



UFSM

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ÁCIDO CLAVULÂNICO
E AMOXICILINA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS
UTILIZANDO TÉCNICAS DE REFLEXÃO NO
INFRAVERMELHO MÉDIO E MÉTODOS DE REGRESSÃO
MULTIVARIADOS**

Aline Lima Hermes Müller

PPGQ

Santa Maria, RS – Brasil

2009

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ÁCIDO CLAVULÂNICO E AMOXICILINA EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS UTILIZANDO TÉCNICAS DE REFLEXÃO NO
INFRAVERMELHO MÉDIO E MÉTODOS DE REGRESSÃO MULTIVARIADOS**

por

Aline Lima Hermes Müller

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, **Área de
Química Analítica**, da Universidade Federal de Santa Maria (RS), como requisito
parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**

Santa Maria, RS – Brasil

2009

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ÁCIDO CLAVULÂNICO E AMOXICILINA EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS UTILIZANDO TÉCNICAS DE REFLEXÃO NO
INFRAVERMELHO MÉDIO E MÉTODOS DE REGRESSÃO MULTIVARIADOS**

Elaborada por
Aline Lima Hermes Müller

Como requisito parcial a obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Érico Marlon de Moraes Flores – Orientador (UFSM - RS)

Marco Flores Ferrão (UNISC - RS)

Ronei de Jesus Poppi (UNICAMP - SP)

Santa Maria, 14 de agosto de 2009

**Aos meus pais Osmar e Lisane.
A minha irmã Carine.
Ao meu grande amor Edson.**

Aprendendo a viver

"Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança. E começa a aprender que beijos não são contratos e presentes não são promessas. E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança. E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão. Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo. E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam... E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso. Aprende que falar pode aliviar dores emocionais. Descobre que se levam anos para se construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida. Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher. Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendemos que os amigos mudam, percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos.

Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos. Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser. Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo, mas se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve. Aprende que, ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados. Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências. Aprende que paciência requer muita prática. Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se. Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou.

Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha. Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens. Poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso. Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não te dá o direito de ser cruel. Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame, não significa que esse alguém não o ama com tudo o que pode, pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso. Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes você tem que aprender a perdoar-se a si mesmo. Aprende que com a mesma severidade com que julga você será em algum momento condenado. Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar... Que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. Aprende que nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar. E que realmente a vida tem valor e que VOCÊ tem valor diante da vida!"

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Maria pela possibilidade de execução deste trabalho, meus agradecimentos.

Ao Prof. Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores** pela orientação, amizade e incentivo. Pelo exemplo de profissionalismo e pelas oportunidades de crescimento profissional. Obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. **Marco Flôres Ferrão**, por toda paciência, amizade e ensinamentos. Pelo profissionalismo e sabedoria. Obrigada!

Aos Profs. Drs. **Valderi Luiz Dressler e José Neri G. Paniz** pela amizade, incentivo e apoio para a minha formação profissional.

À **Fabiana Barcellos da Silva** pela idéia inicial o trabalho, pela amizade e pelos ensinamentos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Química Industrial e Ambiental pela convivência, amizade, conhecimentos e auxílio na realização deste trabalho, em especial a **Fabiane Goldschmidt, Paola e Rochele**.

Ao **Ademir** e à **Valéria** da secretária do PPGQ pela atenção.

Aos meus pais **Osmar e Lisane** e a minha irmã **Carine** pelo amor incondicional, apoio e por sempre acreditar e incentivar todas minhas decisões. Vocês são a base de tudo. Amo vocês!

E a você **Edson**, acredito não ter palavras suficientes para agradecer o incentivo, a paciência, o companheirismo, as palavras de conforto nos momentos difíceis e também, é claro, a colaboração, pois foi uma pessoa imprescindível para concretização deste trabalho. Obrigada por fazer parte da minha vida. Amo você!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xviii
RESUMO.....	xxii
ABSTRACT.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Antibióticos.....	4
2.2. Controle de qualidade dos fármacos AC e AMO.....	6
2.3. Espectroscopia na região do infravermelho.....	8
2.3.1. Reflexão Total Atenuada (FTIR/ATR).....	12
2.3.2. Reflexão Difusa (DRIFTS).....	16
2.4. Análise multivariada.....	18
2.4.1. Métodos de classificação.....	20
2.4.1.1. Análise por Componentes Principais (PCA).....	21
2.4.1.2. Análise por Grupamento Hierárquico (HCA).....	24
2.4.2. Métodos de regressão.....	25
2.4.2.1. Mínimos quadrados parciais (PLS).....	26
2.4.3. Métodos de seleção de variáveis em modelos de regressão..	28
2.4.4. Seleção do conjunto de calibração e previsão.....	29
2.4.5. Tratamento e pré-processamento dos dados.....	30
2.4.6. Avaliação dos modelos de regressão.....	30

2.5. Testes de significância.....	32
2.6. Aplicações da espectroscopia no infravermelho combinada com os métodos multivariados para análise de amostras farmacêuticas	34
2.6.1. Utilização da espectroscopia na região do infravermelho associada a controle de processos farmacêuticos.....	35
2.6.2. Espectroscopia no IR associada a determinações quantitativas.....	37
2.7. Validação de métodos de espectroscopia no IR associado a métodos multivariados de calibração.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1. Instrumentação.....	45
3.2. Reagentes.....	46
3.3. Amostras de ácido clavulânico, amoxicilina e mistura de excipientes.....	47
3.3.1. Preparo das amostras sintéticas.....	49
3.3.2. Amostras comerciais.....	49
3.4. Determinação de amoxicilina e ácido clavulânico por HPLC.....	51
3.5. Análise utilizando espectroscopia no infravermelho.....	52
3.5.1. Aquisição dos espectros por reflexão difusa (DRIFTS).....	52
3.5.2. Aquisição dos espectros por reflexão total atenuada (FTIR/ATR).....	53
3.6. Programas computacionais.....	55
3.7. Análise multivariada – Construção dos modelos.....	56
3.7.1. Seleção das amostras dos conjuntos de calibração e	

previsão	56
3.7.2. Desenvolvimento dos modelos para a determinação de amoxicilina e ácido clavulânico	57
3.7.2.1. Otimização do modelo global.....	57
3.7.2.2. Métodos de seleção de variáveis.....	58
3.7.2.3. Avaliação dos modelos obtidos por iPLS, biPLS e siPLS...	58
3.7.2.4. Avaliação dos resultados frente a parâmetros farmacopeicos.....	59
3.8. Fluxograma das etapas desenvolvidas na determinação de AC e AMO	60
4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	61
4.1. Características gerais dos fármacos AC e AMO	61
4.2. Conjunto de calibração e previsão: seleção das amostras	63
4.3. Identificação de amostras anômalas	66
4.4. Determinação do número de variáveis latentes utilizados na construção dos modelos	67
4.5. Otimização do modelo global para os diferentes tipos de dados adquiridos (FTIR/ATR e DRIFTS)	69
4.5.1 Modelos globais para AC e AMO utilizando dados FTIR/ATR...	69
4.5.2 Modelos globais para AC e AMO utilizando dados DRIFTS.....	71
4.6. Determinação do fármaco AC por FTIR-ATR utilizando os métodos de seleção de variáveis	73
4.6.1. Modelos iPLS	73
4.6.2. Modelos siPLS	75
4.6.3. Modelo biPLS	77

