

---

## APLICAÇÃO DA ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO ASSOCIADO A CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA NO CONTROLE DE QUALIDADE DE FÁRMACOS - REVISÃO

### APPLICATION OF INFRARED SPECTROSCOPY COUPLE WITH MULTIVARIATE CALIBRATION FOR DRUG QUALITY CONTROL - REVISION

Camilla Regina de Souza MADEIRA<sup>1</sup>; Mário Sérgio PIANTAVINI<sup>1</sup>, Angela Cristina Leal Badaró TRINDADE<sup>1</sup>

1- Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Controle de Qualidade, Curitiba, PR, Brasil

Autor para correspondência: angela@ufpr.br

#### RESUMO:

A espectroscopia na região do infravermelho (próximo e médio) pode ser aplicada como alternativa para determinar o teor de substâncias ativas em formas farmacêuticas. A análise quantitativa de fármacos por infravermelho, empregando a técnica de reflectância difusa, apresenta vantagens quando comparada a outras técnicas, como rapidez, menor custo, não utilização de solvente orgânico e determinação direta de um ou mais fármacos, na presença de interferentes. Apesar das vantagens, o espectro obtido por esta técnica apresenta alta complexidade de sinal, devido ao grande número de modos de vibração, e baixa seletividade, pela sobreposição de sinais analíticos. Logo, determinações univariadas são dificultadas, sendo necessário a aplicação de ferramentas quimiométricas, tais como a calibração multivariada. O método mais utilizado é o dos mínimos quadrados parciais (PLS - *Partial Least Squares*), podendo ser empregado para a determinação de um único fármaco (PLS1) ou determinação simultânea de dois ou mais fármacos (PLS2). A validação de modelos multivariados aplicados a medicamentos vem sendo realizada de forma não padronizada, considerando-se parâmetros estabelecidos para normas univariadas e figuras de mérito cabíveis para métodos multivariados, pois ainda não está regulamentada por órgãos fiscalizadores nacionais, tais como ANVISA.

**PLAVRAS-CHAVE:** infravermelho, DRIFT, calibração multivariada, PLS, controle de qualidade, validação de método analítico.

#### ABSTRACT:

The infrared spectroscopy (near and mid region) can be applied as an alternative to determine the content of active pharmaceutical ingredients in pharmaceuticals forms. The quantitative analysis using infrared diffuse reflectance (DRIFT) has advantages, compared to other techniques, such as speed, lowest, no use organic solvent and direct and simultaneous determination of the drug (in the presence of interferents). Despite the advantages, the spectrum obtained by this technique is highly complex signal and low selectivity due to the large number of vibration modes and overlapping analytical signals, respectively. Thus, the univariate methods are hampered, requiring the application of chemometric tools, such as, the multivariate calibration. The most used method is the partial least squares (PLS - *Partial Least Squares*) and can be used for the determination of a single asset (PLS1) or simultaneous determination of two or more

---

active (PLS2). The validation of multivariate models applied to drugs has been carried out in non-standard shape, considering parameters set for univariate methods norms and figures of merit applicable to multivariate methods, as it is not yet regulated by national regulatory agencies, such as ANVISA.

**KEYWORDS:** infrared, DRIFT, multivariate calibration, PLS, quality control, validation of analytical method

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de medicamentos seguros e eficazes envolve a realização de análises de controle de qualidade de matérias-primas e do produto acabado como etapa preliminar para atingir um padrão mínimo de qualidade necessário a um medicamento (ZARONI; NETA; PONTAROLO, 2013)

A ANVISA instituiu, por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, de 16 de abril de 2010, as boas práticas para fabricação de medicamentos, buscando estabelecer rígidos parâmetros de qualidade em todas as etapas de fabricação de um produto. De acordo com as boas práticas de fabricação de medicamentos, os produtos farmacêuticos devem apresentar qualidade compatível com especificações determinadas por códigos oficiais, visando assegurar seu uso (BRASIL, 2010).

A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para o procedimento do controle de qualidade de uma substância ativa ou forma farmacêutica (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

Estudos orientados à quantificação de fármacos geralmente são fundamentados em métodos cromatográficos, usualmente cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), os quais se caracterizam por serem sensíveis e precisos, porém onerosos e demorados. Desse ponto de vista, tem-se buscado alternativas para o controle de qualidade de medicamentos que ofereçam maior rapidez na análise, baixo ou ausente consumo de solventes e conseqüente menor geração de resíduos, mínimo preparo da amostra e menor custo (PASQUINI, 2003; DOU *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009).

Nesse sentido, a combinação de espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada emergiu na última década como uma alternativa promissora para o controle de qualidade de matérias-primas e produto acabado (STUART, 2004), principalmente no modo de refletância difusa (DRIFT). Esta técnica vem sendo amplamente estudada e aplicada, tanto na região do infravermelho próximo (BLANCO *et al.*, 1999a; BLANCO *et al.* 1999b; HERKERT, PRINZ, KOVAR, 2001), quanto na região do infravermelho médio (YANG, IRUDAYARAJ, 2002; PARISOTTO, *et al.*, 2005; PIANTAVINI *et al.*, 2014).

---

A complexidade de sinal e a pouca seletividade observada na espectroscopia no infravermelho (SARRAGUÇA; LOPES, 2009) impedem o desenvolvimento de modelos de calibração fundamentados em procedimentos univariados. Assim, ferramentas quimiométricas, tais como a calibração multivariada, são cada vez mais utilizadas, de maneira a permitir a utilização de toda a informação espectral relevante, ou seja, permitem manipular dados de absorvância espectrais associadas a um ou mais números de onda ao mesmo tempo e a concentração dos analitos (POLLANEN *et al.*, 2005; ZAMORA *et al.*, 1997).

