305.pdf), acesso em 21 de março de 2011.
- IVANOVIC, D.; MEDENICA, M.; MALENOVIC, A.; JANCIC, B. Validation of the RP-HPLC method for analysis of hydrochlorothiazide and captopril in tablets. *Accred Qual Assur* 9, **2004**, 76.
- IYER, S.S.; BARR, W.H.; KARNES, H.T. Characterization of a potential medium for 'biorelevant' in vitro release testing of a naltrexone implant, employing a validated stability-indicating HPLC method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, **2007**, 845.
- JANTRATID, E.; DE MAIO, V.; RONDA, E.; MATTAVELLI, V.; VERTZONI, M.; DRESSMAN, J.B. Application of biorelevant dissolution tests to the prediction of *in vivo* performance of diclofenac sodium from an oral modified-release pellet dosage form. *Euro. J. Pharm. Sci.*, **2009**.
- JOHANSSON, J.; CAUCHI, M.; SUNDGREN, M. Multiple fiber-optic dual-beam UV/Vis system with application to dissolution testing. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29, **2002**, 469.
- JOSHI, A.; PUND, S.; NIVSARKAR, M.; VASU, K.; SHISHOO, C. Dissolution test for site-specific release isoniazid pellets in USP apparatus 3 (reciprocating cylinder):

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Optimization using response surface methodology. *Euro. J. Pharm. Biopharm.* 69, **2008**, 769.
- KENNEY, K. B.; WRING, S. A.; CARR, R. M.; WELLS, G. N.; DUNN, J. A.; Simultaneous determination of zidovudine and lamivudine in human serum using HPLC with tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 22, **2000**, 967.
- KRISHNAIAH, CH.; RAGHUPATHI REDDY, A.; KUMAR, R.; MUKKANTI, K. Stability-indicating UPLC method for determination of Valsartan and their degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 53(3), **2010**, 483.
- LAASONEN, M.; HARMIA-PULKKINEN, T.; SIMARD, C.; RÄSÄNEN, M.; VUORELA, H. Development and validation of a near-infrared method for the quantitation of caffeine in intact single tablets. *Anal. Chem.*, 75(4), **2003**, 754.
- LABCOMPLIANCE. Validation of Analytical Methods: Review and Strategy. Revision 2.01, julho de **2001**. Disponível em: [http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/#08\\_paramters](http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/#08_paramters). Acesso em 21 de março de 2011.
- LAPORTE, J. R.; Para melhor uso dos medicamentos. Disponível em: <http://www.taps.org.br/Paginas/medmedic04.html>, acessado em 14 de julho de **2010**.
- LOPES, M.B.; WOLFF, JC; BIOUCAS-DIAS, J.M.; FIGUEIREDO, M.A.T.; Determination of the composition of counterfeit Heptodin<sup>TM</sup> tablets by near infrared chemical imaging and classical least squares estimation. *Anal. Chem. Acta*, 641, **2009**, 46.
- LÓPEZ-MARTÍNEZ, L.; LOPEZ-de-ALBA, P.L.; LEO-RODRIGUEZ, L.M.; YEPEZ-MURRIETA, M.L. Simultaneous determination of binary mixtures of trimethoprim and sulfamethoxazole or sulphamethoxy pyridazine by the bivariate calibration spectrophotometric method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30, **2002**, 77.
- LORBER, A. Error propagation and figures of merit for quantification by solving matrix equations, *Anal. Chem.* 58, (6), **1986**, 1167.
- LOURENÇÃO, B.C.; MARCOLINO-JUNIOR, L.H.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação condutométrica de captopril em formulações farmacêuticas utilizando sulfato de cobre (II) como titulante. *Quim. Nova* 31, **2008**, 349.
- LUYPAERT, J.; MASSART, D.L.; VANDER HEYDEN, Y. Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceuticals analysis. *Talanta*, 72 (3), **2007**, 865.
- MADAN, J.; DWIVEDI, A.K.; SINGH, S. Estimation of antitubercular drugs combination in

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- pharmaceutical formulations using multivariate calibration. *Anal. Chim. Acta* 538, **2005**, 345.
- MALUF, D. F.; NAGATA, N.; PERALTA-ZAMORA, P.G.; FARAGO, P. V. Determinação simultânea de paracetamol e cafeína por espectrometria UV-Vis associada a ferramentas matemáticas. *Rev. Bras. Farm.*, 89, **2008**, 39.
- MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Rev. Bras. Cien. Farm.*, 38, (4), **2002**, 375.
- MARCOLONGO, R.; Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, **2003**.
- MARKOPOULOU, C.K.; MALLIOU, E.T.; KOUNDOURELLIS, J.E. Application of two chemometric methods for the determination of imipramine, amitriptyline and perphenazine in content uniformity and drug dissolution studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37, **2005**, 249.
- MARKOPOULOU, C.K.; MALLIOU, E.T.; KOUNDOURELLIS, J.E. Chemometric and derivative methods as flexible spectrophotometric approaches for dissolution and assaying tests in multicomponent tablets. *IL Farmaco* 59, **2004**, 627.
- MARTENS, H.; NAES, T.; *Multivariate Calibration*; John Wiley & Sons; Chichester, England, **1989**.
- MAZUREK, S.; SZOSTAK, R. Quantitative determination of captopril and prednisolone in tablets by FT-Raman spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40(5), **2006**, 1225.
- MEDINA, A. R.; FERNANDEZ DE CÓRDOVA, M. L.; MOLINA-DIAZ, A.; Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid by means of a FI ultraviolet pls multiptosensing device. *J. Pharm. Biomed. Anal.* , 21, **1999**, 983.
- MENEGOLA, J.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E.E.S. Dissolution test for citalopram in tablets and comparison of *in vitro* dissolution profiles. *Euro. J. Pharm. Biopharm.* 67, **2007**, 524.
- MESSERSCHIMIDT, I. Análise quantitativa por espectroscopia no infravermelho médio empregando técnicas de reflectância e calibração multivariada. *Tese de Doutorado*, IQ-UNICAMP, **1999**.
- METWALLY, F.H. Simultaneous determination of Nifuroxazide and Drotaverine hydrochloride in pharmaceutical preparations by bivariate and multivariate spectral analysis. *Spectrochim. Acta Part A* 69, **2008**, 343

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MINISTÉRIO DA SAÚDE; Programa Nacional de DST (Doenças Sexualmente Transmissíveis) e AIDS. Dez.2006. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pagina/aids-0>, acesso em 15 out, **2010**.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE; Boletim Epidemiológico AIDS-DST, Ano VI, nº 01, **2010b**.
- MIRZA, T.; TAN, H.S.I.; Determination of captopril in pharmaceutical tablets by anion-exchange HPLC using indirect photometric detection; a study in systematic method development; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25, **2001**, 39.
- MORENO GÁLVEZ, A.; GARCÍA MATEO, J.V.; MARTÍNEZ CALATAYUD, J. Simultaneous dissolution profiles of two drugs, sulfadiazine-trimethoprim and amitriptyline-perphenazine, in solid oral dosage forms by a FIA manifold provided with a single spectrophotometric detector. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30, **2002**, 535.
- MORGANO, M.A.; FARIA, C.G.; FERRÃO, M.F.; FERREIRA, M.M.C.; Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. *Quim. Nova*, 30,2, **2007**, 346.
- NAGATA, N.; Uso de métodos de calibração multivariada na análise de amostras de interesse industrial e espécies de importância ambiental por fluorescência e raios-X. *Tese de Doutorado*, IQ-UNICAMP, **2001**.
- NOVÁKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; SOLICH, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 68(3), **2006**,908.
- OLIVEIRA, E. A.; LABRA, M. E.; BERMUDEZ, J. A produção pública de medicamentos no Brasil: uma visão geral. *Cad. Saúde Públ.*, 22 (11), **2006**, 2379.
- OPAS -Organização Pan-americana de Saúde; <http://www.opas.org.br>. Acessada em 20 de junho de **2004**.
- OTSUKA, M.; Chemoinformetrical evaluation of granule and tablet properties of pharmaceutical preparations by near-infrared spectroscopy. *Chem. Intellig. Lab. Systems*, 82, (1), **2006**, 109.
- OUYANG, J.; BAEYENS, W.R.G.; DELANGHE, J.; VAN DER WEKEN, G.; VAN DAELE, W.; DE KEUKELEIRE, D.; GARCÍA CAMPANA, A.M. Chemiluminescence-based liquid chromatographic determination of hydrochlorothiazide and captopril. *Anal. Chim. Acta* 386, **1999**, 257.