4.7. Determinação do fármaco AMO por FTIR/ATR utilizando os métodos de seleção de variáveis.....	82
4.7.1. Modelos iPLS.....	82
4.7.2. Modelos siPLS.....	83
4.7.3. Modelos biPLS.....	85
4.8. Determinação do fármaco AC por DRIFTS utilizando os métodos de seleção de variáveis.....	89
4.8.1. Modelos iPLS.....	89
4.8.2. Modelos biPLS.....	91
4.8.3. Modelo siPLS.....	93
4.9. Determinação do fármaco AMO por DRIFTS utilizando os métodos de seleção de variáveis.....	97
4.9.1. Modelo iPLS.....	97
4.9.2. Modelo biPLS.....	99
4.9.3. Modelo siPLS.....	100
4.10. Comparação entre as metodologias empregadas no estudo (FTIR-ATR e DRIFTS) para determinação dos fármacos AC e AMO	105
4.10.1. Avaliação dos erros médio de previsão dos melhores modelos e comparação através do teste F.....	105
4.10.2. Análise dos resultados obtidos na determinação do fármaco AC.....	106
4.10.3. Análise dos resultados obtidos na determinação do fármaco AMO.....	108
4.11. Considerações finais.....	109
4.11.1 Linearidade.....	110
4.11.2 Exatidão, precisão e erro sistemático.....	113
5. CONCLUSÕES.....	115
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fórmula estrutural do fármaco amoxicilina triidratada.....	4
Figura 2.	Reação de hidrólise do fármaco AMO pela enzima β -lactamases.....	5
Figura 3.	Fórmula estrutural do fármaco clavulanato de potássio.....	5
Figura 4.	Esquema ilustrativo do interferômetro de <i>Michelson</i> e do espectro resultante da aplicação da transformada de Fourier (FT).....	10
Figura 5.	Representação da reflexão em um elemento de reflexão interna (R_0 = radiação incidente e R_1 = radiação refletida).....	13
Figura 6.	Representação da propagação da radiação infravermelha através de um elemento de reflexão interna.....	13
Figura 7.	Representação de reflexão especular e difusa de uma onda eletromagnética em uma amostra particulada.....	17
Figura 8.	Matriz de dados gerada a partir de um espectro.....	20
Figura 9.	Princípios da análise por componentes principais.....	22
Figura 10.	Representação de um modelo de análise por componentes principais: a) conjunto de dados com dez objetos e três variáveis, b) primeira componente principal calculada através do conjunto de dados.....	23
Figura 11.	Perfil dos espectros das amostras obtidos por DRIFTS.....	53
Figura 12.	Perfil dos espectros das amostras obtidos por FTIR/ATR.....	55
Figura 13.	Fluxograma das etapas desenvolvidas na determinação de AC e AMO por FTIR/ATR e DRIFTS.....	60

Figura 14. Espectros no infravermelho médio do fármaco AC por reflexão total atenuada e reflexão difusa.....	61
Figura 15. Espectros no infravermelho médio do fármaco AMO por reflexão total atenuada e reflexão difusa.....	62
Figura 16. Dendrograma fornecido pela HCA, para a seleção das amostras dos conjuntos de calibração e previsão.....	64
Figura 17. Distribuição das amostras de calibração e previsão para quantificação do fármaco AC.....	65
Figura 18. Distribuição das amostras de calibração e previsão para quantificação do fármaco AMO.....	66
Figura 19. Gráfico utilizado para a seleção das VLs em função do RMSECV. Comportamento do “mínimo local”. Valores de RMSECV para AC utilizando PLS.....	68
Figura 20. Gráfico utilizado para a seleção das VLs em função do RMSECV. Comportamento monotônico. Valores de RMSECV para AC utilizando PLS.....	68
Figura 21. Espectro dividido em 20 intervalos para a determinação do fármaco AC por FTIR/ATR. As barras correspondem aos valores de RMSECV para cada intervalo e a linha tracejada para o modelo global. Os números internos apresentados no interior de cada intervalo correspondem às variáveis latentes.....	75
Figura 22. Espectro dividido em 30 intervalos para a determinação do fármaco AC por FTIR/ATR. As barras correspondem aos valores de RMSECV para cada intervalo e a linha tracejada para o modelo global. Os números internos apresentados no interior de cada intervalo correspondem às variáveis latentes.....	78

- Figura 23.** Valores de referência *versus* valores previstos para o modelo biPLS30 do fármaco AC utilizando os intervalos 10, 21, 23 e 27 por FTIR/ATR..... 79
- Figura 24.** Comparação dos erros relativos dos melhores modelos (iPLS20, si2PLS40 e biPLS30) obtidos para cada uma das amostras de previsão na determinação do fármaco AC a partir de dados obtidos por FTIR/ATR. 80
- Figura 25.** Histograma da diferença entre o valor de concentração do fármaco AC (mg g^{-1}) obtido pelo método de referência e o valor previsto pelo modelo biPLS30..... 81
- Figura 26.** Espectro dividido em 30 intervalos para a determinação do fármaco AMO por FTIR/ATR. As barras correspondem aos valores de RMSECV para cada intervalo e a linha tracejada para o modelo global. Os números internos apresentados no interior de cada intervalo correspondem às variáveis latentes..... 83
- Figura 27.** Espectro dividido em 50 intervalos para a determinação do fármaco AMO por FTIR/ATR. As barras correspondem aos valores de RMSECV para cada intervalo e a linha tracejada para o modelo global. Os números internos apresentados no interior de cada intervalo correspondem às variáveis latentes..... 86
- Figura 28.** Valores de referência *versus* valores previstos para o modelo biPLS do fármaco AMO utilizando os intervalos 12, 35, 38, 42 por FTIR/ATR..... 87
- Figura 29.** Comparação dos erros relativos dos melhores modelos (iPLS30, si2PLS30 e biPLS50) obtidos para cada uma das amostras de previsão na determinação do fármaco AMO a partir de dados obtidos por FTIR/ATR..... 88

- Figura 30.** Histograma da diferença entre o valor de concentração do fármaco AMO (mg g^{-1}) obtido pelo método de referência e o valor previsto pelo modelo biPLS50..... 88
- Figura 31.** Espectro dividido em 20 intervalos para a determinação do fármaco AC por DRIFTS. As barras correspondem aos valores de RMSECV para cada intervalo e a linha tracejada para o modelo global. Os números internos apresentados no interior de cada intervalo correspondem às variáveis latentes..... 91
- Figura 32.** Espectro dividido em 30 intervalos para a determinação de AC por DRIFTS. As barras correspondem aos valores de RMSECV para cada intervalo e a linha tracejada para o modelo global. Os números internos apresentados no interior de cada intervalo correspondem às variáveis latentes..... 95
- Figura 33.** Valores de referência *versus* valores previstos para o modelo siPLS do fármaco AC utilizando os intervalos 13 e 18 por DRIFTS..... 95
- Figura 34.** Comparação dos erros relativos dos melhores modelos obtidos para cada uma das amostras de previsão na determinação do fármaco AC a partir de dados obtidos por DRIFTS..... 96
- Figura 35.** Histograma da diferença entre o valor de concentração do fármaco AC (mg g^{-1}) obtido pelo método de referência e o valor previsto pelo modelo si230PLS..... 96
- Figura 36.** Espectro dividido em 30 intervalos para a determinação do fármaco AMO por DRIFTS. As barras correspondem aos valores de RMSECV para cada intervalo e a linha tracejada para o modelo global. Os números internos apresentados no interior de cada intervalo correspondem às variáveis latentes..... 98

- Figura 37.** Espectro dividido em 10 intervalos, combinando 4 intervalos, para a determinação do fármaco AMO por DRIFTS. As barras correspondem aos valores de RMSECV para cada intervalo e a linha tracejada para o modelo global. Os números internos apresentados no interior de cada intervalo correspondem às variáveis latentes..... 102
- Figura 38.** Valores de referência *versus* valores previstos para o modelo siPLS do fármaco AMO utilizando os intervalos 2, 4, 5 e 6 por DRIFTS..... 103
- Figura 39.** Comparação dos erros relativos dos melhores modelos (iPLS30, si4PLS10 e biPLS20) obtidos para cada uma das amostras de previsão na determinação do fármaco AMO a partir de dados obtidos por DRIFTS..... 104
- Figura 40.** Histograma da diferença entre o valor de concentração do fármaco AMO (mg g^{-1}) obtido pelo método de referência e o valor previsto pelo modelo si410PLS..... 104
- Figura 41.** Resíduos do modelo biPLS30 para determinação do fármaco AC por FTIR/ATR..... 111
- Figura 42.** Resíduos do modelo biPLS50 para determinação do fármaco AMO por FTIR/ATR..... 111
- Figura 43.** Resíduos do modelo si230PLS para determinação do fármaco AC por DRIFTS..... 112
- Figura 44.** Resíduos do modelo si410PLS para determinação do fármaco AMO por DRIFTS..... 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Limites aproximados para as regiões no infravermelho.....	8
Tabela 2.	Propriedades físicas e químicas dos materiais de IRE.....	15
Tabela 3.	Excipientes presentes nas formulações de comprimidos contendo amoxicilina e ácido clavulânico.....	48
Tabela 4.	Composição da mistura de excipientes utilizada na formulação das amostras sintéticas.....	49
Tabela 5.	Composição obtida por HPLC para as amostras dos conjuntos de calibração e previsão.....	50
Tabela 6.	Parâmetros empregados para aquisição dos espectros por DRIFTS.....	52
Tabela 7.	Parâmetros empregados na aquisição dos espectros por FTIR/ATR.....	54
Tabela 8.	Resultados dos modelos globais obtidos para o fármaco AC por FTIR/ATR.....	70
Tabela 9.	Resultados dos modelos globais obtidos para o fármaco AMO por FTIR/ATR.....	71
Tabela 10.	Resultados dos modelos globais obtidos para o fármaco AC por DRIFTS.....	72
Tabela 11.	Resultados dos modelos globais obtidos para o fármaco AMO por DRIFTS.....	73
Tabela 12.	Resultados dos modelos iPLS obtidos para o fármaco AC por FTIR/ATR.....	74