## **2. OBJETIVOS**

Demonstrar as vantagens da aplicabilidade do equipamento de infravermelho associado a calibração multivariada na análise quantitativa de fármacos.

## **3. METODOLOGIA DE BUSCA**

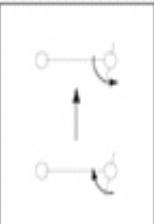
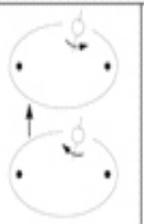
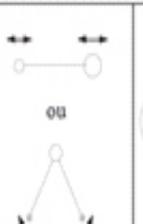
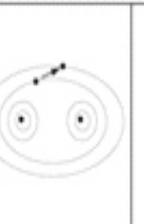
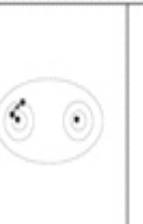
Revisão narrativa.

## **4. REVISÃO DA LITERATURA**

### **4.1 Infravermelho**

A espectroscopia é a ciência que estuda as interações da radiação com a matéria (SKOOG *et al.*, 2000) e os processos que utilizam a luz para medir as concentrações químicas são conhecidos como espectrofotometria (HARRIS, 2001). É uma técnica analítica bastante utilizada na quantificação de fármacos, a qual é baseada na absorção da luz ou, melhor definindo, na absorção seletiva da radiação eletromagnética pelas substâncias, em determinados comprimentos de onda/frequências (HARRIS, 2001; GIL, 2008).

O espectro eletromagnético, representado na FIGURA 01, compreende uma ampla faixa de energia e comprimentos de onda, divididos nas chamadas regiões espectrais. Os efeitos moleculares resultantes de cada região espectral estão relacionados com a energia de cada região. A região do infravermelho encontra-se entre as regiões do visível e no micro-ondas, sendo considerada de baixa energia.

Tipo de alteração quântica:	Alteração de <i>spin</i>		Alteração da orientação	Alteração da configuração	Alteração da distribuição eletrônica		Alteração da configuração nuclear
							
	$10^{-2}$	1	100	$10^4$	$10^6$	Número de onda, $\text{cm}^{-1}$ $10^8$	
	10 m	100 cm	1 cm	100 $\mu\text{m}$	1.000 nm	10 nm	Comprimento de onda 100 $\mu\text{m}$
	$3 \times 10^8$	$3 \times 10^9$	$3 \times 10^{10}$	$3 \times 10^{12}$	$3 \times 10^{14}$	$3 \times 10^{16}$	Frequência, Hz $3 \times 10^{18}$
	$10^{-3}$	$10^{-1}$	10	$10^3$	$10^5$	$10^7$	Energia, $\text{J mol}^{-1}$ $10^9$
Tipo de espectroscopia:	RMN	RSE	Microonda	Infravermelho	Visível e ultravioleta	Raios X	Raios $\gamma$

**FIGURA 01** - REGIÕES DO ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO COM SUAS RESPECTIVAS ENERGIAS E ALTERAÇÕES MOLECULARES

FONTE: WADE (2008)

A radiação infravermelha compreende a faixa de 780 a 100.000 nm ( $7,8 \times 10^{-5}$  a  $1,0 \times 10^{-2}$  cm), sendo dividido em infravermelho próximo (*Near Infrared* – NIR), infravermelho médio (*Middle Infrared* – MIR) e infravermelho distante (*Far Infrared* – FIR) (TABELA 01) (SKOOG *et al.*, 2002).

**TABELA 01** - REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO

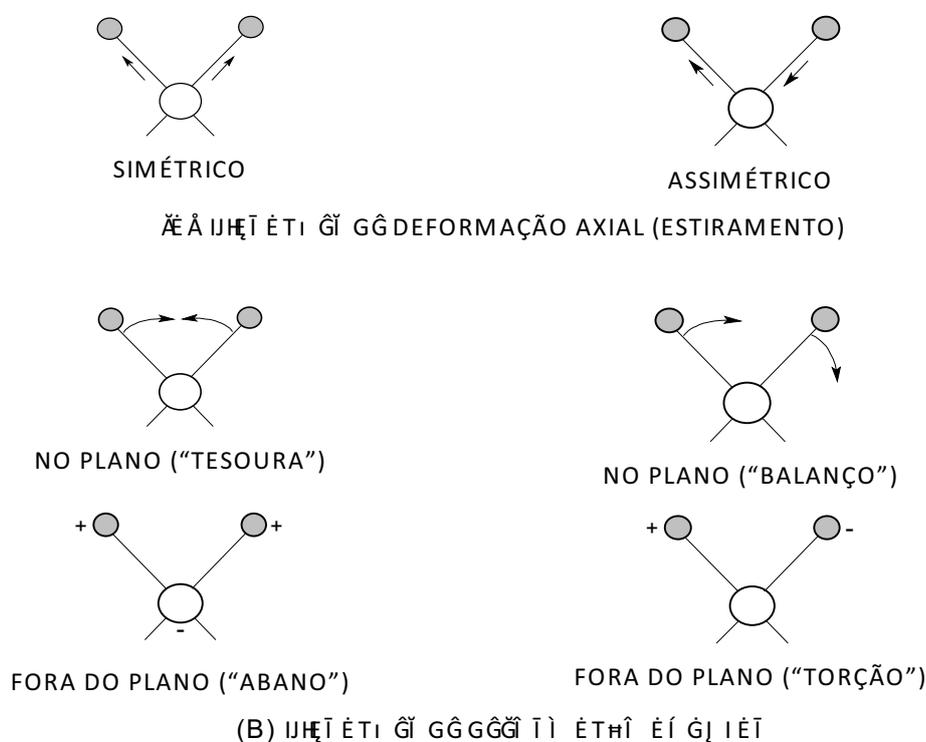
REGIÃO	INTERVALO EM N° DE ONDA ( $\text{cm}^{-1}$ )	INTERVALO EM COMPRIMENTO DE ONDA (nm)
PRÓXIMO	12.800-4.000	780-2.500
MÉDIO	4.000-200	2.500-5.000
DISTANTE	200-10	5.000-100.000

