



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

LAQQA – Laboratório de Quimiometria em Química

Analítica

**MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS APLICADOS À ANÁLISE DE
MEDICAMENTOS POR ESPECTROSCOPIA DE IMAGENS**

Tese de doutorado

RENATO LAJARIM CARNEIRO

Orientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi

Campinas

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO
DE QUÍMICA DA UNICAMP**

C215m Carneiro, Renato Lajarim.
Métodos quimiométricos aplicados à análise de
medicamentos por espectroscopia de imagens /
Renato Lajarim Carneiro. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Ronei Jesus Poppi.

Tese - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Espectroscopia de imagens. 2. Quimiometria.
3. Infravermelho próximo. 4. Uniformidade de
conteúdo. I. Poppi, Ronei Jesus. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Chemometric methods applied to the analysis of drugs by imaging spectroscopy

Palavras-chaves em inglês: Imaging spectroscopy, Chemometric, Near infrared, Content uniformity

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Ronei Jesus Poppi (orientador), Edenir Rodrigues Pereira Filho (DQ-UFSCAR), Gilmar Antônia da Silva (DQ-UFOP), Maria Izabel Maretti Silveira Bueno (IQ-UNICAMP), Fabio Augusto (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 22/01/2010

*Dedico esse trabalho a todos aqueles que fizeram parte
desta minha caminhada;*

*À minha família, que sempre me apoiou e acreditou no meu
trabalho;*

*Àqueles cujos nossos caminhos se cruzaram e fizeram mais
prazerosa minha jornada.*

“Não podemos escolher o que plantamos, mas podemos escolher o que semeamos”

"Aquele que é infiel à sua própria consciência, tem uma dívida impagável consigo mesmo."

AGRADECIMENTOS

- Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que me guiou pelo caminho da persistência, da paciência e me deu o discernimento necessário para escolher a direção a ser seguida nos momentos de dúvida;
- Ao meu pai Uri, minha mãe Marlene, e meus irmãos Wagner e Gustavo, pelo apoio e compreensão durante esses anos;
- Ao Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi, pela orientação e oportunidade de realizar esse trabalho;
- Ao Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga, pela amizade e parceria nos trabalhos;
- Aos amigos de república: Marcelo, Thiago, Pedro, Haroldo, Elmer, Juliana, Raquel e Klécia;
- Aos amigos do laboratório: Jez, Alessandra, Gilmare, Danilo, Werickson, Paulo Henrique e Patricia;
- Aos amigos do Intituto Internacional de Pesquisas Farmacêuticas: Cassiane, Carla, Régis, Renar, André, Fabiana, Rosana, Cibele, Silvia, Ana, Anderson, Fernando, Paula, Patricia, Jardel, Gustavo, Juliana, Débora e José;

- Aos amigos do P&D – Internacional EMS: Juliana Barbosa, Juliana Ferreira, Fernando, João, Lizane, Bianca, Flávia, Letícia, Renata, Márcia, Vanessa e Lílian;
- Ao CNPq e à FAPESP, pelas bolsas de doutorado (parciais);
- À UNICAMP, instituição que forneceu a estrutura necessária para o desenvolvimento da tese;
- À EMS S./A., empresa em que trabalhei durante o doutorado e que possibilitou também a realização deste trabalho;
- E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma com minha formação pessoal e profissional, e que (por esquecimento) não foram citados anteriormente.

SÚMULA CURRICULAR

1. Dados pessoais

- Estado civil: Solteiro;
- Nacionalidade: Brasileiro;
- Data de nascimento: 27/11/1982;
- Naturalidade: Assis Chateaubriand – PR;
- E-mail: renato.carneiro@hotmail.com

2. Formação Acadêmica

- 2.1 Doutorado (08/2007 a 01/2010): Doutorado em Química Analítica na Universidade Estadual de Campinas. Título da tese: *Métodos quimiométricos aplicados à análise de medicamentos por espectroscopia de imagens*. Orientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi.
- 2.2 Mestrado (08/2005 a 07/2007): Mestrado em Química Analítica na Universidade Estadual de Campinas com permanência de 6 meses no Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IIQAB-CSIC), Barcelona, Espanha. Título da dissertação: *Algoritmos genéticos para seleção de variáveis em métodos de calibração de segunda ordem*. Orientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi.
- 2.3 Graduação (02/2001 a 12/2004): Graduação em Bacharelado em Química com atribuições de Bacharel em Química e Química Tecnológica na Universidade Estadual de Londrina. *Título da tese de conclusão de curso*: Salga mista com NaCl e KCl em queijo prato através de salmoura agitada - Modelagem da difusão multicomponente com o emprego do método de elementos finitos. *Orientador*: Prof. Dr. Dionisio Borsato.

3. Artigos completos publicados em periódicos

- BRAGA, J.W.B.; CARNEIRO, R. L. ; POPPI, R.J.. Evaluation of the number of factors needed for residual bilinearization in BLLS and UPLS models to achieve the second-order advantage. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 100 (2), p. 99, 2010.
- CARNEIRO, R. L. ; BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J.; TAULER, R.. Multivariate curve resolution of pH gradient flow injection mixture analysis with correction of the Schlieren effect. *Analyst (London)*, v. 133, p. 774, 2008.
- BONA, E. ; CARNEIRO, R. L. ; BORSATO, D. ; SILVA, R. S. S. F.; FIDELIS, D. A. S. ; Silva, L. H. Monken e . Simulation of NaCl and KCl mass transfer during salting of Prato cheese in brine with agitation: a numerical solution. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 24, p. 337, 2007.
- CARNEIRO, R ; BRAGA, J.W.B.; BOTTOLI, C ; POPPI, R.. Application of genetic algorithm for selection of variables for the BLLS method applied to determination of pesticides and metabolites in wine. *Analytica Chimica Acta*, v. 595, p. 51-58, 2007.
- CARNEIRO, R. L. ; SILVA, R. S. S. F. ; BORSATO, D. ; BONA, E.. Métodos de gradiente para otimização simultânea: estudo de casos de sistemas alimentares.. *Semina. Ciências Agrárias*, v. 26, n. 3, p. 353-362, 2005.

3. Resumos expandidos publicados em anais de congressos

- CARNEIRO, R. L. ; BRAGA, J. W. B. ; POPPI, R. J. . Genetic Algorithm and NPLS for determination of riboflavin and pyridoxine on milk preparations by molecular fluorescence. In: 11th International Conference on Chemometrics for Analytical Chemistry, 2008, Montpellier. 11th International Conference

on Chemometrics for Analytical Chemistry - Abstract Book, 2008., 2008. v. 3. p. 199-203.

- BRAGA, J. W. B. ; CARNEIRO, R. L. ; POPPI, R. J. . A new approach to estimate the numbers of factors in residual bilinearization for BLLS and UPLS models. In: 11th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, 2008, Montpellier. 11th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, 2008, Montpellier. Abstract Book, 2008. v. 1. p. 243-248.

4. Alguns resumos publicados em anais de congressos

- BRAGA, J. W. B. ; CARNEIRO, R ; POPPI, R. J. . Estimativa dos intervalos de confiança para determinações com UPLS/RBL empregando a vantagem de segunda-ordem. In: 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador. 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica - Livro de resumos, 2009.
- BRAGA, J. W. B. ; CARNEIRO, R ; POPPI, R. J. . Determinação da seletividade em modelos UPLS/RBL em situações onde a vantagem de segunda-ordem é empregada. In: 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador. 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica - Livro de resumos, 2009.
- BRAGA, J. W. B. ; CARNEIRO, R. L. ; POPPI, R. J. . Desenvolvimento e validação de um método analítico por FIA e BLLS, aplicado à determinação simultânea de AAS e AA em medicamentos.. In: 30ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindoia.. 30ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química. Resumos, 2007.

- CARNEIRO, R. L. ; BRAGA, J. W. B. ; POPPI, R. J. . Emprego de Algoritmos Genéticos para seleção de variáveis na determinação das vitaminas B2 e B6 em preparações lácteas por fluorescência e NPLS.. In: : 14^o Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa. Livro de resumos do 14^o ENQA, 2007., 2007..
- CARNEIRO, R. L. ; BRAGA, J. W. B. ; POPPI, R. J. . Comparação entre modelos de calibração de segunda ordem BLLS-RBL e NPLS-AG na quantificação de ácido ascórbico e ácido acetilsalicílico em medicamentos por FIA-DAD.. In: II Congresso Iberoamericano e IV Congresso Argentino de Química Analítica., 2007, Buenos Aires. Libro de Resúmenes II Congresso Iberoamericano e IV Congresso Argentino de Química Analítica., 2007.

4. Outros

- Estágio de 08/2004 a 02/2005 na Cia. Iguazu de Café Solúvel nos departamentos de Controle de Qualidade e Pesquisa e Desenvolvimento, onde foi realizada validação de métodos analíticos empregados;
- Funcionário da empresa EMS S./A. a partir de 03/2008, na ocupação de Pesquisador/Supervisor de projetos.

RESUMO

Título: MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS APLICADOS À ANÁLISE DE MEDICAMENTOS POR ESPECTROSCOPIA DE IMAGENS

Autor: Renato Lajarim Carneiro

Orientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi

Foram estudadas metodologias quimiométricas para análises exploratórias e quantitativas de preparações farmacêuticas utilizando a técnica de espectroscopia de imagens na região do infravermelho próximo (NIR) e início do infravermelho médio (MIR). Foram realizadas três aplicações como segue: ① Análise exploratória para diagnosticar separações de fases em um medicamento apresentado na forma de pomada. Foram utilizados os métodos de Análise das Componentes Principais (PCA) e Resolução Multivariada de Curvas – Quadrados Mínimos Alternados (MCR-ALS). Foi possível constatar que o solvente do princípio ativo (API) não formava uma fase estável com o veículo utilizado, ocorrendo separação de fases; ② Análise exploratória para diagnosticar formação de cristais em um medicamento apresentado na forma de creme (emulsão). Foram utilizados os métodos PCA e MCR-ALS. Foi observada a cristalização do API com o solvente utilizado; ③ Determinação da distribuição superficial do princípio ativo e excipientes em comprimidos, avaliando a homogeneidade da amostra. Foram utilizados modelos PCA para análise exploratória e modelos Quadrados Mínimos Parciais por Intervalos (iPLS) para quantificação. Os mapas de concentração mostraram que o medicamento em questão era homogêneo com exceção de alguns cristais presentes.

De maneira geral, a técnica de espectroscopia de imagens mostrou grande potencial na determinação da homogeneidade de fármacos, gerando resultados que podem ser interpretados visualmente através dos mapas de absorção, escores ou de concentração.

ABSTRACT

Title: CHEMOMETRIC METHODS FOR ANALYSIS OF PHARMACEUTICAL PREPARATIONS BY IMAGING SPECTROSCOPY

Author: Renato Lajarim Carneiro

Adviser: Dr. Ronei Jesus Poppi

Chemometric methods were studied for exploratory and quantitative analysis of pharmaceutical preparations using near and mid infrared (NIR and MIR) imaging spectroscopy. Three applications were accomplished as follows: (1st) Exploratory analysis to diagnose phase separation in a ointment formulation. It was used Principal Component Analysis (PCA) and Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Squares (MCR-ALS) methods. Phase separation was observed between ointment base (vehicle) and solvent of the active ingredient (API); (2nd) Exploratory analysis to diagnose crystallization process in a cream (emulsion). It was used PCA and MCR-ALS methods. Crystallization was observed after stability period due precipitation of a API salt; (3rd) Determination of superficial distribution of the API and excipients in tablets in order to evaluate sample homogeneity. PCA models were used for exploratory analysis and Interval Partial Least Squares (iPLS) model was applied for API and excipient quantification. Concentration maps of tablets showed good API and excipient homogeneity, except for a few large crystals.

These applications showed that imaging spectroscopy is a powerful tool for homogeneity studies of pharmaceutical preparations. Results of three applications could be visually interpreted through absorption, score and concentration maps.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	xxiii
LISTA DE FIGURAS.....	xxv
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS GERAIS.....	1
1.1 Imagens hiperespectrais, RGB e escala de cinza.....	3
1.2 Imagens hiperespectrais da superfície terrestre.....	7
1.3 Espectroscopia de imagens com resolução micrométrica.....	10
1.4 Spotlight 400N FT-NIR Imaging System.....	12
1.5 Objetivos.....	14
CAPÍTULO 2 – DEFINIÇÕES E MÉTODOS MATEMÁTICOS E QUIMIOMÉTRICOS UTILIZADOS.....	15
2.1 Propriedades locais versus propriedades globais.....	17
2.2 Definindo a “ordem” dos dados de espectroscopia de imagens.....	18
2.2.1 Dados de ordem zero.....	20
2.2.2 Dados de primeira ordem.....	20
2.2.3 Dados de segunda ordem.....	21
2.3 Desdobramento de imagens espectrais.....	23
2.4 Modelos para dados de primeira ordem (bilineares).....	24
2.4.1 PCA.....	25
2.4.2 MCR-ALS.....	28
2.4.3 iPLS.....	31
2.5 Rotinas utilizadas.....	33

CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DA HOMOGENEIDADE DE UM MEDICAMENTO APRESENTADO COMO POMADA.....	35
3.1 Introdução e objetivos.....	37
3.2 Parte experimental.....	38
3.3 Resultados e discussões.....	39
3.3.1 Análise prévia.....	39
3.3.2 Análise das componentes principais.....	45
3.3.3 Resolução multivariada de curvas.....	51
3.4 Conclusões.....	54
 CAPÍTULO 4 – ANÁLISE DE PRECIPITADOS EM MEDICAMENTO APRESENTADO COMO CREME.....	 57
4.1 Introdução e objetivos.....	59
4.2 Parte experimental.....	59
4.3 Resultados e discussões.....	61
4.3.1 Análise prévia.....	61
4.3.2 Análise das componentes principais.....	65
4.3.3 Resolução multivariada de curvas.....	69
4.4 Conclusões.....	72
 CAPÍTULO 5 – ANÁLISE DE PRECIPITADOS EM MEDICAMENTO APRESENTADO COMO CREME.....	 75
5.1 Introdução e objetivos.....	77
5.2 Parte experimental.....	78
5.3 Resultados e discussões.....	83
5.3.1 Resultados preliminares por análise convencional de espectroscopia NIR de reflectância.....	83
5.3.2 Análise das componentes principais para dados de espectroscopia de imagens.....	86

5.3.3	Análise quantitativa utilizando iPLS para dados de espectroscopia de imagens.....	91
5.4	Conclusões.....	104
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES.....		107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição planejada para cada um dos 10 pontos padrões.....	81
Tabela 2 – Composição real em porcentagem para cada um dos 10 pontos padrões.....	82
Tabela 3 – Porcentagem de variância explicada em cada PC para cada conjunto de replicata de cada padrão.....	85
Tabela 4 – Intervalo utilizado do espectro, número de PCs e os erros absolutos médios de previsão para o iPLS.....	92
Tabela 5 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do primeiro padrão.....	94
Tabela 6 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do segundo padrão.....	95
Tabela 7 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do terceiro padrão.....	96
Tabela 8 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do quarto padrão.....	97
Tabela 9 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do quinto padrão.....	98
Tabela 10 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do sexto padrão.....	99

Tabela 11 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do sétimo padrão.....100

Tabela 12 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do oitavo padrão.....101

Tabela 13 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do nono padrão.....102

Tabela 14 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do décimo padrão.....103

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 – Ilustração da informação obtida a partir de uma solução (a), e a partir de uma amostra analisada como imagem (b). Na primeira temos um só valor de concentração, na segunda temos um valor de concentração para cada pixel.....3

Figura 2 – Ilustração do sistema somatório de cores RGB.....4

Figura 3 – Representação de imagens com 10 x 10 pixels. (a) Imagem em escala de cinza de 8 bits, cada pixel possui um valor inteiro entre 0 e 255; (b) Imagem colorida padrão RGB, cada pixel possui três valores inteiros entre 0 e 255; (c) Imagem hiperespectral, cada pixel possui n valores, onde n é o número de comprimentos de onda monitorados pelo equipamento.....5

Figura 4 – Imagem do vulcão do Monte Etna, em destaque, (3.350 metros de altitude) adquirida pelo ENVISAT/MERIS em 25 de novembro de 2006.....8

Figura 5 – Equipamento Spotlight 400N FT-NIR Imaging System da Perkin-Elmer. A) óptica do equipamento de imagem; B) espectrofotômetro NIR, C) posicionador de amostra; D) joystick controlador do posicionador de amostras.....12

Figura 6 – Esquema óptico do equipamento Spotlight 400N FT-NIR Imaging System da Perkin-Elmer.....13

Figura 7 – Esquema óptico de uma lente Cassegrain.13

Capítulo 2

Figura 8 – Os quadrados representam pixels. a) Representa a análise de uma imagem hiperespectral de uma placa de Petri, onde a finalidade é encontrar o número total de UFC. b) Representa a análise de uma imagem hiperespectral de um fármaco em um comprimido, a informação espacial é mantida a fim de estudar a homogeneidade da amostra.....17

Figura 9 – Representação esquemática dos diferentes tipos de dados em um sistema HPLC-DAD: (a) escalar (uma única medida instrumental), (b) vetor de dados, (c) uma matriz de dados.....19

Figura 10 – Matriz de dados de espectroscopia de imagens para um único comprimento de onda, ou seja, uma única medida instrumental por pixel. Essa imagem também é chama de *mapa de absorbância*.....19

Figura 11 – Desdobramento/redobramento do hipercubo em matriz, preservando a informação espacial.....24

Figura 12 – Decomposição de uma matriz de dados com PCA.....25

Figura 13 – Ilustração gráfica da obtenção do mapa de escores. Exemplo para uma imagem espectral de 4x4 pixels e 3 componentes principais. As cores dos pixels somente estão indicando que a posição espacial de cada pixel é mantida.....27

Figura 14 – Ilustração gráfica da obtenção do mapa de concentração relativa. Exemplo para uma imagem espectral de 4x4 pixels e 3 componentes químicos distintos. As cores dos pixels somente estão indicando que a posição espacial de cada pixel é mantida.....29

Figura 15 – Ilustração gráfica da obtenção da construção de um modelo de calibração para dados de espectroscopia de imagens utilizando os espectros médios de cada amostra.....32

Figura 16 – Ilustração gráfica da obtenção do mapa de concentração. Exemplo para uma imagem espectral de 4x4 pixels e 3 espécies químicas calibradas. As cores dos pixels somente estão indicando que a posição espacial de cada pixel é mantida.....33

Capítulo 3

Figura 17 – Estrutura molecular do tacrolimus.....38

Figura 18 – Fotomontagem na região do visível, em escala de cinza, das áreas analisadas por espectrometria de imagens. As letras em vermelho representam diferentes estruturas dentro da pomada. A representação da amostra prensada na lâmina mostra a posição das áreas analisadas, sendo a amostragem 1 da borda da amostra e a amostragem 2 do centro da amostra. Ainda foi utilizada uma área do mesmo conjunto de lâminas para obter o “branco” das lâminas.....40

Figura 19 – Espectros NIR de pixels obtidos na análise espectroscópica das imagens da figura 18.....41

Figura 20 – Mapas de absorção: reconstrução das imagens das amostragens 1 e 2 da figura 18 utilizando a intensidade de absorção para as frequências 4320 cm^{-1} , 3420 cm^{-1} , 3240 cm^{-1} e 2960 cm^{-1} . As barras de cores apresentam os valores de absorção.....43

Figura 21 – Espectros tratados: (A) antes e; (B) após a aplicação de primeira derivada.....	46
Figura 22 – Porcentagem de variância explicada pelas 15 primeiras componentes principais na análise PCA para as duas amostragens da pomada.....	47
Figura 23 – Mapa de escores dos quatro primeiros componentes principais da amostragem 1.....	48
Figura 24 – (A) Loadings dos 4 primeiros componentes principais da amostragem 1 e; (B) integral numérica desses loadings.....	49
Figura 25 – Mapa de escores dos quatro primeiros componentes principais da amostragem 2.....	49
Figura 26 – (A) Loadings dos 4 primeiros componentes principais da amostragem 2 e; (B) integral numérica desses loadings.....	50
Figura 27 – Mapas de concentração: resultados obtidos para as duas amostragens da pomada apresentadas na figura 18. A numeração corresponde aos componentes químicos no MCR.....	52
Figura 28 – Para a amostragem 1: (A) Espectros puros recuperados e; (B) integral numérica desses espectros.....	53
Figura 29 – Para a amostragem 2: (A) Espectros puros recuperados e; (B) integral numérica desses espectros.....	53

Capítulo 4

- Figura 30** – Estrutura molecular do imiquimode.....60
- Figura 31** – Fotomontagem na região do visível, em escala de cinza, das áreas analisadas por espectroscopia de imagens. A representação da amostra prensada na lâmina mostra a posição das áreas analisadas, sendo ambas as amostragens da parte interna amostra dispersa na lâmina. Foi utilizada ainda uma área do mesmo conjunto de lâminas para obter o “branco” das lâminas.....62
- Figura 32** – Espectros NIR de pixels obtidos na análise espectroscópica das imagens da figura 31.....62
- Figura 33** – Mapas de absorção das duas amostragens para os números de onda 3420 cm^{-1} , 3240 cm^{-1} e 2930 cm^{-1}64
- Figura 34** – Espectros tratados: (A) antes e; (B) após a aplicação da primeira derivada.....65
- Figura 35** – Porcentagem de variância explicada pelas 15 primeiras componentes principais na análise PCA para as duas amostragens do creme.....66
- Figura 36** – Mapa de escores dos quatro primeiros componentes principais da amostragem 1.....67
- Figura 37** – Mapa de escores dos quatro primeiros componentes principais da amostragem 2.....68
- Figura 38** – Loadings dos 4 primeiros componentes principais da: (A) amostragem 1 e; (B) amostragem 2.....69

Figura 39 – Mapas de concentração relativa: resultados obtidos para as duas amostragens do creme, apresentadas na figura 31. As colunas da direita e da esquerda trazem os mapas de concentração relativa recuperados pelo MCR-ALS para a primeira e a segunda amostragem, respectivamente.....71

Figura 40 – Espectros puros recuperados pelo MCR-ALS para a primeira (A) e segunda (B) amostragem do creme. Esses espectros estão correlacionados com os mapas de concentração da figura 39.....71

Capítulo 5

Figura 41 – Estrutura molecular da espironolactona.....78

Figura 42 – Planejamento ternário dos padrões: X1, X2 e X3 referem-se ao amido, espironolactona e sulfato de cálcio, respectivamente.....81

Figura 43 – O círculo azul representa um comprimido analisado, cujo diâmetro era de 8 mm. O quadrado laranja indica a área varrida pelo espectrofotômetro de imagens, 4mm x 4mm.....83

Figura 44 – Média dos espectros das replicatas dos padrões obtidos na região NIR por análise de reflectância convencional.....84

Figura 45 – Primeira derivada dos espectros médios dos padrões, obtidos por espectroscopia NIR convencional.....85

Figura 46 – Espectros NIR de alguns pixels obtidos na análise dos comprimidos por espectroscopia de imagens.....87

Figura 47 – Primeira derivada dos espectros de alguns pixels obtidos na análise dos comprimidos por espectroscopia de imagens (espectros da figura 46).....	87
Figura 48 – Mapa de escores das seis primeiras componentes principais da primeira replicata do primeiro padrão.....	88
Figura 49 – Loadings dos 4 primeiros componentes principais dos dados de imagens (A) e integral numérica dos loadings (B).....	90
Figura 50 – Mapas de concentração da primeira replicata do primeiro padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.....	94
Figura 51 – Mapas de concentração da primeira replicata do segundo padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.....	95
Figura 52 – Mapas de concentração da primeira replicata do terceiro padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.....	96
Figura 53 – Mapas de concentração da primeira replicata do quarto padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.....	97
Figura 54 – Mapas de concentração da primeira replicata do quinto padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.....	98

Figura 55 – Mapas de concentração da primeira replicata do sexto padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.....	99
Figura 56 – Mapas de concentração da primeira replicata do sétimo padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.....	100
Figura 57 – Mapas de concentração da primeira replicata do oitavo padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.....	101
Figura 58 – Mapas de concentração da primeira replicata do nono padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.....	102
Figura 59 – Mapas de concentração da primeira replicata do décimo padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.....	103

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS GERAIS

1.1 – Imagens hiperespectrais, RGB e escala de cinza.

Na análise química tradicional, a amostra pode ser uma solução homogênea, um gás ou um sólido homogeneizado e a análise destas amostras reflete suas propriedades globais, ou seja, da amostra como um todo. Para sólidos e outros meios não homogêneos sempre houve a necessidade de se adquirir informação química local, a fim de gerar mapas de concentração de compostos ou encontrar outras propriedades de interesse [1]. Desta maneira, a caracterização química de uma amostra pode ser considerada sob aspectos globais ou locais. A figura 1 ilustra a diferença entre a determinação da concentração de um analito em solução e a análise de uma amostra sólida preservando a informação espacial.

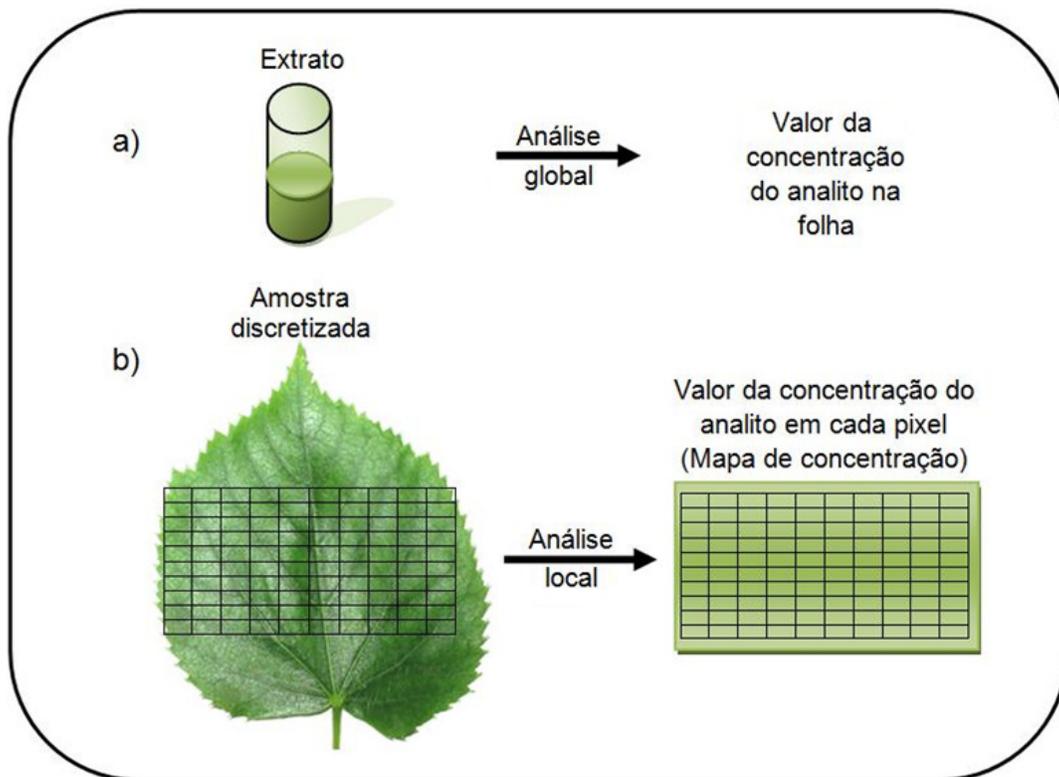


Figura 1 – Ilustração da informação obtida a partir de uma solução (a), e a partir de uma amostra analisada como imagem (b). Na primeira temos um só valor de concentração, na segunda temos um valor de concentração para cada pixel.

Análises de espécies dissolvidas são adequadas para a determinação da composição global, mas muitas vezes existe o interesse na composição local ao longo da estrutura espacial da amostra para obter uma descrição da composição química da superfície do material. Essa descrição local adiciona informações sobre a amostra, tais como: homogeneidade e distribuição de constituintes em uma superfície e ainda auxilia a interpretar e monitorar processos que possam ocorrer nessas superfícies [2].

O estudo do potencial analítico de imagens “convencionais” ou simplesmente “fotografias” não é recente e seus fundamentos estão bem estabelecidos, sendo que imagens em preto e branco ou coloridas, foram utilizadas com sucesso em trabalhos que são referências básicas na análise de imagens aplicada à química [1,3-5]. A espectroscopia de imagem, por sua vez, é uma das novas tecnologias para caracterização química de amostras e baseia-se na medida de um espectro completo por unidade da superfície da amostra, conhecida como *pixel* [2,6-9].

Nas imagens digitais convencionais, as cores visíveis são obtidas através da combinação de três imagens univariadas criando um sistema aditivo de cores: uma imagem utilizando intensidade da cor vermelha, uma imagem utilizando intensidade da cor verde, uma imagem utilizando intensidade da cor azul (padrão RGB, do inglês: *red, green, blue*).

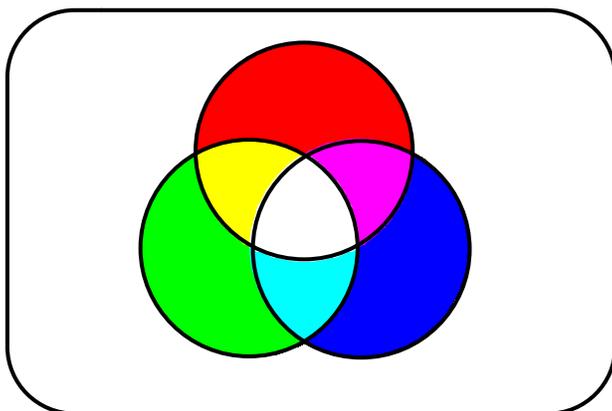


Figura 2 – Ilustração do sistema somatório de cores RGB.

Em um sistema digital de 8 bits, a intensidade de cada uma destas cores pode ser representada com valores inteiros entre 0 e 255. Como são 8 bits para cada cor, a resultante final é de $16,78 \times 10^6$ possibilidades de cores, o que normalmente é mais que o suficiente para aplicações convencionais [5]. No caso de imagens em escala de cinza, existe uma só matriz, e a intensidade de cinza nos pixels varia de zero (cor preta) a 255 (cor branca), também para um sistema de 8 bits. Na espectroscopia de imagem, ao invés de uma matriz (como na escala de cinza) ou três matrizes (como no padrão colorido RGB), temos o número de matrizes igual ao número de comprimentos de onda monitorados em um espectro, e os valores contidos nesses pixels não estão limitados a valores inteiros ou a valores entre 0 a 255, pois são valores de absorbância ou reflectância, entre outros, sendo estes contínuos [5]. O arranjo tridimensional formado com as imagens registradas em todos os comprimentos de onda de interesse define-se *hiperespectro*, *imagem hiperespectral* ou ainda *hipercubo espectral* [9]. A figura 3 ilustra a diferença entre a estrutura dos dados de imagens em escala de cinza, coloridas ou hiperespectrais.