- ÖZDEMİR, D.; ÖZTÜRK, B. Genetic Multivariate Calibration Methods for Near Infrared (NIR) Spectroscopic Determination of Complex Mixtures. *Turk J Chem*, 28, **2004**, 497.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PANDERI, I.; PARISSI-POULOU, M. Determination of captopril and captopril-hydrochlorothiazide combination in tablets by derivative UV spectrophotometry. *Intern. J. Pharmac*, 86, **1992**, 99.
- PARHAM, H.; ZARGAR, B. Square-wave voltammetric (SWV) determination of Captopril in reconstituted serum and pharmaceutical formulations. *Talanta* 65, **2005**, 776.
- PEETERS, K.; DE MAESSCHALCK, R.; BOHETS, H.; VANHOUTTE, K.; NAGELS, L. In situ dissolution testing using potentiometric sensors. *Euro. J. Pharm. Sci.* 34, **2008**, 243.
- PIMENTA, A.M.; ARAÚJO, A.N.; MONTENEGRO, M.C.B.S.M. Sequential injection analysis of captopril based on colorimetric and potentiometric detection. *Anal. Chim. Acta* 438, **2001**, 31.
- PORCHE, D.; Abacavir Sulfate, Lamivudine and Zidovudine (Trizivir™). *Journal of the Association of Nurses in AIDS Care*, 12 (6), 88-90, **2001**.
- PRIETO, J.A.; AKESOLO, U.; JIMÉNEZ, R.M.; ALONSO, R.M. Capillary zone electrophoresis applied to the determination of the angiotensin-converting enzyme inhibitor cilazapril and its active metabolite in pharmaceuticals and urine. *J. Chromatog. A* 916, **2001**, 279.
- PRIETO, J.A.; JIMÉNEZ, R.M.; ALONSO, R.M. Square wave voltammetric determination of the angiotensin converting enzyme inhibitors cilazapril, quinapril and ramipril in pharmaceutical formulations. *IL Fármaco* 58, **2003**, 343.
- PULGARÍN, J.A.M.; MOLINA, A.A.; PÉREZ-OLIVARES NIETO, G. Determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations by time resolved chemiluminescence. *Anal. Chim. Acta* 518, **2004**, 37.
- PULGARÍN, J.A.M.; BERMEJO, L.F.G.; LÓPEZ, P. F. Sensitive determination of captopril by time-resolved chemiluminescence using the stopped-flow analysis based on potassium permanganate oxidation. *Anal. Chim. Acta* 546(1), **2005**, 60.
- RAGNO, G.; IOELE, G.; RISOLI, A. Multivariate calibration techniques applied to the spectrophotometric analysis of one-to-four component systems. *Anal. Chim. Acta* 512, **2004**, 173.
- RAZAK, O.A. Electrochemical study of hydrochlorothiazide and its determination in urine and tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34, **2004**, 433.
- REICH, G.; Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. *Adv Drug Deliver Rev*, 57, **2005**, 1109.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- REVELLE, L. K.; WESTENBERGER, B. J.; ELLISON, C. D.; FUSSNER, A. S.; JENNEY, S.; KOLINSKI, R. E.; LIPE, T. G.; LYON, R. C.; MOORE, T. W.; SMITH, A. P. *et al.* Quality assessment of internet pharmaceutical products using traditional and non-traditional analytical techniques. *Intern. J. Pharm.*, 306, (1-2), **2005**, 56.
- REZAEI, B.; DAMIRI, S. Voltammetric behavior of multi-walled carbon nanotubes modified electrode-hexacyanoferrate (II) electrocatalyst system as a sensor for determination of captopril. *Sensors and Actuators B* 134, **2008**, 324.
- REZENDE, K.R.; MUNDIM, I.M., TEIXEIRA, L.S.; SOUZA, W. C.; RAMOS, D.R.; CARDOSO, C. R.F.; SOUZA, I.C.; GRATÃO, M.Z.; BELLÓRIO, K. B. Determination of captopril in human plasma, using solid phase extraction and high-performance liquid chromatography, coupled to mass spectrometry: Application to bioequivalence study. *J. Chromatog. B*, **2006**.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*, 27, **2004**, 771.