FONTE: Adaptado de SKOOG *et al.* (2002)

Tal radiação induz transições em estados vibracionais e rotacionais associados com o estado eletrônico fundamental das moléculas (SKOOG *et al.*, 2000). Os átomos, ou grupo de átomos, dos compostos orgânicos vibram com maior rapidez e com maior amplitude em torno das ligações covalentes que os unem. Estas vibrações são quantizadas e, quando ocorrem, os compostos absorvem energia infravermelha em certas regiões do espectro.

A deformação axial e a deformação angular são os tipos de vibrações moleculares observados nos espectros no infravermelho (FIGURA 02). A deformação axial ou estiramento é um movimento rítmico ao longo do eixo de ligação em que a distância entre os átomos aumenta ou diminui enquanto que a deformação angular é um movimento em que ocorrem variações nos ângulos das ligações químicas (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A interação de uma molécula com a radiação infravermelha só é possível quando o campo eletromagnético oscila na mesma frequência do momento dipolar dessa molécula, ou seja, ao absorver a radiação de infravermelho a molécula converte esta energia em vibração, gerando um espectro vibracional que costuma aparecer como bandas. Assim, a formação do espectro na região do infravermelho será resultado da frequência de absorção, que depende da massa dos átomos, do arranjo geométrico dos átomos e da força de ligação entre eles (SCHARDER, 1995).



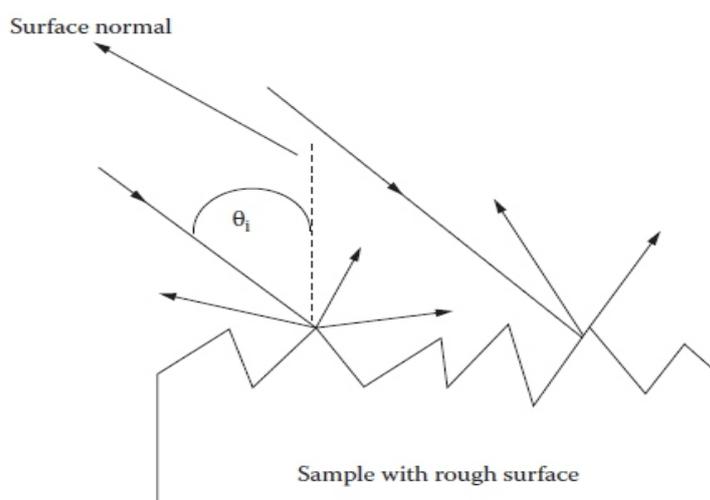
**FIGURA 02** – MODOS DE VIBRAÇÃO MOLECULAR (OS SINAIS + E – INDICAM MOVIMENTOS PARA CIMA E PARA BAIXO DO PLANO, RESPECTIVAMENTE)

**FONTE:** Adaptado de SKOOG *et al.* (2000)

O equipamento que emite a radiação nas moléculas e quantifica a radiação absorvida para realizar as vibrações moleculares é o espectrômetro de infravermelho. Existem dois tipos de instrumentos: os clássicos que possuem um prisma (técnica dispersiva) e os por Transformada de Fourier. Os espectrômetros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) são atualmente os mais utilizados, pois proporcionam um espectro de melhor qualidade, que é adquirido mais rapidamente (STUART, 2004). O FTIR coleta simultaneamente os dados em todas as frequências do espectro e isto só é possível devido ao interferômetro. O interferômetro de Michelson converte a radiação multifrequência, que é constante com o tempo, em um interferograma que é dado não em função da frequência, mas do tempo. Posteriormente, através do processo matemático de transformação de Fourier, o interferograma é convertido em um espectro (HESSE; MEIER; ZEEH, 2008).

Os espectros na região do infravermelho podem ser adquiridos por meio de métodos de transmissão ou por métodos de reflectância. Os métodos de transmissão baseiam-se na absorção da radiação em números de ondas específicos enquanto passam pela amostra, que pode ser líquida, gasosa ou sólida. Já os métodos de reflectância podem ser por meio de reflexão interna como o reflectância total atenuada (ATR) ou por reflexão externa que pode ser especular ou difusa (STUART, 2004).

O método de reflectância difusa ou DRIFTS (do inglês, *diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy*) é realizado principalmente em amostras sólidas pulverizadas e consiste na reflexão da radiação incidente sobre as partículas da superfície da amostra de forma difusa, ou seja, em múltiplas direções, uma vez que a superfície da amostra é irregular (FIGURA 03). Após o espalhamento, a radiação é coletada por espelhos que a direcionam ao detector (BLANCO *et al.*, 2001; STEUER; SCHULZ, 2003; SUN; XIANG; AN, 2004; PARISOTTO *et al.*, 2009;).



**FIGURA 03** - REFLECTÂNCIA DIFUSA EM UMA AMOSTRA DE SUPERFÍCIE IRREGULAR ( $\theta_i$ ; ÂNGULO ENTRE A RADIAÇÃO INCIDENTE E A REFLEXÃO DE UMA AMOSTRA COM SUPERFÍCIE REGULAR).