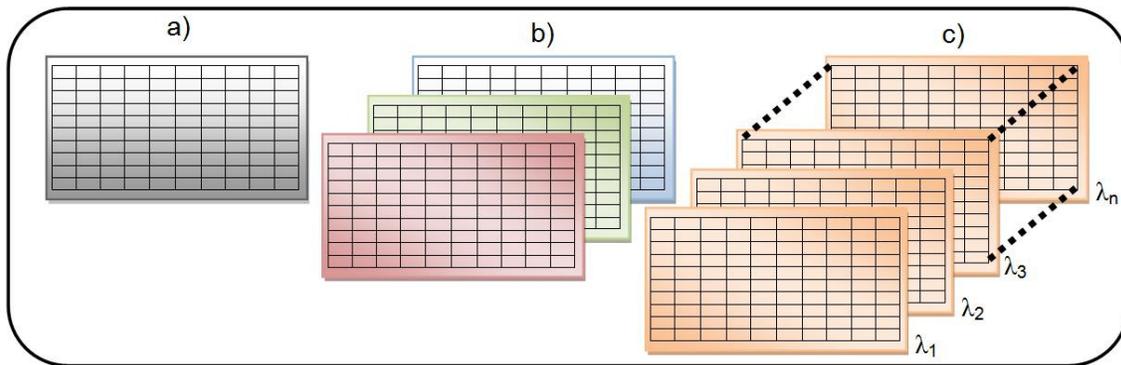


Figura 3 – Representação da estrutura de imagens com 10 x 10 pixels. (a) Imagem em escala de cinza de 8 bits, cada pixel possui um valor inteiro entre 0 e 255; (b) Imagem colorida padrão RGB, cada pixel possui três valores inteiros entre 0 e 255; (c) Imagem hiperespectral, cada pixel possui n valores, onde n é o número de comprimentos de onda monitorados pelo equipamento.

Os princípios físicos e químicos para obtenção das imagens hiperespectrais são os mesmos daqueles utilizados em equipamentos convencionais (que não geram imagens) e estão bem estabelecidos, de maneira que os espectros tomados em cada pixel podem ser resultantes de todo tipo de interação da radiação com a matéria: emissão, absorção, reflexão, espalhamento, fluorescência, fosfluorescência, incidência de radiação de alta energia, bombardeamento com partículas, quimioluminescência, etc. [5]. Assim a principal diferença da espectroscopia de imagem em relação à convencional é que a resolução espacial da amostra é mantida.

Uma imagem hiperespectral pode ser formada por centenas de milhares de medidas e um dos principais problemas é processamento de tantos dados. Aproximações clássicas tendem a trabalhar com representações reduzidas da imagem utilizando somente uma medida por pixel, a intensidade cumulativa de toda a amostra ou o sinal em um comprimento de onda particular [10-12]. Estes métodos, embora simples, não aproveitam toda a qualidade e quantidade de informações contidas nas medidas hiperespectroscópicas. Assim, os métodos multivariados são os mais apropriados para a análise na espectroscopia de imagens, pois eles utilizam o conjunto de dados completos.

Muitas técnicas na espectroscopia de imagem geram sinais para o qual a intensidade do sinal é proporcional à concentração do composto no pixel, seguindo relação equivalente à lei de Beer-Lambert na espectroscopia de amostras em solução. Assim, a análise simultânea de todos espectros na imagem é necessária para tornar possível a interpretação da estrutura espacial da imagem, sendo indispensável a utilização de ferramentas quimiométricas [2].

Muitos métodos multivariados tem sido utilizados para identificação de características espectrais dos pixel, ou na classificação de imagens. Algoritmos adaptados para resolução espectral e consequente quantificação de substâncias, utilizando imagens hiperespectrais ainda é uma área pouco explorada [2,13].

Já existem dezenas de aplicações que fazem uso da espectroscopia de imagens. Algumas delas são listadas a seguir.

1.2 – Imagens hiperespectrais da superfície terrestre.

Imagens hiperespectrais da superfície terrestre são normalmente obtidas por absorção Vis-NIR-IR da radiação refletida, espalhada ou emitida pelos alvos, e são capturadas por escâneres aéreos como o Espectrômetro de Imagens Vis/IR Airborne (AVIRIS) da NASA (do inglês, *National Aeronautics and Space Administration*) [14] ou o ENVISAT/MERIS da ESA (do inglês, *European spacial agency*) [15].

O ENVISAT é o satélite mais potente disponível na atualidade, monitorando a biosfera e a atmosfera. É equipado com diversos dispositivos com tecnologia de ponta, entre eles o dispositivo MERIS (do inglês: *Medium Resolution Imaging Spectrometer*). Alguns dados do dispositivo MERIS:

- Resolução espacial de 300m (para regiões limitadas) e 1,2km em base global;
- 15 bandas espectrais programáveis em largura e posição;
- Faixas do visível e infravermelho-próximo 390 a 1040 nm;
- Cobertura global da Terra em 3 dias;

A figura 4 mostra uma imagem da superfície terrestre obtida pelo MERIS/ENVISAT.

O sensor MERIS, originalmente dedicado a fazer observações da cor da água nos oceanos, zonas costeiras e águas interiores, teve seu escopo de objetivos ampliado para a realização de estudos atmosféricos e da superfície terrestre. A partir de medições da cor da água, é possível derivar concentrações de clorofila na superfície da água, do material em suspensão e de cargas de aerossóis sobre o domínio marinho. Também é possível estimar a altura do topo

de nuvens, o total de vapor d'água na coluna atmosférica, a carga de aerossóis sobre os continentes e o status da vegetação e sua distribuição (biomassa e índices de vegetação). Contudo, para muitos estudos mais simples, a validação e o desenvolvimento destes tipos de análises empregam sensores portáteis [16].



Figura 4 – Imagem do vulcão do Monte Etna, em destaque, (3.350 metros de altitude) adquirida pelo ENVISAT/MERIS em 25 de novembro de 2006.

Os dados hiperespectrais obtidos através de satélites ou aviões são usados em muitos campos da ciência. Vários destes campos adotam o termo “*Sensoriamento Remoto*” para estes tipos de análises, sendo que existem revistas científicas especializadas em publicações acerca deste assunto. Dentre as áreas da ciência que utilizam esta tecnologia, as de maior impacto são:

- *Mineralogia*: O objetivo original do desenvolvimento de tecnologia para obtenção de dados hiperespectrais do espaço, que era a análise de minerais, já está bem desenvolvido. Muitos minerais podem ser identificados a partir de imagens e a relação destes com minerais valiosos tais como ouro [17,18] já é bem compreendida. Atualmente o estudo está direcionado em relação a vazamentos de petróleo e gás natural de oleodutos e de fontes naturais, seus efeitos sobre a vegetação e seus espectros característicos [19-21].

- *Agricultura*: Embora os custos de aquisição de imagens hiperespectrais sejam tipicamente altos, a aquisição de imagens hiperespectrais é cada vez mais utilizada para monitorar o desenvolvimento e a saúde de lavouras em certos climas. Na Austrália, a espectrometria de imagem foi utilizada para monitorar lavouras de arroz, cana de açúcar, pimentas e algodão [22]. Outro trabalho recente é o uso de dados hiperespectrais para monitorar o efeito da adição de nitrogênio sobre lavoura de batatas [23].

- *Campo militar*: A tecnologia de imagens hiperespectrais também é empregada no campo militar com propósitos de monitoramento de áreas. A tecnologia de imagens hiperespectrais é particularmente útil no campo de segurança militar, devido às vantagens que possui diante de interferências decorrentes de efeitos atmosféricos (absorção, espalhamento, turbulência, etc.) [24]. Outro campo de desenvolvimento da tecnologia hiperespectral na área militar é o reconhecimento automático de padrões de alvos pré-estabelecidos [25].

- *Poluição e monitoramento atmosférico*: Outra aplicação das imagens hiperespectrais foi na avaliação da poluição por cidades e indústrias através de sensores Vis/IR acoplados em aviões com imagens capturadas numa altitude entre 1,5 e 2 km [26].

Dados hiperespectrais com resolução micrométrica podem ser obtidos de maneira análoga aos espectros de reflectância do infravermelho próximo [27] e do infravermelho médio [28] para amostras convencionais, porém a área de

incidência da radiação proveniente da fonte é microscópica e varre toda a superfície da amostra. Também é possível gerar dados hiperespectrais de espectroscopia Raman [2] e de fluorescência molecular [29] focalizando o laser ou o comprimento de onda de excitação, respectivamente. Microscopia eletrônica de varredura com espectrometria de energia dispersiva (SEM-EDS) [30] e espectrometria de massa de íons secundários com detecção por tempo de voo (ToF-SIMS) [31], também geram dados hiperespectrais. Nessas técnicas um feixe de elétrons ou de íons é focalizado em pixels da amostra, na técnica SEM-EDS e ToF-SIMS, respectivamente.

1.3 – Espectroscopia de imagens com resolução micrométrica

A espectroscopia de imagens com resolução micrométrica também possui muitos campos de aplicação:

- *Campo da arte*: Devido à extrema fragilidade e alto valor de artefatos e obras de artes antigas, são necessárias técnicas especiais, não destrutivas, para avaliações deste tipo de amostra. Espectroscopia de imagem por reflectância representa uma ferramenta sem igual na análise científica de obras de arte preciosas, para as quais, técnicas micro-invasivas de análise não podem ser utilizadas [32]. A espectroscopia de imagem é uma ferramenta já consolidada para análise de obras e pinturas, já que gera informação espectral de cada ponto da superfície, mantendo o mesmo aspecto visual da imagem analisada [33-34].

- *Controle de qualidade de alimentos* [35]: Através de imagens na região NIR, é possível identificar problemas em alimentos e monitorar a qualidade destes devido à resolução espacial que a técnica possui. O principal objetivo deste monitoramento é agregar valor aos produtos que serão comercializados, já que serão livres de defeitos. Um sistema hiperespectral foi construído utilizando a faixa de 400-1000 nm do espectro eletromagnético, e foi utilizado para detectar maçãs que possuíam alguma irregularidade no que diz respeito à regiões batidas ou

amassadas dos frutos. Também foi utilizada espectroscopia de imagem para análise óssea de aves destinadas ao consumo humano, além da detecção de defeitos ou determinação da qualidade de tomates [36-39].

- *Medicina*: A espectroscopia de imagem também possui grande escopo de aplicação na área médica, ou seja, naquelas análises que resultam uma imagem. Dentre as aplicações já realizadas estão as análises de línguas humanas utilizando imagens VIS-NIR e redes neurais [40], além de imagens de ressonância magnética cerebral [41].

- *Controle de qualidade industrial*: Em muitos casos é de extrema importância conhecer a homogeneidade do produto acabado. A espectroscopia de imagens já foi utilizada para encontrar o teor de alumina utilizada para cobertura de materiais [42], na determinação da distribuição de tamanhos de partículas em agregados naturais e industriais [43], e para estudar a homogeneidade na distribuição de componentes constituintes de fármacos [2].

- *Aplicações na área farmacêutica*: A espectroscopia de imagens micrométricas baseadas nas espectroscopias Raman, MIR e NIR, está sendo aplicada principalmente no campo farmacêutico devido à necessidade de estudos de uniformidade de conteúdo, transição polimórfica e da detecção de impurezas nos princípios ativos, que estão na concentração de traços [44]. A *espectroscopia de imagens Raman* foi utilizada para: caracterizar o efeito das diferentes tecnologias de processamento de comprimidos (granulação por spray dry, granulador vertical e compressão direta) em propriedades como uniformidade de conteúdo, polimorfismo, e teor do princípio ativo [45]; em análise de medicamento em forma de suspensão [46] e; na determinação de polimorfos no princípio ativo [46]. A espectroscopia de imagens NIR [48,49,50] já foi utilizada para estudo do ácido acetilsalicílico em comprimidos comerciais [51]; para controle de qualidade de comprimidos revestidos e na detecção de impurezas pontuais [52], quantificação e uniformidade de conteúdo em comprimidos [53], determinação da

composição de medicamentos falsificados [54]; monitoramento de processo e controle de qualidade [55,56].

1.4 – Spotlight 400N FT-NIR Imaging System

A figura 5 traz uma fotografia do equipamento utilizado para a realização das análises de imagens nesta tese. O módulo da esquerda é o microscópio propriamente dito, e o da direita é o espectrofotômetro, o qual contém a fonte de radiação NIR.

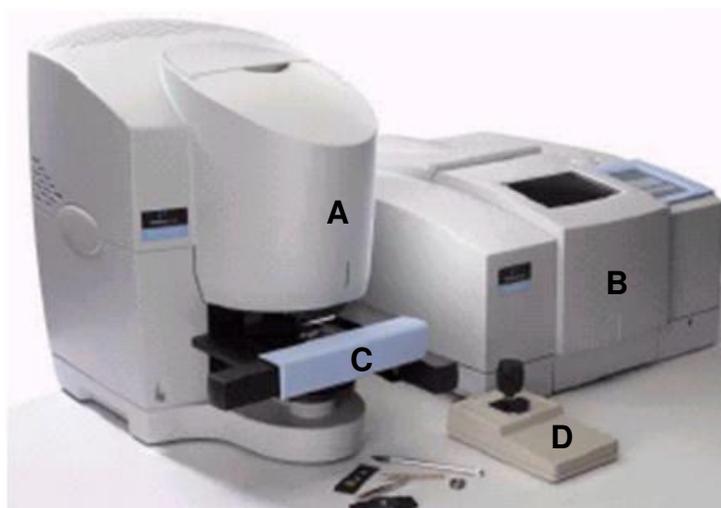


Figura 5 – Equipamento Spotlight 400N FT-NIR Imaging System da Perkin-Elmer. A) Compartimento da óptica do equipamento de imagem; B) espectrofotômetro NIR, C) posicionador de amostra; D) joystick controlador do posicionador de amostras.

Este equipamento é capaz de varrer a superfície de uma amostra, analisando individualmente pixels com dimensões de $6,25 \times 6,25 \mu\text{m}^2$, $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ ou $50 \times 50 \mu\text{m}^2$, cobrindo a faixa espectral do infravermelho próximo e o início do infravermelho médio, de 7.800 a 2.200 cm^{-1} .

Nas análises, a amostra é colocada sobre uma lâmina de vidro para microscopia e essa é colocada sobre o posicionador C da figura 5. Com o joystick

D ajusta-se o foco e a área da amostra a ser analisada pelo equipamento. O “branco” da análise é obtido passando a radiação pela lâmina de vidro sem amostra, no caso de análises por transmitância, ou incidindo a radiação sobre uma peça de ouro polido, no caso de análises por reflectância. A partir daí o equipamento inicia a varredura da área previamente selecionada.

A figura 6 traz o esquema óptico do equipamento e a figura 7 traz o esquema óptico de um refletor Cassegrain.

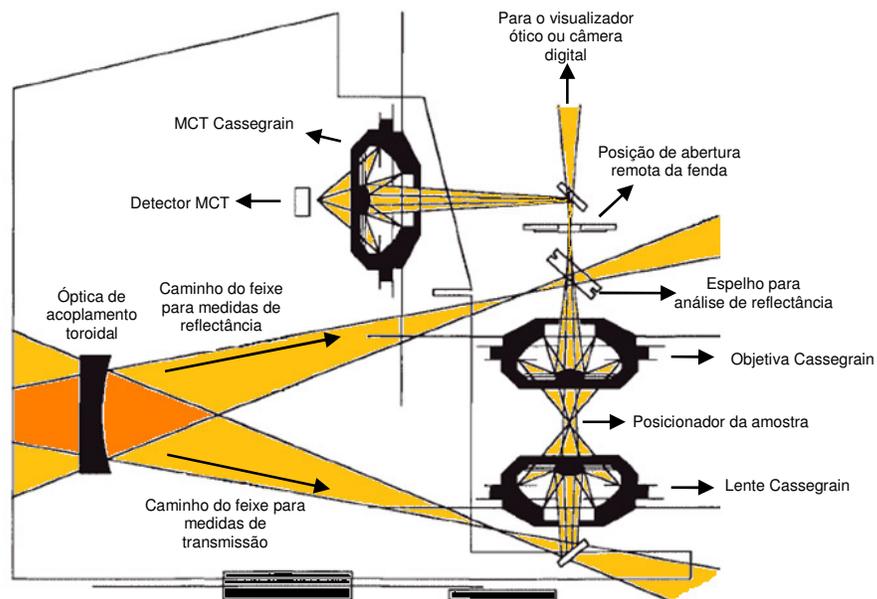


Figura 6 – Esquema óptico do equipamento Spotlight 400N FT-NIR Imaging System da Perkin-Elmer.

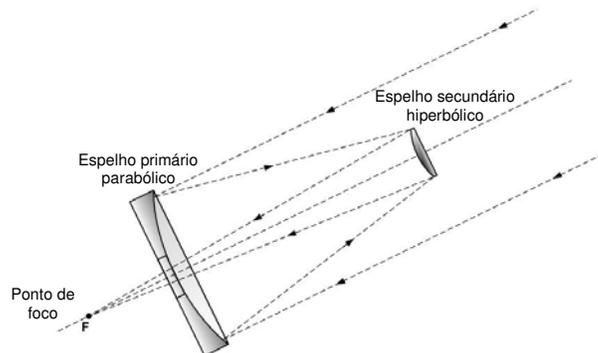


Figura 7 – Esquema óptico de uma lente Cassegrain.

Na figura 6, a radiação proveniente da fonte do espectrofotômetro NIR (não apresentada na figura) é direcionada para o dispositivo de ótica de acoplamento toroidal. Daí, a radiação NIR segue para a lente Cassegrain (para análises de transmissão), ou para o espelho de reflectância (para análises por reflectância), atingindo a amostra por transmissão ou reflectância. Após passar pela fenda de abertura remota, a radiação é refletida para a lente Cassegrain do detector MCT (telureto de cádmio e mercúrio) e conseqüentemente detectada.

O equipamento possui três dispositivos com esquema de construção Cassegrain, que é a combinação de um espelho côncavo primário e um espelho convexo secundário, como ilustrado na figura 7.

1.5 – Objetivos

Dentro do que se propõe o objetivo desta tese, foram estudadas metodologias quimiométricas para o tratamento de dados de imagem, obtidos através do espectrofotômetro de imagem Spotlight 400N FT-NIR Imaging System. Foram realizadas três aplicações como segue:

- Análise exploratória para diagnosticar separações de fases em um medicamento apresentado na forma de pomada. Neste conjunto de dados, foram utilizados os métodos exploratórios PCA e o MCR-ALS.
- Análise exploratória para diagnosticar formação de cristais em um medicamento apresentado na forma de creme (emulsão). Neste conjunto de dados, foram utilizados os métodos exploratórios PCA e o MCR-ALS.
- Quantificação e determinação da localização de princípios ativos e excipientes em medicamentos em forma de comprimidos, avaliando a homogeneidade da amostra. Neste conjunto de dados foram utilizados modelos PCA para análise exploratória e modelos iPLS para quantificação de 3 excipientes e 1 princípio ativo.

CAPÍTULO 2

DEFINIÇÕES, MÉTODOS MATEMÁTICOS E QUIMIOMÉTRICOS UTILIZADOS

2.1 – Propriedades locais versus propriedades globais

A espectroscopia de imagens pode ser utilizada para os seguintes fins: detecção, reconhecimento de padrões, classificação e quantificação [9].

A análise quantitativa a partir de imagens pode ser realizada em dois sentidos:

- Na determinação de uma propriedade global como: a concentração total de uma substância na amostra [42], o escurecimento de frutas devido à oxidação [57] ou o número de unidades formadoras de colônia (UFC) em placas de Petri [58]. Uma ilustração é apresentada na figura 8a.
- Para encontrar o mapa de concentração: ou seja, encontrar a propriedade desejada em cada pixel mantendo a informação espacial [2,13,28]. Uma ilustração é apresentada na figura 8b.

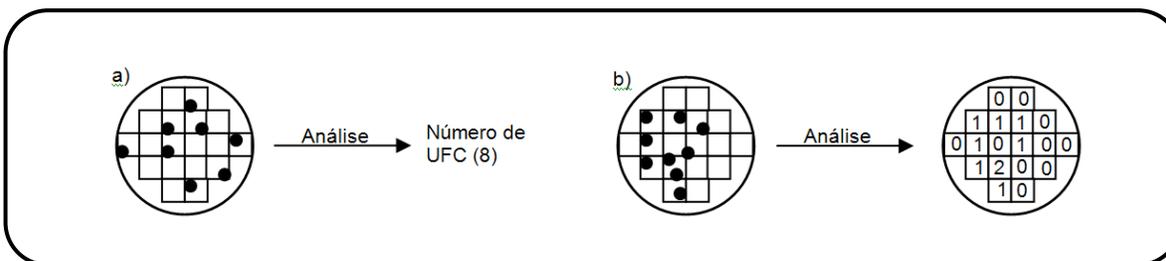


Figura 8 – a) Representa a análise de uma imagem hiperespectral de uma placa de Petri, onde a finalidade é encontrar o número total de UFC. b) Representa a análise de uma imagem hiperespectral de um fármaco em um comprimido, a informação espacial é mantida a fim de estudar a homogeneidade da amostra. Os quadrados representam pixels.

Antes de iniciar a discussão a respeito da quantificação utilizando imagens, é necessário frisar que na determinação de uma propriedade global, cada imagem está relacionada com um valor da propriedade de interesse. Quando o interesse é o mapeamento, cada pixel está relacionado com um valor da propriedade de

interesse, ou seja, se a imagem possuir 50x50 pixels, haverá para essa imagem 2500 valores da propriedade de interesse, ou seja, um para cada pixel. Essa diferença é fundamental para a compreensão das diferenças nos procedimentos de quantificação para uma ou outra finalidade.

Nesta tese, todas as aplicações de espectroscopia de imagens foram realizadas buscando mapear a amostra, ou seja, estudando suas propriedades locais (mapa de absorção, mapa de escores, mapa de concentração relativa).

2.2 – Definindo a “ordem” dos dados de espectroscopia de imagens

Os processos de calibração e de análise exploratória podem ser definidos como uma série de operações que estabelecem, sob condições específicas, uma relação matemática entre medidas instrumentais e valores da propriedade de interesse. Os dados existentes podem ser divididos quanto à complexidade ou dimensionalidade, em dados de ordem zero, primeira e segunda ordem [15]. A “ordem” dos dados irá definir o tipo de método quimiométrico (seja de calibração ou exploratório) utilizado no estudo dos dados.

A figura 9 mostra uma representação esquemática dos três tipos de ordem de dados, obtidos através de um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD), capaz de gerar dados reais de segunda ordem. A figura 10 traz uma imagem espectroscópica de um fármaco com detecção espectrofotométrica num único comprimento de onda. Apesar da semelhança entre as figuras 9 e 10, os dados diferem completamente entre si com relação à estrutura.

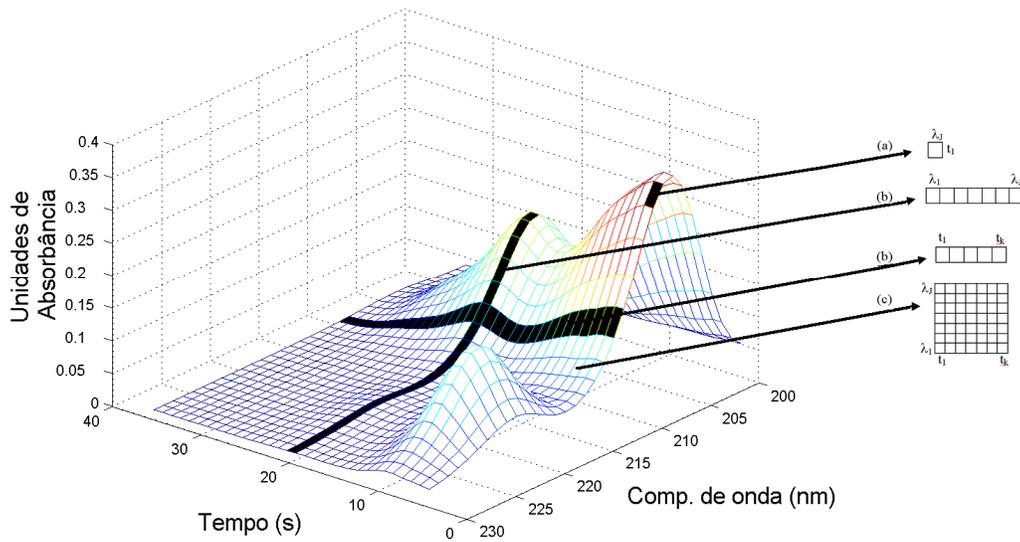


Figura 9 – Representação esquemática dos diferentes tipos de dados em um sistema HPLC-DAD: (a) escalar (uma única medida instrumental); (b) vetor de dados (linha ou coluna) e; (c) uma matriz de dados.

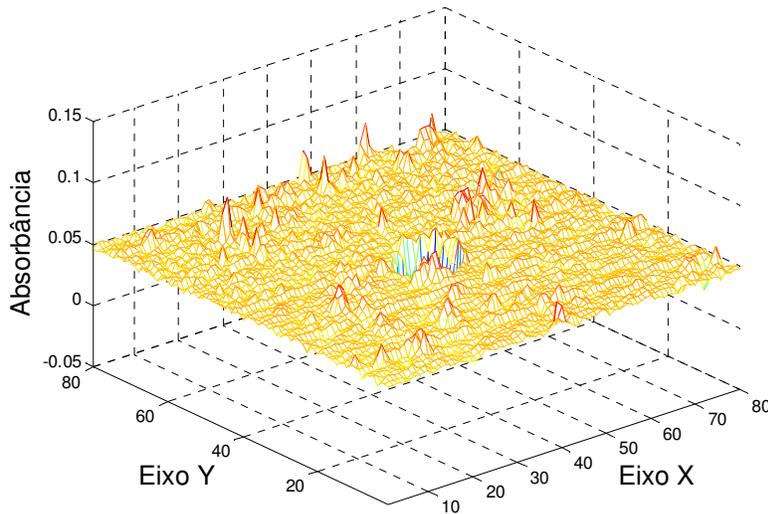


Figura 10 – Matriz de dados de espectroscopia de imagens para um único comprimento de onda, ou seja, uma única medida instrumental por pixel. Essa imagem também é chama de *mapa de absorbância*.

2.2.1 – Dados de ordem zero

Em modelos de calibração de ordem zero, é realizada apenas uma medida por amostra, isto é, um único valor escalar é obtido por amostra, sendo então uma análise univariada. Segundo o exemplo mostrado na figura 9 ele é representado por um ponto da superfície, que corresponde à leitura da absorbância em um comprimento de onda λ_1 em um tempo t_1 . Exemplos típicos de instrumentos que geram esse tipo de dados incluem medidas eletroquímicas, espectrofotométricas ou cromatográficas, com monitoramento de um único ponto ou variável.

Como será visto na operação “desdobramento”, os pixels, em uma análise local de imagem, se comportam como amostras individuais analisadas microscopicamente. Não existe qualquer correlação na localização dos pixels nas dimensões x e y . Assim, numa analogia com as imagens, dados de ordem zero seriam representados por uma imagem em escala de cinza, ou ainda pela absorção em um único comprimento de onda numa imagem hiperespectral, ou seja, seria a própria figura 10.

A figura 10 é também conhecida como *mapa de absorbância*, onde os pixels contêm valores de absorbância de um único comprimento de onda. Os mapas de absorbância somente terão uma importância significativa na interpretação dos dados caso o comprimento de onda visualizado no mapa de absorbância seja seletivo a uma substância.

Calibrações de ordem zero são as mais aplicadas em análises de rotina, contudo sua aplicação requer que a grandeza medida diretamente no sistema (ex.: absorbância de um composto) seja livre de interferentes que possam provocar desvios entre sua relação com a propriedade de interesse.

2.2.2 – Dados de primeira ordem

Métodos de calibração de primeira ordem fazem uso de um vetor de medidas instrumentais para cada amostra. Pelo exemplo da Figura 9, são

possíveis dois tipos de dados: monitorando um comprimento de onda λ_i nos tempos de t_1 a t_k , ou monitorando os comprimentos de onda λ_1 a λ_j em um determinado tempo. Exemplos de dados multivariados incluem medidas espectrométricas e eletroquímicas em que se monitora uma determinada faixa espectral ou de variação de potencial. Esses métodos possibilitam análises mesmo na presença de interferentes (desde que esses interferentes estejam presentes nas amostras de calibração) e determinações simultâneas em análises sem resolução. Diversos modelos de calibração multivariada vêm sendo utilizados, tais como: regressão linear múltipla (MLR), regressão por componentes principais (PCR) e regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) [57].

Fazendo uma analogia com dados de espectroscopia de imagens, dados de primeira ordem são representados por toda a estrutura tridimensional. Isso porque, se cada pixel atua como uma amostra isolada, o que se observa são diversas amostras com um espectro correspondente, como demonstrado neste mesmo capítulo no item 2.3. Dessa maneira, os dados de primeira ordem para imagens seriam representados por diversas figuras semelhantes à figura 10, cada uma contendo a imagem univariada de um comprimento de onda monitorado, ou seja, um conjunto de matrizes, uma para cada comprimento de onda formando assim uma imagem hiperespectral.

2.2.3 – Dados de segunda ordem

Dados de segunda ordem são obtidos por métodos que geram uma matriz de dados por amostra. Como é mostrada na Figura 9, uma matriz de dimensões $j \times k$, que define a superfície mostrada na figura é obtida para cada amostra. Caso forem analisadas “i” amostras, teremos um tensor de dados \underline{X} de dimensões $i \times j \times k$. Esse tipo de dados pode ser gerado através de diversas técnicas, como: cromatografia líquida ou gasosa com detecção por espectrometria de massas (HPLC-MS e CG-MS respectivamente), cromatografia líquida com detecção por

arranjo de diodos (HPLC-DAD), ressonância magnética nuclear de duas dimensões (RMN-2D), fluorescência molecular de excitação e emissão, análise por injeção em fluxo com gradiente de pH com detecção por arranjo de diodos(FIA-DAD), etc. [15]. Esses métodos possuem a grande vantagem de permitirem a determinação de espécies de interesse na presença de interferentes, mesmo que estes interferentes não tenham sido incluídos nas amostras de calibração. Essa característica é chamada “vantagem da segunda ordem”. Além disso, o perfil de cada composto linearmente independente, presente na amostra, pode ser estimado com dados de segunda ordem. O número de amostras requerido para a construção de modelos de calibração de segunda ordem é sensivelmente menor que aquele necessário para modelos de primeira ordem [15].

Existe certa contradição na literatura a respeito da natureza dos dados de imagens pois cada amostra gera um arranjo tridimensional de dados (eixo x , eixo y , eixo λ) e por outro lado, uma imagem não possui trilinearidade, ou seja, não possui um perfil nas dimensões espaciais x e y . Para ilustrar este fato, pensemos num conjunto de 5 comprimidos semelhantes, a distribuição espacial do princípio ativo e dos excipientes na superfície do comprimido será sempre diferente, o que resultará numa superfície com sinais em posições aleatórias. Já numa superfície obtida com técnicas de fluorescência excitação-emissão ou cromatografia com arranjo de diodos, os sinais sempre terão o mesmo perfil para um determinado composto. Conseqüentemente, é equivocado analisar imagens RGB ou espectroscópicas da mesma maneira com que se faz com dados realmente trilineares, como de fluorescência excitação-emissão por exemplo. Assim, métodos para dados de segunda ordem como o PARAFAC (análise de fatores paralelos) não resolvem corretamente dados de espectroscopia de imagens.

É importante ressaltar que existem casos especiais em que os dados de espectroscopia de imagens são trilineares ou até tetralineares, no caso de múltiplas amostras. Um exemplo deste tipo de dado seria a detecção espectroscópica em cromatografia de camada delgada bidimensional (TLC-2D).

Num experimento destes, teríamos um perfil de retenção relacionado à um solvente, outro perfil de retenção relacionado à um segundo solvente, um perfil espectroscópico em cada ponto, e ainda um perfil de concentração, no caso de múltiplas amostras. Não foram encontrados na literatura artigos que trabalhassem os dados de TLC-2D com detecção de imagens.

Resumindo a discussão, imagens são essencialmente dados de primeira ordem. Por exemplo: se uma folha de árvore é recortada em 100 partes (como sugere a figura 1) com uma tesoura, depois é preparado um extrato com cada fração recortada da folha e na seqüência cada extrato é analisado independentemente por um espectrofotômetro UV-DAD, obteremos uma imagem hiperespectral com 100 pixels, ou seja, 100 amostras independentes, preservando sua posição espacial.

Desta maneira, nesta tese, foram utilizados métodos quimiométricos para tratamento de dados de primeira ordem. Nas análises das imagens como dados de primeira ordem, cada pixel é considerado uma amostra independente, sendo analisadas as semelhanças e diferenças entre a composição química de cada pixel.