Tabela 13. Resultados dos modelos siPLS obtidos para o fármaco AC por FTIR/ATR.....	76
Tabela 14. Resultados dos modelos biPLS obtidos para o fármaco AC por FTIR/ATR.....	78
Tabela 15. Intervalos e as vibrações correspondentes à determinação do fármaco AC por FTIR/ATR.....	79
Tabela 16. Resultados dos modelos iPLS obtidos para o fármaco AMO por FTIR/ATR.....	82
Tabela 17. Resultados dos modelos siPLS obtidos para o fármaco AMO por FTIR/ATR.....	84
Tabela 18. Resultados dos modelos biPLS obtidos para o fármaco AMO por FTIR/ATR.....	85
Tabela 19. Intervalos e vibrações correspondentes à determinação do fármaco AMO por FTIR/ATR.....	86
Tabela 20. Resultados obtidos para os melhores modelos iPLS para o fármaco AC utilizando DRIFTS.....	90
Tabela 21. Resultados obtidos para os melhores modelos iPLS para o fármaco AC utilizando DRIFTS.....	92
Tabela 22. Intervalos e vibrações correspondentes à determinação do fármaco AC por DRIFTS.....	92
Tabela 23. Resultados obtidos para os melhores modelos siPLS para o fármaco AC utilizando DRIFTS.....	94
Tabela 24. Resultados obtidos para os melhores modelos iPLS para o fármaco AMO utilizando DRIFTS.....	98
Tabela 25. Resultados obtidos para os melhores modelos biPLS de AMO utilizando DRIFTS.....	99

Tabela 26. Intervalos e vibrações correspondentes à determinação do fármaco AMO por DRIFTS.....	100
Tabela 27. Resultados obtidos para os melhores modelos siPLS para o fármaco AMO utilizando DRIFTS.....	101
Tabela 28. Intervalos e vibrações correspondentes à determinação do fármaco AMO por DRIFTS.....	102
Tabela 29. Teste F aplicado na comparação dos erros médios de previsão para os melhores modelos desenvolvidos na determinação do fármaco ácido clavulânico por FTIR/ATR e DRIFTS.....	106
Tabela 30. Teste F aplicado na comparação dos erros médios de previsão para os melhores modelos desenvolvidos na determinação do fármaco amoxicilina por FTIR/ATR e DRIFTS.....	106
Tabela 31. Valores obtidos pela metodologia oficial, FTIR/ATR e DRIFTS na determinação do fármaco AC.....	107
Tabela 32. Valores obtidos pela metodologia oficial, FTIR/ATR e DRIFTS na determinação do fármaco AMO.....	108
Tabela 33. Melhores modelos obtidos para os fármacos AC e AMO para os dados obtidos por ATR/FTIR e DRIFTS.....	110
Tabela 34. Parâmetros de mérito obtidos para as amostras de calibração na determinação dos fármacos AC e AMO por FTIR/ATR e DRIFTS.....	113
Tabela 35. Parâmetros de mérito obtidos para as amostras de previsão na determinação dos fármacos AC e AMO por FTIR/ATR e DRIFTS.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. A, autoescalado.
2. AC, ácido clavulânico.
3. AMO, amoxicilina.
4. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
5. ATR, reflexão total atenuada, do inglês *attenuated total reflection*.
6. ATR/FTIR, espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier e reflexão total atenuada, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflection*.
7. biPLS, mínimos quadrados parciais por exclusão de intervalos, do inglês *backward interval partial least squares*.
8. CP, componente principal.
9. DRIFTS, espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier e reflectância difusa, do inglês *diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy*.
10. DTGS, detector de sulfato de triglicina deuterada.
11. EMEA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products.
12. FDA, *Food and Drug Administration*.
13. FIR, infravermelho distante, do inglês *far infrared*.
14. FT, transformada de Fourier, do inglês *Fourier transform*.
15. FTIR, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*.

16. HCA, análise por agrupamentos hierárquicos, do inglês *hierarchical cluster analysis*.
17. HPLC, cromatografia a líquido de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*.
18. ICH, Conferência Internacional de Harmonização, do inglês *International Conference on Harmonisation*.
19. iPLS, mínimos quadrados parciais por intervalo, do inglês *interval partial least squares*.
20. IR, espectroscopia na região do infravermelho, do inglês *infrared spectroscopy*.
21. IRE, elemento de reflexão interna, do inglês *internal reflection element*.
22. IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry.
23. LDA, análise discriminante linear, do inglês *linear discriminant analysis*.
24. M, centrado na média.
25. MIR, infravermelho médio, do inglês *mid infrared*.
26. MLR, regressão linear múltipla, do inglês *multiple linear regression*.
27. MSC, correção do espalhamento multiplicativo, do inglês *multiplicative scatter correction*.
28. NAS, sinal analítico líquido, do inglês *net analytical signal*.
29. NIR, infravermelho próximo, do inglês *near infrared*.
30. PAT, tecnologia analítica de processos, do inglês *process analytical technology*.
31. PCA, análise por componentes principais, do inglês *principal component analysis*.

32. PCR, regressão por componentes principais, do inglês *principal component regression*.
33. PLS, mínimos quadrados parciais, do inglês *partial least squares*.
34. R, coeficiente de correlação.
35. RMSE, raiz quadrada dos erros médios, do inglês *root mean square error*.
36. RMSEC, raiz quadrada do erro médio da calibração, do inglês *root mean square error of calibration*.
37. RMSECV, raiz quadrada do erro médio da validação cruzada, do inglês *root mean square error of cross-validation*.
38. RMSEP, raiz quadrada do erro médio de previsão, do inglês *root mean square error of prediction*.
39. RMSEV, raiz quadrada do erro médio da validação, do inglês *root mean square error of validation*.
40. RSEP, erro padrão de predição relativo, do inglês *relative standard error of prediction*.
41. SDV, desvio padrão dos erros de validação, do inglês *standard deviation validation*.
42. SIMCA, modelagem independente de analogia de classes, do inglês *soft independent modelling of class analogy*.
43. SNV, variável normal padrão, do inglês *standard normal variate*
44. siPLS, mínimos quadrados parciais por sinergismo de intervalos, do inglês *synergy interval partial least squares*.
45. SNV, variável normal padrão, do inglês *Standard Normal Variate Transformation*.
46. SQR, substância química de referência.

- 47** TV, total de variáveis.
- 48.** USP, Farmacopéia dos Estados Unidos, do inglês *United States Pharmacopoeia*.
- 49.** VL, variáveis latentes.

RESUMO

Os fármacos ácido clavulânico (AC) e amoxicilina (AMO) são utilizados em associação e são comercializados no Brasil como agentes antibióticos. A determinação simultânea destes fármacos é, normalmente, realizada por cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*). O presente estudo teve por objetivo a determinação simultânea de AC e AMO utilizando técnicas de espectroscopia de reflexão no infravermelho médio (FTIR/ATR e DRIFTS) combinadas com métodos de análise multivariada. Utilizaram-se 19 amostras comerciais e 17 amostras sintéticas (28 amostras para o conjunto de calibração e 8 amostras para o conjunto previsão). Obtiveram-se modelos de calibração por mínimos quadrados parciais (PLS) e seleção de variáveis através dos algoritmos por mínimos quadrados parciais por intervalo (iPLS), por sinergismo (siPLS) e por exclusão (biPLS). Os melhores modelos foram obtidos através da utilização do pré-processamento centrado na média e do tratamento de correção do espalhamento de luz (MSC). Utilizando os dados obtidos por FTIR/ATR o modelo que apresentou melhor capacidade preditiva foi aquele que utilizou o algoritmo biPLS, fornecendo um erro padrão de predição relativo (RSEP) de 3,58% (raiz quadrada do erro médio de previsão - RMSEP = 6,17 mg g⁻¹) para AC e RSEP de 5,12% (RMSEP = 33,58 mg g⁻¹) para AMO. Quando utilizados os dados obtidos por DRIFTS, os melhores modelos foram os que utilizaram o algoritmo siPLS, produzindo RSEP de 4,98% (RMSEP = 8,44 mg g⁻¹) para AC e RSEP de 4,75% (RMSEP = 23,31 mg g⁻¹) para AMO. Os resultados de ambas as metodologias propostas foram comparados com os valores obtidos pela metodologia de referência por HPLC, não se verificando diferença significativa entre seus valores. Desta forma, os resultados mostraram que as técnicas de FTIR/ATR e DRIFTS associadas aos métodos de regressão multivariados permitiram a obtenção de modelos apropriados para a determinação simultânea de AC e AMO em formulações farmacêuticas.