**FONTE:** SMITH (2011)

---

Este método, nos últimos anos, tem se tornado uma ferramenta de confiável valor para a implementação nas rotinas de análise e controle de qualidade dos ingredientes farmacêuticos ativos, em função de características como possibilidade de análises rápidas, não destrutivas, não invasivas, de baixo custo (instrumental e operacional), e que podem ser realizadas em tempo real tanto em produto acabado quanto na fase de processo (PASQUINI, 2003; KIPOUROS *et al.*, 2005, YANG; IRUDAYARAJ, 2002). Além disso, a técnica tornou-se extremamente atrativa, pois não há necessidade de utilizar solventes orgânicos, não gerando resíduos e assim, podendo ser chamada de sustentável. Outro grande atrativo da técnica é a menor intervenção humana na análise, pela necessidade de mínimo preparo de amostra (menor manipulação da amostra) (LIMA *et al.*, 2009; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012).

A aplicação desta técnica espectrofotométrica não se restringe somente a determinação dos teores de fármacos em diferentes formas farmacêuticas, tais como soluções (FERREIRA; GOMES; SENA, 2009), suspensões (SILVA *et al.*, 2012), pós (FERREIRA *et al.*, 2013), comprimidos intactos (BLANCO; PEGUERO, 2012) e creme de uso tópico (CORRER *et al.*, 2005). É também aplicado na quantificação de fármacos de baixa dosagem (CHALUS *et al.*, 2005), identificação de matérias-primas e excipientes (SWARBRICK, 2008), para medição do tamanho de partícula (ROGGO *et al.*, 2007; BLANCO; PEGUERO, 2008), análise polimórfica (YU, *et al.*, 2004), determinação de umidade em vários produtos intermediários e acabados (WANG *et al.*, 2009) e identificação de medicamentos falsificados (ZHANG *et al.*, 2008; FUA, *et al.*, 2010).

Por tais vantagens, métodos fundamentados em espectroscopia no infravermelho tornaram-se populares na indústria e na pesquisa, tanto na região do infravermelho próximo (XIANG *et al.*, 2009; SARRAGUÇA, LOPES, 2009; ROCHA *et al.*, 2010; SARRAGUÇA, LOPES, 2011) quanto na região do infravermelho médio (ROSSIGNOLI *et al.*, 2008; MALUF *et al.*, 2010; BUNACIU; ABOUL-ENEIN; FLESCHIN, 2010; MAZUREK; SZOSTAK, 2011).

No entanto, a complexidade de sinal e a pouca seletividade observada na espectroscopia no infravermelho (SARRAGUÇA; LOPES, 2009) dificultam o desenvolvimento de métodos de quantificação fundamentados em procedimentos univariados (relação direta entre intensidade de absorção de um dos sinais do espectro com a concentração do analito). Com o advento dos microprocessadores digitais e de técnicas computacionais avançadas, permitiu-se a análise de misturas complexas, como os medicamentos (fármacos e excipientes), em cujos espectros ocorre a sobreposição intensa das bandas, dificultando bastante a determinação direta dos fármacos (DE SOUZA, FERRÃO, PARISOTTO, FURTADO, 2004). Para contornar esta limitação da espectroscopia no infravermelho, a transformada de Fourier aliada às

---

técnicas quimiométricas são cada vez mais utilizadas, de maneira a permitir a utilização somente da informação espectral significativamente interessante para a obtenção do dado quantitativo (POLLANEN *et al.*, 2005; NEUMANN *et al.*, 2004; PARISOTTO *et al.*, 2005).

#### 4.2 Calibração multivariada

A quimiometria é a parte da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para definir ou selecionar as condições ótimas de medidas e experimentos, bem como extrair o máximo de informações a partir da análise de dados químicos (BRUNS *et al.*, 2006).

Uma ferramenta quimiométrica muito útil e que vem sendo bastante difundida na química analítica é a calibração multivariada, a qual permite correlacionar os diferentes fatores que estão presentes numa amostra, especialmente em amostras complexas, como um medicamento. As espectroscopias são grandemente beneficiadas por esta ferramenta, pois com o seu uso, é possível utilizar mais de um comprimento de onda, por exemplo, para a quantificação de uma substância ou mais substâncias, sendo comum o uso de grandes regiões do espectro, ou até mesmo o espectro inteiro, o que representa uma maior confiabilidade para a quantificação (FERREIRA *et al.*, 1999).

Com a sofisticação das técnicas instrumentais, impulsionada pela invasão de microprocessadores e microcomputadores no laboratório químico, tornaram-se necessários tratamentos de dados mais complexos do ponto de vista matemático-estatístico, a fim de relacionar intensidades de sinais obtidos com os resultados desejados. Nesses sistemas, a conversão da resposta instrumental no dado químico de interesse requer a utilização de técnicas de estatística multivariada, álgebra linear e análise numérica. Essas técnicas se constituem numa das principais alternativas para a interpretação de dados e para aquisição do máximo de informações sobre o sistema (BRUNS e FAIGLE, 1985).

Partindo deste aspecto, a quimiometria tem emergido com papel significativo na química analítica, tendo mesmo sido incorporada nos sistemas operacionais de equipamentos analíticos, principalmente quando os componentes presentes numa mistura necessitam ser determinados simultaneamente, mas a informação analítica disponível não apresenta seletividade, devido a sobreposição de bandas na determinação (BRO, 2003; HOPKE, 2003; MILLER, 1995; SENA *et al.*, 2004).