2.3 – Desdobramento de imagens espectrais

Como discutido anteriormente, os dados de espectroscopia de imagem possuem 3 dimensões: x e y , que são dimensões espaciais, e uma terceira dimensão relacionada aos espectros. Contudo, esses dados não são trilineares, mas sim bilineares [2]. As dimensões espaciais x e y não possuem qualquer relação entre si, ou seja, não é possível decompor uma matriz de imagem como produto de três vetores sem perder grande parte da informação contida na imagem.

Baseado nisso, o hipercubo pode ser desdobrado em forma de uma matriz bidimensional sem perder qualquer informação espacial. A figura 11 mostra graficamente a operação denominada desdobramento (do inglês, *unfolding*), e a operação inversa, denominada redobramento [2].



Figura 11 – Desdobramento/redobramento do hipercubo em matriz, preservando a informação espacial.

Quando obtemos a matriz desdobrada, podemos utilizá-la diretamente nos métodos quimiométricos de primeira ordem.

2.4 – Modelos para dados de primeira ordem (bilineares)

Devido ao fato de cada pixel se comportar de maneira a representar uma amostra distinta, o que temos são espectros de diversos pixels, que podem ser tratados como diferentes amostras. Como a concentração de cada composto poderá ser diferente em cada pixel (algumas significativamente diferentes, outras não), obteremos um espectro diferente para cada pixel, que é resultante da soma dos espectros individuais de cada substância na concentração em que cada uma se encontra em cada pixel. Isso torna possível a utilização de vários modelos clássicos de métodos quimiométricos de primeira ordem, tais como: regressão linear múltipla, análise de componentes principais, regressão por componentes principais, quadrados mínimos parciais e resolução multivariada de curvas por quadrados mínimos alternados.

O processo de desdobramento apresentado no item 2.3 foi utilizado em todas as aplicações nesta tese, fornecendo aos dados a estrutura necessária para a aplicação dos métodos de primeira ordem citados anteriormente.

2.4.1 – PCA

A análise de componentes principais baseia-se na decomposição de uma matriz de dados **D** em termos chamados *scores* (**t**) e *loadings* (**l**). O produto entre cada par de *scores* e *loadings*, explicarão uma percentagem da variância da matriz **D**, de maneira que a soma do produto de todos estes pares será igual a **D**. Na decomposição PCA, cada um destes pares é denominado “componente principal” (PC). Assim, a primeira PC explica mais que a segunda, e esta mais que a terceira, e assim sucessivamente. Uma maneira de encontrar os *scores* e *loadings* de uma matriz é através da Decomposição de Valores Singulares, SVD (do inglês, *Singular Value Decomposition*).

Os *scores*, *loadings* e porcentagem de variância explicada para cada PC serão dados pelos termos da decomposição SVD de acordo com as equações que se seguem. Graficamente, a decomposição PCA é representada pela figura 12.

$$\mathbf{D} \xrightarrow{\text{SVD}} \mathbf{U} \times \mathbf{S} \times \mathbf{V}^T \longrightarrow \mathbf{T} \times \mathbf{L}^T$$

onde:

$$\mathbf{T}(\text{scores}) = \mathbf{U} \times \mathbf{S}, \quad \mathbf{L}(\text{loadings}) = \mathbf{V} \quad \text{e,} \quad \% \text{ var_exp_PC}_i = \frac{S_i}{\sum_{i=1}^{n^{\text{pc}}} S_i}$$

O diagrama ilustra a decomposição da matriz de dados **D** em componentes principais. À esquerda, a matriz **D** é representada por um retângulo azul. Isso é igual a uma soma de produtos de *scores* e *loadings*. Cada termo da soma consiste em um retângulo vertical azul contendo t_1 , t_2 , ..., t_n multiplicado por um retângulo horizontal azul contendo l_1^T , l_2^T , ..., l_n^T . Os termos são separados por sinais de adição e pontos suspensivos. À direita, essa soma é igual a um retângulo azul contendo a matriz **T** multiplicado por um retângulo azul contendo a matriz L^T , seguido por um sinal de adição e um retângulo azul contendo a matriz **E**.

Figura 12 – Decomposição de uma matriz de dados com PCA.

Softwares matemáticos como Matlab e Octave possuem um comando SVD que decompõe diretamente a matriz **D**, de maneira que a análise PCA pode ser facilmente realizada mesmo sem um programa especializado.

A PCA é comumente aplicada para determinar o posto (do inglês *rank*) que é o número de componentes necessárias para explicar a matriz de dados **D** [57,58]. Neste tipo de análise, o número de componentes principais necessárias para explicar satisfatoriamente a variância do conjunto de dados da imagem, está relacionado com o número de componentes químicos presentes no modelo. Esse tipo de aplicação da PCA é denominada *análise exploratória global*, e é utilizada principalmente para encontrar o número de substâncias que originam diferentes espectros (posto químico) na imagem quando não há um conhecimento prévio do modelo.

A PCA também é utilizada na *análise exploratória local*. Neste tipo de análise, determina-se o posto químico utilizando apenas conjuntos de pixels vizinhos, varrendo toda a imagem. A idéia neste tipo de análise é encontrar pixels com mais componentes do que o número de componentes conhecidos do modelo. Por exemplo, através de uma análise exploratória global encontra-se que a imagem possui 3 componentes, porém, quando se realiza a análise local encontra-se alguns pixels com 4 componentes. Esse componente adicional representa algum composto que está em pequena quantidade na imagem estando presente em apenas alguns pixels, não sendo possível identificá-lo na análise global [2].

Como explicado, o PCA decompõe a matriz de dados **D** em escores e loadings. Os loadings correspondem à dimensão espectral dos dados, que contém o peso de cada variável (número de onda) nos escores de cada pixel. Já os escores trazem, para cada pixel, valores que estão correlacionados à concentração de cada substância em cada pixel.

Imaginemos agora um conjunto de dados de espectroscopia UV, onde temos 100 amostras, cada uma com uma concentração diferente de 4 substâncias químicas. Neste caso teremos no conjunto total de dados 100 amostras, porém

somente 4 espectros, e o que caracterizará a similaridade entre as amostras será a intensidade (concentração) de cada um desses espectros em cada amostra. Então, se duas ou mais amostras tiverem concentrações próximas para cada uma das quatro substâncias, elas serão semelhantes. Da mesma maneira, se duas ou mais amostras possuírem escores semelhantes, elas terão aproximadamente a mesma composição química.

Como explicado anteriormente, cada pixel atua como uma amostra independente. Dessa maneira, podemos inferir diretamente que numa análise PCA, quando dois ou mais pixels apresentarem escores semelhantes, eles possuirão composição química semelhante, sendo o oposto também verdadeiro. Daí surge a aplicação dos *mapas de escores*. A figura 13 ilustra graficamente a obtenção do mapa de escores a partir de um conjunto de dados de espectroscopia de imagens.

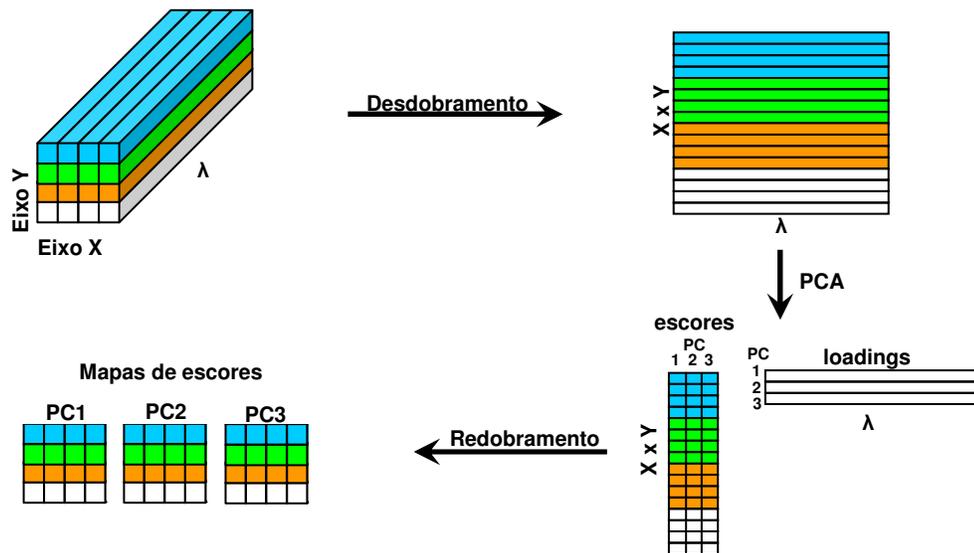


Figura 13 – Ilustração gráfica da obtenção do mapa de escores. Exemplo para uma imagem espectral de 4x4 pixels e 3 componentes principais. As cores dos pixels somente estão indicando que a posição espacial de cada pixel é mantida.

Se for possível visualizar diferenças significativas entre os escores dos pixels nos mapas de escores da figura 13, sobretudo da primeira e segunda componente principal (as quais explicam a maior parte da variância), pode-se afirmar que existe heterogeneidade na amostra analisada por espectroscopia de imagens.

2.4.2 – MCR-ALS

A resolução multivariada de curvas por quadrados mínimos alternados (MCR-ALS) tem sido o método de resolução mais comumente utilizado em análise de imagens [58,59]. Ele funciona por iteratividade otimizando os perfis de concentração e espectral (matrizes **C** e **S^T**) com a ajuda de restrições baseadas no conhecimento químico ou matemático sobre as características dos dados [59].

Após o desdobramento da imagem espectroscópica, é obtida a matriz **D**, de maneira semelhante como realizado para a PCA anteriormente. Esta matriz **D** é decomposta pelo algoritmo de quadrados mínimos alternados (ALS) no produto de duas matrizes: **C** e **S^T**, onde **C** representa a concentração de cada substância pura na imagem e **S** representa o espectro de cada substância pura. Desta maneira, estabelece-se uma relação linear equivalente à Lei de Beer-Lambert, onde:

$$\text{Abs} = abc, \quad \text{se } b = 1, \text{ então:} \quad \text{Abs} = ac = cs,$$

como os coeficientes de absorvidade representam o espectro (**S**) e **C** representa a concentração, chegamos à equivalência da relação. A expressão para o MRC se resume então ao seguinte:

$$\mathbf{D} = \mathbf{CS}^T + \mathbf{E},$$

onde **D** é a matriz de dados e **E** é o erro experimental.

A figura 14 mostra o processo de resolução para um exemplo de imagem espectroscópica. As fileiras em **S** contêm os espectros dos componentes puros e

as colunas **C** os perfis de concentração ou mapas de concentração desdobrados correspondentes. Este perfil é reestruturado de acordo com a estrutura da imagem original para mostrar apropriadamente o mapa de concentração do componente.

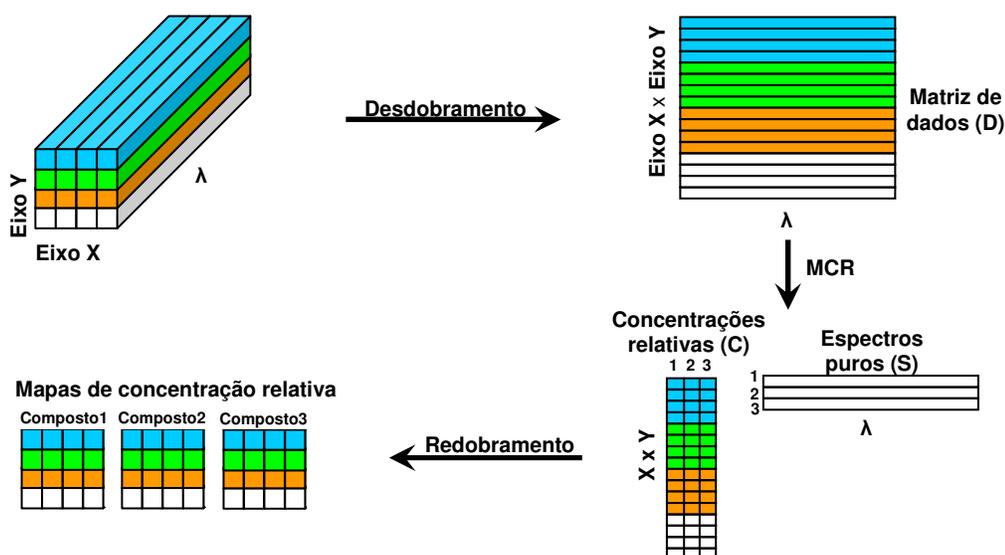


Figura 14 – Ilustração gráfica da obtenção do mapa de concentração relativa. Exemplo para uma imagem espectral de 4x4 pixels e 3 componentes químicos distintos. As cores dos pixels somente estão indicando que a posição espacial de cada pixel é mantida.

Os mapas de concentração relativa dos compostos são de grande utilidade, pois assim como os mapas de escores, trazem informações sobre a homogeneidade da amostra analisada além de fornecer uma boa estimativa do perfil espectral dos componentes que não estão homogêneos.

Os passos gerais do método aplicado para análise de imagens são resumidos a seguir:

1) Determinação do número de componentes em **D**, obtido a partir do PCA global.

2) Estimativa inicial do \mathbf{C} ou do \mathbf{S}^T .

As estimativas iniciais têm sido obtidas por seleção dos espectros mais dissimilares nas medidas das imagens [60] para formar a estimativa inicial para o \mathbf{S}^T . Como não existe uma variação seqüencial nos perfis de concentração desdobrados dos compostos na imagem, as estimativas iniciais de \mathbf{C} são formadas selecionando os valores de absorbância de um determinado comprimento de onda nos espectros contidos nas imagens.

3) Dado \mathbf{D} e \mathbf{S}^T , calcular \mathbf{C}^* ;

$$\mathbf{C}^* = \mathbf{D}\mathbf{S}^{T+} \quad (\mathbf{S}^{T+} \text{ é a pseudoinversa de } \mathbf{S}^T) \quad [59];$$

4) Dado \mathbf{D} e \mathbf{C}^* , calcular \mathbf{S}^{T*} ;

$$\mathbf{S}^{T+} = \mathbf{C}^{*+}\mathbf{D} \quad (\mathbf{C}^{*+} \text{ é a pseudoinversa de } \mathbf{C}^*) \quad [59];$$

Os perfis de concentração e espectral em uma imagem são forçados a ser positivos. A informação de posto local (isto é, presença ou ausência de determinadas substâncias em determinados pixels) pode ser usada quando disponível. Quando algumas imagens são tratadas conjuntamente, as substâncias conhecidamente ausentes em certas imagens são forçadas a possuir perfis de concentração nulos para estas imagens.

5) Verifica-se se o produto $\mathbf{C}^*\mathbf{S}^{T*}$ reproduz \mathbf{D} satisfatoriamente. Quando a reconstrução da informação original utilizando o modelo bilinear dado por \mathbf{C}^* e \mathbf{S}^{T*} é aceitável, o processo de resolução é terminado. Caso contrário, a otimização iterativa continua voltando ao passo 3. O critério de convergência é baseado na comparação do ajuste do modelo entre duas iterações consecutivas. Quando a diferença é suficientemente pequena (isto é, iterações adicionais não resultam em uma melhora significativa do ajuste), o processo iterativo é encerrado.

A qualidade do modelo ajustado é descrita em termos relativos pelo uso da expressão que se segue, onde $e_{i,j}$ corresponde ao resíduo associado com a

reprodução do i_j^{th} elemento no conjunto de dados e d_{ij} é o i_j^{th} elemento no conjunto de dados:

$$\% \text{ var} = 100 \times 1 - \frac{\sum_{i,j} e_{i,j}^2}{\sum_{i,j} d_{i,j}^2}$$

É importante frisar que o MCR-ALS busca espectros puros e não espectros de substâncias puras. Isso significa que tudo o que estiver homogêneo na análise por imagens irá gerar somente um espectro e será identificado pelo MCR-ALS como sendo somente uma substância, ainda que esse espectro seja resultante da mistura de 2 ou mais espectros de substâncias puras.

Outro ponto a ser ressaltado, é que o perfil de concentração encontrado pelo MCR-ALS, muitas vezes citado como perfil de concentração relativo, não se trata de uma unidade real de medida como aquele encontrado por métodos de calibração, mas sim, de uma unidade relativa que dá a intensidade do espectro puro normalizado em cada pixel. Essa intensidade de cada espectro puro em cada pixel é que é tomada como concentração relativa de cada substância nos pixel.

2.4.3 – *i*PLS

Diferentemente da PCA e do MCR-ALS, que são métodos exploratórios, os métodos quadrados mínimos parciais e quadrados mínimos parciais por intervalos são métodos quantitativos, nos quais é necessário realizar calibração prévia para quantificar as espécies de interesse.

O modelo PLS é o modelo de regressão multivariada mais comumente utilizada em calibração de dados de espectroscopia NIR. Ele se assemelha ao PCR, diferindo na maneira com que as componentes principais são calculadas. Enquanto as componentes principais do PCA buscam explicar a máxima variância de \mathbf{D} num espaço ortogonal, as componentes do PLS consideram a informação proveniente de \mathbf{Y} para otimizar a correlação entre os escores de \mathbf{D} (matriz \mathbf{T}) e as respostas \mathbf{Y} . Devido a este fato, as componentes do PLS são conhecidas como

“variáveis latentes” (VL). O PLS é calculado de maneira iterativa buscando a correlação máxima entre os escores de \mathbf{D} (\mathbf{T}) e de \mathbf{Y} (\mathbf{U}):

$$\mathbf{D} = \mathbf{T}\mathbf{L}^T + \mathbf{E}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U}\mathbf{Q}^T + \mathbf{F}$$

$$\mathbf{U} = \mathbf{B}\mathbf{T}$$

$$\text{Calibração: } \mathbf{B} = (\mathbf{T}^T\mathbf{T})^{-1}\mathbf{T}\mathbf{U}$$

$$\text{Previsão: } \mathbf{Y} = \mathbf{T}^*\mathbf{B}\mathbf{Q}^T$$

O iPLS, quadrados mínimos parciais por intervalos, é uma extensão do modelo PLS no qual os espectros da matriz \mathbf{D} são divididos em n partes, e são executados modelos PLS com cada uma dessas partes ou com combinações destas. Este artifício permite ao PLS encontrar regiões mais lineares e com menos ruídos, às quais proporcionarão um menor erro de calibração.

A figura 15 ilustra a representação gráfica da criação do modelo de calibração para espectroscopia de imagens, utilizada no capítulo 5. A figura 16 traz a previsão quantitativa de uma imagem espectral a partir do modelo criado na figura 15.

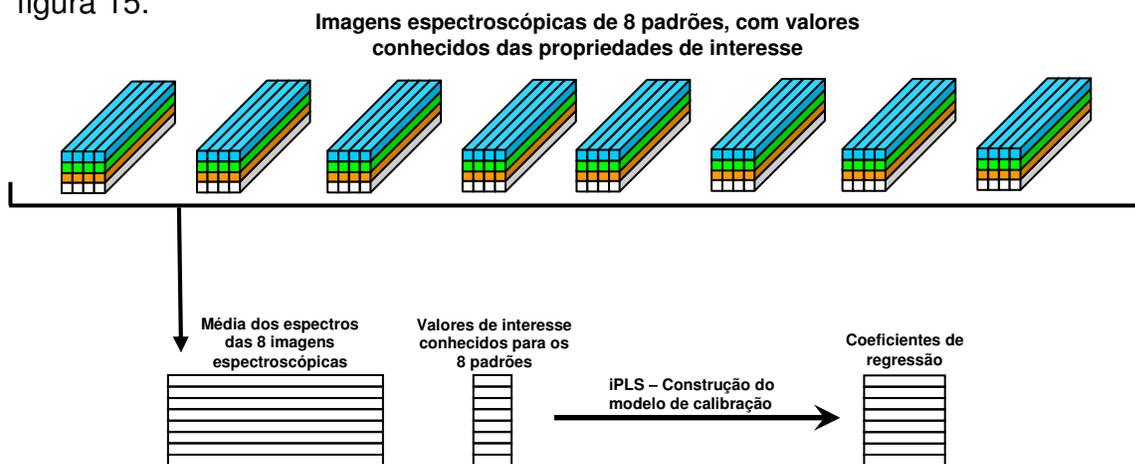


Figura 15 – Ilustração gráfica da obtenção da construção de um modelo de calibração para dados de espectroscopia de imagens utilizando os espectros médios de cada amostra.

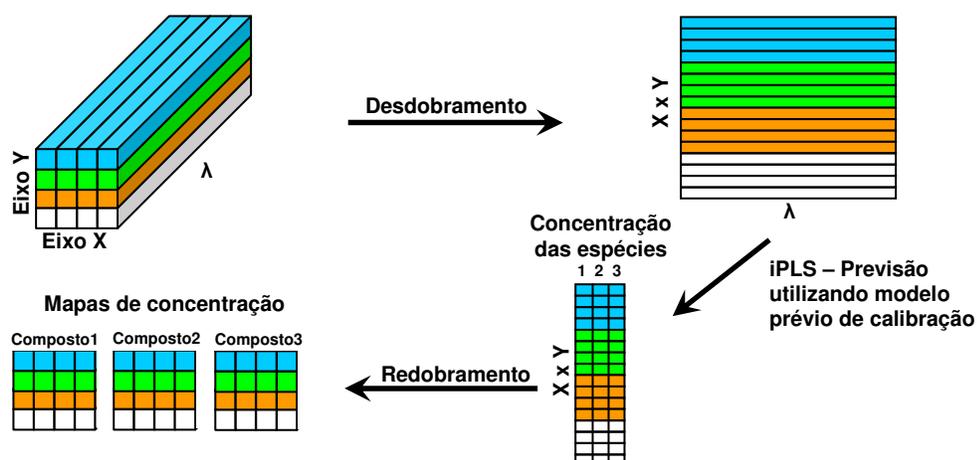


Figura 16 – Ilustração gráfica da obtenção do mapa de concentração. Exemplo para uma imagem espectral de 4x4 pixels e 3 espécies químicas calibradas. As cores dos pixels somente estão indicando que a posição espacial de cada pixel é mantida.

2.5 – Rotinas utilizadas

Para realização das análises PCA foi utilizada a rotina SVD do software Matlab 2008b.

As análises por MCR-ALS foram realizadas utilizando o software disponibilizado no site da Universidade de Barcelona [61] por Romà Tauler.

As análises por iPLS foram realizadas utilizando a rotina PLSREGRESS do software Matlab 2008b.

CAPÍTULO 3

ANÁLISE DA HOMOGENEIDADE DE UM MEDICAMENTO APRESENTADO COMO POMADA

3.1 – Introdução e objetivos

Medicamentos apresentados em forma de pomada são constituídos apenas de fase oleosa, sendo que, quase sempre, o veículo é uma mistura de parafinas de cadeia longa (vaselinas). Comumente, o processo de produção de uma pomada baseia-se nas seguintes etapas:

1º) Em um recipiente os excipientes e o princípio ativo são dissolvidos em um solvente, enquanto em outro recipiente a vaselina é aquecida até se liquefazer.

2º) O solvente com os excipientes é vertido e misturado à vaselina liquefeita.

3º) O sistema é submetido à agitação por um período de tempo considerado suficiente para se obter a homogeneidade no produto após o resfriamento e solidificação da pomada.

A homogeneidade em pomadas e cremes é uma propriedade de fundamental importância na qualidade do medicamento. Em apresentações sólidas, a homogeneidade não se altera com o tempo de prateleira dos medicamentos. Já em pomadas e cremes, o medicamento apresenta-se em forma semi-sólida, sendo que a mobilidade dos componentes do medicamento é suficientemente alta para diminuir a homogeneidade do produto ao longo do tempo.

Assim, o objetivo desta aplicação foi utilizar a espectroscopia de imagens NIR para analisar microscopicamente a homogeneidade de uma formulação apresentada na forma de pomada.

3.2 – Parte experimental

A pomada desenvolvida e analisada neste contexto era um produto para tratamento de doenças auto-imunes de pele, o API deste produto chama-se Tacrolimus, uma molécula bastante complexa produzida pela bactéria *Streptomyces Tsukubaensis*. A concentração do API na pomada era de 0,1%, não sendo possível visualizar seu espectro na região NIR devido sua baixa concentração. A figura 17 apresenta a fórmula estrutural do tacrolimus.

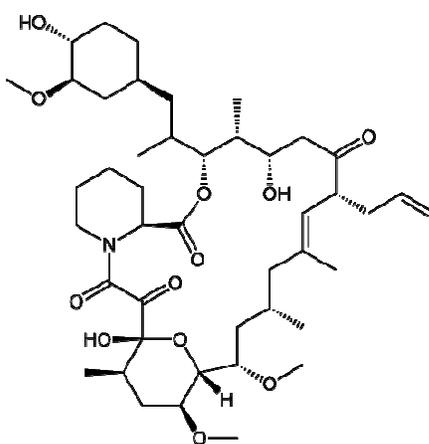


Figura 17 – Estrutura molecular do tacrolimus

Como dito anteriormente, uma das etapas de produção de pomadas, é a solubilização prévia do API em um solvente adequado, que será homogeneizado com a vaselina liquefeita. O solvente utilizado nesta pomada foi um solvente orgânico que continha um grupo funcional hidroxila (R – OH).

Análises de microscopia ótica de uma amostra exposta à estabilidade acelerada (40°C e 75% umidade relativa) por 3 meses haviam mostrado indícios de uma fase líquida ou gasosa nas bordas da fase semi-sólida, quando esta era amostrada numa plaqueta de vidro para microscopia,.

Com a análise por espectroscopia de imagens, seria possível identificar se as aparentes separações de fases na pomada eram de fato devido à

lipofobicidade do solvente (ou seja, este não ser solúvel na vaselina) ou se poderia ser uma fração líquida da vaselina. Isto é possível pois a imagem espectral apresenta informações químicas das amostras, e não somente informações visuais, como a microscopia convencional.

A análise foi realizada colocando uma pequena quantidade desta pomada entre duas lâminas de vidro, prensando manualmente a amostra entre as duas lâminas de microscopia.

Quando se prensa uma pomada, um creme ou mesmo um líquido entre duas lâminas, cria-se um caminho óptico bastante reduzido. Devido à espessura reduzida deste caminho óptico, existe a possibilidade de realizar as análises por transmitância, pois a quantidade de radiação que atinge o detector é suficiente para obter uma relação sinal/ruído satisfatória. As análises por transmitância na espectroscopia de imagem resultam em sinais mais intensos e menos ruidosos, pois a luz não é espalhada (o que acaba resultando em perda de luz), pelo contrário, continua focada.

Assim, essa aplicação foi realizada utilizando o modo de transmitância do espectrofotômetro de imagens. As análises foram realizadas utilizando pixels com dimensões de $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ e resolução espectral de 16cm^{-1} . Foram analisadas duas áreas de 4mm^2 ($2000 \times 2000\mu\text{m}$) que deram origem a duas imagens espectrais de 80×80 pixels. Assim, cada imagem era constituída por 6400 pixels, ou espectros. O tempo gasto para adquirir cada imagem espectral foi de 60 minutos.

3.3 Resultados e discussões

3.3.1 Análise prévia

A figura 18 apresenta as duas imagens visíveis das áreas analisadas por espectroscopia de imagens. Essas áreas foram selecionadas buscando regiões da

Capítulo 3 Análise da homogeneidade de um medicamento apresentado como pomada
amostra onde havia indícios de heterogeneidade, utilizando o microscópio visível do equipamento.

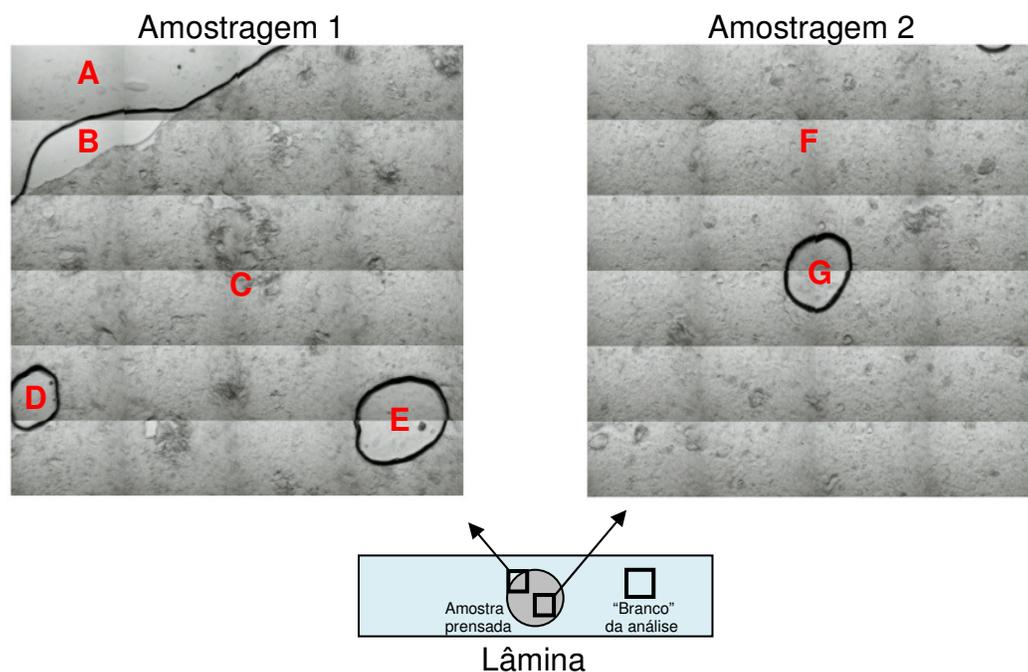


Figura 18 – Fotomontagem na região do visível, em escala de cinza, das áreas analisadas por espectrometria de imagens. As letras em vermelho representam diferentes estruturas dentro da pomada. A representação da amostra prensada na lâmina mostra a posição das áreas analisadas, sendo a amostragem 1 da borda da amostra e a amostragem 2 do centro da amostra. Ainda foi utilizada uma área do mesmo conjunto de lâminas para obter o “branco” das lâminas.

Como pode ser observado na figura 18, existem estruturas visivelmente distintas na pomada. Contudo, não é possível afirmar do que se tratam tais estruturas. Apenas sabe-se que as posições A e C da amostragem 1 na figura 18, correspondem à parte externa e interna da amostra, respectivamente, e também

que a posição F da amostragem 2 corresponde à parte interna da amostra. As outras regiões distintas presentes nas imagens, identificadas pelas posições B, D, E e G, são de composição desconhecida. Caso a composição destas fosse apenas ar atmosférico, não haveria maiores problemas na formulação, porém, tais regiões poderiam ter composição líquida, o que representaria separação de fases na pomada. Tal líquido poderia ser o solvente do API ou uma fração líquida da vaselina.

Após a obtenção das imagens visíveis da figura 18 e do “branco” das lâminas, foram obtidos os espectros de cada pixel, das áreas selecionadas no modo visível. A figura 19 apresenta os espectros NIR de alguns pixels analisados.