ABSTRACT

Clavulanic acid (AC) and amoxicillin (AMO) drugs are used in association and they are commercialized in Brazil as antibiotic agent. The simultaneous determination of these drugs is, usually, carried out by high performance liquid chromatography (HPLC). In the present study a methodology for simultaneous determination of AC and AMO was developed using Fourier transform mid infrared technique coupled with attenuated total reflectance (FTIR/ATR) and diffuse reflectance (DRIFTS). Nineteen commercial samples and 17 synthetic samples (28 samples for calibration set and 8 samples for prevision set) were used. Calibration models were developed using partial least squares (PLS) and interval partial least squares (iPLS), synergy partial least squares (siPLS) and backward interval partial least squares (biPLS) were used as variable selection methods. Multiplicative scatter correction (MSC) and the data centered in the media produced the best models. A relative standard error of prediction (RSEP) of 3.58% (root mean square error of prediction – RMSEP = 6.17 mg g⁻¹) for AC and RSEP of 5.12% (RMSEP = 33.58 mg g⁻¹) for AMO was obtained after interval selection using biPLS algorithm for FTIR/ATR. For DRIFTS 4.98% (RMSEP = 8.44 mg g⁻¹) and 4.75% (RMSEP = 23.31 mg g⁻¹) RSEP values were obtained for AC and AMO, respectively, after selection of better intervals by siPLS. Results obtained by the proposed methodology were compared with those using the methodology by HPLC and no significant differences were obtained. Therefore, results using FTIR/ATR and DRIFTS techniques combined to multivariate analysis methods were suitable for the simultaneous determination of AC and AMO in commercial pharmaceuticals products.

1. INTRODUÇÃO

Diante do crescente número de indústrias farmacêuticas, do aumento da demanda e das denúncias de falsificação de medicamentos, torna-se necessário atestar a qualidade dos mesmos. A qualidade dos produtos farmacêuticos é de suma importância, não apenas para aperfeiçoar e avaliar os processos de produção, mas principalmente para assegurar os padrões de qualidade que garantem a eficácia e a segurança dos medicamentos à população. Desta forma, a disponibilidade de metodologias analíticas confiáveis e, se possíveis rápidas e de menor custo, são extremamente importantes. Para tanto, órgãos oficiais como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Farmacopéias (de diferentes países) e o *Food and Drug Administration* (FDA - USA) determinam e orientam parâmetros a serem adotados pelas indústrias farmacêuticas, principalmente, aqueles relacionados aos métodos de análise necessários para o controle de qualidade das diferentes formulações, tanto para determinação de uma única substância ativa como para as respectivas associações.

A associação de dois ou mais fármacos em uma única formulação é um recurso terapêutico muito comum. Este tipo de terapia tem, dentre alguns dos objetivos, facilitar a adesão do paciente ao tratamento, uma vez que diminui o número de formas farmacêuticas administradas, além da possibilidade de potencializar a ação de um dos fármacos.⁸⁷ Por exemplo, a associação dos fármacos ácido clavulânico (AC) e amoxicilina (AMO) tem por objetivo a proteção da ação farmacológica da amoxicilina frente à degradação promovida pelas enzimas β -lactamases produzidas por certas bactérias, sendo que estes fármacos associados são comercializados rotineiramente no Brasil.

Segundo diversas farmacopéias^{17,36,106} a determinação simultânea destes fármacos deve ser realizada por cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*), sendo este o procedimento adotado

⁸⁷ Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Farmacologia. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2001).

¹⁷ British Pharmacopoeia Commission (Org.). British Pharmacopoeia 2001. London (2001).

³⁶ European Pharmacopoeia 2002. 4. ed Strasbourg (2001).

¹⁰⁶ United States Pharmacopoeia, USP 31 – NF 26: the official compendia of standards. Rockville (2007).

pelas indústrias farmacêuticas. Porém, muitas vezes esta técnica não atende as necessidades das indústrias farmacêuticas e produz quantidades significativas de resíduos tóxicos.

Assim, tem se buscado técnicas alternativas para o controle de qualidade de fármacos e medicamentos, que ofereçam maior rapidez na análise, mínimo preparo da amostra, baixo consumo de solventes e menor geração de resíduos. Sob este aspecto espectroscopia no infravermelho tem se tornado uma alternativa viável, pois apresenta as vantagens acima descritas, principalmente quando associada às técnicas de reflexão, tais como reflexão difusa (DRIFTS, do inglês *diffuse reflectance Fourier transform spectroscopy*) e reflexão total atenuada (FTIR/ATR, do inglês *Fourier transform infrared – attenuated total reflectance*).^{5,96}

Diversas etapas do controle de qualidade de medicamentos podem ser supervisionadas empregando esta técnica, como a etapa de uniformidade de mistura e conteúdo, espessura do revestimento de comprimidos,^{8,68,101} identificação e quantificação de substâncias ativas em medicamentos,^{62,109} detecção de estados polimórficos,⁴⁸ entre outras.

A combinação da espectroscopia no infravermelho com as ferramentas de análise multivariada permite melhorar a qualidade dos resultados obtidos para misturas complexas tendo em vista a ocorrência de informações espectrais com sobreposição de sinais e o grande número de variáveis.⁸⁸ O método de regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS, do inglês *partial least squares*) é uma ferramenta de análise multivariada que tem a capacidade de relacionar os sinais obtidos com o analito de interesse utilizando toda a faixa espectral. É possível que estas informações sejam otimizadas utilizando os métodos de seleção de variáveis, onde o conjunto de dados é dividido em intervalos equidistantes. Os intervalos podem ser analisados individualmente (subconjuntos de número de ondas) sendo, assim, possível identificar aquelas regiões que apresentam informações relevantes relacionadas com as amostras em estudo e descartar aquelas regiões não

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

⁹⁶ Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J., *Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos*, Rio de Janeiro (2006) 490 p.

⁸ Blanco, M.; Alcalá M., *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 353-359.

⁶⁸ Moes, J. J. *et al.*, *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 108-118.

¹⁰¹ Sulub, Y. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 611 (2008) 143-150.

⁶² Li, G.; Tocarra, G.; Jing, W.; Wen, Z., *Vib. Spectrosc.* 50 (2009) 152-159.

¹⁰⁹ Vredenburgt, M.J. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 840-849.

⁴⁸ Gilpin, R. K.; Zhou, W., *Vib. Spectrosc.* 37 (2005) 53-59.

⁸⁸ Roggo, Y. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 683-700.

pertinentes, através a avaliação dos valores de erro obtidos por cada intervalo.⁷³ Estes intervalos podem ser combinados⁷¹ ou, ainda, excluídos a partir da avaliação daqueles intervalos não significantes e, geralmente proporcionam menores erros de previsão.⁶¹

Na literatura são encontrados poucos trabalhos que utilizam FTIR/ATR e ferramentas de análise multivariada para análise de fármacos e medicamentos.^{13,94} sendo a espectroscopia no infravermelho por DRIFTS a mais difundida^{12,22,55,58,99} Cabe ressaltar que, até o presente, apesar das possíveis vantagens da utilização da espectroscopia no infravermelho por reflexão total atenuada e difusa associados a métodos multivariados, não foram encontrados na literatura trabalhos utilizando como foco a determinação simultânea dos fármacos ácido clavulânico e amoxicilina.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de métodos analíticos alternativos para a determinação simultânea dos fármacos AC e AMO em amostras de formulações farmacêuticas comerciais e sintéticas, através da utilização de espectroscopia no infravermelho médio com técnicas de reflexão (FTIR/ATR e DRIFTS) associadas a métodos de regressão multivariados. Foram utilizados três métodos de seleção de variáveis, o método dos mínimos quadrados parciais por intervalo (iPLS, do inglês *interval partial least squares*), o método dos mínimos quadrados parciais por sinergismo de intervalos (siPLS, do inglês *synergical interval partial least squares*) e o método dos mínimos quadrados parciais por exclusão (biPLS, do inglês *backward interval partial least squares*). Por fim os valores obtidos pelas metodologias propostas foram comparados com aqueles obtidos pela metodologia oficial (HPLC).

⁷³ Norgaard, L. *et al.*, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 413-419.

⁷¹ Munck, L. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 446 (2001) 171-186.

⁶¹ Leardi, R.; Norgaard, L., *J. Chemom.* 18 (2004) 486-497.

¹³ Boyer, C. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 433-437.

⁹⁴ Silva, F. E. B. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 800-805.

¹² Borer, M. W. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 641-650.

²² Chalus, P.; Roggo, Y.; Walter, S.; Ulmschneider, M., *Talanta* 66 (5) (2005) 1294-1302.

⁵⁵ Ito, M. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 819-827.