Atualmente, a maioria das metodologias propostas para determinação de fármacos é baseada em técnicas cromatográficas e determinações univariadas. Apesar dessas metodologias estarem bem estabelecidas e serem reconhecidas pelos órgãos reguladores, elas podem apresentar desvantagens em certas situações, tais

como custo e tempo de análise relativamente alto. Desta forma, a partir da última década, o emprego de espectroscopia molecular e calibração multivariada passaram a representar uma alternativa promissora na determinação direta de fármacos e na determinação de um analito ou mais analitos na presença de interferentes (geralmente os excipientes), onde, ao invés da separação físico-química, a análise multivariada permite a modelagem dos interferentes junto ao(s) analito(s) de interesse através da separação quimiométrica de seus sinais (SENA *et al.*, 2004). O desenvolvimento deste tipo de método tornou-se importante, tendo como objetivo sua futura aceitação pelas agências reguladoras (SENA *et al.*, 2007).

O método de calibração multivariada mais amplamente usado em quimiometria é o dos mínimos quadrados parciais, PLS (*Partial Least Squares*) (TAN *et al.*, 2011), usado na construção de modelos de regressão baseados em uma decomposição em variáveis latentes. Para dados espectrofotométricos, os dados instrumentais medidos são organizados na matriz de variáveis independentes (matriz X), representada na FIGURA 04 (a) apresentando uma amostra em cada linha e as respostas instrumentais medidas (valores de absorvância) em cada coluna, para cada comprimento de onda. Em outra matriz de variáveis dependentes (matriz Y), os dados de concentração do analito de interesse serão inseridos, sendo que cada linha corresponde à uma amostra (correspondente à matriz X) e cada coluna corresponde à concentração do analito em pesquisa, conforme FIGURA 04 (b) (FERREIRA *et al.*, 1999; SENA *et al.*, 2007).

$$(a) \quad X = \begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1m} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2m} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ X_{n1} & X_{n2} & \dots & X_{nm} \end{bmatrix} \quad (b) \quad Y = \begin{bmatrix} X_{11} \\ X_{21} \\ \vdots \\ X_{n1} \end{bmatrix}$$

**FIGURA 04** - (A) MATRIZ DE VARIÁVEIS INDEPENDENTES, GERADA POR DADOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS E (B) MATRIZ DE VARIÁVEIS DEPENDENTES

**FONTE:** FERREIRA *et al.*, 1999

Quando um modelo PLS é montado, utilizando na matriz Y dois ou mais componentes, ou seja, quando se busca a quantificação de dois ou mais componentes, esse método é chamado PLS2. Da mesma forma, quando a matriz Y é composta por apenas um componente de interesse, esse modelo é chamado PLS1 (BRERETON, 2000; SENA *et al.*, 2004). Utilizando os mesmos dados experimentais e montando diferentes modelos, verificam-se diferenças na previsão das concentrações estimadas para os analitos em estudo, quando se utiliza PLS1 e PLS2, o que demonstra a

influência da concentração nesse tipo de modelamento. Em alguns casos, a estimativa da concentração no PLS2 é pior do que aquela estimada por PLS1. Entretanto, PLS2 fornece informações úteis, como a faixa espectral que pode ser mais significativa e quais concentrações podem ser determinadas com maior grau de confiança. Dessa forma, utilizar PLS2 para montar um modelo multivariado inicial pode ser uma boa estratégia para, posteriormente, montar modelos utilizando PLS1 que forneçam melhores resultados de previsão (PASQUINI, 2003).

Ao montar um modelo de calibração multivariada, deve-se tomar cuidado com a escolha do número de variáveis latentes. Essa escolha, que pode ser realizada pelo software utilizado, deve ser avaliada pelo operador, para evitar que um grande número de variáveis latentes seja escolhido e cause prejuízo nas previsões realizadas pelo modelo. Durante a montagem do modelo, cada número de variáveis latentes explica uma porção dos dados utilizados, chamada de variabilidade. Com o aumento do número de variáveis latentes, a explicação dessa variabilidade aumenta, incluindo aqui, a chance de um ruído ser explicado por uma variável latente, por exemplo. Dessa forma, a avaliação do operador é indispensável. Para essa avaliação, o uso de um conjunto de amostras externas pode ser utilizado. A avaliação das diferenças entre os resultados finais previstos pelo modelo e os valores de referência é uma forma segura de otimizar o número de variáveis latentes a serem escolhidos (PASQUINI, 2003).

Além da utilização de um conjunto de amostras externas ao modelo, uma validação cruzada pode ser utilizada na busca da otimização do número de variáveis latentes a ser escolhido para a montagem do modelo (PASQUINI, 2003). Na validação cruzada, cada amostra é retirada do modelo, o modelo é construído novamente e essa amostra que foi retirada é utilizada para uma previsão da concentração do analito. O erro de previsão é calculado. Esse procedimento é feito para todas as amostras do modelo. A soma dos quadrados dos erros de previsão é feita. Quando o valor dessa soma apresentar o menor valor, este pode ser avaliado como o melhor número de variáveis latentes (FERREIRA *et al.*, 1999).

Outro fator importante é a detecção das anomalias, a qual é um fator determinante para a capacidade preditiva do modelo de calibração (FERREIRA *et al.*, 1999; PASQUINI, 2003). A *leverage* ('*influência*') determina a influência da amostra no modelo multivariado, podendo ser interpretada, geometricamente, como a distância de uma amostra ao centróide do conjunto de dados. Valores pequenos de *leverage* indicam que a amostra em questão influi pouco na construção do modelo de calibração, ou seja, não requer mais uma variável latente para sua explicação (FERREIRA *et al.*, 1999). O resíduo de *Student* verifica se a amostra está ou não dentro de uma distribuição normal dos dados, com um nível de confiança de 95%. Como a unidade de desvio padrão do valor médio é utilizada para definir esse parâmetro, os valores para o resíduo de *Student* são definidos como  $\pm 2,5$ . Valores acima destes, são considerados

---

anomalias (FERREIRA *et al.*, 1999).