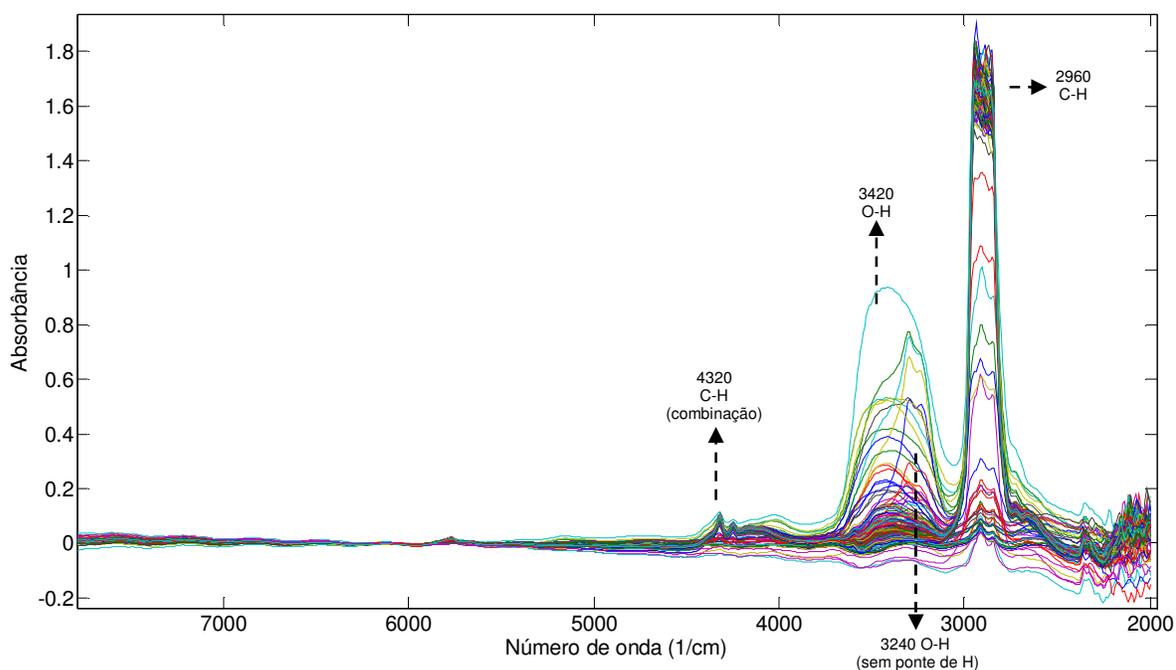


Figura 19 – Espectros NIR de pixels obtidos na análise espectroscópica das imagens da figura 18.

Observando a figura 19, é fácil notar que existem regiões (ou pixels) com diferentes espectros e, portanto, com diferente composição química. A variedade

de espectros já indica antecipadamente que a amostra não é completamente homogênea. Os picos correspondentes às vibrações C–H (2960 cm^{-1}) são muito intensos, o que já era esperado já que a porcentagem de vaselina (alcanos de cadeia longa, ou parafinas) na pomada é cerca de 90%. Mesmo com o caminho ótico bastante reduzido, não foi possível diminuir a absorção da banda correspondente às vibrações C–H abaixo de 1,8 unidades de absorbância, devido à grande absorvidade dos alcanos. As bandas de O–H (3420 cm^{-1}) vêm da hidroxila do solvente utilizado.

Depois de obtida a imagem espectroscópica, pôde-se realizar uma análise inicial da homogeneidade sem nenhum tipo de pré-tratamento. Como mostrado na figura 19, existem diferentes picos de absorção nos pixels. Desta maneira, pode-se reconstruir as imagens das amostragens 1 e 2 da figura 18 utilizando valores de absorbância de uma única frequência para cada pixel. Assim, a imagem será construída de maneira semelhante à imagem visível da figura 18, porém ao invés do valor de escala de cinza, os pixels irão conter o valor de absorbância de determinada frequência. A figura 20 mostra as imagens 1 e 2 da figura 18 em termos de absorção nas frequências 4320 , 3420 , 3240 e 2900 cm^{-1} , que são picos característicos do espectro desta pomada.

A figura 20, embora sem nenhum tratamento, já traz informações bastante interessantes sobre a amostra. Nas imagens da figura 20 que trazem os mapas de absorção do número de onda 4320 cm^{-1} , o qual corresponde às bandas de combinação de vibrações C–H, pode-se observar que praticamente toda a amostra possui intensidade de absorção semelhante. Porém algumas regiões praticamente não absorveram radiação. Essas regiões que não apresentaram absorção na banda C-H provavelmente devem ser ar atmosférico dissolvido na pomada.

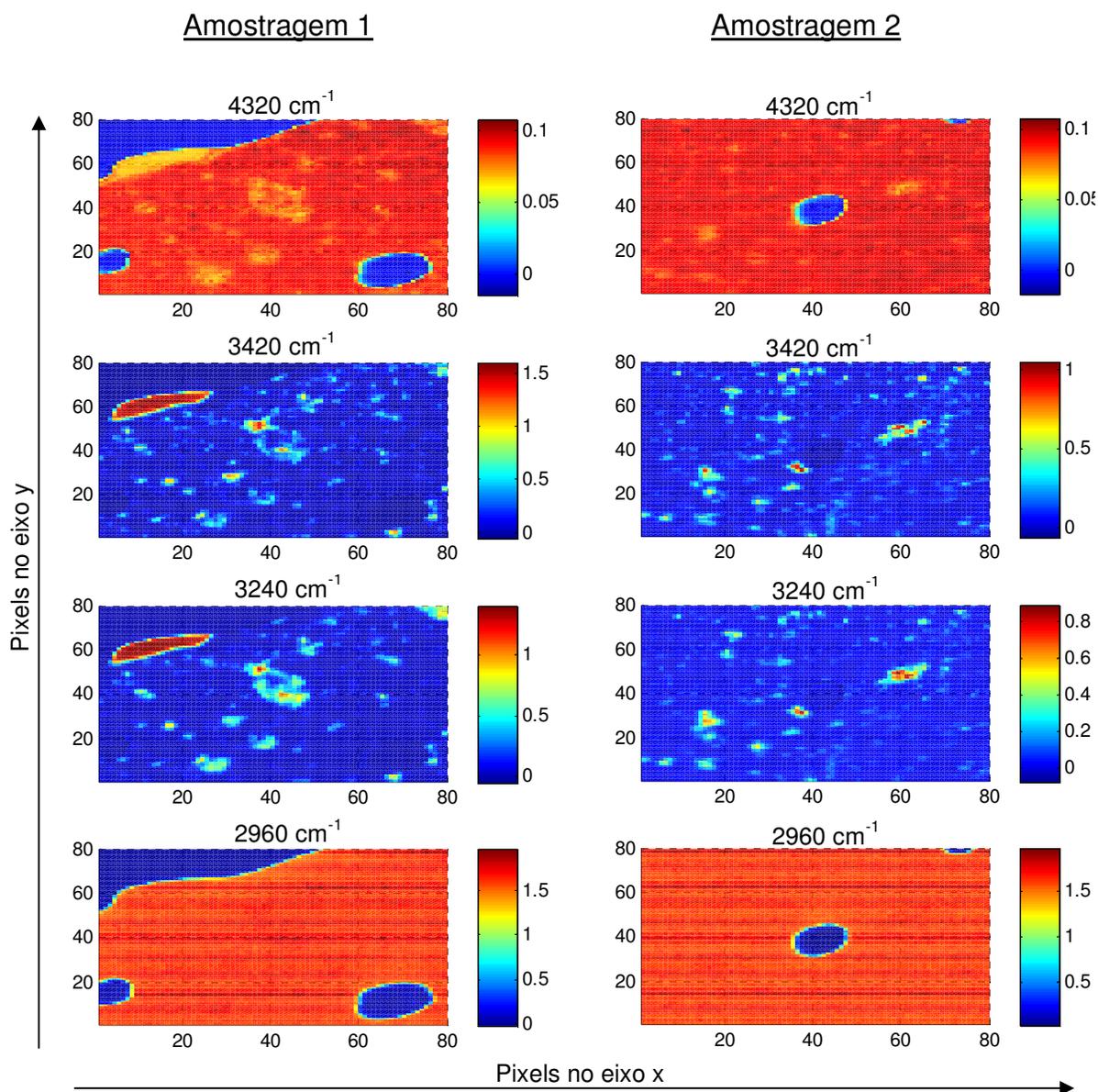


Figura 20 – Mapas de absorção: reconstrução das imagens das amostragens 1 e 2 da figura 18 utilizando a intensidade de absorção para as frequências 4320 cm^{-1} , 3420 cm^{-1} , 3240 cm^{-1} e 2960 cm^{-1} . As barras de cores apresentam os valores de absorção.

Nas imagens correspondentes aos mapas de absorção do número de onda 3420 cm^{-1} , o qual corresponde ao estiramento O–H, pode-se ver que os pixels que

possuem a maior absorção nesta região estão concentrados em algumas partes da amostra, tanto para a amostragem 1 quanto para a amostragem 2. De antemão, sabemos que o solvente possui um grupo O–H, não presente na vaselina, e essa imagem já é um indício da separação de fase deste solvente diante da vaselina.

Pode-se observar nos espectros da figura 18, que ao lado da banda de 3420 cm^{-1} correspondente ao estiramento O–H, existe uma banda mais estreita em torno do comprimento de onda de 3240 cm^{-1} . Essa banda é normalmente atribuída ao estiramento N–H de aminas, porém não havia qualquer tipo de amina na formulação da pomada. Sabe-se que o estiramento O–H adquire forma de banda mais larga de absorção no infravermelho devido à presença de ligações de hidrogênio, que expandem os níveis de energia de absorção. Desta maneira, o mais provável é que essa banda em 3240 cm^{-1} também seja de origem do estiramento O–H, porém originada em regiões onde o solvente esteja parcialmente dissolvido na vaselina, de maneira que há certo acúmulo do solvente, mas ainda não há predominância de ligações de hidrogênio. A diferença entre o estiramento O–H com e sem ligações de hidrogênio é comumente encontrada em tabelas de atribuição de bandas [62].

Devido ao fato das absorções nas frequências 3420 cm^{-1} e 3240 cm^{-1} se sobreporem, os mapas de absorção para essas duas frequências na figura 20 são muito semelhantes.

Ainda na figura 20, nas imagens do mapa de absorção do número de onda 2960 cm^{-1} , o qual corresponde ao estiramento C–H, pode-se ver que praticamente toda a amostra possui intensidade de absorção semelhante, com exceção de algumas bolhas. Já era esperado que tanto a vaselina como o solvente utilizado absorvessem nesta frequência, pois ambos possuem ligações C–H, sendo justificável que estas imagens possuam absorção em todas as regiões, ainda que esteja ocorrendo separação de fases.

Nas duas amostragens realizadas na pomada, pôde-se observar que existiam estruturas distintas em diferentes regiões nas superfícies analisadas. Pela figura 20, pôde-se ver que algumas dessas bolhas não absorveram em nenhuma das regiões analisadas, isso indica que possivelmente as duas regiões inferiores da amostragem 1 (estruturas D e E da figura 18) e a região central da amostragem 2 (estrutura G da figura 18) não passam de bolhas de ar dissolvidas na pomada.

Já a região superior da amostragem 1 (estrutura B da figura 18), apresenta absorção diferente para diferentes frequências, indicando possível separação de fases.

3.3.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

Para a realização da análise exploratória com o PCA e com o MCR-ALS, os dados foram tratados de maneira a maximizar as diferenças que possam existir entre os espectros nos diferentes pixels. Os espectros obtidos passaram pelos pré-tratamentos (respeitando a seqüência):

1. Alinhamento da linha base;
2. Seleção da região espectral que continha a maior parte da informação;
3. Alisamento por média móvel (n=5);
4. Primeira derivada;

A figura 21 traz os espectros já tratados, antes e após a primeira derivada. Comparando os espectros com e sem a primeira derivada, pode-se observar o benefício da primeira derivada. Os picos em 3420 e 3240 cm^{-1} que estavam sobrepostos adquiriram sinais não sobrepostos após o tratamento com a primeira derivada. Essa característica é especialmente importante no método MCR-ALS, facilitando consideravelmente a convergência correta do modelo. Para as análises

PCA e MCR-ALS foram utilizadas as primeiras derivadas dos espectros tratados, ilustrados na figura 21B.

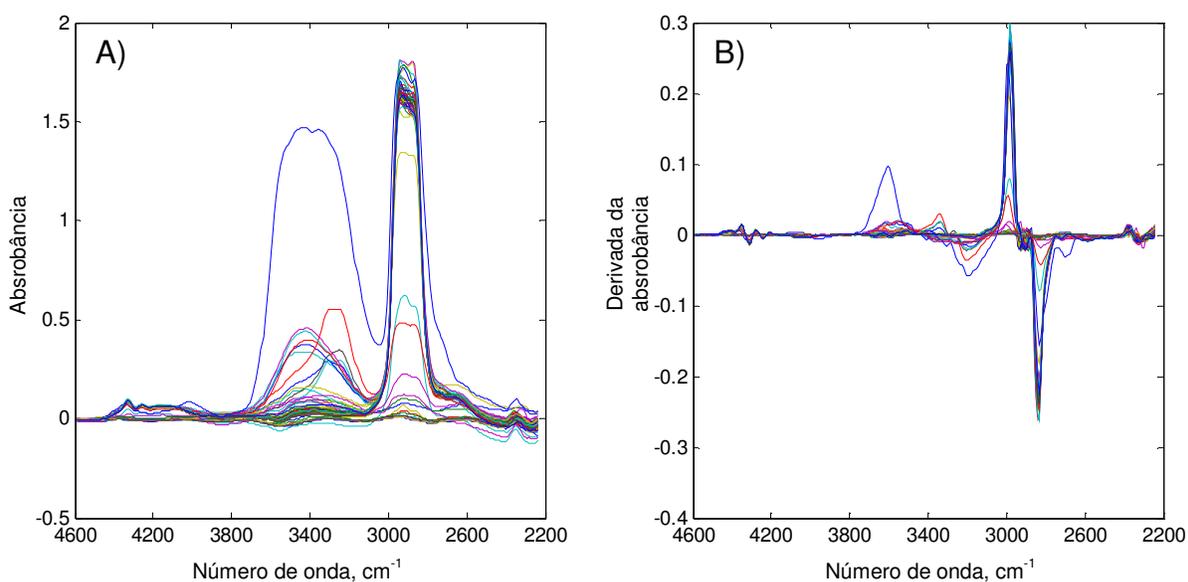


Figura 21 – Espectros tratados: (A) antes e; (B) após a aplicação de primeira derivada.

O PCA foi então realizado após o tratamento dos dados. A figura 22 mostra a variância explicada pelas primeiras 15 componentes principais, para as duas amostragens da figura 18.

Pode-se observar na figura 22 que o número ótimo de componentes principais para descrever o modelo são 3 componentes, já que após a terceira componente a porcentagem de variância explicada é praticamente constante. Assim, será considerado que o posto da matriz de dados de cada amostragem é 3, ou seja, os espectros de todos os pixels podem ser obtidos através de combinação linear de três espectros individuais.

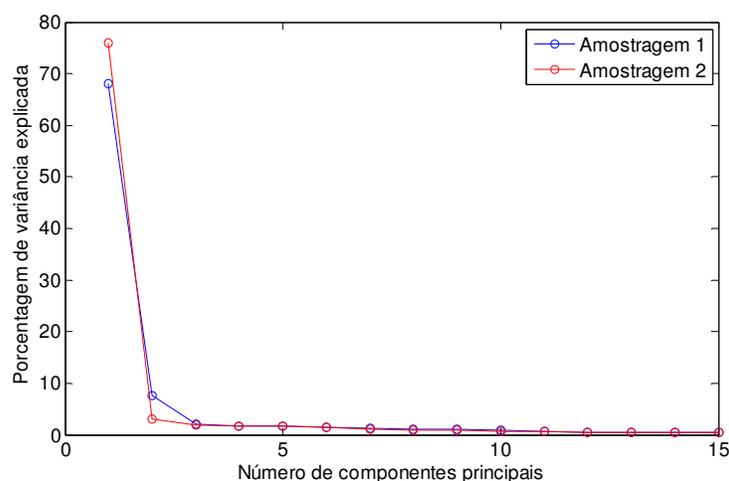


Figura 22 – Porcentagem de variância explicada pelas 15 primeiras componentes principais na análise PCA para as duas amostragens da pomada.

Numa análise mais cuidadosa da figura 22, observa-se que a variância total explicada pelas três primeiras componentes é de aproximadamente 80%, tanto para a amostragem 1 como para a amostragem 2. Aparentemente uma variância de 80% não explica satisfatoriamente um conjunto de dados, porém vale lembrar que esses dados são de imagem, sendo que temos 6400 pixels, o que equivaleria a uma análise PCA de 6400 amostras na análise espectroscópica convencional. O alto número de pixels faz aumentar a presença de diferentes perfis de ruídos. Assim, quanto maior o número de pixel analisados, menor será a porcentagem de variância explicada utilizando o mesmo número de componentes numa análise PCA, não significando, contudo, que os dados de interesse não estejam contidos nas primeiras componentes principais.

Como explicado no capítulo 2, quando realizamos o PCA em dados de espectrometria de imagens, podemos associar os escores de cada componente principal a cada pixel, e montar os mapas de escores. A figura 23 traz os mapas dos escores das 4 primeiras componentes principais da amostragem 1, e a figura 24 traz os vetores de loadings associados a essas componentes principais. As figuras 25 e 26 trazem as mesmas informações, porém para a amostragem 2.

Enquanto os mapas de absorvidade (figura 20) trazem informações sobre uma única frequência, os mapas de escores trazem o “resumo químico” dos pixels, isto é, mostram diretamente a similaridade dos espectros contidos em cada pixel. Isso porque quando dois ou mais pixels possuem os mesmos valores de escores, muito provavelmente eles possuirão a mesma composição química.

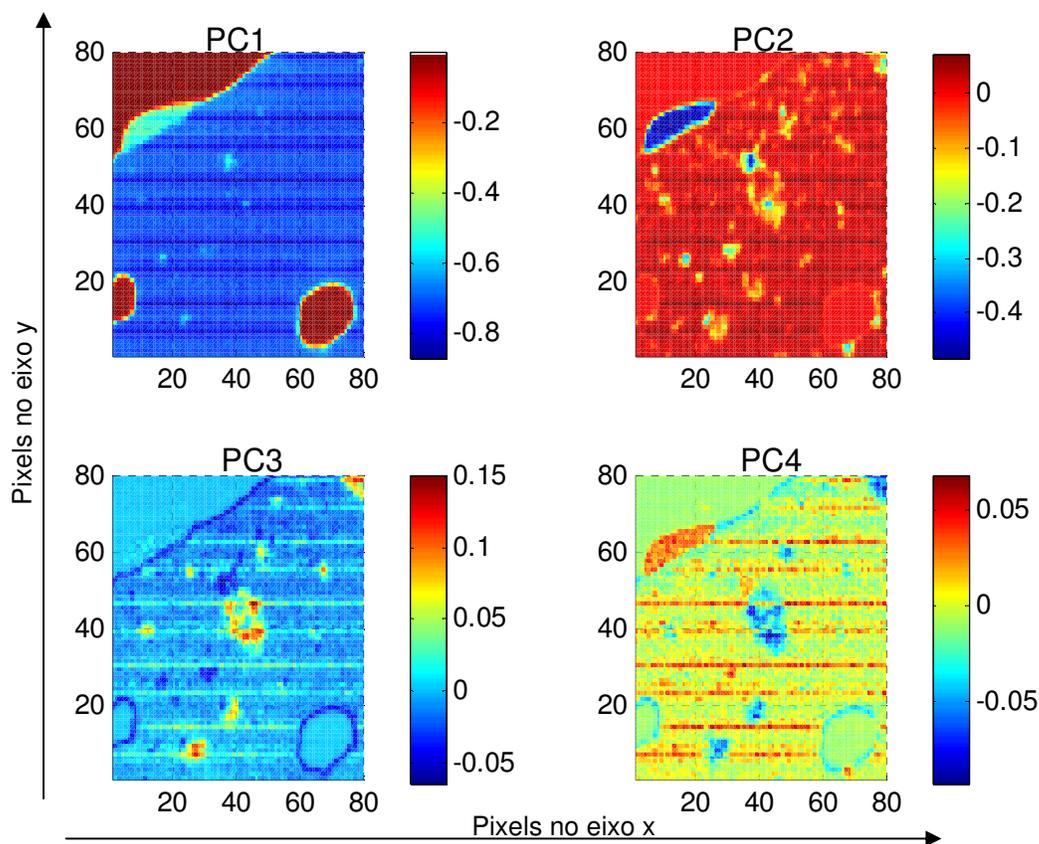


Figura 23 – Mapa de escores dos quatro primeiros componentes principais da amostragem 1.

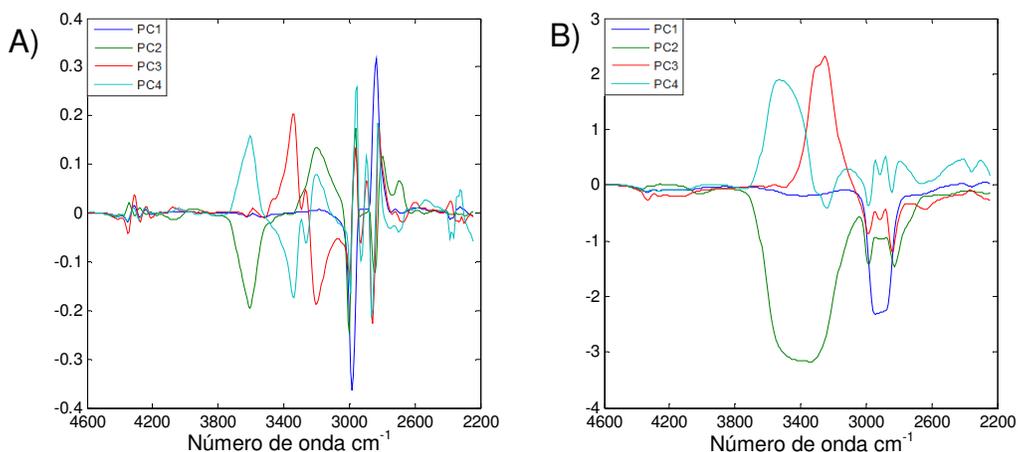


Figura 24 – (A) Loadings dos 4 primeiros componentes principais da amostragem 1 e; (B) integral numérica desses loadings.

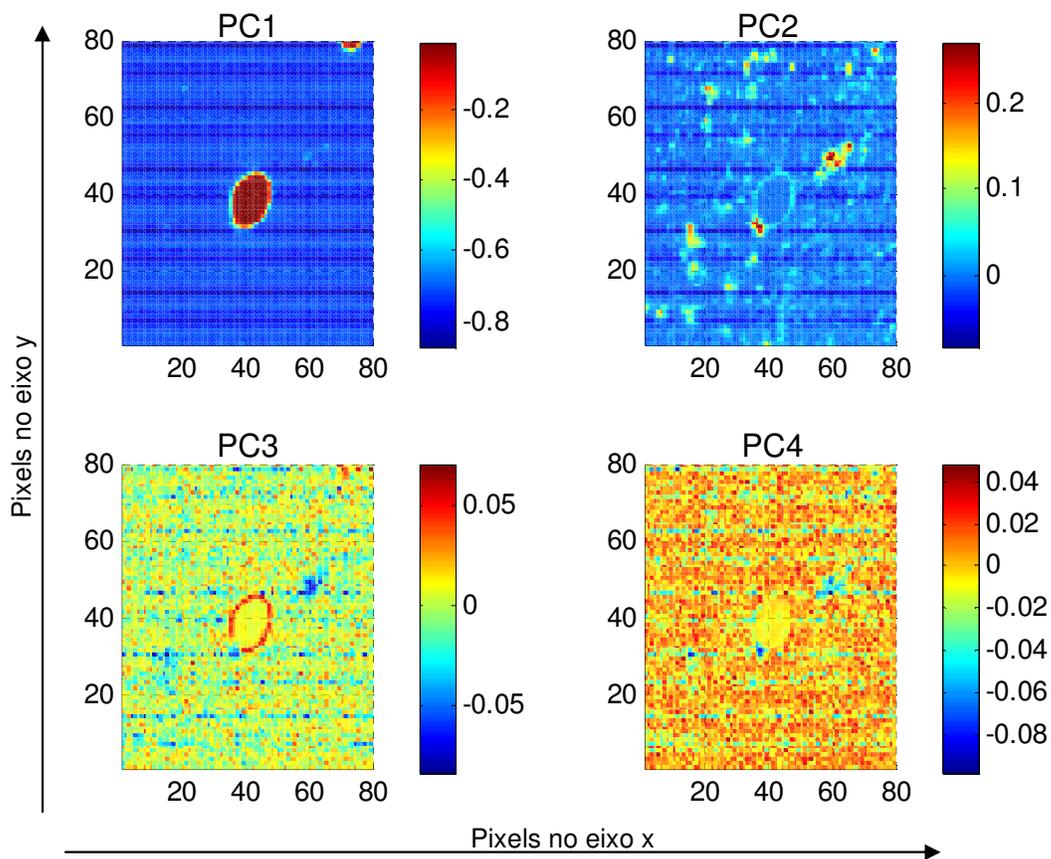


Figura 25 – Mapa de escores dos quatro primeiros componentes principais da amostragem 2.

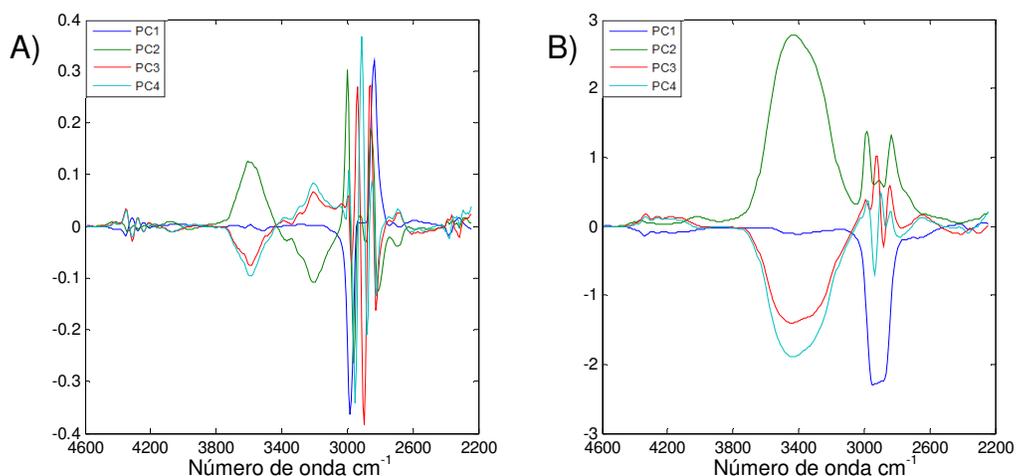


Figura 26 – (A) Loadings dos 4 primeiros componentes principais da amostragem 2 e; (B) integral numérica desses loadings.

As duas regiões inferiores da amostragem 1 (estruturas D e E da figura 18) realmente são de ar atmosférico, já que o escore para essas estruturas é próximo de zero para todas as componentes principais, como pode ser observado na figura 23. Já a região superior da amostragem 1 (estrutura B da figura 18) possui escores diferentes em relação ao restante da pomada para cada componente principal, tratando-se realmente de uma separação de fases entre duas substâncias com espectros distintos.

Os escores dos pixels da região central da amostragem 2 (estrutura G da figura 18) também são próximos de zero, confirmando que também trata-se de uma bolha de ar.

Nas figuras 24 e 26, os loadings dos PCAs das duas amostragens mostram que as frequências que possuem maior influência sobre os escores estão em torno de 3420 cm^{-1} e 2960 cm^{-1} , que são justamente as frequências correspondentes aos estiramentos O–H e C–H, respectivamente. O alto nível de ruídos em torno da frequência 2960 cm^{-1} para a derivada dos loadings é causado devido a esse pico apresentar ruído elevado no seu máximo de absorção, pois

devido à alta absorvidade desta frequência na pomada, a absorção está próxima a duas unidades de absorbância, como observado na figura 21A.

3.3.3 Resolução Multivariada de Curvas (MCR-ALS)

O método MCR é um método iterativo baseado nos quadrados mínimos e para ser inicializado necessita de uma estimativa dos “espectros puros” presentes na amostra. No pacote MCR-ALS, está incluído a rotina “*pure*”, que teoricamente seleciona os espectros mais puros do conjunto de dados. A rotina *pure* foi utilizada para inicializar o método MCR-ALS.

É importante ressaltar que, como o MCR é um método não-supervisionado, tudo o que estiver homogêneo na amostra será considerado como sendo um único espectro ou substância. Nesse sentido, a expressão “espectro puro” aqui não se refere a um componente puro, mas sim, a soma de componentes que tenham concentração constante em determinadas regiões da imagem.

Com base na análise dos espectros dos pixels (onde se visualiza claramente 3 espectros distintos), nas componentes principais obtidas no PCA (onde foi considerado que as 3 primeiras componentes explicam a variação espectral), e em análises prévias com o MCR-ALS (buscando 2, 3 ou 4 espectros distintos), a condição ótima para a análise foi a busca de 3 espectros distintos.

Através dos quadrados mínimos alternados, foram recuperadas estimativas da intensidade destes 3 espectros em cada pixel. Essa intensidade está relacionada diretamente com a concentração dos componentes em cada pixel. A figura 27 traz as imagens das estimativas dos mapas de concentração obtidos através do método MCR-ALS para as amostragens 1 e 2. A figura 28 e a figura 29 trazem as derivadas dos espectros individuais recuperados e a integral numérica dessas derivadas das amostragens 1 e 2, respectivamente.

Pode-se notar que a escala de cores do MCR nos mapas de concentração contempla somente valores positivos. Isso é devido à restrição de não-

negatividade nos valores que correspondem à concentração, já que não existe concentração negativa. Na amostragem 1 da figura 27, pode-se visualizar claramente que a composição das duas regiões inferiores é zero nos mapas de concentração dos três componentes. Já a região superior possui alta concentração dos três componentes. Já a região superior possui alta concentração da componente 3, e o restante da pomada tem apenas alguns pixels com alta concentração desta componente.

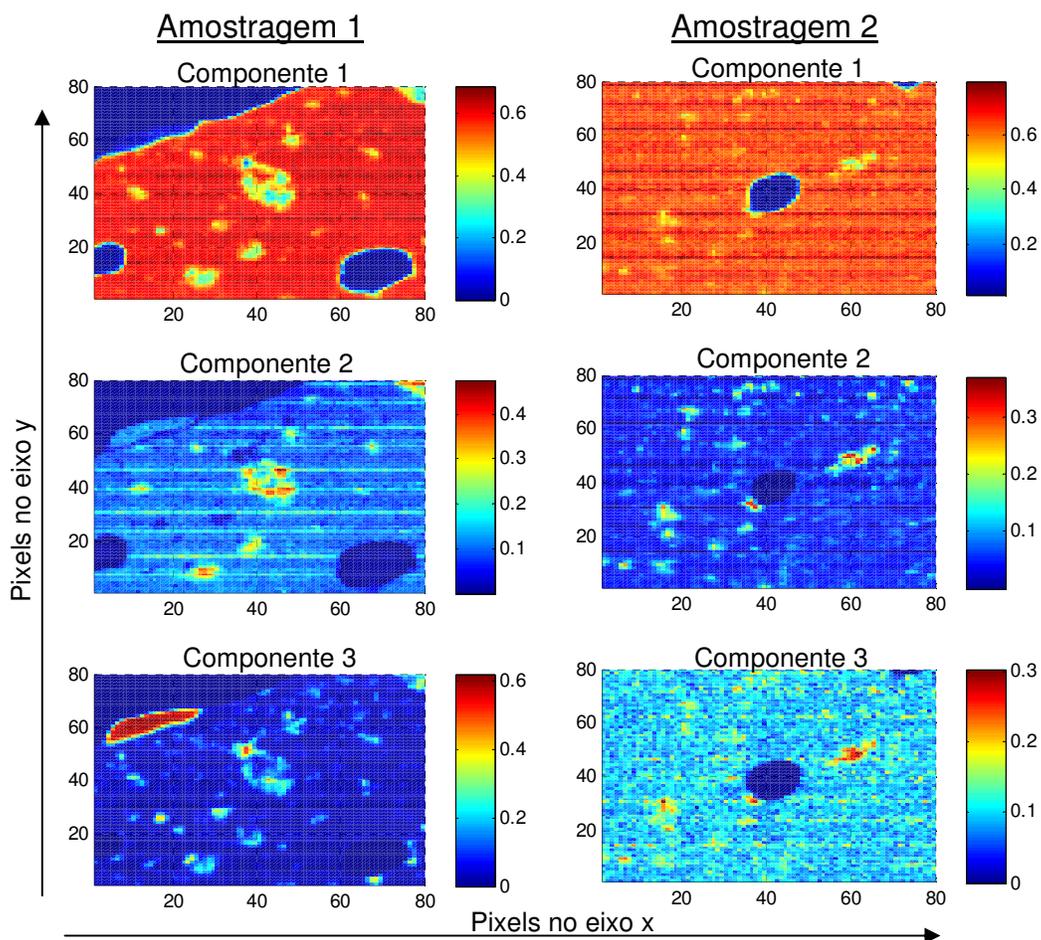


Figura 27 – Mapas de concentração: resultados obtidos para as duas amostragens da pomada apresentadas na figura 18. A numeração corresponde aos componentes químicos no MCR.