⁵⁸ Kojima, T. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 788-791.

⁹⁹ Souza, J. S.; Ferrão, M. F., *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 42 (2006) 437-445.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Antibióticos

Os antibióticos são substâncias produzidas por diversas espécies de microorganismos (bactérias, fungos) com a capacidade de inibir a reprodução ou destruir outros microorganismos. Eles podem ser classificados de acordo com diversos critérios como estrutura química, mecanismo de ação, tipos de microorganismos-alvo, espectro de atividade, tipo de ação, fontes de origem, entre outros. Para que um antibiótico seja eficaz, ele precisa atingir o alvo e ligar-se a ele.⁵¹ Porém, muitas vezes isso pode não ocorrer, devido à resistência bacteriana. As bactérias podem tornar-se resistentes devido a vários fatores, como por exemplo, o uso abusivo e errôneo destes antibióticos.

Os β -lactâmicos são antibióticos úteis e amplamente prescritos e agem inibindo a síntese da parede bacteriana formada por peptidoglicanos.⁵¹ Dentre o grupo de antibióticos β -lactâmicos fazem parte a AMO e o AC que são fármacos objetos deste estudo.

O AMO, segundo Silva⁹⁵ é classificado como penicilina de amplo espectro e pertence a classe das aminopenicilinas. O AMO apresenta a seguinte fórmula estrutural (Figura 1):

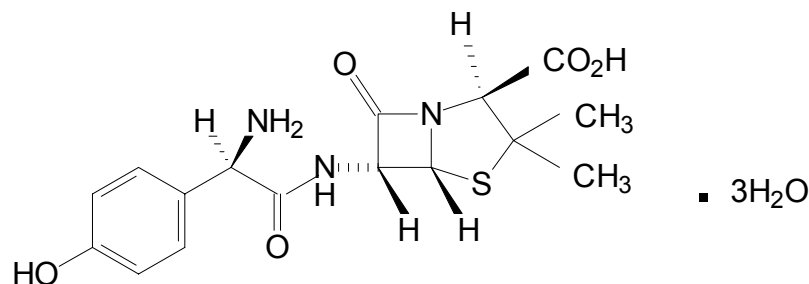


Figura 1. Fórmula estrutural do fármaco amoxicilina triidratada. Adaptação da ref. 106.¹⁰⁶

⁵¹ Harman, J. G.; Limbird, L. E.; Gilman, A. G. (Ed.). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, Rio de Janeiro (1996) 1647 p.

⁹⁵ Silva, P.; *Farmacologia*, 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2002) 1374 p.

¹⁰⁶ United States Pharmacopoeia, USP 31 – NF 26: the official compendia of standards. Rockville (2007).

Muitas penicilinas, dentre elas o AMO, são inativadas pelas enzimas β -lactamases. Estas enzimas hidrolisam o anel β -lactâmico, conforme Figura 2, resultando em derivados de ácido peniciloico. Assim, as β -lactamases destroem a atividade terapêutica antimicrobiana porque os derivados do ácido peniciloico, assim obtidos, são inativos.^{4, 27}

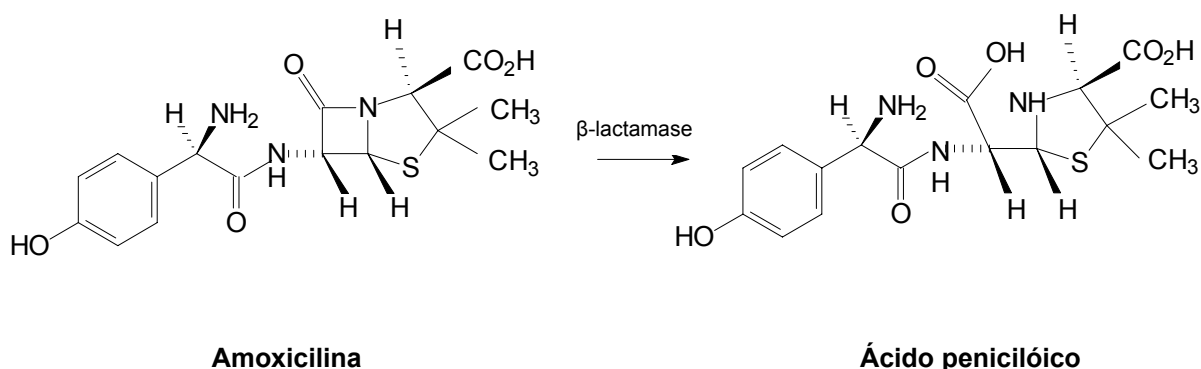


Figura 2. Reação de hidrólise do fármaco AMO pela enzima β -lactamases. Adaptação da ref. 27.²⁷

O AC também é um derivado β -lactâmico e foi descoberto em 1976 pelo laboratório inglês Beecham.¹⁸ É um composto produzido a partir da bactéria *Streptomyces clavuligerus* e que apresenta fraca atividade antimicrobiana, mas que possui grande capacidade inibitória de muitas β -lactamases bacterianas.³² Este fármaco é comercializado na forma de clavulanato de potássio conforme Figura 3.

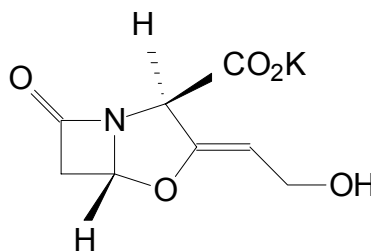


Figura 3. Fórmula estrutural do fármaco clavulanato de potássio. Adaptação da ref. 106.¹⁰⁶

⁴ Baglley, K. H.; Brown, A. G.; Schofield, C. J., *Nat. Prod. Rep.*, 14 (4) (1997) 309-333.

²⁷ Coleman, K. *et al.*, *J. Antimicrobial Chemother.* 33 (1994) 1091-1116.

¹⁸ Brown A. G. *et al.*, *The J. Antibiotics* 29 (6) (1976) 668-669.

³² Demain, A. L.; Elander, R. P., *Antonie van Leeuwenhoek* 75 (1999) 5-19.

¹⁰⁶ United States Pharmacopoeia, USP 31 – NF 26: the official compendia of standards. Rockville (2007).

O uso simultâneo de dois ou mais agentes antibióticos é recomendado em situações especificamente definidas, como infecções mistas, para produzir um efeito farmacológico sinérgico ou para evitar o aparecimento de resistência bacteriana.⁹⁵

Assim, associações de AC e AMO são indicadas para aqueles pacientes que apresentam infecções bacterianas com suspeita que as causas sejam cepas produtoras de β -lactamases resistentes à amoxicilina.³² Essa associação é comercializada na forma de comprimidos, suspensões e pó para solução injetável.¹⁰³

2.2. Controle de qualidade dos fármacos AC e AMO

Diante do crescente número de indústrias farmacêuticas e do aumento da demanda e da falsificação de medicamentos, torna-se cada vez mais necessário atestar a qualidade, a eficiência e a segurança dos medicamentos. Assim, a autenticidade dos produtos farmacêuticos é de suma importância, não apenas para aperfeiçoar e avaliar os processos de produção mas, principalmente, para assegurar os padrões de qualidade que garantem a eficácia e a segurança dos medicamentos que devem chegar ao paciente.⁸³

Para tanto, órgãos oficiais como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Farmacopéias (de diferentes países) e o *Food and Drug Administration* (FDA) determinam e orientam parâmetros a serem adotados pelas indústrias farmacêuticas, principalmente, aqueles relacionados aos métodos de análise necessários para o controle de qualidade das diferentes formulações.

As técnicas clássicas de análise são, ainda, muito utilizadas pela maioria das indústrias no controle de qualidade de fármacos, apesar de serem destrutivas, morosas e de utilizarem grandes quantidades de solventes e reagentes. Dentre elas, pode-se destacar a cromatografia a líquido que tem sido amplamente empregada no controle de qualidade de indústrias farmacêuticas.

O método de análise para formulações mistas contendo amoxicilina e ácido clavulânico está descrito na Farmacopéia Norte Americana (USP, do inglês, *United*

⁹⁵ Silva, P.; Farmacologia, 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2002) 1374 p.

³² Demain, A. L.; Elander, R. P., *Antonie van Leeuwenhoek* 75 (1999) 5-19.

¹⁰³ Sweetmenn, S. C.; Martindale, W.; *Martindale: the complete drug reference*. 33. ed. London: Pharmaceutical Press, 2002. 2483 p.

⁸³ Pinto, T. J. A.; Kaneko, T. M.; Ohara, M. T.; *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*, 2ª ed. São Paulo: Atheneu (2000) 325 p.