Uma validação, utilizando amostras que não foram utilizadas na construção do modelo, é o passo final para garantir a capacidade preditiva deste. A utilização dessas amostras externas produz dados mais confiáveis (PASQUINI, 2003).

Quando o modelo for utilizado para a previsão de novas amostras, estas devem estar na faixa de concentração das amostras utilizadas para a construção do modelo (FERREIRA *et al.*, 1999).

O modelo desenvolvido deve ser verificado periodicamente, para avaliar a flutuação que pode ser inerente ao equipamento. O uso rotineiro de um modelo também pode requerer a inclusão de novas amostras de referência, assim como a verificação da otimização para garantir a robustez deste modelo (PASQUINI, 2003).

### **4.3 Validação de métodos baseados na espectroscopia na região do infravermelho e calibração multivariada**

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de um método conhecido envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório (BRITO *et al.*, 2003). Esse processo denomina-se validação.

Um método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos em farmacopeias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos por órgãos fiscalizadores pertinentes (ANVISA, 2003; BRITO *et al.*, 2003; RIBANI, *et al.*, 2004; INMETRO, 2010; ICH, 2005).

No Brasil, os órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a ANVISA e o INMETRO. A legislação brasileira que determina quais figuras de mérito devem ser analisadas e em quais categorias de produtos (conforme sua finalidade) é a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA, sendo esta o “Guia para validação de métodos analíticos e bionalíticos”.

AANVISA (2003) preconiza que o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi ou quantitativa de fármacos. Os parâmetros (figuras de mérito) a serem determinados e o grau de exigência de cada um dependem da aplicação e do propósito regulado por uma norma de um órgão de fiscalização ou dos guias de validação internacionalmente reconhecidos.

Na prática, a validação de métodos quantitativos baseados na região do infravermelho com calibração multivariada, aplicados na determinação de ativos farmacêuticos nos laboratórios da indústria farmacêutica de controle de qualidade, ainda não está devidamente regulamentada pelos órgãos de fiscalização, tanto nacionais quanto internacionais (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Em 2012, a ASTM (*American Society for Testing and Materials*) publicou a norma

---

E-1655-05, descrevendo especificamente o desenvolvimento e a validação de modelos de calibração multivariada a partir da espectroscopia no infravermelho (ASTM, 2012). Esta norma vem sendo aplicada em uma variedade de métodos com calibração multivariada para quantificação de diversos tipos de analitos, incluindo medicamentos, reportando recomendações relativas à preparação das amostras dos conjuntos de calibração e validação interna, dos parâmetros estatísticos para avaliar, otimizar e validar os modelos. No entanto, esta norma não abrange todos os testes necessários e requeridos pelos órgãos de fiscalização. Em alguns trabalhos nacionais e internacionais publicados, os parâmetros de validação aplicados em métodos multivariados utilizaram alguns testes definidos pelas normas univariadas e outros por recomendações para análises multivariadas seguindo esta norma (SENA *et al.*, 2007; PIANTAVINI *et al.*, 2014).

No Brasil, a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA é utilizada para a definição de alguns dos testes de validação para métodos multivariados. Entre eles estão os testes de precisão, robustez e estabilidade. Já para os testes de exatidão, seletividade, sensibilidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação são normalmente seguidas as recomendações da norma da ASTM (2012). Testes adicionais, como o teste para erro sistemático (*bias*) e o desvio residual de previsão das amostras de calibração e das amostras de validação, também são normalmente realizados para métodos multivariados (FERREIRA; BRAGA; SENNA, 2012).

Por se tratar de uma área de aplicação recente, com diversas vantagens em seu uso, os métodos empregando a espectroscopia na região do infravermelho associada a calibração multivariada serão cada vez mais empregados, tanto para análises de rotina, em indústrias ou farmácias magistrais, como para análises de fiscalização. Caberá, então, aos órgãos reguladores nacionais (ANVISA, INMETRO), a definição de quais e como estes parâmetros serão aplicados aos métodos multivariados.

## 5. COMENTÁRIOS

Novas metodologias visando a identificação, quantificação e controle de qualidade dos produtos farmacêuticos têm sido empregadas pelo crescente desenvolvimento da espectroscopia no infravermelho e da quimiometria.

As técnicas espectroscópicas na região do infravermelho (médio e próximo), através do modo reflectância difusa, associadas às ferramentas quimiométricas apresentam um grande potencial na quantificação de princípios ativos, especialmente em misturas complexas, com possibilidade de quantificação simultânea de dois ou mais ativos, sem a necessidade de qualquer separação prévia de seus componentes.

---

Além disso, os métodos espectroscópicos multivariados apresentam grande aplicabilidade, pois são metodologias analíticas simples, com baixo gerar resíduos, bem como o baixo custo (operacional e instrumental). Tais vantagens tornam a espectroscopia na região do infravermelho associada à calibração multivariada uma excelente alternativa para análises de rotina de laboratórios de controle de qualidade de medicamentos, no monitoramento do processo produtivo de indústrias farmacêuticas e, até mesmo, no controle de qualidade de formulações magistrais.

## 6. REFERÊNCIAS

ANVISA. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos - Resolução - RE no 899**. ed, 2003.