Na amostragem 2 da figura 27, a amostra se encontra mais homogênea para os três componentes recuperados pelo MCR-ALS, com exceção de alguns pontos além da bolha de ar presente no meio da imagem.

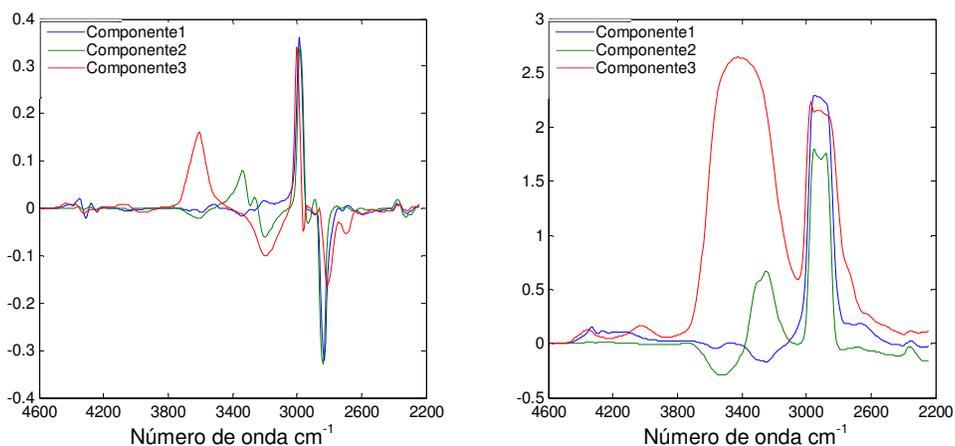


Figura 28 – Para a amostragem 1: (A) Espectros puros recuperados e; (B) integral numérica desses espectros.

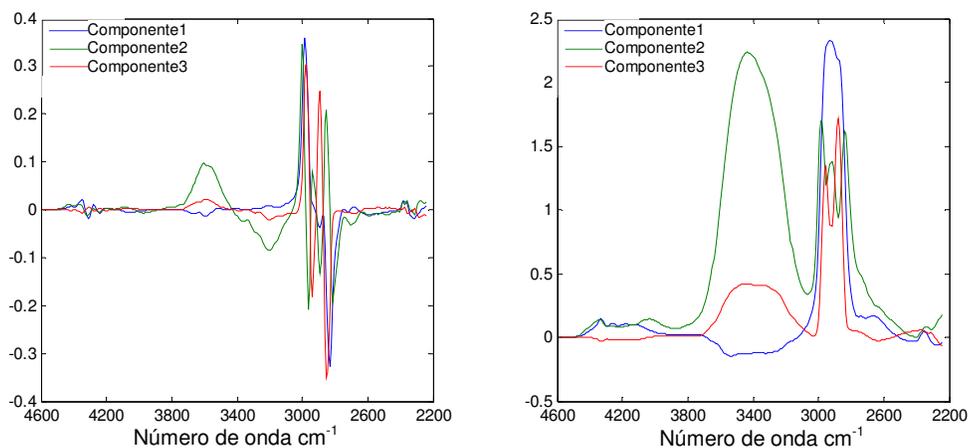


Figura 29 – Para a amostragem 2: (A) Espectros puros recuperados e; (B) integral numérica desses espectros.

Através da análise dos espectros recuperados pelo MCR-ALS apresentados nas figuras 28B e 29B, pode-se claramente observar que a primeira componente está relacionada com o estiramento C-H, com máximo de absorção em torno de

2960 cm^{-1} . A segunda componente da figura 28, está relacionada com o estiramento O-H, com máximo de absorção em torno de 3300 cm^{-1} , e a terceira componente ao estiramento O-H, com máximo de absorção em 3420 cm^{-1} , que foi considerado a frequência de estiramento O-H na presença de ligações de hidrogênio. Comparando os mapas de concentração relativa da primeira amostragem na figura 27, pode-se notar que a componente 3 está acumulada numa região da imagem, fazendo sentido o fato desta componente apresentar absorção no estiramento O-H em forma de banda, ao contrário da componente 2, que está mais dispersa no mapa de concentração relativo, e apresenta um espectro estimado com pico mais estreito para a absorção na região do estiramento O-H.

As segunda e terceiras componentes para a segunda amostragem (figura 29) foram invertidas pelo MRC-ALS em relação à primeira amostragem. Pode-se observar na figura 29 que os espectros recuperados da segunda e da terceira componente possuem bandas largas em 3420 cm^{-1} , embora a segunda componente tenha uma banda bem mais intensa. Da mesma maneira que na primeira amostragem, na segunda amostragem o espectro com menor intensidade de absorção na banda O-H está mais disperso no creme (componente 2, amostragem 2, figura 27), e o espectro com maior intensidade está concentrado em alguns pontos (componente 3, amostragem 2, figura 27), reforçando a teoria do deslocamento da absorção do estiramento O-H em função das ligações de hidrogênio.

3.4 Conclusões

A falta de micro-homogeneidade da pomada em questão foi comprovada com auxílio da espectroscopia de imagens. O problema envolvido com a migração do solvente é que ele arrastava consigo o API, diminuindo a homogeneidade do produto.

A vantagem da utilização da espectroscopia de imagens nestes casos é clara, já que não há qualquer tipo de pré-tratamento da amostra, a análise é mais rápida e os resultados são interpretados visualmente, com uma resolução micrométrica.

CAPÍTULO 4

ANÁLISE DE PRECIPITADOS EM MEDICAMENTO APRESENTADO COMO CREME

4.1 – Introdução e Objetivos

Medicamentos apresentados em forma de creme são constituídos de uma fase aquosa e uma fase oleosa (normalmente uma vaselina liquefeita) na presença de um surfactante formando uma emulsão.

Comumente, o processo de produção de um creme baseia-se nas seguintes etapas:

1º) Em recipientes separados, os excipientes e o API são dissolvidos em um solvente apropriado e a vaselina é aquecida até se liquefazer;

2º) O solvente com os excipientes e com o API é vertido e misturado à vaselina liquefeita, sob agitação, sendo o surfactante adicionado à essa mistura;

3º) É adicionada certa quantidade de água à mistura da etapa 2, formando a emulsão;

4º) O sistema é submetido à agitação por um período de tempo considerado suficiente para se obter a homogeneidade do produto após o resfriamento do creme.

Como discutido anteriormente, a homogeneidade em pomadas e cremes é uma propriedade de fundamental importância na qualidade do medicamento, sendo que a ocorrência da separação de fases compromete a eficácia do medicamento.

Assim, o objetivo desta aplicação foi utilizar a espectroscopia de imagens NIR para analisar microscopicamente a homogeneidade de uma formulação apresentada na forma de creme.

4.2 Parte experimental

O creme analisado neste contexto era um medicamento utilizado para câncer de pele e outras doenças dérmicas, tendo um efeito imunomodulador sobre

a resposta das células. O API deste creme é chamado de Imiquimode e sua estrutura é ilustrada na figura 30.

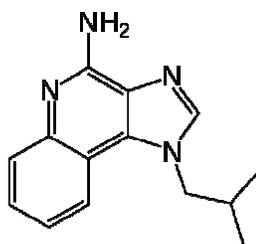


Figura 30 – Estrutura molecular do imiquimode.

O creme foi preparado solubilizando previamente o API em um solvente apropriado, bastando para as conclusões a informação de que ele possui um grupo funcional carboxila, ou seja, era um ácido carboxílico (R – OOH). A este era adicionada vaselina oftálmica e então o surfactante e água. Desta formulação, aproximadamente 50% consistia de água, 40% de fase oleosa (incluindo o solvente), 5% do API e o restante de outros excipientes. Análises prévias, realizadas por microscopia ótica, mostraram que havia sinais de precipitação de algum componente no produto. Através de estudos da formulação e busca bibliográfica, foi encontrado que o princípio ativo formava sais com alguns ácidos orgânicos, devido ao fato de o API ser uma amina, que é um composto básico [63].

Para confirmar que os sólidos formados no creme eram de fato sais do princípio ativo, foi utilizada a microscopia de imagem. Assim, seria possível analisar os espectros dos cristais isoladamente, e comparar com a fração homogênea do creme.

A análise foi realizada colocando uma pequena quantidade do creme entre duas lâminas de vidro, prensando manualmente a amostra entre as duas lâminas de microscopia da mesma maneira que foi realizada com a pomada no capítulo 3, criando também um caminho ótico bastante reduzido.

Nesta aplicação, foi possível trabalhar com a menor resolução espacial do equipamento, que é de $6,25 \times 6,25 \mu\text{m}^2$, pois mesmo com essa resolução foi obtida uma relação sinal/ruído satisfatória. Os fatores que possibilitaram essa alta resolução espacial foram a utilização do modo transmitância no equipamento, o reduzido caminho ótico e a baixa absorvidade molar do creme (se comparado com a pomada do capítulo 3, onde somente foi possível trabalhar com $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ utilizando um caminho ótico semelhante).

Assim, como no capítulo anterior, foram realizadas duas amostragem do creme disperso entre as lâminas de vidro. As análises foram realizadas no modo de transmitância, utilizando pixels com dimensões de $6,25 \times 6,25 \mu\text{m}^2$ e resolução espectral de 16 cm^{-1} . Foram analisadas duas áreas de 1mm^2 ($1000 \times 1000\mu\text{m}$) que deram origem a duas imagens espectrais de 160×160 pixels. Logo, cada imagem era constituída por 25600 pixels ou espectros. O tempo de aquisição de cada imagem foi de aproximadamente 4 horas.

4.3 Resultados e discussões

4.3.1 Análise prévia

A figura 31 traz as imagens visíveis das áreas analisadas por espectroscopia de imagens.

Como pode ser visto na figura 31, existem estruturas visivelmente distintas no creme. Tais estruturas assemelham-se a hexágonos que poderiam ser cristais precipitando no creme.

Após a obtenção das imagens visíveis da figura 31, foram obtidas as imagens espectroscópicas da mesma área. A figura 32 traz os espectros NIR de alguns pixels das áreas analisadas.

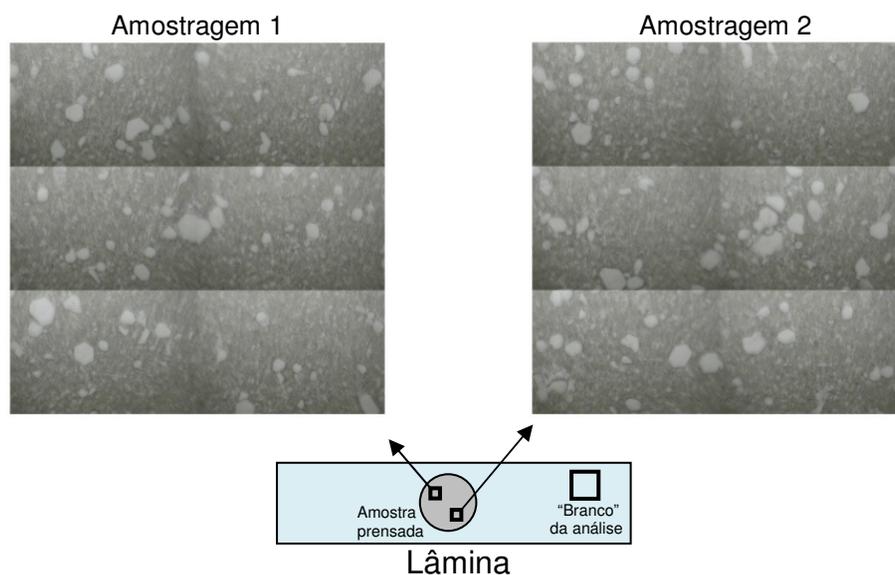


Figura 31 – Fotomontagem na região do visível, em escala de cinza, das áreas analisadas por espectroscopia de imagens. A representação da amostra prensada na lâmina mostra a posição das áreas analisadas, sendo ambas as amostragens da parte interna da amostra dispersa na lâmina. Foi utilizada ainda uma área do mesmo conjunto de lâminas para obter o “branco” das lâminas.

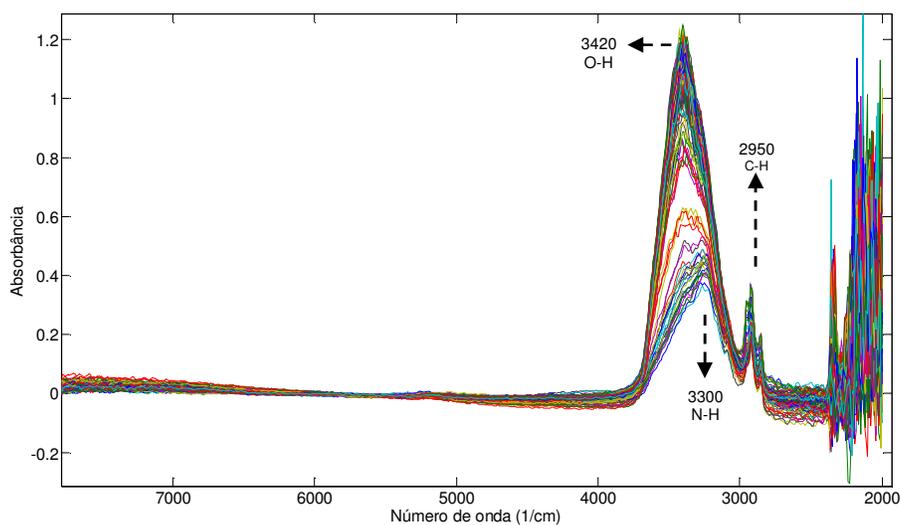


Figura 32 – Espectros NIR de alguns pixels, obtidos na análise espectroscópica das áreas da figura 31.

Observando a figura 32 pode-se notar que existem regiões (ou pixels) com diferentes espectros e, portanto, com diferente composição química. A variedade de espectros já indica antecipadamente que a amostra não é completamente homogênea. O pico de grande intensidade em 3420 cm^{-1} vem da alta porcentagem de água na formulação (em torno de 50%). O pico em 3300 cm^{-1} provem do estiramento N–H da única amina presente na formulação, o próprio princípio ativo Imiquimode. A banda em 2950 cm^{-1} é proveniente dos estiramentos C–H da fase oleosa do creme que contém, sobretudo, vaselina.

Após obtidas as imagens espectroscópicas, pôde-se realizar uma análise inicial da homogeneidade sem nenhum tipo de pré-tratamento. Como mostrado na figura 32, existem diferentes picos de absorção nos pixels. Desta maneira, pode-se reconstruir a figura com os valores de absorbância para alguns números de onda. A figura 33 apresenta os mapas de absorbância em três comprimentos de onda: 3420 cm^{-1} , 3240 cm^{-1} e 2950 cm^{-1} , para as duas amostragens realizadas.

A figura 33, embora sem nenhum tratamento, já traz informações importantes sobre a amostra. Nas imagens da figura 33 que trazem os mapas de absorção do número de onda 3420 cm^{-1} , correspondente ao estiramento O–H, pode-se ver que praticamente toda a amostra possui alta intensidade de absorção com exceção das estruturas hexagonais, visíveis já na figura 31. Como a formulação possui mais de 50% de água, o esperado é que a imagem referente à esta banda estivesse distribuída por toda a superfície da amostra, de maneira homogênea. Através dessa imagem, já é possível afirmar que as estruturas cristalinas possuem muito menos água que o restante do creme.

Os mapas de absorção do número de onda 3240 cm^{-1} presentes na figura 33, não trazem informações úteis neste momento, já que a banda está sobreposta com a banda da água, presente em grande quantidade no creme de maneira que o mapa de absorção fica semelhante ao do número de onda 3420 cm^{-1} .

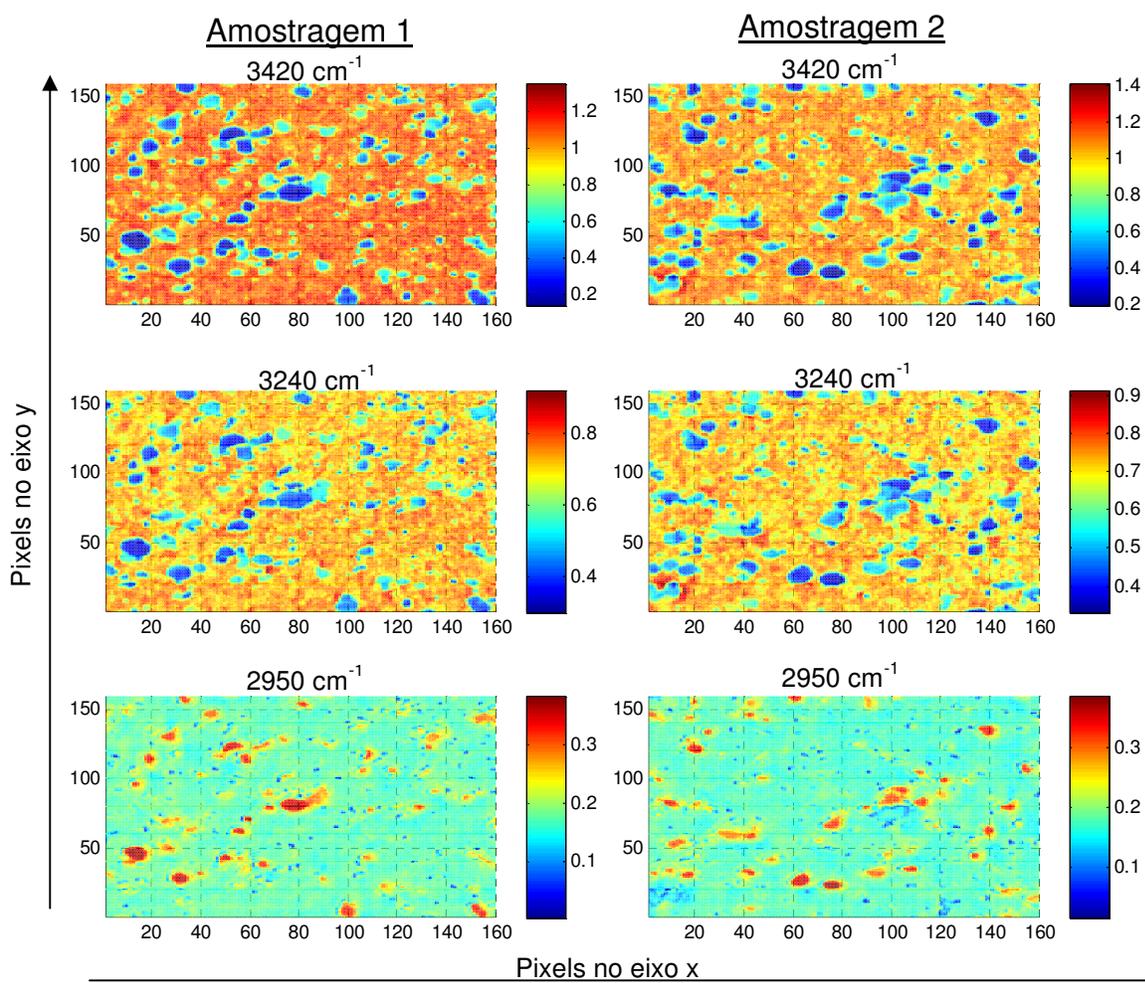


Figura 33 – Mapas de absorção das duas amostragens para os números de onda 3420 cm⁻¹, 3240 cm⁻¹ e 2950 cm⁻¹.

Nas imagens da figura 33 que trazem os mapas de absorção do número de onda 2950 cm⁻¹, o qual corresponde ao estiramento C–H, pode-se observar que as estruturas que apresentaram baixa absorvidade para o número de onda correspondente ao estiramento O–H, obtiveram grande absorvidade para estiramento C–H. Já é possível inferir com certo nível de segurança que as estruturas cristalinas possuem uma cadeia carbônica saturada (ao menos em parte), o que confirmaria a suspeita de que o precipitado fosse resultante da formação de um sal do API com o ácido carboxílico utilizado como solvente.

4.3.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

Para a realização da análise exploratória com o PCA e com o MCR-ALS, os dados foram tratados de maneira a maximizar as diferenças que possam existir entre os espectros dos pixels. Os espectros obtidos passaram pelos pré-tratamentos (respeitando a seqüência):

1. Alinhamento da linha base;
2. Seleção da região espectral que continha a maior parte da informação;
3. Alisamento por média móvel ($n=5$);

A figura 34 apresenta os espectros tratados e a primeira derivada destes espectros. Diferentemente da aplicação do capítulo 3, nesta aplicação a primeira derivada dos espectros apresentou alto nível de ruído, como pode ser visto na figura 34B.

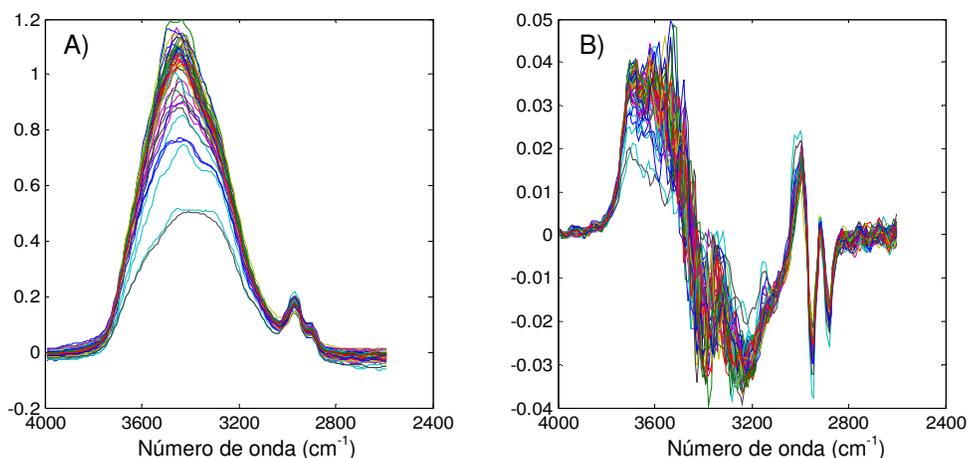


Figura 34 – Espectros tratados: (A) antes e; (B) após a aplicação da primeira derivada.

A primeira derivada de espectros é obtida calculando a diferença entre absorções de duas freqüências consecutivas. Assim, se os dados forem ruidosos haverá oscilação aleatória de valores de absorção para cada freqüência, e a

derivada será ruidosa. No caso, os altos níveis de ruído das derivadas diminuíram a variância explicada pelo PCA, além de dificultar a convergência do modelo MCR-ALS. De fato, após vários testes foi observado que o PCA não conseguia explicar a variância dos dados de maneira satisfatória, obtendo menos que 50% de variância explicada para as 5 primeiras componentes principais juntas. Isso é facilmente explicado já que os ruídos não possuem perfil de componente químico e estão em grande intensidade nas derivadas dos espectros. Esses ruídos não modelados contêm grande parte da variância não explicada. O modelo MCR-ALS também não conseguiu convergir quando foram utilizadas as primeiras derivadas dos espectros em nenhuma das duas amostragens.

Em testes utilizando os espectros sem a primeira derivada, tanto o PCA quanto o MCR-ALS geraram ótimos resultados. Assim, tanto para o PCA como para o MCR-ALS foram utilizados os espectros sem derivar.

O PCA foi então executado e, como pode ser observado na figura 35, o número ótimo de componentes principais para descrever o modelo está entre 3 e 4 componentes, já que após a quarta componente a porcentagem de variância explicada é praticamente constante. Os perfis de variância explicada em função das componentes principais para as duas amostragens são praticamente idênticos, de maneira que estão sobrepostos na figura 35.

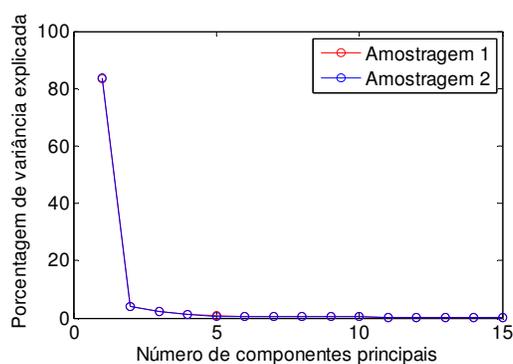


Figura 35 – Porcentagem de variância explicada pelas 15 primeiras componentes principais na análise PCA para as duas amostragens do creme.

As figuras 36 e 37 trazem os mapas de escores para as 4 primeiras componentes principais das amostragens 1 e 2, respectivamente.

Como discutido no capítulo 2, enquanto os mapas de absorvância trazem informações sobre uma única frequência, os mapas de escores trazem o “resumo químico” dos pixels, isto é, mostram diretamente a similaridade dos espectros contidos em cada pixel. Isso porque quando dois ou mais pixels possuem os mesmos valores de escores, muito provavelmente eles possuirão a mesma composição química.

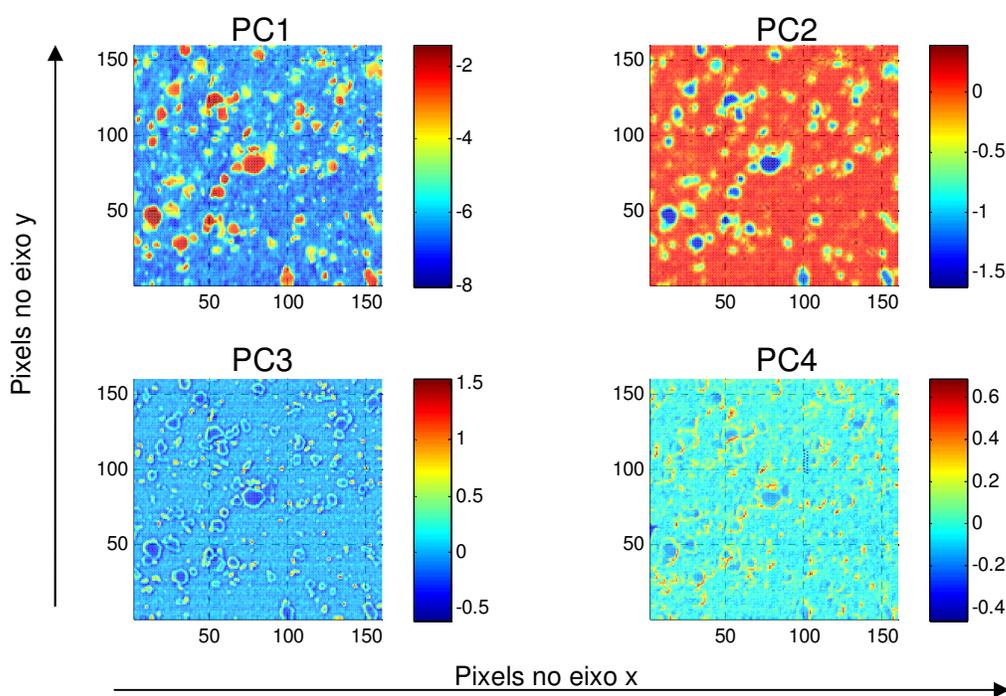


Figura 36 – Mapa de escores dos quatro primeiros componentes principais da amostragem 1.

Pode ser observado nos mapas de escores das componentes 1 e 2, das figuras 36 e 37, que existe um alto contraste entre o creme em si e as estruturas cristalinas estudadas. Via de regra, na análise PCA, uma componente principal sempre explica mais variância que a componente posterior. Assim, a componente principal que explica a maior parte da variância dos dados é a primeira, seguida

pela segunda, e assim por diante. Dessa maneira, pode-se afirmar que a maior parte da variância, que está contida nas duas primeiras componentes principais, difere o creme em si das estruturas cristalinas.

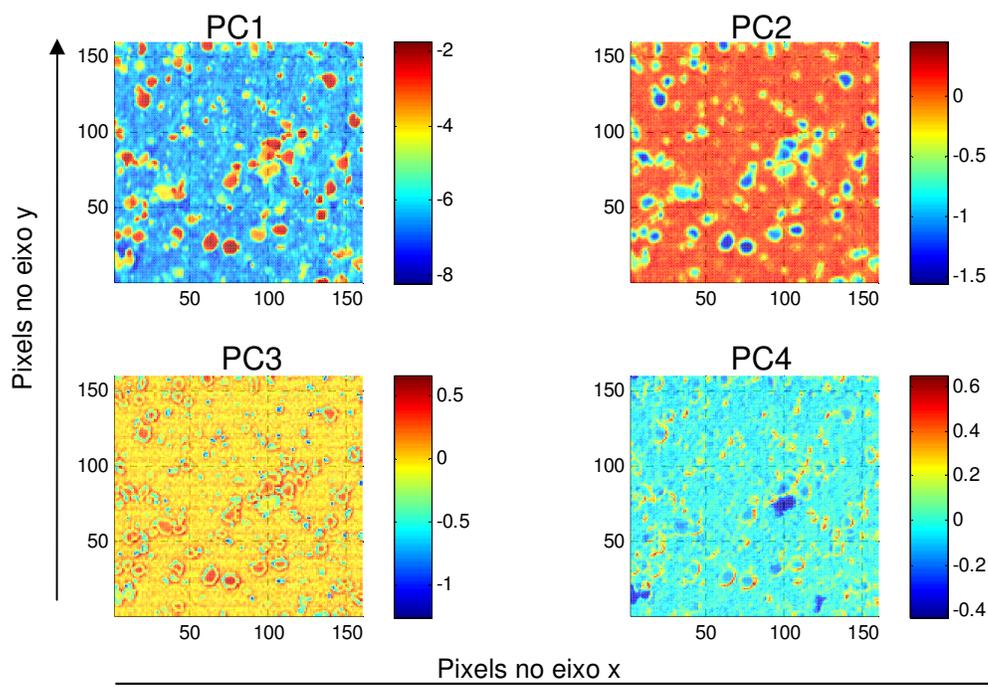


Figura 37 – Mapa de escores dos quatro primeiros componentes principais da amostragem 2.

A figura 38 traz os loadings das PCA das duas amostragens, associados aos mapas de escores das figuras 36 e 37. Pode-se observar que todas as variáveis possuem alta influência na explicação do modelo. Isso ocorre devido à seleção prévia dos comprimentos de onda que continham a maior parte da informação espectral. Nota-se também que os loadings para ambas as amostragens são muito semelhantes, o que indica coerência na decomposição PCA. O fato dos loading da terceira componente estar praticamente invertida nas figuras 38A e 38B não indica divergência alguma entre a PCA das duas amostragem, pois os sinais negativos e positivos alternam entre os loadings e os escores, de maneira que o produto final será o mesmo. Por isso, pode-se notar

nos escores da PC3 nas figuras 36 e 37 que a intensidade dos escores está invertida nas duas figuras, assim como os loadings na figura 38 para a PC3.