- RIBEIRO, IN: A INDUSTRIA FARMACEUTICA NO BRASIL. São Paulo: sem data de publicação. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/Industria%20farmaceutica%20no%20Brasil.txt.pdf>, acesso em 21 de março de **2011**.
- RIBEIRO, P.R.S.; SANTINI, A.O.; PEZZA, H.R.; PEZZA, L. Potentiometric determination of captopril in pharmaceutical formulations. *Ecl. Quím.* 28, **2003**.
- ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; LEMA-MARTINEZ, C.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44 (3), **2007**, 683.
- ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004–2008: A review. *Anal. Chim. Acta* 635, **2009**, 22.
- ROSSI, R.C.; DIAS, C.L.; DONATO, E.M.; MARTINS, L.A.; BERGOLD, A.M.; FRÖHLICH, P.E. Development and validation of dissolution test for ritonavir soft gelatin capsules based on *in vivo* data. *Int. J. Pharm.* 338, **2007**, 119.
- ROSSIGNOLI, P.S.; CORDEIRO, G. A.; CORRER, C.J.; PERALTA-ZAMORA, P.G.; PONTAROLO, R. Determinação espectroscópica multivariada de glucosamina e condroitina em formulações farmacêuticas. *Quim. Nova* 31, **2008**, 1285.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SAKA, K.; UEMURA, K.; SHINTANI-ISHIDA, K.; YOSHIDA, K.; Determination of amobarbital and phenobarbital in serum by gas chromatography–mass spectrometry with addition of formic acid to the solvent. *J. Chromatogr. B*, 869, **2008**, 9.
- SALEM, I.; SAIF, W. A.; JMEIAN, Y.; AL TAMIMI, J.I. A selective and rapid method for the quantification of captopril in human plasma using liquid chromatography / selected reaction monitoring mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37, **2005**, 1073.
- SANTELLLO, J.L.; MION JR, D. Captopril associado à hidroclorotiazida no tratamento da hipertensão leve e moderada. Estudo multicêntrico brasileiro. *Arq. Bras. Cardiol.* 71, **1998**, 713.
- SANTOS, J. Desenvolvimento de métodos espectroscópicos multivariados para quantificação de captopril e hidroclorotiazida em associação. *Dissertação de Mestrado*, DQI-UFPR, **2009**.
- SARRAGUÇA, M. C.; LOPES, J. L. Quality control of pharmaceuticals with NIR: From lab to process line. *Vib. Spectrosc.* 49,(2), **2009**, 204.
- SAVITZKY, A.; GOLLAY, M. J. E., Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Square Procedures, *Anal. Chem.*, 36, **1964**, 1627.
- SCAFI, S.H.F.; PASQUINI, C. Identification of counterfeit drugs using near-infrared spectroscopy. *Analyst*, 126, **2001**, 2218.
- SEKAR, R.; AZHAGUVEL, S.; Simultaneous determination of HIV-protease inhibitors lamivudine and zidovudine in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*,39, **2005**, 653.
- SENA, M. M.; FERNANDES, J. C. B.; ROVER, L. ; POPPI, R. J.; KUBOTA, L. T.; [Application of two- and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid mixtures using ultraviolet spectrophotometry.](#) *Anal. Chim. Acta*, 409, **2000**, 159.
- SENA, M.M.; FREITAS, C.B.; SILVA, L.C.; PÉREZ, C.N.; DE PAULA, Y.O. Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em formulações farmacêuticas usando calibração multivariada. *Quim. Nova* 30, **2007**, 75.
- SHAHROKHIAN, S.; KARIMI, M.; KHAJEHSHARIFI, H.; Carbon-paste electrode modified with cobalt-5-nitrosalophen as a sensitive voltammetric sensor for detection of captopril. *Sensors and Actuators B: Chem.*, 109, (2), **2005**, 278.
- SHAMA, S.A.; AMIN, A. EL-S.; OMARA, H. Colorimetric microdetermination of captopril in pure form and in pharmaceutical formulations. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 102, **2006**, 261.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SIANGPROH, W.; NGAMUKOT, P.; CHAILAPAKUL, O. Electrochemical determination of captopril at boron-doped diamond thin film electrode applied to a flow injection system. *Sens. Actuators B* 91, **2003**, 60.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T.A. *Princípios de análise instrumental*. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, **2002**.
- SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. *Fundamentos da Química Analítica*. Trad. 8ª ed. Americana, São Paulo, Thomson, **2006**.