States Pharmacopoeia)¹⁰⁶, na Farmacopéia Britânica (BP, do inglês *British Pharmacopoeia*)¹⁷ e Farmacopéia Européia (do inglês, *European Pharmacopoeia*).³⁶ Todas estas Farmacopéias descrevem o doseamento desta associação utilizando a solubilização dos comprimidos em solvente apropriado e sua determinação por cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC).

Recentemente, muitos procedimentos analíticos têm sido propostos para a determinação de amoxicilina e ácido clavulânico em formulações farmacêuticas. Grande parte destas propostas estão fundamentadas em técnicas instrumentais utilizando HPLC com diferentes tipos de detectores: detector de massa e detector eletroquímico.^{1,105} Há, ainda, propostas utilizando espectroscopia derivativa¹¹ e métodos colorimétricos.⁷⁸

Estes métodos analíticos clássicos apesar de serem muito utilizados pela maioria das indústrias farmacêuticas no controle de qualidade de fármacos e medicamentos apresentam algumas limitações, pois necessitam de prévio preparo das amostras e dos padrões, são métodos morosos e que utilizam grande quantidade de solventes e reagentes.

Deste modo, a necessidade de métodos alternativos para controle de qualidade de fármacos e medicamentos, o controle de processos, determinações em menor tempo e redução no consumo de reagentes fazem da espectroscopia no infravermelho uma boa alternativa. A vantagem da espectroscopia no infravermelho tem sido reconhecida, principalmente, após iniciativa do FDA de incentivar as indústrias farmacêuticas a promover mudanças no monitoramento de processos. A análise durante o processo permite reduzir as causas de variabilidade na linha de produção e aumentar a qualidade, produtividade e competitividade do produto.

A espectroscopia no infravermelho próximo^{6,33,101} e médio^{13,79,94,112} permite a análise de amostras sem um exaustivo preparo da mesma, bem como

¹⁰⁶ United States Pharmacopoeia, USP 31 – NF 26: the official compendia of standards. Rockville (2007).

¹⁷ British Pharmacopoeia Commission (Org.). British Pharmacopoeia 2001. London (2001).

³⁶ European Pharmacopoeia 2002. 4. ed Strasbourg (2001).

¹ Aghazadeh, A.; Kazemifard, G., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 325-329.

¹⁰⁵ Tsou, T. L. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1197-1205.

¹¹ Bobrowska-Grzesik, E., *Mikrochim. Acta* 136 (2001) 31-34.

⁷⁸ Pajchel, G.; Borowiecka, B.; Chojnowski, W., *Acta Poloniae Pharm.* 49 (1992) 17-21.

⁶ Blanco M.; Alcalá M.; Bautista M., *Eur. J. Pharm. Sci.* 3 (2008) 409-414.

³³ Dou, Y. *et al.*, *Eur. J. Pharm. Sci.* 37 (2007) 193-199.

¹⁰¹ Sulub, Y. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 611 (2008) 143-150.

¹³ Boyer, C. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 433-437.

⁷⁹ Parisotto, G. *et al.*, *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 43 (2007) 89-96.

⁹⁴ Silva, F. E. B. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 800-805.

¹¹² Wu, Y. W. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 498-504.

determinações *in-line*, ou seja, o sensor encontra-se em contato direto com a linha de processo.¹⁰⁴ Esta técnica fornece informações importantes tanto qualitativa quanto quantitativa no que se refere a sistemas complexos (como misturas de fármacos) possibilitando, ainda, a análise de amostras que encontram-se no estado sólido, semi-sólido e líquido sem a necessidade de solubilização da amostra.

2.3. Espectroscopia na região do infravermelho

A radiação infravermelha refere-se a faixa do espectro eletromagnético compreendida entre a região do visível e a região das microondas. Sua faixa espectral compreende radiações no intervalo de aproximadamente 12800 a 10 cm^{-1} e está dividida em infravermelho próximo, médio e distante, conforme mostrado na Tabela 1.⁵

Tabela 1. Limites aproximados para as regiões no infravermelho.

Região do infravermelho	Número de onda (cm^{-1})	Comprimento de onda (nm)	Freqüência (Hz)
Próximo (NIR)	12.800 a 4.000	780 a 2.500	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Médio (MIR)	4.000 a 200	2.500 a 5.000	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Distante (FIR)	200 a 10	5.000 a 10.000	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$

Ao contrário das radiações nas regiões do ultravioleta e do visível que, ao incidirem sobre uma molécula causam transições eletrônicas, a radiação infravermelha causa alteração nos modos rotacionais e vibracionais das moléculas. Dessa forma, a espectroscopia no infravermelho está baseada no fato que, quando as moléculas absorvem luz de determinada freqüência, elas são excitadas a um nível de energia mais alto. Para que uma molécula possa absorver radiação com comprimento de onda no infravermelho, esta precisa apresentar uma variação no

¹⁰⁴ Trevisan M.; Poppi, R. J., *Quim. Nova* 29 (2006) 1065-1071.

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

momento de dipolo como consequência do movimento vibracional. Apenas nessas circunstâncias o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de um de seus movimentos.^{5,98}

O momento de dipolo é determinado pela magnitude da diferença e pela distância entre dois centros de carga. Uma molécula que possui essa variação do momento dipolar, ao vibrar, sofre uma variação regular do momento dipolar, produzindo um campo que pode interagir com o campo elétrico associado à radiação infravermelha incidente. Quando a frequência da radiação coincide exatamente com a frequência vibracional natural da molécula, ocorre uma transferência de energia, resultando em uma variação da amplitude da vibração molecular e, conseqüentemente, em absorção de radiação.⁹⁸

Os modelos de instrumentos mais antigos utilizados para obtenção de espectros no infravermelho, denominados espectrômetro dispersivo, têm sido gradativamente substituídos por espectrômetros no infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR), sendo este denominado método interferométrico, pois apresenta como componente óptico básico o interferômetro de *Michelson*.^{5,98}

O interferômetro de *Michelson* consiste, basicamente, de dois espelhos planos, posicionados perpendicularmente um ao outro, sendo um deles fixo e o outro móvel, conforme mostrado na Figura 5. A radiação proveniente da fonte chega a um divisor de feixes, que transmite 50% desta radiação para o espelho móvel e 50% para o espelho fixo. Os dois raios são refletidos por esses espelhos, retornando ao divisor de feixes onde se recombina e sofrem interferências construtivas e destrutivas. Metade da radiação que chega ao separador de feixes é refletida de volta em direção à fonte e a outra metade emerge do separador de feixe em direção a amostra, e em seguida ao detector, sendo denominada de radiação transmitida.^{5,52,96,108}

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

⁹⁸ Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed. Porto Alegre: Bookman (2002) 836 p.

⁵² Harris, C. D.; *Análise Química Quantitativa*, Rio de Janeiro (2005) 876 p.

⁹⁶ Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J., *Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos*, Rio de Janeiro (2006) 490 p.

¹⁰⁸ Voort, V.; *Food Res. Int.* 25 (1992) 397-403.

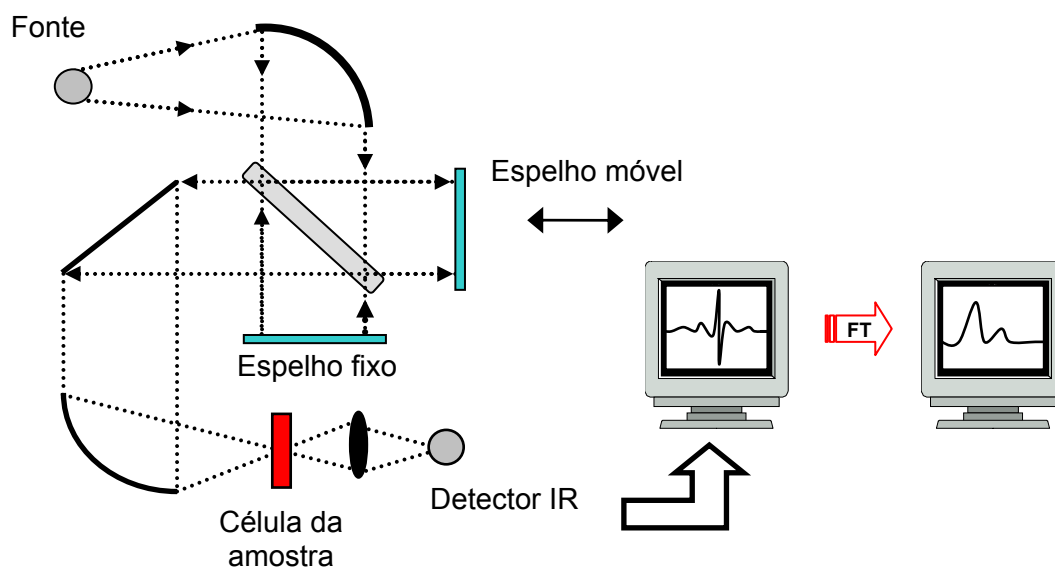


Figura 4. Esquema ilustrativo do interferômetro de *Michelson* e do espectro resultante da aplicação da transformada de *Fourier* (FT). Adaptação da ref. 108.¹⁰⁸