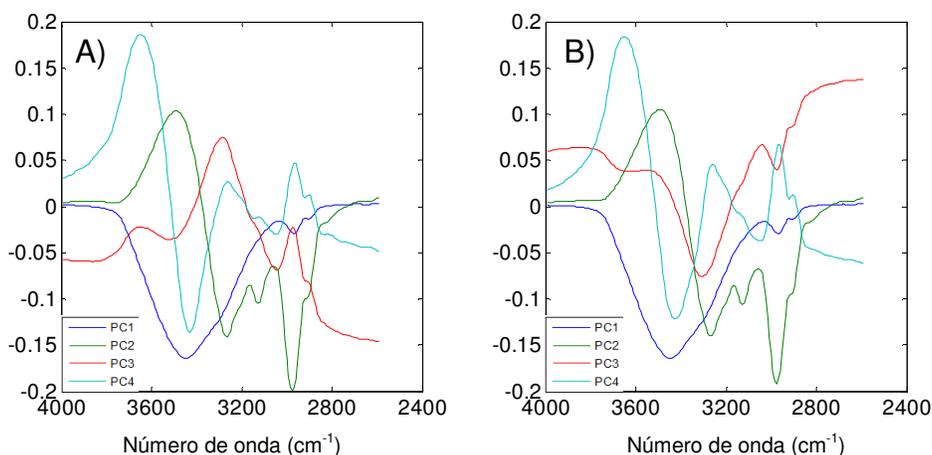


Figura 38 – Loadings dos 4 primeiros componentes principais da: (A) amostragem 1 e; (B) amostragem 2.

4.3.3 Resolução Multivariada de Curvas (MCR-ALS)

Na análise com o MCR-ALS, a rotina “*pure*” foi utilizada para selecionar os pixels com espectros mais puros para inicializar o método MCR-ALS.

Nesta aplicação, devido ao fato de os espectros terem sido utilizados sem a aplicação da primeira derivada, pode-se utilizar a restrição de não-negatividade na resolução tanto do perfil espectral como do perfil de concentração. Na aplicação do capítulo 3, somente foi possível utilizar a restrição de não-negatividade no modo da concentração, já que as derivadas dos espectros possuem sinais positivos e negativos, e a aplicação da não-negatividade no perfil espectral impediria a convergência do modelo.

Como explicado anteriormente, o MCR é um método não-supervisionado de resolução. Tudo o que estiver homogêneo na amostra será considerado como sendo um único espectro ou substância. Nesse sentido, a expressão “espectro

puro” aqui não se refere a um componente puro, mas sim, a soma de componentes que tenham concentração constante na imagem.

O MCR-ALS foi primeiramente executado buscando 4 componentes puros nas imagens, número baseado na análise PCA executada previamente. Os resultados obtidos mostraram que o MCR encontrou, na verdade, apenas dois espectros puros nas imagens, pois dos 4 espectros recuperados, 3 eram muito semelhantes.

O MCR-ALS foi executado então com 3 componentes, na tentativa de obter 3 espectros puros distintos. Novamente o MCR recuperou apenas dois espectros puros, pois dos 3 espectros recuperados, dois eram praticamente iguais.

O MCR-ALS foi então finalmente executado com 2 componentes, recuperando perfeitamente dois espectros puros. Numa análise da falta de ajuste dos dados recuperados pelo MCR, em relação à cada tentativa (buscando 4, 3 ou 2 espectros puros), foi possível constatar que praticamente não houve variação da falta de ajuste, indicando realmente que o MCR-ALS está encontrando somente dois espectros puros para as duas amostragens do creme.

Assim, através do MCR-ALS, foram recuperadas estimativas da intensidade destes 2 espectros puros em cada pixel. Essa intensidade está relacionada diretamente com a concentração dos componentes em cada pixel. A figura 39 traz as imagens das estimativas dos mapas de concentração obtidos através do método MCR-ALS para as amostragens 1 e 2. A figura 40A e 40B traz os espectros individuais recuperados para as amostragens 1 e 2, respectivamente.

A figura 39 ilustra claramente a separação de fases tanto na amostragem 1 como na amostragem 2. Os dois componentes puros que o MCR recuperou explicam justamente o creme e as estruturas cristalinas. Como discutido anteriormente, isso não quer dizer que somente há duas espécies químicas no creme, mas sim, que existem duas regiões de composição química homogênea, que geram somente um espectro cada.

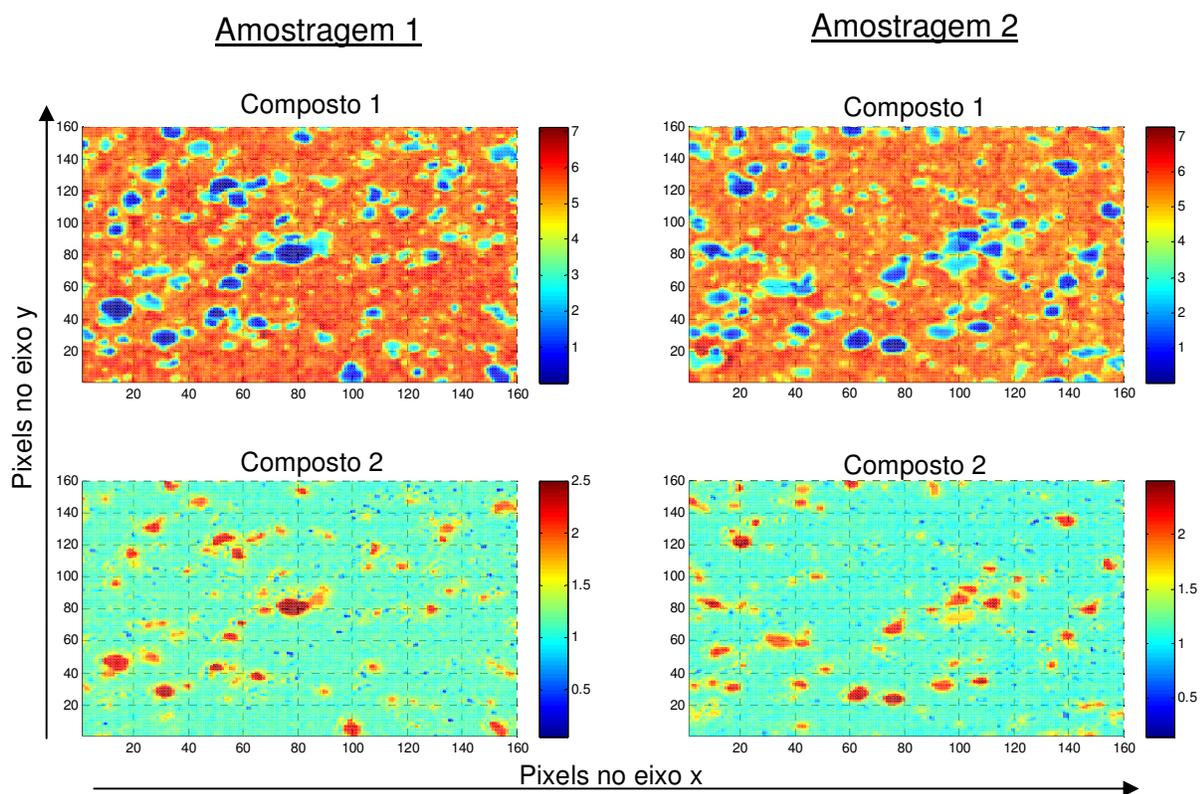


Figura 39 – Mapas de concentração relativa: resultados obtidos para as duas amostragens do creme, apresentadas na figura 31. As colunas da direita e da esquerda trazem os mapas de concentração relativa recuperados pelo MCR-ALS para a primeira e a segunda amostragem, respectivamente.

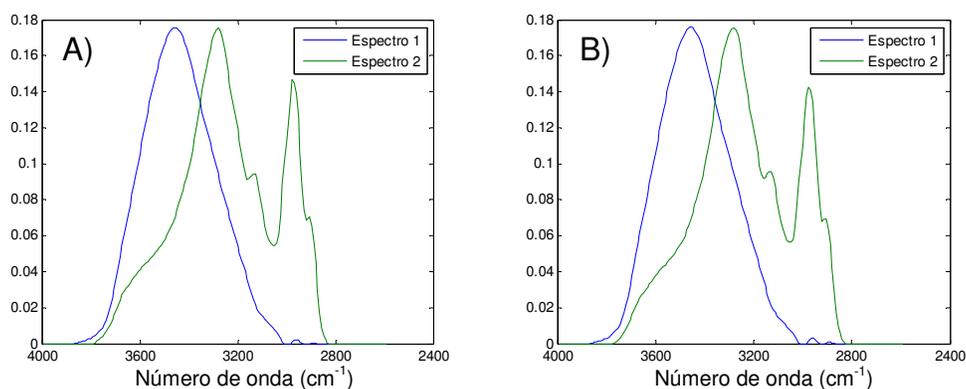


Figura 40 – Espectros puros recuperados pelo MCR-ALS para a primeira (A) e segunda (B) amostragem do creme. Esses espectros estão correlacionados com os mapas de concentração da figura 39.

Analisando a figura 39 em conjunto com a figura 40, vemos que o primeiro espectro puro recuperado pelo MCR é relativo ao creme em si, e o segundo espectro puro está relacionado com as estruturas cristalinas. Observando mais cuidadosamente a figura 39, observando a barra de cores lateral que indica a concentração relativa dos espectros dos dois componentes recuperados, pode-se notar que praticamente não há concentração alguma do componente 1 nas espécies cristalinas. A concentração do componente 1 é representado pela cor azul escuro nessas estruturas, cor que é relacionada à concentração zero na barra de cores lateral.

Ao contrário, componente 2 está presente principalmente nas estruturas cristalinas, representada pela cor vermelha, porém, também está presente no restante do creme, sendo representada pela cor verde claro.

Analisando a figura 40, é facilmente observado que o primeiro espectro puro refere-se à água (estiramento O–H) devido à grande absorção em torno da frequência 3500 cm^{-1} . Já o segundo espectro puro refere-se à amina (estiramento N–H) e à fase orgânica (estiramento C–H) da formulação, com absorbâncias em torno de 3300 cm^{-1} e 2950 cm^{-1} , respectivamente. Desta maneira, pode-se afirmar que:

- as estruturas cristalinas não possuem água;
- a fase oleosa e o API estão concentrados nas estruturas cristalinas (reforçando a idéia de precipitação do API com o ácido carboxílico);
- também há fase oleosa e API na no restante creme, porém em concentração menor que nas estruturas cristalinas;

4.4 Conclusões

Pode-se verificar diretamente pelas imagens que os pixels dos cristais possuíam em sua composição basicamente fase oleosa e API, diferindo-se do restante da formulação do creme. Pode-se verificar também que a concentração de água nesses cristais era muito menor que no restante do creme. Estendendo

esse raciocínio para a figura 32, podemos ver que nos espectros onde há ausência da banda O–H, a banda da amina permanece.

Como discutido no início do capítulo, havia indícios de que os precipitados fossem sais do API com o solvente e posteriormente foi realizada cristalização isolada do sal do API. A estrutura dos cristais sintetizados foi analisada por microscópio ótico e eram idênticas às estruturas encontradas no creme analisado.

Assim, podemos concluir que o espectro da segunda componente, encontrada pelo MCR-ALS realmente se tratava do espectro do sal do API, formado por uma amina e um ácido carboxílico.

Um trabalho semelhante foi realizado em 1997 pela empresa 3M [64], com o intuito de identificar a composição dos cristais formados num produto semelhante. Como não possuíam o equipamento, a alternativa foi separar os cristais por centrifugação e caracterizá-los fora do creme. Obviamente essa alternativa oferece mais possibilidades analíticas, porém a análise de imagem é mais rápida e não invasiva, já que os cristais foram analisados diretamente no creme.

CAPÍTULO 5

ANÁLISE DE MEDICAMENTOS APRESENTADOS NA FORMA DE COMPRIMIDOS

5.1 – Introdução e objetivos

Um ponto crítico no processo de produção de medicamentos na forma de comprimidos é a homogeneização dos excipientes e API, sendo os processos de produção e homogeneização realizados de duas maneiras distintas: *compressão direta* e *via úmida*.

Na compressão direta, os excipientes e o API são adicionados num recipiente apropriado (conhecido como *bin*) e homogeneizados por um certo período de tempo, então essa mistura é levada diretamente para a compressora para produção dos comprimidos.

Dependendo das propriedades dos excipientes e API, processos de compressão direta podem não ser adequados para produção, gerando comprimidos com alta friabilidade, baixa dureza, dissolução irregular, e outros problemas. Nestes casos é utilizada a produção por via úmida. Na produção por via úmida os excipientes e o API são umedecidos com água, sob agitação mecânica, para formar aglomerados homogêneos de partículas. Após essa etapa, esses aglomerados são secos em leito fluidizado ou estufa e depois classificados segundo seus tamanhos. Este pó granulado, formado por aglomerados de partículas, é levado à compressora para produção dos comprimidos.

O processo de homogeneização de partículas sólidas, como o que ocorre na produção de comprimidos, é bastante delicado. Isso porque, uma homogeneização pouco eficiente pode resultar em comprimidos com concentração do API acima do especificado, e outros comprimidos com a concentração do API abaixo do especificado, tendo implicações diretas na eficiência farmacêutica do medicamento.

Além da diferença de concentração do API nos comprimidos, pode ocorrer também que num mesmo comprimido, o API não esteja regularmente distribuído

por todo o volume do comprimido. Isso é crítico nos casos em que são administradas doses fracionadas, como $\frac{1}{2}$ ou $\frac{1}{4}$ do comprimido.

A propriedade que define se o API está regularmente distribuído ou não em um comprimido, é chamada de *uniformidade de conteúdo* e foi a propriedade estudada neste capítulo através de:

- Análise preliminar dos dados utilizando espectroscopia de reflectância convencional na faixa do NIR e PLS, a fim de diagnosticar precocemente possíveis problemas relacionados ao planejamento e verificar os erros de quantificação;
- Análise exploratória via PCA (mapas de escores);
- Análise quantitativa por iPLS (mapas de concentração).

5.2 Parte experimental

Os comprimidos analisados neste capítulo foram produzidos com o princípio ativo espironolactona, um diurético poupador de potássio que impede que o organismo absorva muito sal e previne que os níveis de potássio fiquem muito baixos. A figura 41 traz a estrutura deste API.

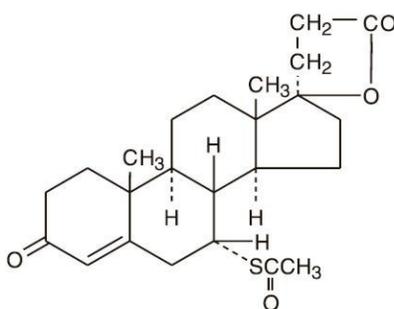


Figura 41 – Estrutura molecular da espironolactona.

Para o desenvolvimento das formulações, foram utilizados os seguintes excipientes: amido (diluyente), sulfato de cálcio (diluyente), povidona (polímero polivinílico, utilizado como aglutinante) e estearato de magnésio (lubrificante), além de água.

Através de um processo de produção manual, via úmida, foram preparados comprimidos padrões com mesclas dos excipientes e do princípio ativo em diferentes proporções. Normalmente, essas proporções não podem ser variadas livremente e serem comprimidas da mesma maneira, pois isso acarreta em problemas como quebra espontânea do comprimido (*capping*) e aderência aos punções da prensa, problemas que são contornados pelo trabalho de formulação do medicamento. Devido à isso procurou-se restringir a variação dos componentes à um limite que não fosse prejudicial ao desempenho na compressão.

Assim, além do API, haviam mais 5 compostos na formulação do medicamento. Dois deles foram desconsiderados como de interesse para a quantificação: a umidade (água) e o estearato de magnésio. O estearato foi desconsiderado devido à sua baixa concentração na formulação (0,5% em massa), sendo que este é utilizado apenas como lubrificante, para que o granulado não grude nos punções. A água foi desconsiderada devido à dificuldade de controlar esta como variável (além da água adicionada, também há água na umidade já presente nos excipientes). Porém a concentração de água em cada padrão foi aferida por balança analisadora de umidade (perda por secagem).

Restaram então quatro componentes químicos: espironolactona (API), amido, sulfato de cálcio dihidratado e povidona. Dentro dessas substâncias, a que possuía menor concentração era a povidona, por isso o planejamento experimental foi realizado utilizando os outros três componentes, através de um planejamento ternário de misturas originando 10 pontos padrões. A estes 10 pontos foram realizadas adições de diferentes quantidades de povidona a fim de tentar quantificá-la também. Foram preparadas 5 replicatas para cada padrão.

O planejamento de mistura partiu de uma mistura padrão, que era a proporção considerada ideal do produto. À essa mistura padrão foram adicionados excipientes e/ou princípio ativo assim como planejado, resultando em variações na porcentagem de cada excipiente e do princípio ativo. Como já discutido anteriormente, a variação da composição foi controlada a fim de evitar problemas no processo de compressão.

Para preparar os padrões, partiu-se de uma massa de 300mg da mistura padrão. Como a massa média do comprimido foi estimada estar em torno de 360 mg, o planejamento foi executado adicionando 60 mg (de mistura das 4 substâncias monitoradas) em 300 mg da mistura padrão. Essa adição de 60mg corresponde a uma variação na faixa de $\pm 20\%$ de cada substância da amostra, com relação à concentração da mistura padrão.

Foram realizados alguns testes na prensa mecânica para encontrar a pressão de compressão ideal. Foi encontrado que com 1 tonelada/polegada² de pressão os comprimidos atingiam dureza considerada ideal para estudos de dissolução.

A preparação dos padrões então se resumiu à:

- 1º Pesar 300 mg da mistura padrão (MP);
- 2º Adicionar mistura de 60 mg dos componentes de acordo com o planejamento ternário;
- 3º Adicionar a quantidade de povidona de acordo com o planejamento;
- 4º Realizar a compressão na prensa mecânica utilizando 1 tonelada/polegada² de pressão.

A figura 42 ilustra o planejamento ternário utilizado, onde se varia a fração de cada um dos três componentes (exceto a povidona), entre 0 e 1, de maneira que:

$$X_1 + X_2 + X_3 = 1 \text{ (fração)} \quad \text{ou} \quad X_1 + X_2 + X_3 = 60 \text{ mg (massa),}$$

onde, X₁, X₂ e X₃ referem-se a espironolactona, sulfato de cálcio e amido, respectivamente.

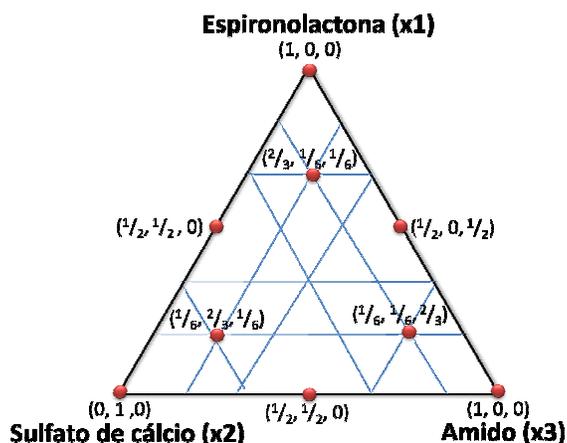


Figura 42 – Planejamento ternário dos padrões: X₁, X₂ e X₃ referem-se a espironolactona, sulfato de cálcio e amido, respectivamente.

A tabela 1 ilustra a preparação de cada padrão de acordo com o planejamento de mistura ternária.

Tabela 1 – Composição planejada para cada um dos 10 pontos padrões.

Padrões										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 (MP)
Mistura padrão (MP)	300	300	300	300	300	300	300	300	300	360
Espironolactona	60	0	0	30	30	0	40	10	10	0
Sulfato de cálcio	0	60	0	30	0	30	10	40	10	0
Amido	0	0	60	0	30	30	10	10	40	0
Povidona	20	15	10	5	0	5	10	15	20	0

A tabela 2 apresenta a porcentagem corrigida de cada composto em cada padrão, levando em conta a umidade presente em cada composto e massa real utilizada na preparação dos padrões.

Tabela 2 – Composição real em porcentagem para cada um dos 10 pontos padrões.

Padrão →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Espironolactona	27,74	12,12	12,28	20,66	20,95	12,45	23,08	14,78	14,59	15,14
Sulfato de cálcio	22,76	36,24	23,37	30,46	24,02	30,46	25,60	31,85	24,92	28,83
Amido	31,72	32,14	46,95	33,02	40,87	40,31	34,97	34,51	41,05	40,18
Povidona	7,81	6,68	5,52	4,32	3,09	4,32	5,52	6,68	7,81	3,71
Estearato de magnésio	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Umidade	9,47	12,32	11,39	11,03	10,57	11,96	10,33	11,69	11,13	11,64
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

A análise de imagens dos comprimidos foi realizada utilizando a técnica de reflectância, já que a fonte do equipamento não era potente o suficiente para que a radiação emitida atravessasse o comprimido, não sendo possível a análise por transmitância neste caso. Desta maneira, não seria possível medir a concentração total de cada componente nos comprimidos, pois a análise de reflectância é superficial. Assim, a unidade de medida a ser trabalhada foi a porcentagem de cada componente, onde a soma da massa de todos componentes em cada comprimido é sempre 100% (restrição básica em planejamentos de mistura). Esse foi o motivo pelo qual foi realizado um planejamento de mistura. Outro ponto é que o planejamento de mistura ternária fornece 6 níveis de variação (contando com a mistura padrão) para cada componente, ou seja, uma curva com 6 pontos para cada componente, utilizando somente 10 experimentos.

Foram realizadas análises de imagem em cada uma das 5 replicatas dos 10 padrões, totalizando 50 imagens espectrais. As análises foram realizadas no modo de reflectância, utilizando pixels com dimensões de $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ e resolução espectral de 16 cm^{-1} . Foram analisadas áreas de 16mm^2 ($4000 \times 4000\mu\text{m}$) que deram origem a 50 imagens espectrais de 80×80 pixels. Logo, cada imagem era constituída por 6400 pixels ou espectros. O tempo de aquisição de cada imagem espectral foi de aproximadamente uma hora. A figura 43 ilustra a fração de cada comprimido analisado.

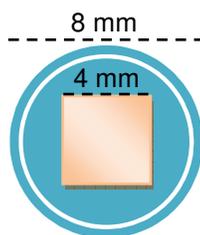


Figura 43 – O círculo azul representa um comprimido analisado, cujo diâmetro era de 8 mm. O quadrado laranja indica a área analisada pelo espectrofotômetro de imagens, 4mm x 4mm.

5.3 Resultados e discussões

5.3.1 – Resultados preliminares por análise convencional de espectroscopia NIR de reflectância

Após preparo dos comprimidos padrões, um espectrofotômetro NIR-FT Nicolet Antaris II foi utilizado para obter espectros de reflectância de cada comprimido. Foi utilizada resolução espectral de 8cm^{-1} e faixa espectral de 10000 a 4000 cm^{-1} . Através da análise convencional, obtendo o espectro do comprimido como um todo, é possível diagnosticar facilmente possíveis erros de preparo de amostra e visualizar se o planejamento foi suficientemente adequado para realizar previsões quantitativas.

A figura 44 apresenta os espectros médios das 5 replicatas de cada padrão, obtidos através da análise NIR convencional. Devido ao fato desta aplicação utilizar reflectância, foi necessário empregar o método de correção de espalhamento multiplicativo (MCS) para corrigir os espectros. Os espectros apresentados na figura 44 já estão corrigidos por MSC.

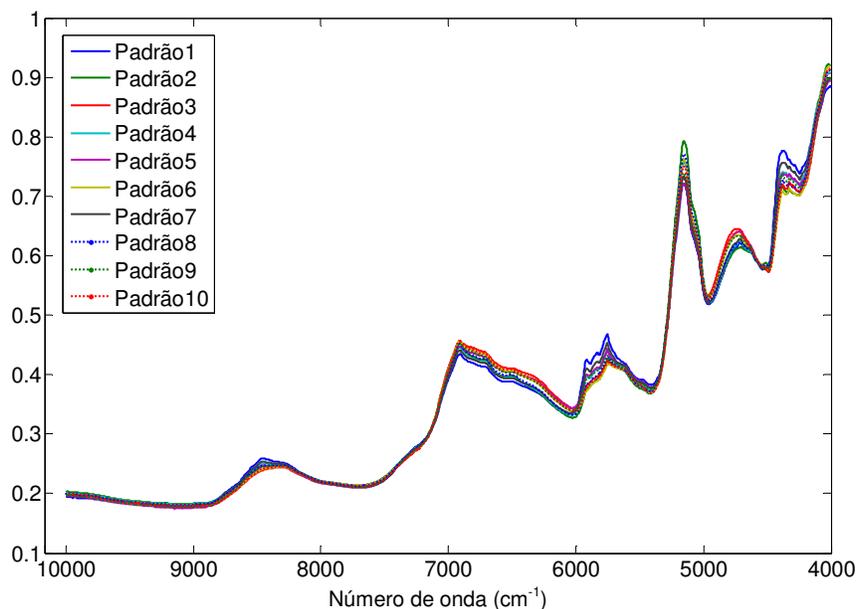


Figura 44 – Média dos espectros das replicatas dos padrões obtidos na região NIR por análise de reflectância convencional.

No conjunto de espectros da figura 44 pode-se visualizar pequenas diferenças entre cada padrão, originadas pelas pequenas diferenças nas formulações.

É comum na espectroscopia NIR a alta semelhança de espectros de amostras com composição significativamente diferente, sendo a diferença muitas vezes imperceptível visualmente. Devido à isso, a utilização da primeira derivada ou centragem na média são comumente aplicados sobre os espectros antes da quantificação propriamente dita. Esses dois métodos tendem a realçar a diferença real existente entre dois ou mais espectros, suprimindo boa parte da informação que não é de interesse.

Na figura 45, são apresentados os espectros da figura 44 após serem tratados com a primeira derivada. A faixa de frequências exibidas na figura 45 foi reduzida para 4000 a 6500 cm^{-1} para facilitar a visualização das diferenças espectrais.

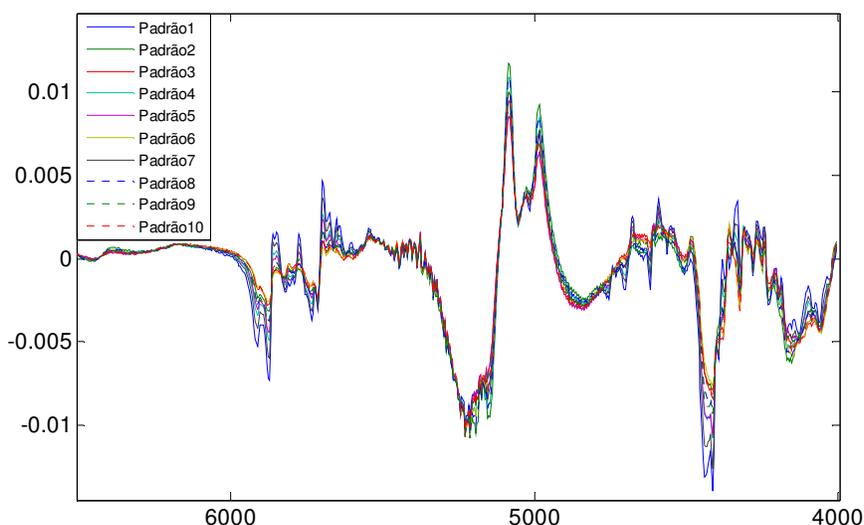


Figura 45 – Primeira derivada dos espectros médios dos padrões, obtidos por espectroscopia NIR convencional.

A tabela 3 traz a porcentagem de variância explicada, através de análise SVD/PCA, dos conjuntos de replicatas, para identificar possíveis outliers e erros grosseiros de preparo. Como pode-se ver, não houve nenhum padrão que necessitou de mais de uma componente principal para explicar mais que 99,36% da variância, levando a crer que os padrões foram corretamente preparados e são representativos da amostra preparada.

Tabela 3 – Porcentagem de variância explicada em cada PC para cada conjunto de replicata de cada padrão.

Nº da PC	Pontos do planejamento (conjuntos de replicatas)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	99,46	99,46	99,67	99,64	99,61	99,36	99,78	99,75	99,81	99,62
2	0,30	0,23	0,20	0,18	0,22	0,41	0,11	0,15	0,11	0,26
3	0,12	0,22	0,06	0,11	0,09	0,14	0,05	0,05	0,05	0,08
4	0,07	0,04	0,03	0,05	0,04	0,05	0,04	0,03	0,02	0,03
5	0,03	0,03	0,02	0,01	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02

Antes de realizar as medições com o equipamento de espectroscopia de imagens, os resultados obtidos pelo Nicolet Antaris II foram utilizados para obter uma prévia dos erros de previsão, realizando uma calibração PLS convencional e calculando a média dos erros absolutos por validação cruzada. Foram utilizadas as primeiras derivadas dos espectros obtidos com o equipamento NIR convencional, corrigidos por MSC e alisados (n=5). Os valores médios dos erros absolutos, utilizando a validação cruzada e 4 componentes principais, foram considerados aceitáveis e são apresentados a seguir:

- 1,38 % para a espironolactona;
- 0,89 % para o sulfato de cálcio;
- 1,21 % para o amido e;
- 1,19 % para a povidona;

5.3.2 – Análise exploratória PCA para dados de espectroscopia de imagens

Após a análise por espectroscopia convencional, os 50 comprimidos foram analisados por espectroscopia de imagens.

A figura 46 apresenta os espectros obtidos de alguns pixels e a figura 47 apresenta a primeira derivada dos espectros da figura 46. Pode-se notar a semelhança dos espectros obtidos com o equipamento NIR de imagens e com o equipamento NIR convencional, cujos espectros foram mostrados na figura 44.

Nas análises de imagens, foram utilizados os mesmos pré-tratamentos utilizados nos espectros convencionais, ou seja, correção de espalhamento por MSC, alisamento (n=5) e primeira derivada.

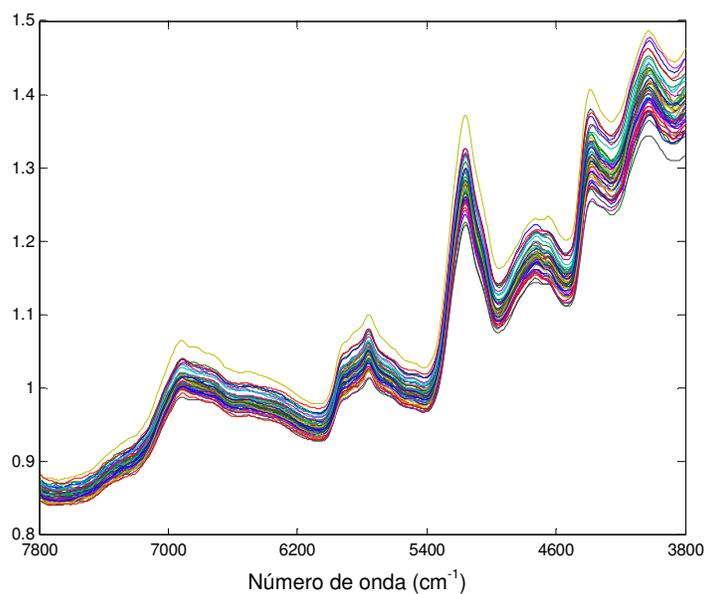


Figura 46 – Espectros NIR de alguns pixels obtidos na análise dos comprimidos por espectroscopia de imagens.

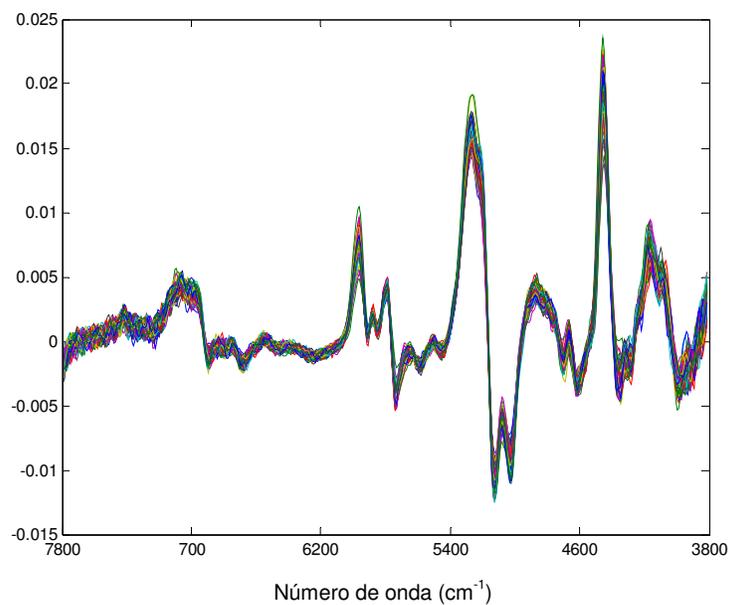


Figura 47 – Primeira derivada dos espectros de alguns pixels obtidos na análise dos comprimidos por espectroscopia de imagens (espectros da figura 46).