ASTM. **E1655-05: Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis**. ed. West Conshohocken, 2012.

BLANCO, M., *et al.* Analytical control of pharmaceutical production steps by near infrared reflectance spectroscopy. **Anal. Chim. Acta**, v. 392, n. 2-3, p.237-246, 1999a.

BLANCO, M. *et al.* Development and validation of methods for the determination of miokamycin in various pharmaceutical preparations by use of near infrared reflectance spectroscopy. **Analyst, London**, v. 124, n. 7, p. 1089-1092, 1999b.

BLANCO, M. *et al.* Influence of the procedure used to prepare the calibration sample set on the performance of near infrared spectroscopy in quantitative pharmaceutical analyses. **Analyst**, v. 126, n. 7, p.1129-1134, 2001.

BLANCO, M.; PEGUERO, A. An expeditious method for determining particle size distribution by near infrared spectroscopy: Comparison of PLS2 and ANN models. **Talanta** **77**, 647-651, 2008.

BLANCO, M.; A. PEGUERO, A new and simple PLS calibration method for NIR spectroscopy. API determination in intact solid formulations. **Anal. Methods**, 1507–1512, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. Diário Oficial da União. 19 abr 2010; Seção 1:79-83.

BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, v. 125, n. 11, p.2125-2154, 2000.

---

BRITO, N. M. *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, n., p.129-146, 2003.

BRO, R.; Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemist. **Anal. Chim. Acta**, 500, 85, 2003.

BROWN, M. J. *et al.* Better blood pressure control: how to combine drugs. **J Hum Hypertens**, v. 17, n. 2, p.81-86, 2003.

BRUNS, R.E.; NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S. “25 Anos de quimiometria no Brasil”, **Quím. Nova** 29:1401, 2006.

BRUNS, R.E.; FAIGLE, J.F.G.; “Quimiometria”, **Quím. Nova** 8:84, 1985.

BUNACIU, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; FLESCHEIN, S. Application of Fourier Transform infrared spectrophotometry in pharmaceutical drugs analysis. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 45, n. 3, p.206-219, 2010.

CHALUS, P, Y. ROGGO, S.WALTER, M. ULMSCHNEIDER, Near-infrared determination of active substance content in intact low-dosage tablets, **Talanta** **66**, 1294–1302, 2005.

CORRER, C. J.; CORDEIRO, G.; GASPARETTO, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; PONTAROLO, R.; Determination of kojic acid in pharmaceutical products by UV-Vis spectrophotometry and multivariate calibration **Acta Farm. Bonaerense**. 24, 416, 2005

DE SOUZA, J.S.; FERRÃO, M.F.; PARISOTTO, G.; FURTADO, J.C. Análise de medicamentos antiinflamatórios não-esteróides manipulados empregando espectroscopia no infravermelho (DRIFTS). **Rev. Cienc. Farm.**, Araraquara, v.25, n.2, p.91-98, 2004.

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, 193, 2007.

ESCOBAR, C.; BARRIOS, V. Combined therapy in the treatment of hypertension. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 1, p.3-8, 2009.

FERREIRA, M. M. C. *et al.* Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v., n. 22, p.724, 1999.

---

FERREIRA, M. H., GOMES, J. F. F., SENA, M. M., Development and validation of a multivariate calibration model for determination of dipyrone in oral solutions by near infrared spectroscopy, **J. Braz. Chem. Soc.** 20, 1680–1686, 2009.

FERREIRA, M. H.; BRAGA, J. W. B.; SENA, M. M. Development and validation of a chemometric method for direct determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples by diffuse reflectance near infrared spectroscopy. **Microchemical Journal**, 2012.

FERREIRA, M. H.; BRAGA, J. W. B.; SENA, M. M. Development and validation of a chemometric method for direct determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples by diffuse reflectance near infrared spectroscopy. **Microchemical Journal** 109, 158–164, 2013.

FUA, Q. *et al.* Construction of a universal quantitative model for ibuprofen sustained-release capsules from diferente manufacturers using near-infrared diffuse reflection spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy** 53, 214-217, 2010.

GRADMAN, A. H. *et al.* Combination therapy in hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 4, n. 2, p.90-98, 2010.

GIL, E.S. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, 2008. p. 486.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2001.

HERKERT, T., PRINZ, H., KOVAR, K. One hundred percent online identity check of pharmaceutical products by near infrared spectroscopy on the packaging line. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 51, n. 1, p. 9 - 16, 2001.

HESSE, M.; MEIER, H.; ZEEH, B. **Spectroscopy Methods in Organic Chemistry**. 2<sup>a</sup>. ed: Thieme, 2008.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios da Análise Instrumental**. 6<sup>a</sup>. ed, 2009.

HOPKE, P. K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, n. 1-2, p.365-377, 2003.

---

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH. **ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**, 2005.

LIMA, K. M. G. et al. Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p.1635-1643, 2009.

MALUF *et al.* Determinação de sibutramina em formas farmacêuticas através de espectroscopia no infravermelho com refletância difusa e métodos de calibração multivariada, **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 3, 649-652, 2010.

MAZUREK, S.; SZOSTAK, R. Comparison of infrared attenuated total reflection and Raman spectroscopy in the quantitative analysis of diclofenac sodium in tablets. **Vibrational Spectroscopy**, v. 57, n. 1, p.157-162, 2011.

MILLER, C. E.; The use of chemometric techniques in process analytical method development and operation. **Chemom. Intell. Lab. Syst.**, 30, 11-22, 1995.