- SILVA, F.E.B.; FERRÃO, M.F.; PARISOTTO, G.; MÜLLER, E.I.; FLORES, E.M.M. Simultaneous determination of sulphamethoxazole and trimethoprim in powder mixtures by attenuated total reflection-Fourier transform infrared and multivariate calibration. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 49, **2009**, 800.
- SIMÕES, S. S.; Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIRR e calibração multivariada. *Tese de Doutorado*, DQ-UFPB, **2008**.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial; Capítulo 6: Tratamento Medicamentoso, página 28; **2006**. Disponível em: <http://departamentos.cardiol.br/dha/vdiretriz/vdiretriz.asp>, acesso em 21 de março de **2011**.
- SOTOMAYOR, M.D.P.T.; DIAS, I.L.T.; LANZA, M.R.V.; MOREIRA, A.B.; KUBOTA, L.T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Quim. Nova* 31, **2008**, 1755.
- SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Atividade anti-retroviral e propriedades farmacocinéticas da associação entre lamivudina e zidovudina. *Rev. Bras. Cienc. Farmaceut.* 40, **2004**, 9.
- STEFAN, R.I.; VAN STADEN, J.K.F.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Amperometric biosensors/sequential injection analysis system for simultaneous determination of S- and R-captopril. *Biosens. & Bioelect.* 15, **2000**, 1.
- STEWART, J.T.; FAN, B.; Determination of zidovudine/lamivudine/nevirapine in human plasma using ion-pair HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28, **2002**, 903.
- SUNTORNUSUK, L.; Separation of cold medicine ingredients by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 22, **2001**, 139.
- THOMAS, E.V.; A Primer on Multivariate Calibration. *Anal. Chem.*, 66, **1994**, 795.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- TOMŠŮ, D.; ICARDO, M.C.; CALATAYUD, J.M. Automated simultaneous triple dissolution profiles of two drugs, sulphamethoxazole–trimethoprim and hydrochlorothiazide–captopril in solid oral dosage forms by a multicommutation flow-assembly and derivative spectrophotometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36, **2004**, 549
- TRNKOVÁ, L.; KIZEK, R.; VACEK, J.; Square wave and elimination voltammetric analysis of azidothymidine in the presence of oligonucleotides and chromosomal DNA. *Bioelectrochemistry*, 63,(1-2), **2004**,31.
- USLU, B.; ÖZKAN, S. A.; Determination of lamivudine and zidovudine in binary mixtures using first derivative spectrophotometric, first derivative of the ratio-spectra and high-performance liquid chromatography–UV methods. *Anal. Chim. Acta*, 466, **2002**, 175.
- USP-The United States Pharmacopeia, 30<sup>th</sup> ed., The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, USA, **2009**, pp. 2447-2448, 3492-3493.
- VALDERRAMA, P.; Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo. *Tese de Doutorado*, IQ-UNICAMP, **2005**.
- VALDERRAMA, P.; BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. *Quim. Nova*, 32 (5), **2009**, 1287.
- VALENTINI, S.R.; SOMMER, W.A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. *Arq. Mudi.* 11(2), **2007**, 26.
- VERWEIJ-VAN WISSEN, C.P.W.G.M.; AARNOUTSE, R.E.; BURGER, D.M.; Simultaneous determination of the HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors lamivudine, didanosine, stavudine, zidovudine and abacavir in human plasma by reversed phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 816, **2005**, 121.
- WU, H.; TAWAKKUL, M.; WHITE, M.; KHAN, M.A. Quality-by-Design (QbD): An integrated multivariate approach for the component quantification in powder blends. *Int. J. Pharm.* 372, **2009**, 39.
- YAZDI, A.S.; RAZAVI, N.; YAZDINEJAD, S. R.; Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline by dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography flame ionization detection. *Talanta*, 75, **2008**,1293.
- ZAITUNE, M.P.A.; BARROS, M.B. de A.; CÉSAR, C.L.G.; CARANDINA, L.; GOLDBAUM, M. Hipertensão arterial em idosos: prevalência, fatores associados e práticas de controle no Município de Campinas, São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 22(2), **2006**, 285.

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ZHANG, Q.; LI, Y. .; HUANG, C. Z.; Quality control of piperazine in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis. *Talanta*, 76, **2008**, 44.