Foi executada a análise PCA para visuar a homogeneidade do conteúdo dos comprimidos e verificar o número de componentes principais necessárias para explicar o modelo.

A figura 48 apresenta os mapas de escores das 6 primeiras componentes principais de um comprimido do primeiro ponto padrão. A porcentagem de variância explicada da 1ª a 6ª PC foi de 42,27%, 2,63%, 1,68%, 1,04%, 0,79%, 0,77%, consecutivamente. Foi possível observar nas 4 primeiras componentes principais, a existência de pontos com alto teor de algum componente específico. Os dois últimos mapas apresentam escores já no nível de ruídos, indicando que quatro componentes principais são suficientes para explicar o modelo.

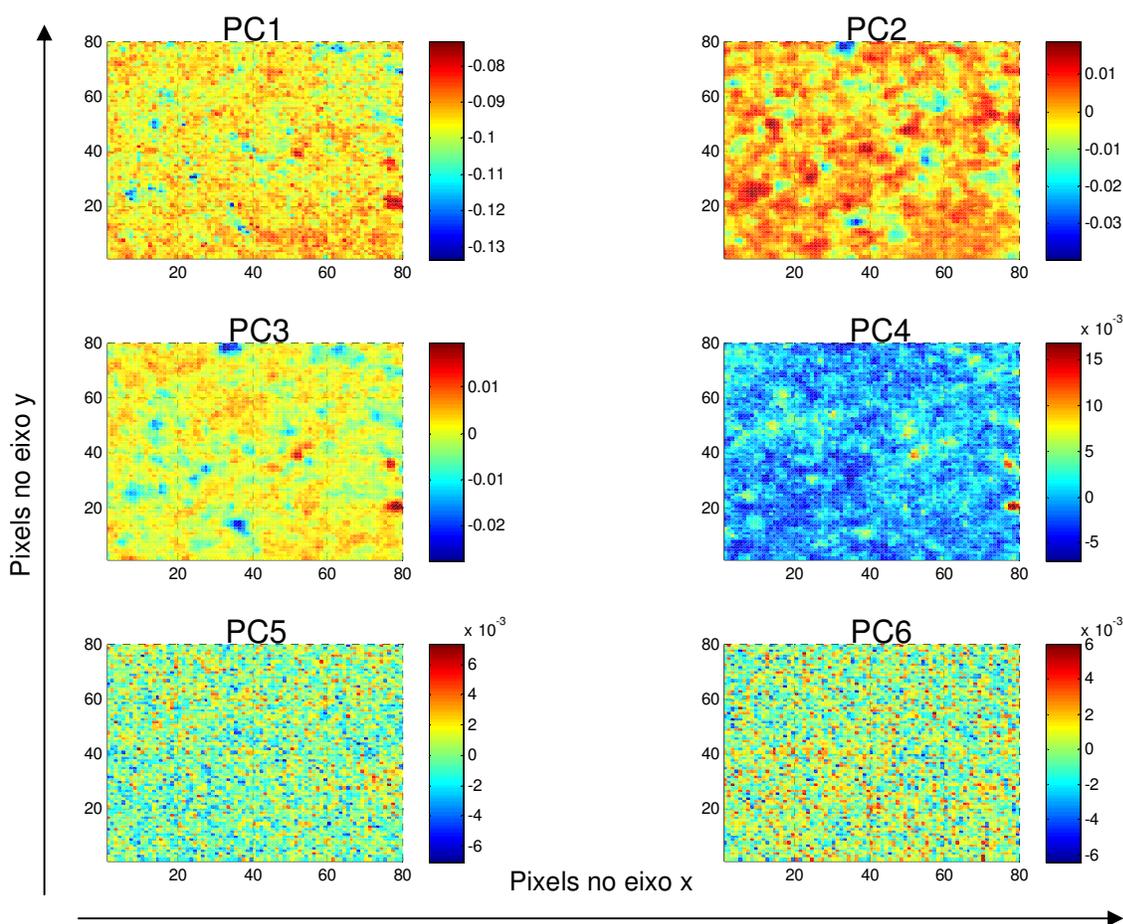


Figura 48 – Mapa de escores das seis primeiras componentes principais da primeira replicata do primeiro padrão.

Diferentemente de medicamentos apresentados em forma de pomada ou creme que são formas semi-sólidas de apresentação, nos comprimidos os excipientes e API estão aglomerados, e não solubilizados. Isso afeta diretamente a maneira com que se interpreta a análise de uniformidade de conteúdo.

Qualquer indício de separação de fases em semi-sólidos pode ser um alerta de instabilidade da formulação, já que todos componentes deveriam estar solubilizados formando uma só fase. Já as partículas do API e dos excipientes possuem diferentes tamanhos sendo comum a existência de partículas cujas dimensões estejam contida entre 10 a 500 μm . Isso não implica num comprometimento da qualidade do medicamento, pelo contrário, a granulometria é uma característica que deve ser rigorosamente controlada para manter a biodisponibilidade do API semelhante em diferentes lotes de fabricação, independentemente dessa distribuição de tamanho possuir uma faixa larga ou estreita, ou ainda, mais que uma faixa de distribuição. Dessa maneira, é esperado que seja possível visualizar pontos nos quais haja aglomeração de um dos excipientes ou do API, devido à presença de cristais maiores destas substâncias. O tamanho dos pixels nesta aplicação era de 50 μm , de maneira que partículas com mais de 200 μm podem ser formadas por 4 pixels, sendo possível visualizá-las na espectroscopia de imagens.

As manchas que possuem uma só coloração, se destacando nos mapas de escores da figura 48, possivelmente são cristais de algum dos componentes da formulação.

Ao contrário das análises de transmitância realizadas nas aplicações anteriores, a análise por reflectância é superficial, não amostrando o volume completo da amostra num pixel. Além disso, existe um certo poder de penetração da radiação NIR, que varia com a composição do material analisado e com o comprimento de onda monitorado, podendo chegar de micrômetros até milímetros, para os comprimentos de onda de menor absorvidade. Essa característica

implica que, ainda que haja um cristal de uma única substância na superfície do comprimido, a radiação NIR pode atravessar o cristal e ainda passar por cristais de outras substâncias. Esta característica dificulta enormemente a utilização de métodos não-supervisionados de resolução de curvas como o MRC-ALS empregado nas outras aplicações. Devido a isso, dificilmente será observado nesta aplicação pixels contendo somente uma substâncias pura.

A figura 49 apresenta os loadings associados aos mapas de escores da figura 48. Foram exibidos os loadings das 4 primeiras componentes para facilitar a visualização, já que as outras componentes principais apresentaram somente ruídos nos escores.

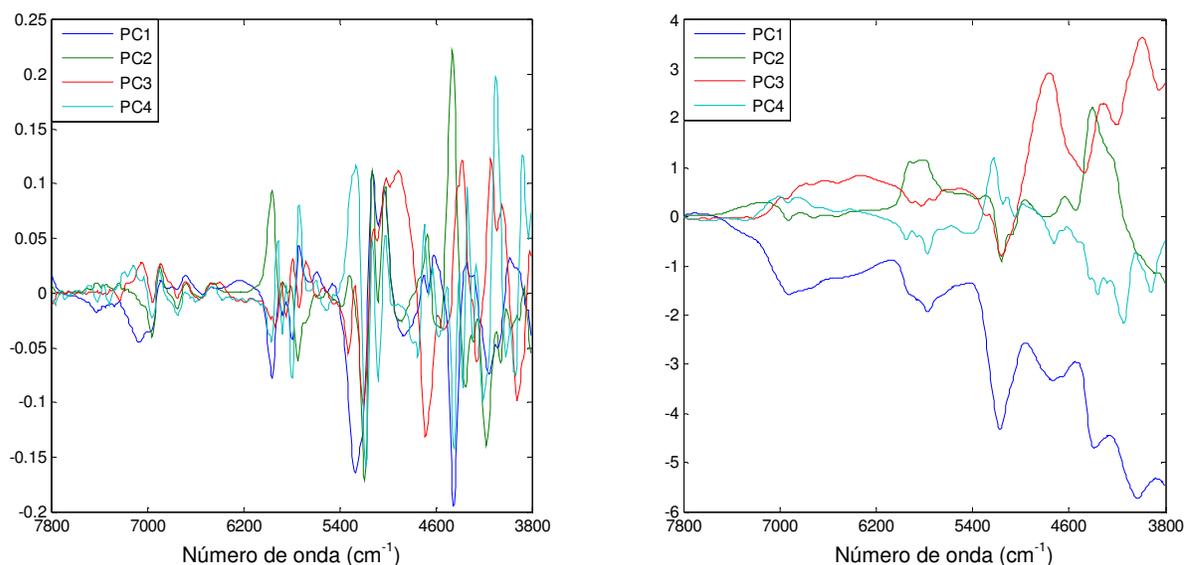


Figura 49 – Loadings dos 4 primeiros componentes principais dos dados de imagens (A) e integral numérica dos loadings (B).

Devido à similaridade dos espectros na região NIR, não é possível inferir informações sobre quais componentes principais podem estar associados parcialmente com cada excipiente ou princípio ativo. Nos capítulos anteriores havia sido possível pois foram analisadas também frequências do final do espectro infravermelho médio.

Nas medidas por reflectância utilizando o equipamento de imagens, não é possível utilizar a região do infravermelho médio devido ao grande ruído espectral na região. A intensidade de radiação que chega ao detector é muito baixa, pois a absorvidade do MIR está relacionada a vibrações puras, sendo extremamente alta se comparada com as absorções da região NIR. Na região do NIR as absorvidades são baixas por se tratarem de freqüências de combinação e sobretudo, muito menos prováveis de serem absorvidas. Essa baixa probabilidade de absorção da radiação NIR também justifica o alto poder de penetração desta radiação.

5.3.3 – Análise quantitativa utilizando iPLS para dados de espectroscopia de imagens

A maneira com que o modelo de calibração foi construído neste estudo é um pouco diferente da calibração convencional. Aqui, não existem amostras de calibração e previsão, mas somente os comprimidos padrões.

Para construir um modelo PLS (ou iPLS), são necessários os espectros das amostras (**D**) e as concentrações das substâncias de interesse que compõe as amostras (**Y**). Nesta aplicação, os valores das concentrações das substâncias de interesse estão correlacionadas com o comprimido como um todo, de maneira que para criar o modelo de calibração, o ideal seria obter o espectro do comprimido como um todo. Porém, isso não é possível no equipamento utilizado, sendo possível somente a obtenção de pixels de no máximo $50 \times 50 \mu\text{m}^2$.

O espectro de cada pixel obtido não poderia, de maneira alguma, ser correlacionado com os valores de concentração dos comprimidos, pois a composição individual de cada pixel certamente seria diferente da composição global do comprimido. Assim, para construção do modelo de calibração, os valores

de concentração das substâncias de interesse em cada comprimido foram correlacionados com o espectro médio de todos os pixels de cada comprimido.

Para analisar a validade do modelo, foram calculados os erros médios absolutos para os espectros médios. Com baixos erros para os espectros médios, espera-se também melhores previsões para os espectros individuais dos pixels. Para minimizar os erros de calibração, foi realizada seleção de intervalos nos espectros. Os espectros NIR foram divididos em 5 partes e foram criados modelos de calibração para cada composto monitorado, com cada uma das partes selecionadas dos espectros. A tabela 4 mostra os valores médios dos erros absolutos dos melhores modelos encontrados, assim como o intervalo do espectro utilizado para a calibração e o número de PCs necessárias. Os valores de erro absoluto são dados em porcentagem em relação à massa total, ou seja, é a simples diferença entre o valor previsto e o real.

Tabela 4 – Intervalo utilizado do espectro, número de PCs e os erros absolutos médios de previsão para o iPLS.

	Espironolactona	Sulfato de cálcio	Amido	Povidona
Intervalo (cm⁻¹)	4696-3920	4696-3920	4696-3920	6248-5472
Número de PCs	4	3	3	3
Erro absoluto (%)	0,70	0,94	1,26	0,49

Após a construção dos modelos de calibração com os espectros médios, esses modelos foram utilizados para prever, não mais os espectros médios por validação cruzada, mas sim os espectros de cada pixel. Desta maneira, em cada pixel foram obtidas as concentrações de cada um dos 4 compostos monitorados. Como a informação espacial foi mantida mesmo após a operação de desdobramento, foram reconstruídas imagens com a concentração de cada componente, sendo obtidas então 4 imagens de concentração, ou 4 mapas de concentração para cada comprimido. Esses mapas de concentração mostram a distribuição de cada componente na superfície do comprimido.

Os mapas de concentração para espironolactona, sulfato de cálcio, amido e povidona, das primeiras replicatas de cada padrão, são exibidos nas figuras 50 a 49. Juntamente com os mapas de concentração das substâncias monitoradas, foi calculado o mapa de concentração total, que fornece a soma da porcentagem das quatro substâncias monitoradas em cada pixel. A porcentagem total esperada para a soma das concentrações das quatro substâncias está em torno de 89%, sendo que o restante é correspondente à água e ao estearato de magnésio.

Nos mapas de concentração, cada pixel possui um valor de concentração de um dos componentes da amostra, assim, pode-se calcular a concentração das substâncias no comprimido como um todo pela simples média aritmética da concentração de cada substância em todos os pixels de uma imagem. Como cada imagem era formada de 6400 pixels, a concentração de cada substância em cada comprimido será a média das concentrações desses 6400 pixels de cada imagem.

Pode ser observado nos mapas de concentração que, quando existe um acúmulo de alguma das substâncias em determinados pontos dos comprimidos, sempre existirá um déficit na concentração das outras substâncias nesses mesmos pixels. Nas figuras 50 a 59, a cor azul representa uma concentração mais baixa e a vermelha representa concentrações mais altas. Assim, onde houver aglomerados na cor vermelha nos mapas de concentração de uma substância, haverá um acúmulo da respectiva substância, sendo que nos mapas de concentração das outras substâncias essas regiões normalmente terão a coloração azul, indicando baixa concentração destas substâncias naqueles pixels. Essa característica pode ser vista sobretudo nas figuras 52 e 57, onde existe um grande acúmulo de sulfato de cálcio em alguns pontos, provavelmente devido à cristais de grandes dimensões dessa substância. As tabelas de 5 a 14 trazem os valores de concentração obtidos para os comprimidos como um todo, através da concentração média nos pixels. Também são apresentados os erros absolutos em relação à concentração real dos comprimidos e o desvio padrão da concentração nos pixels para cada composto e em cada imagem.

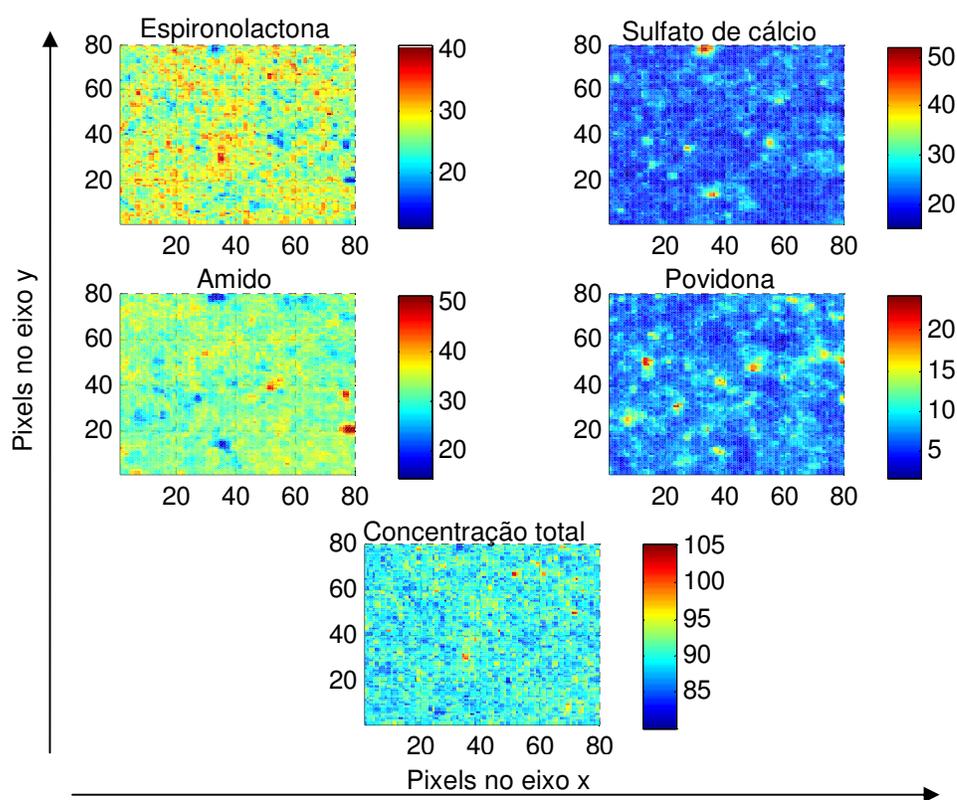


Figura 50 – Mapas de concentração da primeira replicata do primeiro padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.

Tabela 5 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do primeiro padrão.

Padrão 1	Previsto	Real	Erro absoluto (%)	Desvio padrão entre os pixels
Espironolactona	27,11	27,74	- 0,63	3,15
Sulfato de cálcio	22,60	22,76	- 0,16	2,90
Amido	32,48	31,72	0,76	2,83
Povidona	7,64	7,81	- 0,17	2,14
Total*	89,84	90,03	- 0,19	2,20

*Porcentagem total das substâncias monitoradas

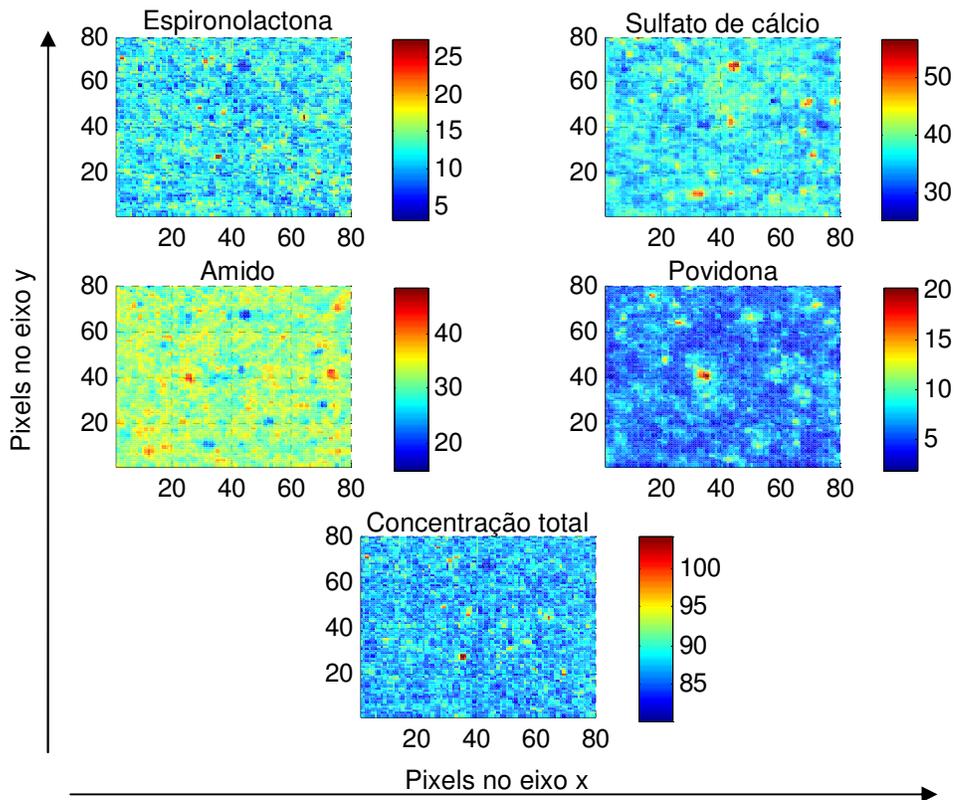


Figura 51 – Mapas de concentração da primeira replicata do segundo padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.

Tabela 6 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do segundo padrão.

Padrão 2	Previsto	Real	Erro absoluto (%)	Desvio padrão entre os pixels
Espironolactona	12,04	12,12	-0,08	2,31
Sulfato de cálcio	36,83	36,24	0,59	2,70
Amido	32,14	32,14	0,00	2,56
Povidona	6,32	6,68	-0,36	1,63
Total*	87,34	87,18	0,16	2,11

*Porcentagem total das substâncias monitoradas

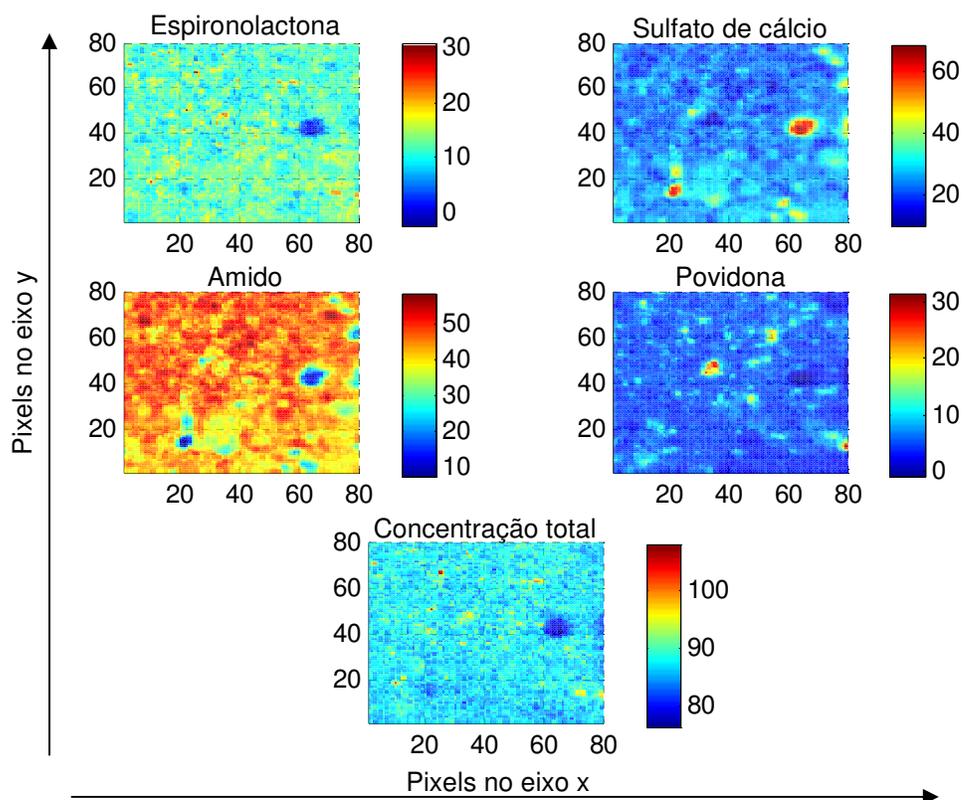


Figura 52 – Mapas de concentração da primeira replicata do terceiro padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.

Tabela 7 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do terceiro padrão.

Padrão 3	Previsto	Real	Erro absoluto (%)	Desvio padrão entre os pixels
Espironolactona	11,97	12,28	-0,31	2,55
Sulfato de cálcio	25,71	23,37	2,34	5,74
Amido	44,08	46,95	-2,87	5,87
Povidona	5,70	5,52	0,18	2,44
Total*	87,46	88,12	-0,66	2,19

*Porcentagem total das substâncias monitoradas

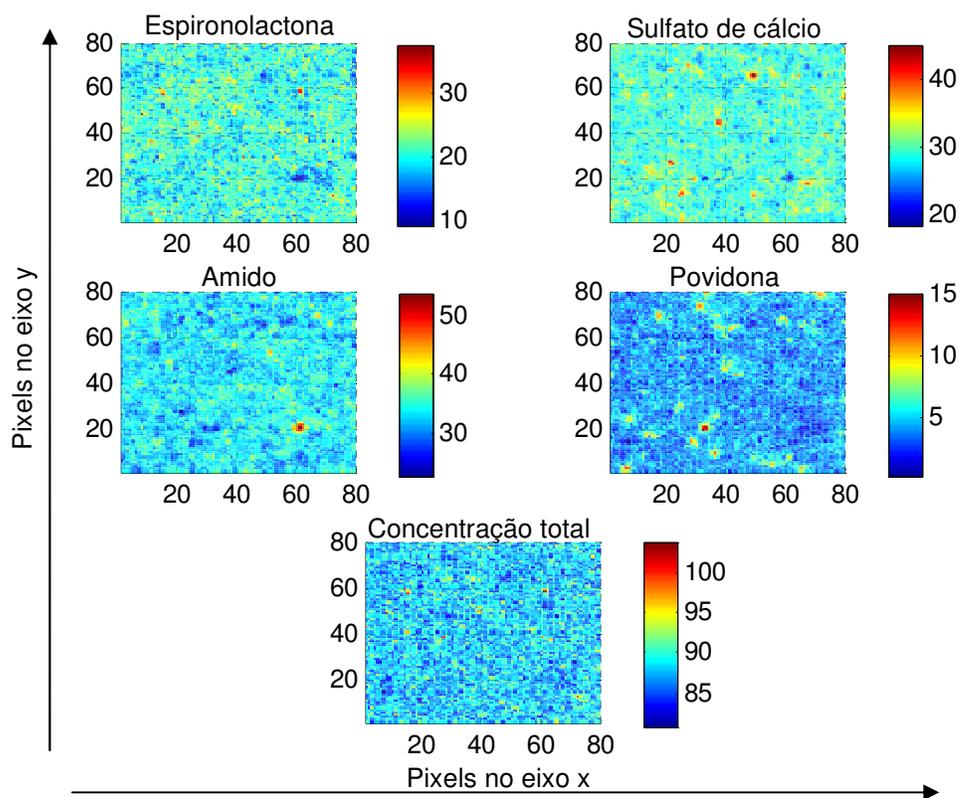


Figura 53 – Mapas de concentração da primeira replicata do quarto padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.

Tabela 8 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do quarto padrão.

Padrão 4	Previsto	Real	Erro absoluto (%)	Desvio padrão entre os pixels
Espironolactona	20,77	20,66	0,11	2,47
Sulfato de cálcio	29,56	30,46	-0,90	2,01
Amido	33,52	33,02	0,50	2,34
Povidona	4,42	4,32	0,10	1,34
Total*	88,27	88,46	-0,19	2,15

*Porcentagem total das substâncias monitoradas

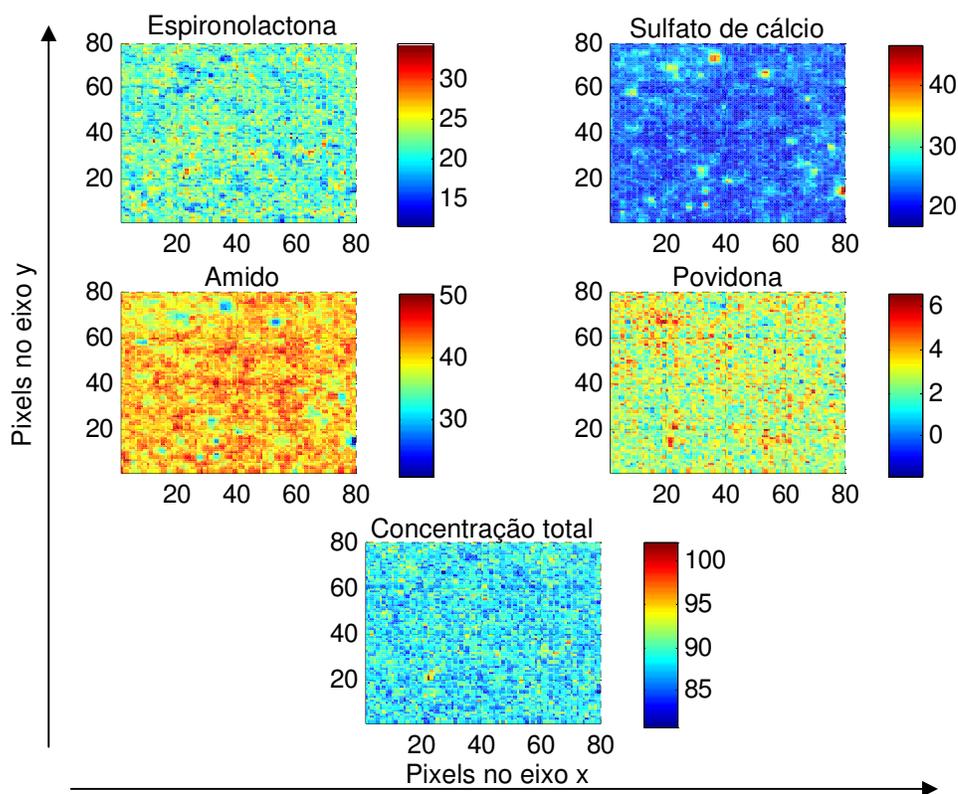


Figura 54 – Mapas de concentração da primeira replicata do quinto padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.

Tabela 9 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do quinto padrão.

Padrão 5	Previsto	Real	Erro absoluto (%)	Desvio padrão entre os pixels
Espironolactona	21,66	20,95	0,71	2,43
Sulfato de cálcio	23,14	24,02	-0,88	2,51
Amido	40,95	40,87	0,08	2,67
Povidona	2,81	3,09	-0,28	0,94
Total*	88,56	88,93	-0,37	2,06

*Porcentagem total das substâncias monitoradas

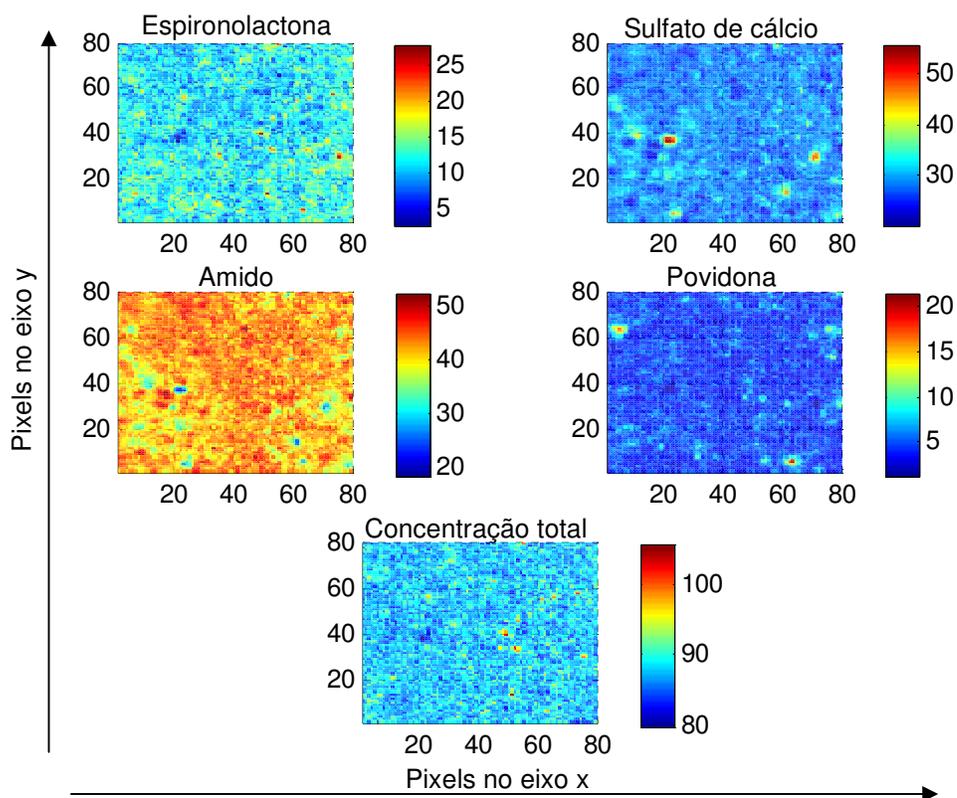


Figura 55 – Mapas de concentração da primeira replicata do sexto padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.