A espectroscopia com interferômetro de *Michelson* e transformada de *Fourier* apresenta várias vantagens. A primeira delas é a eficiência de transporte (ou vantagem de Jaquinot), que é obtida porque os equipamentos com transformada de *Fourier* possuem poucos elementos ópticos e nenhuma fenda para atenuar a radiação. Como consequência, a potência da radiação que incide no detector é muito maior que em equipamentos dispersivos, obtendo-se um ganho na relação sinal-ruído.⁹⁸

Dentre outras vantagens pode-se destacar o fato em que todos os elementos da radiação atingem o detector simultaneamente. Essa característica possibilita a obtenção de espectros em poucos segundos, ao contrário dos equipamentos dispersivos que levam de 3 a 5 minutos. O aumento na razão sinal-ruído também é devido ao fato do espectrômetro com transformada de *Fourier* utilizar a energia do espectro inteiro em vez de analisar uma seqüência de pequenas faixas de onda geradas pelo sistema de grades e/ou prismas utilizados na espectroscopia dispersiva.^{98,108}

Para obter um espectro no infravermelho utilizando o método interferométrico realiza-se, primeiramente, o *background*. Em seguida, a amostra é colocada entre o

¹⁰⁸ Voort, V.; *Food Res. Int.* 25 (1992) 397-403.

⁹⁸ Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed. Porto Alegre: Bookman (2002) 836 p.

interferômetro e o detector, onde absorverá, preferencialmente, radiação de alguns comprimentos de onda. Posteriormente, utiliza-se um procedimento matemático denominado transformada de *Fourier* para transformar os interferogramas em espectros no domínio da frequência, passíveis de interpretação.^{5,96}

Dentre os métodos mais utilizados para obtenção de espectros no infravermelho destacam-se os métodos de transmissão e de reflexão. Em ambos os casos existem diferentes acessórios disponíveis, comercialmente, para se obterem espectros no infravermelho de amostras sólidas, líquidas e gasosas.

O método mais utilizado para obtenção de espectros no infravermelho é o de transmissão. Neste método a radiação passa através da amostra, sendo parte da radiação absorvida e parte transmitida. É um método que pode ser utilizado tanto para os estudos de amostras sólidas, líquidas e gasosas. A dificuldade na reprodução do caminho óptico (espessura da pastilha) muitas vezes inviabiliza a sua utilização para fins quantitativos.¹⁰⁰ Já os métodos de reflexão são muito úteis para o estudo de amostras que apresentam dificuldade no seu preparo para posterior análise por transmissão, como borracha, alimentos, resinas, fármacos, etc. Os espectros adquiridos no modo de reflexão podem ser utilizados tanto para análise qualitativa quanto quantitativa. Dentre os modos de aquisição de espectros destacam-se os métodos de reflexão externa ou especular, de reflexão total atenuada (ATR, do inglês *Attenuated Total Reflection*) e de reflexão difusa conhecido pela sigla DRIFTS (do inglês *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform*).^{5,100}

Estes métodos estão sendo cada vez mais utilizados, particularmente, porque não envolvem processos morosos de preparo de amostra e são úteis tanto para análises qualitativas quanto quantitativas. Tendo em vista que o presente trabalho utilizou para aquisição dos espectros os modos de reflexão total atenuada (ATR) e difusa (DRIFTS), será dada maior ênfase a estas técnicas que utilizaram estes tipos de acessórios para obtenção de espectros.

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

⁹⁶ Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J., *Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos*, Rio de Janeiro (2006) 490 p.

¹⁰⁰ Stuart B., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Chichester: John Wiley (2004) 224 p.

2.3.1. Reflexão Total Atenuada (FTIR/ATR)

A espectroscopia no infravermelho de reflexão total atenuada (FTIR/ATR, do inglês *Fourier Transform Infrared - Attenuated Total Reflectance*) conhecida, também, por espectroscopia de reflexão total interna, é uma técnica de obtenção de espectros na região do infravermelho para amostras que apresentam dificuldade de manuseio, como sólidos que apresentam solubilidade limitada, filmes, pastas, fios, adesivos e pós. Esta técnica requer pouco ou nenhum preparo para a maioria das amostras e é uma das mais versáteis técnicas de amostragem.⁹² A FTIR/ATR, desenvolvida simultânea e independentemente por Harrick⁵³ e Fahrenfort³⁸ é um tipo de espectroscopia na qual uma amostra é colocada em contato com um meio mais denso denominado de prisma ou elemento de reflexão interna (IRE, do inglês, *internal reflection element*) que apresenta alto índice de refração.

Quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (prisma) para um menos denso (amostra), ocorre reflexão⁹² e a fração do feixe incidente que é refletida aumenta com o ângulo de incidência.⁹⁸ Na FTIR/ATR a radiação infravermelha interage com um cristal sofrendo uma reflexão total interna somente quando o ângulo de incidência da interface entre a amostra e o cristal é maior que o ângulo crítico (para um determinado valor do ângulo de incidência, denominado ângulo crítico, nenhuma radiação passa pela interface, sendo totalmente refletida). A radiação penetra por determinada distância no meio menos denso (amostra) antes de ocorrer a reflexão completa. Esta penetração é chamada de onda evanescente e tipicamente está a uma profundidade de alguns micrômetros. A intensidade da radiação é reduzida (atenuada) pela amostra em regiões do espectro do infravermelho as quais a amostra absorve.^{53,100}

A Figura 5 ilustra a reflexão total atenuada através do emprego de um IRE que deve ser composto de um material com alto índice de refração, para que somente uma pequena parte do feixe de radiação incidente seja refletida ao atingir o

⁹² Settle, F. A.; Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry, Upper Saddle River: Prentice Hall, (1997) 995 p.

⁵³ Hind, A. R.; Bhargava S. K.; McKinnon A.; *Adv. Colloid Interface Sci.* 93 (2001) 91-114.

³⁸ Fahrenfort, J., *Spectrochim. Acta* 17 (1961) 698-709.

⁹⁸ Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed. Porto Alegre: Bookman (2002) 836 p.

¹⁰⁰ Stuart B.; *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Chichester: John Wiley (2004) 224 p.

³⁹ Ferrão, M. F.; Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2000.

cristal.⁵³ A radiação infravermelha é focalizada sobre a extremidade do IRE, refletida através do IRE e então direcionada ao detector.⁵³

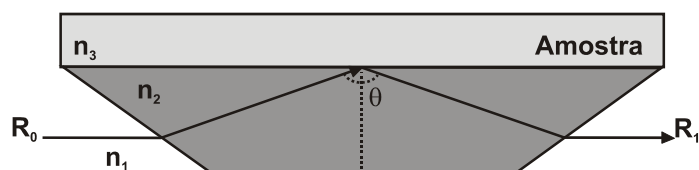


Figura 5. Representação da reflexão em um elemento de reflexão interna (R_0 = radiação incidente e R_1 = radiação refletida). Adaptação da ref. 53.⁵³

O fenômeno de reflexão interna segue algumas condições para ser observado. A radiação deve penetrar em um prisma que apresente um alto índice de refração em relação ao meio externo, como por exemplo, o cristal de ATR, para então poder ser refletida total e internamente, como pode ser observado na Figura 6 na qual o feixe de radiação encontra-se no interior do prisma de ATR.

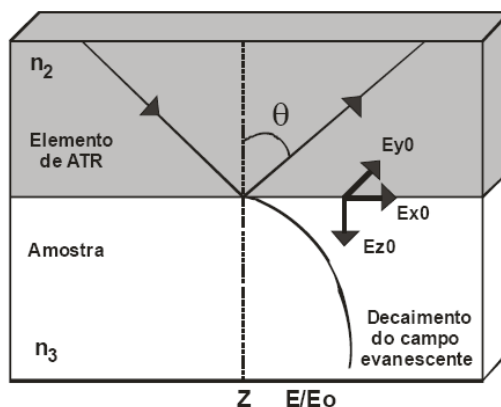


Figura 6. Representação da propagação da radiação infravermelha através de um elemento de reflexão interna. Adaptação da ref. 67.⁶⁷

A profundidade de penetração em espectroscopia de reflexão total atenuada é dependente do comprimento de onda (λ), índice de refração do cristal n_2 e do ângulo

⁵³ Hind, A. R.; Bhargava S. K.; McKinnon A.; *Adv. Colloid Interface Sci.* 93 (2001) 91-114.