NEUMANN, L.G.; FERRÃO, M.F.; PARISOTTO, G.; DE SOUZA, J.S.; KONZEN, P.H.A.; BRUXEL JUNIOR, V.; FURTADO, J.C. Algoritmo genético na otimização de HCA de espectros por reflexão difusa no infravermelho de medicamentos antiinflamatórios. **Tecno-Lóg.**, Santa Cruz do Sul, v. 8, n.2, p.9-28, 2004.

PARISOTTO, G. *et al.* Análise exploratória aplicada no estudo de medicamentos contendo piroxicam. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 41, n. 4, 2005.

PARISOTTO, G. *et al.* Desenvolvimento de metodologias no infravermelho aplicadas para a quantificação de cloridrato de metformina em formulações farmacêuticas. **Orbital**, v. 1, n. 1, p.38-48, 2009.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals practical aspects and analytical applications. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n.2, p.198-219, 2003.

PIANTAVINI, M. S., F.L.D.PONTES, C.P. UBER, D.P. STREMEL, M.M. SENA, R. PONTAROLO, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** 125 (2014) 396–40.

---

PÖLLÄNEN, K. *et al.* DRIFT-IR for quantitative characterization of polymorphic composition of sulfatiazole. **Anal. Chim. Acta**, 544, 108, 2005.

ROCHA, W.F.C.; ROSA, A.L.; MARTINS, J.A.; POPPI, R.J. Determination and validation of nimesulide in pharmaceutical formulation by near infrared spectroscopy, **J. Braz. Chem. Soc.** **21**, 1929–1936, 2010.

ROGGO, Y. *et al.* A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical Technologies. **J. Pharm. Biomed. Anal.** **44**, 683, 2007

SARRAGUÇA, M.C; J.A. LOPES, The use of net analyte signal (NAS) in near infrared spectroscopy pharmaceutical applications: Interpretability and figures of merit, **Anal. Chim. Acta** **642**, 179–185, 2009.

SARRAGUÇA, M. C.; SOARES, S. O.; LOPES, J. A. A near-infrared spectroscopy method to determine aminoglycosides in pharmaceutical formulations. **Vibrational Spectroscopy**, v. 56, n. 2, p.184-192, 2011.

SCHARDER, B. **Infrared and Raman Spectroscopy: method and applications**. 1. ed: VCH, 1995.

SENA, M. M. *et al.* Determinação Espectrofotométrica Simultânea de Paracetamol e Ibuprofeno em Formulações Farmacêuticas usando Calibração Multivariada. **Quim. Nova** 30:75, 2007.

SENA, M. M. *et al.* Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 4, p.743-749, 2004.

SILVA, M.A.M.; FERREIRA, M.H.; BRAGA, J.W.B.; SENA, 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, 800, 2009.

SILVA, M.A.M.; FERREIRA, M.H.; BRAGA, J.W.B.; SENA, M.M. Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of amoxicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy, **Talanta** **89**, 342–351, 2012.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH Analytical Chemistry: an introduction. 7<sup>th</sup> ed., p. 551, 2000.

---

SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOLOMONS, T. W. G. **Química orgânica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1996.

STEUER, B.; SCHULZ, H. Near-infrared analysis of fennel (*Foeniculum vulgare* Miller) on different spectrometers – Basic considerations for a reliable network. **Phytochem. Anal., Sussex**, v.14, p.285-289, 2003.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. 1. ed: John Wiley & Sons, Ltd, 2004

SUN, M.L.; XIANG, B.R.; AN, D.K. A near-infrared diffuse reflectance analysis method for the noninvasive quantitative analysis of ambroxol hydrochloride tablets. **Yao Xue Xue Bao**, v.39, n.1, p.60-63, 2004.

SWARBRICK, B. Process analytical technology: a strategy for keeping manufacturing viable in Australia **Vib. Spectrosc.** **44**, 171-8, 2008.

TAN, C. *et al.* A simple ensemble strategy of uninformative variable elimination and partial least-squares for near-infrared spectroscopic calibration of pharmaceutical products. **Vibrational Spectroscopy**, 2011.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi**, v. 11, n. 2, p.26-31, 2007.

XIANG, D.; KONIGSBERGER, M.; WABUYELE, B.; HORNING, K.; CHENEY, J. Development of robust quantitative methods by near-infrared spectroscopy for rapid pharmaceutical determination of content uniformity in complex tablet matrix, **Analyst** **134**, 1405-1415, 2009.

YANG H., IRUDAYARA, J. J. Rapid determination of vitamin C by NIR, MIR and FT-Raman techniques. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.54, n.9, p.1247-1255, 2002.

YU, L. X., et al. Applications of process analytical technology to crystallization process. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 56, p.349-369, 2004.

WANG, H.G.; SENIOR, P.R.; MANN, R.; YANG, W.Q. Online measurement and control of solids moisture in fluidized bed dryers. **Chim. Eng. Sci.** **64**, 2893-2902, 2009.

---

---

ZAMORA, P.P. *et al.* Alternativas quimiométricas para a resolução de problemas analíticos clássicos. Determinação espectrofotométrica de misturas de zircônio e háfnio. **Quím. Nova**, v. 20, n. 5, p. 469-474, 1997.

ZARONI; NETA; PONTAROLO. Ensaio de controle de qualidade aplicados às formas farmacêuticas. In: VIEIRA, REDIGUIERI; REDIGUIERI. **A regulação de medicamentos no Brasil**. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 470-472.

ZHANG, X.B., FENG, Y.C., HU, C.Q. Feasibility and extension of universal quantitative models for moisture content determination in beta-lactam powder injections by near-infrared spectroscopy. **Anal. Chim. Acta** **630**, 131, 2008.