Tabela 10 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do sexto padrão.

Padrão 6	Previsto	Real	Erro absoluto (%)	Desvio padrão entre os pixels
Espironolactona	11,86	12,45	-0,59	2,32
Sulfato de cálcio	29,06	30,46	-1,40	2,47
Amido	42,38	40,31	2,07	2,97
Povidona	4,77	4,32	0,45	1,35
Total*	88,03	87,54	0,49	2,08

*Porcentagem total das substâncias monitoradas

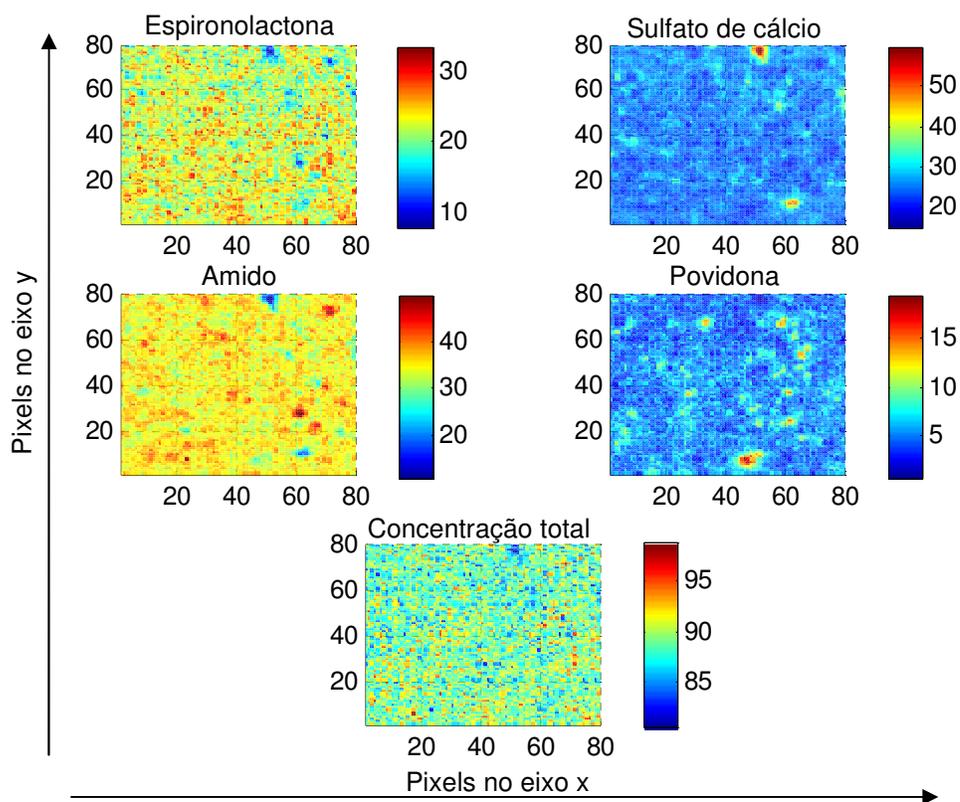


Figura 56 – Mapas de concentração da primeira replicata do sétimo padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.

Tabela 11 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do sétimo padrão.

Padrão 7	Previsto	Real	Erro absoluto (%)	Desvio padrão entre os pixels
Espironolactona	22,47	23,08	-0,61	2,81
Sulfato de cálcio	25,90	25,60	0,30	3,07
Amido	35,15	34,97	0,18	2,85
Povidona	5,49	5,52	-0,03	1,69
Total*	89,01	89,17	-0,16	2,19

*Porcentagem total das substâncias monitoradas

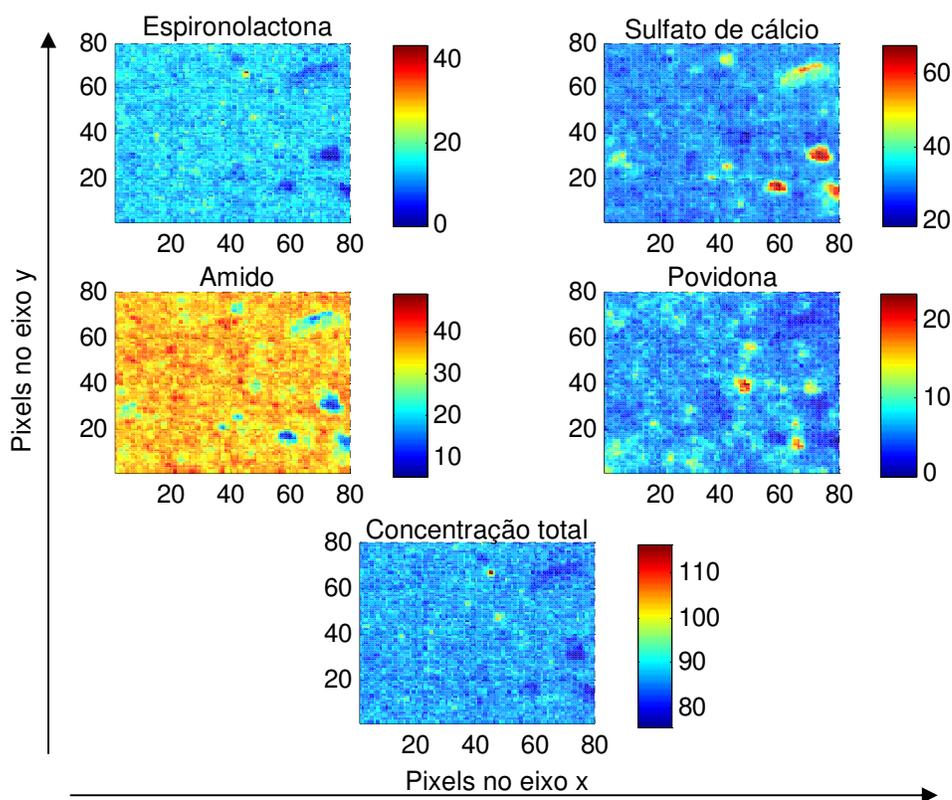


Figura 57 – Mapas de concentração da primeira replicata do oitavo padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.

Tabela 12 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do oitavo padrão.

Padrão 8	Previsto	Real	Erro absoluto (%)	Desvio padrão entre os pixels
Espironolactona	13,72	14,78	-1,06	2,64
Sulfato de cálcio	31,80	31,85	-0,05	4,58
Amido	34,97	34,51	0,46	3,95
Povidona	6,09	6,68	-0,59	2,14
Total*	86,58	87,82	-1,24	2,44

*Porcentagem total das substâncias monitoradas

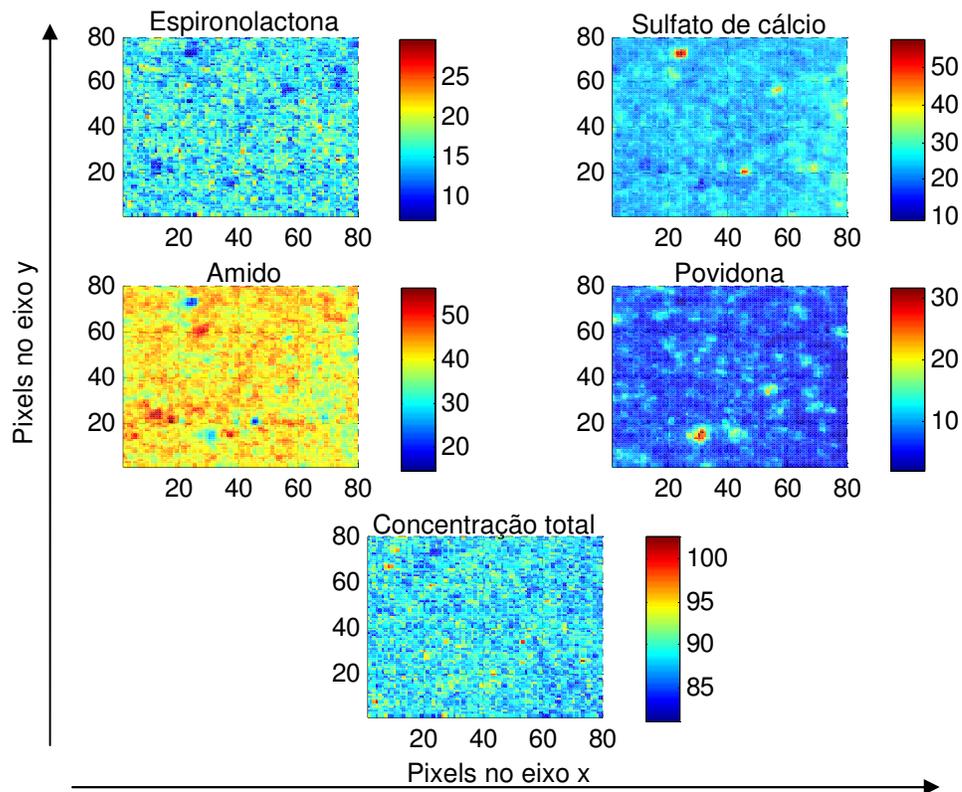


Figura 58 – Mapas de concentração da primeira replicata do nono padrão, obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.

Tabela 13 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do nono padrão.

Padrão 9	Previsto	Real	Erro absoluto (%)	Desvio padrão entre os pixels
Espironolactona	15,50	14,59	0,91	2,32
Sulfato de cálcio	24,42	24,92	-0,50	3,02
Amido	41,05	41,05	0,00	3,31
Povidona	7,69	7,81	-0,12	2,34
Total*	88,67	88,37	0,30	2,09

*Porcentagem total das substâncias monitoradas

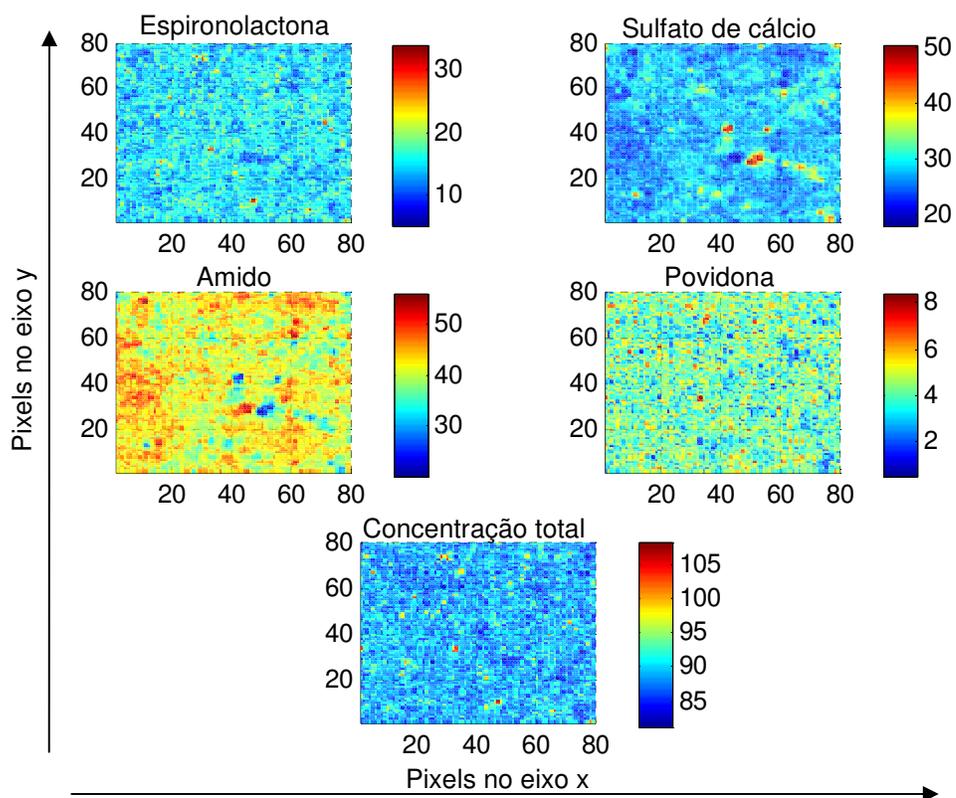


Figura 59 – Mapas de concentração da primeira replicata do décimo padrão (mistura padrão), obtidos utilizando iPLS. As barras de cores trazem os valores em porcentagem em relação à composição total.

Tabela 14 – Previsão da concentração das espécies monitoradas no comprimido como um todo. Dados da primeira replicata do décimo padrão.

Padrão 10 (MP)	Previsto	Real	Erro absoluto (%)	Desvio padrão entre os pixels
Espironolactona	15,26	15,14	0,12	2,44
Sulfato de cálcio	27,86	28,83	-0,97	3,02
Amido	41,86	40,18	1,68	3,53
Povidona	4,11	3,71	0,40	0,96
Total*	89,09	87,86	1,23	2,31

*Porcentagem total das substâncias monitoradas

Nas figuras 50 a 59 pode-se observar que as substâncias que mais apresentaram aglomerados nos comprimidos foram a povidona e o sulfato de cálcio. É importante observar também que os mapas de concentração total, exibidos nestas mesmas figuras, possuem um perfil de distribuição homogêneo, não sendo possível identificar acúmulo de nenhum componente da formulação. Isso confirma a boa previsão do modelo, mostrando que independente do acúmulo de uma de outra substância, a soma da concentração de todas elas sempre estará em torno do previsto, cerca de 90%, em cada pixel.

Através dos valores de desvio padrão dos pixels contidos nas tabelas de 5 a 14, é possível identificar que imagens com acúmulos pontuais de algum componente da formulação possuem maiores desvio padrão. Isso pode ser observado comparando a tabela 7 e a figura 52 com o restante das imagens, principalmente para o sulfato de cálcio.

5.4 Conclusões

A análise prévia dos padrões realizada com um equipamento NIR convencional mostrou que os padrões haviam sido preparados corretamente e que os erros de previsão, através de validação cruzada, eram aceitáveis.

Mesmo utilizando um número reduzido de experimentos e a necessidade de se trabalhar com os espectros médios dos comprimidos, os erros absolutos dos modelos na espectroscopia de imagens foram bastante aceitáveis (entre 0,49% e 1,26%) quando realizada a validação cruzada com os espectros médios.

As figuras 50 a 59 apresentaram os mapas de concentração obtidos para as primeiras replicatas de cada padrão. Pôde-se observar que existe uma distribuição homogênea de todos os compostos e que em alguns pontos existem acúmulos (cristais ou aglomerados) de uma das substâncias. Se compararmos as figuras 48 e 50, referentes à primeira replicata do primeiro padrão, poderemos ver que a análise por PCA já havia identificado qualitativamente essa micro-

heterogeneidade, e o iPLS veio confirmar quantitativamente a presença de cada composto em cada pixel.

Os mapas de concentração total nas figuras 50 a 59 mostram que a previsão foi realizada de maneira correta, já que a soma das porcentagens de todos os componentes está em torno de 89%, que era o esperado, já que o restante trata-se de água e estearato de magnésio.

As tabelas de 5 a 14 apresentam os erros para quantificação das substâncias no comprimido como um todo. Os valores previstos obtidos foram gerados pela simples média aritmética da concentração de cada substância em todos os pixels da imagem. Aqui é possível comparar o valor previsto com o real, pois como dito anteriormente, a composição global do comprimido é conhecida, mas a composição em cada pixel não. Os erros apresentados estão dentro dos valores esperados, que haviam sido obtidos por análise prévia por NIR convencional e utilizando o espectro médio dos comprimidos na análise por espectroscopia de imagens, confirmando mais uma vez a coerência dos modelos.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

A informação local fornecida pela análise de imagem possibilita novos ramos de pesquisa e auxilia a resolução de problemas já existentes, como estudos de micro-homogeneidade, sobretudo em medicamentos.

Nesta tese, a espectroscopia de imagens foi utilizada de maneira inédita no estudo da estabilidade de formulações de um creme e de uma pomada, além de ser utilizada na quantificação micrométrica dos excipientes e do API num medicamento apresentado como comprimido.

Em cada um dos medicamentos analisados a espectroscopia de imagem, associada à quimiometria mostrou seu potencial de aplicação:

1. Na primeira aplicação, a espectroscopia de imagens foi utilizada para avaliar a homogeneidade de uma pomada, desenvolvida com o imunossupressor Tacrolimus. Pomadas são apresentações que consistem somente em fase oleosa, sendo que a base é normalmente vaselina, cuja concentração está em torno de 80 a 90%. Para homogeneizar o API com a vaselina, foi utilizado um solvente, que no caso foi uma molécula de baixo peso molecular com um grupo funcional álcool. A falta de micro-homogeneidade da pomada em questão foi comprovada com auxílio da espectroscopia de imagens. Pode-se notar claramente nos mapas de absorção para a frequência correspondente ao estiramento O–H que o solvente estava se separando da vaselina, já que o único composto que possuía radical –OH na formulação era o solvente. O problema envolvido com a separação de fases entre o solvente e a vaselina é que ele arrastava consigo o API, diminuindo a homogeneidade do produto. Isso faria com que diferentes concentrações do princípio ativo fossem utilizadas a cada aplicação do produto pelo paciente. A vantagem da utilização da espectroscopia de imagens nestes casos é clara, já que não houve qualquer tipo de pré-tratamento da amostra, a análise foi rápida e os resultados são interpretados visualmente com uma resolução micrométrica.

2. Na segunda aplicação, a espectroscopia de imagens foi utilizada para estudar a formação de precipitados no desenvolvimento de um creme contendo o imunomodulador Imiquimode. Um creme consiste basicamente de uma fase oleosa e uma fase aquosa que são unidas por um surfactante formando uma emulsão estável. No desenvolvimento desta formulação, o API foi dissolvido num ácido carboxílico e homogeneizado apropriadamente com o restante dos excipientes. Após um mês de estabilidade, o produto foi analisado por microscopia ótica e foi verificado que havia precipitados no creme, sendo que a análise por microscopia ótica utilizando luz polarizada mostrou se tratar de estruturas cristalinas. Pôde-se verificar diretamente pelos mapas de absorbância que os cristais possuíam em sua composição uma fração significativa da fase oleosa e do API da formulação. Pôde-se verificar também pelos mapas de concentração relativa obtidos por MCR-ALS, que a concentração de água nesses cristais era muito menor que no restante do creme. Ainda nos mapas de concentração relativa, pode-se observar que nos pixels onde há ausência da banda O–H (cristais), a banda da amina permanece e onde existe alta concentração de água (presença da banda –OH) também está presente o espectro da fase oleosa e do API, porém em concentração menor que nos cristais. Em um estudo posterior, esses cristais foram sintetizados e estudados fora do creme, provando que realmente se tratava do sal do ácido carboxílico com o API, que possuía agrupamento amina em sua estrutura. Essa cristalização do API compromete a formulação do medicamento, já que altera a biodisponibilidade do API no creme.
3. A terceira aplicação da espectroscopia de imagens teve por objetivo quantificar os excipientes e API de um medicamento apresentado na forma de comprimidos. A análise prévia dos padrões por espectroscopia NIR convencional mostrou que seria possível quantificar as substâncias de

interesse utilizando o conjunto de padrões preparados. Foram obtidas então imagens espectroscópicas dos 50 comprimidos preparados. Para estimativa dos erros de previsão, foi realizada uma validação cruzada com os espectros médios de cada comprimido e, mesmo utilizando um número reduzido de experimentos, os erros absolutos dos modelos na espectroscopia de imagens foram bastante aceitáveis (entre 0,49% e 1,26%) quando realizada a validação cruzada com os espectros médios. Pôde-se observar a partir dos mapas de concentração que existe uma distribuição homogênea de todos os compostos, e que em alguns pontos existem acúmulos (cristais ou aglomerados) de um dos componentes. A análise preliminar por PCA já havia apresentados indícios da possibilidade de se visualizar cristais ou aglomerados de uma das substâncias monitoradas. Os mapas de concentração total mostram que a previsão foi realizada de maneira correta, já que a soma das porcentagens de todos os componentes está em torno de 89%, que era o esperado, já que o restante tratava-se de água e estearato de magnésio. Foi possível comparar o valor previsto de concentração total com o real, pois a composição global do comprimido era conhecida, mas a composição em cada pixel não. Os erros obtidos estavam dentro dos valores esperados que haviam sido obtidos por análise prévia por NIR convencional, confirmando mais uma vez a coerência dos modelos. Diferentemente das outras duas aplicações, a existência de micro-heterogeneidade é um fator comum em medicamentos apresentados como comprimidos, pois os excipientes e o API são compactados, e não dissolvidos como no caso de semi-sólidos. A homogeneidade em medicamentos sólidos não deve ser avaliada tomando por base dimensões micrométricas mas sim milimétricas (dimensões significativamente maiores que os cristais individuais de cada substância presente na formulação).

Os métodos quimiométricos utilizados nesta tese mostraram-se robustos e eficientes para análise global e local da constituição química dos medicamentos analisados.

Para ampliar a idéia do potencial da técnica, a tabela 16 mostra em tamanho próximo ao real as áreas analisadas em cada aplicação.

Tabela 16 – Resumo da estrutura das imagens analisadas.

Aplicação	Área analisada	Tamanho aproximado da área total analisada	Número de espectros/pixels analisados	Tamanho dos pixels
Comprimido	16 mm ²		6400	50 x 50 μm ²
Pomada	4 mm ²		6400	25 x 25 μm ²
Creme	1 mm ²		25600	6,25 x 6,25 μm ²

Sobretudo na aplicação da técnica de imagens na análise do creme, o número de pixels analisados surpreende. São 25600 pixels obtidos de uma área de apenas 1 mm².

Os equipamentos de imagem NIR, MIR e Raman tendem a reduzir de preço com o aumento do campo de aplicação da técnica e o desenvolvimento de softwares quimiométricos mais amigáveis. Devido às inúmeras vantagens da técnica de imagens perante a técnica espectroscópica convencional, é esperado um crescimento exponencial de publicações relacionadas ao tema nos próximos anos, consolidando a técnica de espectroscopia de imagens no meio analítico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] P. Geladi., E. Bengtsson, K. Esbensen, H. Grahn. *Trends Anal. Chem.* 11 (1), 41-53, **1992**.
- [2] A. de Juan, R. Tauler, R. Dyson, C. Marcolli, M. Rault, M. Mader, *Trends Anal. Chem.* 23 (1), 70-79, **2004**.
- [3] K. Esbensen, P. Geladi. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 7 (1-2), 67-86, **1989**.
- [4] P. Geladi., E. Bengtsson, K. Esbensen, H. Grahn. *Trends Anal. Chem.* 11 (3), 121-130, **1992**.
- [5] P. Geladi, H. Grahn,. *Multivariate Image Analysis*, Wiley, Chichester, **1996**.
- [6] J.P. Hornak, *Encyclopedia of Imaging Science and Technology*, Wiley, Chichester, West Sussex, UK, **2002**.
- [7] P. Colarusso, L.H. Kidder, I.W. Levin, J.C. Fraser, J.F. Arens, E.N. Lewis, *Appl. Spectrosc.* 52 (3), 106A-120A, **1998**.
- [8] P. Geladi,. *Multivariate Image Analysis in Chemistry and Related Areas: Chemometric Image analysis*, Wiley, Chichester, West Sussex, UK, **1996**.
- [9] Chein-I Chang,. *Hyperspectral Imaging: Techniques for spectral detection and classification*. Kluwer Academy/Plenum Publishers, New York, **2003**.
- [10] F. Orsini, D. Ami, A.M. Villa, G. Sala, M.G. Bellotti, S.M. Doglia. *J. Microbiol. Methods* 42 (1), 17-27, **2000**.
- [11] M. Fischer, C.D. Tran.. *Anal. Chem.* 71 (13), 2255-2261, **1999**.
- [12] P.M. Baldwin, D. Bertrand, B. Novales, B. Bouchet, G. Collobert, D.J. Gallant. *Anal. Chem.* 69 (21) 4339-4348, **1997**.
- [13] L. Duponchel, W. Elmi-Rayaleh, C. Ruckebusch, J. P. Huvenne.. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43 (6), 2057-2067, **2003**.
- [14] <http://aviris.jpl.nasa.gov/>, acessado em **11/12/2009**.
- [15] <http://envisat.esa.int/>, acessado em **11/12/2009**.

- [16] M.T.G. Casero, F.L. Granados, J.M.P. Barragan, M.J. Exposito, L.G. Torres. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 132 (5), 611-618, **2007**.
- [17] F.A. Kruse, S.L. Perry, A. Caballero. *Annals of Geophysics*. 49 (1), 83-92, **2006**.
- [18] P. Bierwirth, D. Huston, R. Blewett. *Economic Geology and the Bulletin of the Society of Economic Geologists*. 97 (4), 819-826, **2002**.
- [19] X. Da-qi, N. Guo-qiang, J. Li-li, L. Ting, G. Shu-le, S. Xian-biao. *Spectroscopy and Spectral Analysis*. 27 (11), 2150-2154, **2007**.
- [20] A. Samberg. *Canadian Journal of Remote Sensing*, 33 (3), 143-149, **2007**.
- [21] R.J. Ellis, P.W. Scott. *Remote Sensing of Environment*, 93 (1-2), 118-130, **2004**.
- [22] N.R. Rao, P.K. Garg, S.K. Ghosh. *Precision Agriculture*, 8 (4-5), 173-185, **2007**.
- [23] N. Jain, S.S. Ray, J.P. Singh, S. Panigrahy. *Precision Agriculture*, 8 (4-5), 225-239 **2007**.
- [24] B.S. Chauhan, E. David, P.K. Datta. *Defence Science Journal*, 55 (4), 493-503, **2005**.
- [25] H. Ren, C.I. Chang. *IEEE Transactions on Aerospace and Electronic Systems*, 39 (4), 1232-1249, **2003**.
- [26] A. Barducci, M. Benvenuti, L. Bonora, F. Castagnoli, D. Guzzi, P. Marcoionni, I. Pippi. *Annals of Geophysics*, 49 (1), 305-310, **2006**.
- [27] G. ElMasry, N. Wang, A. ElSayed, M. Ngadi. *Journal of Food Engineering*, 81 (1), 98–107, **2007**.
- [28] J. van der Weerd, S.G. Kazarian. *Journal of Controlled Release*, 98 (2), 295–305, **2004**.
- [29] P. Pantano, W.G. Kuhr. *Anal. Chem.* 65 (18), 2452-2458, **1993**.
- [30] H.F. Ounsi, T. Al-Shalan, Z. Salameh, S. Grandini, M. Ferrari. *Journal of Endodontics*, 34 (1), 53–55, **2008**.

- [31] L.A. Klerk, A. Broersen, I.W. Fletcher, R. van Liere, R.M.A. Heeren. *International Journal of Mass Spectrometry*, 260 (2–3), 222–236, **2007**.
- [32] M. Bacci, A. Casini, C. Cucci, A. Muzzi, S. Porcinai. *Journal of Cultural Heritage*, 6 (4), 329-336, **2005**.
- [33] J.R. Mansfield, M.G. Sowa, C. Majzels, C. Collins, E. Cloutis, H. H. Mantsch. *Vibrational Spectroscopy*. 19 (1), 33–45, **1999**.
- [34] M. Attas, E. Cloutis, C. Collins, D. Goltz, C. Majzels, J.R. Mansfield, H. H. Mantsch, *Journal of Cultural Heritage*, 4 (2), 127–136, **2003**.
- [35] A.A. Gowen, C.P. O'Donnell, P.J. Cullen, G. Downey, J.M. Frias. *Trends in Food Science and Technology*, 18(12), 590-598, **2007**.
- [36] K. Chao, Y.R. Chen, W.R. Hruschka, B. Park. *Applied Engineering in Agriculture*, 17 (1), 99-106, **2001**.
- [37] M.S. Kim, A.M. Lefcourt, K. Chao, Y.R. Chen, I. Kim, D.E. Chan. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 45 (6), 2027-2037, **2002**.
- [38] I. Kavdir, D.E. Guyer. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 45 (6), 1995-2005, **2002**.
- [39] G. Polder, G.W.A.M. van der Heijden, I.T. Young. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 45(4), 1155-1161, **2002**.
- [40] Z. Liu, D. Zhang, J.Q. Yan, Q.L. Li, Q.L. Tang. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 31 (8), 672-678, **2007**.
- [41] C.F. Beckmann, S.M. Smith. *Neuroimage*, 25 (1), 294–311, **2005**.
- [42] J. Tessiera, C. Duchesnea, C. Gauthierb, G. Dufourb. *Chemical Engineering Science*, 63, 1370 – 1380, **2008**.
- [43] C.K. Dahl, K.H. Esbensen. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 89 (1), 9–25, **2007**.
- [44] C. Gendrin, Y. Roggo, C.Collet. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 533–553, **2008**.
- [45] B. Vajna, I. Farkas, A. Szabo, Z. Zsigmond, G. Marosi. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 30–38, **2010**.

- [46] S.C. Park, M. Kim, J. Noh, H. Chung, Y. Woo, J. Lee, M.S. Kemper. *Analytica Chimica Acta*, 593, 46–53, **2007**.
- [47] W.Q. Lin, J.H. Jiang, H.F. Yang, Y. Ozaki, G.L. Shen, R.Q. Yu. *Anal. Chem.*, 78, 6003–6011, **2006**.
- [48] J.M. Amigo, J. Cruz, M. Bautista, S. MasPOCH, J. Coello, M. Blanco. *Trends in Analytical Chemistry*, 27 (8), 696–713, **2008**.
- [49] K. Awa, T. Okumura, H. Shinzawa, M. Otsuka, Y. Ozaki. *Analytica Chimica Acta*, 619, 81–86, **2008**.
- [50] S. Sasic, *Applied Spectroscopy*, 61 (3), 239-250, **2007**.
- [51] J. Cruz, M. Bautista, J.M. Amigo, M. Blanco, *Talanta*, 80, 473–478, **2009**.
- [52] C. Cairós, J.M. Amigo, R. Watt, J. Coello, S. MasPOCH, *Talanta*, 79, 657–664, **2009**.
- [53] J.M. Amigo, C. Ravn. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, 76–82, **2009**.
- [54] M.B. Lopes, J.C. Wolff, J.M. Bioucas-Dias, M.A.T. Figueiredo. *Analytica Chimica Acta*, 641, 46–51, **2009**.
- [55] A.A. Gowen, C.P. O'Donnell, P.J. Cullen, S.E.J. Bell. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69, 10–22, **2008**.
- [56] S. Sasic. *Analytica Chimica Acta*, 611, 73–79, **2008**.
- [57] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Vol. 2*, in: Data Handling in Science and Technology, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, **1997**.
- [58] A. de Juan, E. Casassas, R. Tauler, Soft Modeling of Analytical Data, in: R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, UK, **2000**.
- [59] R. Tauler, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 30, 133, **1995**.
- [60] Windig W., Stephenson D.A.. *Anal. Chem.* 64, 2735, **1992**.
- [61] <http://www.ub.edu/mcr/ndownload.htm>, acessado em **11/12/2009**.

[62] R.M. Silverstein, F.X. Webster, D.J. Kiemle. *Spectrometric Identification of Organic Compound*, 7th edition. Editora: John Wiley & Sons, Inc. United States of America, **2005**.

[63] Kumar T. L., Vishweshwar P., Babu J. M., Vyas K.. *Cryst. Growth Des.* 9 (11), 4822, **2009**.

[64] http://www.aapsj.org/abstracts/AM_1998/2445.html, acessado em **11/12/2009**.