⁶⁷ Mirabella, F. M., *Appl. Spectrosc.* 21 (1985) 45-178.

e radiação incidente θ .¹⁰⁰ Desta forma a profundidade de penetração pode ser calculada pela seguinte Equação 1:⁵³

$$D_p = \frac{\lambda}{2\pi n \sqrt{\sin^{-1}\theta - \left(\frac{n_3}{n_2}\right)}}$$

(1)

Onde:

D_p = profundidade de penetração, usualmente em μm ;

λ = comprimento de onda, usualmente em μm ;

n_2 = índice de refração do elemento de reflexão interno;

n_3/n_2 = razão entre os índice de refração da amostra e do elemento de reflexão interno;

θ = ângulo de incidência da radiação.

De um modo geral, a profundidade de penetração está na faixa de $0,05 \lambda$ a $0,2 \lambda$, e com isso o caminho óptico varia de $0,25$ a $4 \mu\text{m}$, dependendo do comprimento de onda e do material do IRE.⁵ Assim, qualquer material que estiver em contato com o cristal de ATR pode absorver a radiação incidente atenuando sua intensidade e, desta forma, originando um espectro no infravermelho. Contudo, a profundidade de penetração é proporcional ao comprimento de onda e, portanto, é observado um aumento constante na profundidade de penetração na amostra com a varredura do espectro de comprimentos de onda maiores para menores. Dessa forma, a profundidade de penetração varia com o índice de refração da amostra e seu efeito é menos pronunciado quando o índice de refração do cristal de ATR é maior.³⁹

Há uma ampla variedade de materiais que estão disponíveis para utilização como IRE, conforme Tabela 2. A escolha por este material depende de inúmeros

¹⁰⁰ Stuart B.; *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Chichester: John Wiley (2004) 224 p.

⁵³ Hind, A. R.; Bhargava S. K.; McKinnon A.; *Adv. Colloid Interface Sci.* 93 (2001) 91-114.

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

³⁹ Ferrão, M. F.; Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2000

fatores, tais como, a faixa espectral de interesse, a natureza dos solventes a ser utilizado, propriedades químicas e físicas do cristal e por fim o custo.⁵³

Tabela 2. Propriedades físicas e químicas dos materiais do IRE*

Composição	Índice de reflexão	Dureza (kg/mm ²)	Ponto de fusão (C°)	Material de limpeza	Faixa espectral
Diamante	2,4	7.000	3500	Álcool, acetona, água	4.500-2.500 1.667-33
Ge	4,0	550	926	Álcool, acetona, tolueno, água	5.000-900
Quartzo	1,4	174	1610	Álcool, acetona, água	25.000-2.200 250-FIR**
Si	3,4	1.150	1.420	Álcool, acetona, água	9.500-1500 350-FIR**
ZnSe	2,4	135	1520	Álcool, acetona, água	20.000-700
ZnS	2,2	178	1830	Álcool, acetona, água	14.000-1000

* Adaptação da ref. 53.

** Infravermelho distante (do inglês, far infrared).

De um modo geral, é difícil assegurar a reprodutibilidade do contato da amostra sobre o elemento de ATR e esta pode ser afetada por alguns fatores como variação da pressão aplicada sobre a amostra e a área de contato. Quando se deseja obter medidas quantitativas, deve-se colocar toda área do cristal em contato com a amostra garantindo, assim, uma boa reprodutibilidade. Este efeito é observado na variação da intensidade das bandas com a pressão aplicada. Dessa

⁵³ Hind, A. R.; Bhargava S. K.; McKinnon A.; *Adv. Colloid Interface Sci.* 93 (2001) 91-114.

forma, aumentando-se a pressão aplicada, a eficiência de contato é aumentada e, conseqüentemente, as intensidades das bandas, também, aumentam.^{21,67}

2.3.2. Reflexão Difusa (DRIFTS)

O modo de obtenção de espectros por reflexão difusa vem sendo amplamente associado tanto aos instrumentos que operam no infravermelho próximo (NIR) como associado àqueles que trabalham na região do infravermelho médio (MIR). Esta técnica vem sendo muito aplicada nos dias atuais devido sua facilidade em se obter espectros a partir de materiais na forma de pós, sólidos e espécies adsorvidas em sólidos.^{25,79,85,97}

A reflexão difusa ocorre em superfícies não totalmente planas, podendo o substrato ser contínuo ou fragmentado (na forma de pó). Neste processo de reflexão o feixe incide na superfície da amostra interagindo com a matriz. Uma parte da radiação é refletida pela sua superfície e uma segunda parte é parcialmente absorvida sofrendo múltiplos espalhamentos e retornando, posteriormente, a superfície da mesma conforme mostrado Figura 7. Neste tipo de reflexão a radiação incidente entra em contato diversas vezes com as partículas da amostra sendo, conseqüentemente, atenuada.^{40,110}

²¹ Carlsson, D. J.; Wiles D. M., *Canadian J. Chem.* 48 (1970) 2397-2406.

⁶⁷ Mirabella, F. M., *Appl. Spectrosc.* 21 (1985) 45-178.

²⁵ Chong, X. M. et al., *Vib. Spectrosc.* 49 (2009) 196-203.

⁷⁹ Parisotto, G. et al., *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 43 (2007) 89-96.

⁸⁵ Pöllänen, K. et al., *Anal. Chim. Acta* 544 (2005) 108-117.

⁹⁷ Singh, P. et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 248-254.

⁴⁰ Ferrão, M. F., *Tecno-lógica* 5 (2001) 63-85.

¹¹⁰ Wilson, R. H., *Trends Anal. Chem.* 9 (1990) 127-131.

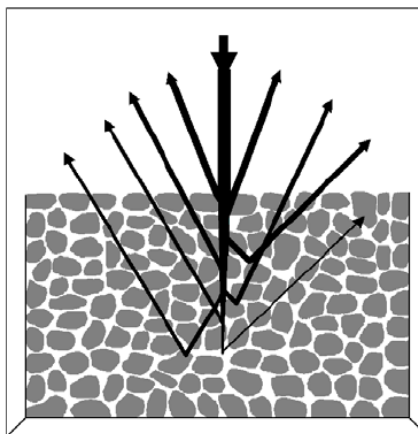


Figura 7. Representação de reflexão especular e difusa de uma onda eletromagnética em uma amostra particulada. Adaptação de ref. 40.⁴⁰

Cabe salientar que a radiação que retorna de forma difusa de um substrato é, geralmente, muito inferior em magnitude que a radiação incidente. Em função disso, a maior parte dos acessórios de reflexão difusa representam esquemas ópticos que visam concentrar a radiação para, posteriormente, a mesma ser focada sobre o sistema de detecção dos instrumentos.²⁰

Diversos parâmetros afetam o formato da banda, a posição, a intensidade em ambos os espectros de reflexão difusa (infravermelho próximo e infravermelho médio). Entre eles destaca-se: geometria ótica, absorção pela matriz, índice de refração, absorvidade, empacotamento da amostra, morfologia (tamanho da partícula), concentração do analito.⁴⁰

O espectro obtido por medidas de reflexão difusa não apresenta relação direta entre a intensidade dos picos e a composição, como observado nos espectros de transmitância, em que a intensidade das bandas de absorção é diretamente proporcional à concentração da amostra. Contudo, os dados obtidos por reflexão podem ser convertidos em dados que resultem em espectros semelhantes aos obtidos por transmissão, utilizando a equação de Kubelka-Munk (Equação 2).^{5,40,80}

⁴⁰ Ferrão, M. F., *Tecno-lógica* 5 (2001) 63-85.

²⁰ Burns, D. A.; Ciurczak, E. W., *Handbook of Near-Infrared Analysis*. New York (2001) 814 p.

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

⁸⁰ Pasikatan, M. C. et al., *J. Near Infrared Spectrosc.* 9 (2001) 153-164.

$$f(R_{\infty}) = \frac{k}{s} = \frac{(1-R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} \quad (2)$$

Onde:

$f(R_{\infty})$ = corresponde ao espectro corrigido

R_{∞} = reflexão da amostra para profundidade infinita

k = coeficiente da absorção da amostra (que é proporcional a concentração)

s = coeficiente de espalhamento da amostra.

A equação de Kubelka-Munk sugere que: a) a radiação espalhada é isotropicamente distribuída; b) as partículas são randomicamente distribuídas e de tamanho inferior a da espessura da camada e c) a camada está sujeita apenas a reflexão difusa.⁸⁰

O coeficiente de espalhamento (s) determina a extensão da interação da luz incidente com a amostra antes da radiação retornar a superfície e, dessa forma, controla a profundidade na qual a luz penetra na amostra. Quanto menor o valor de s , maior é o valor de $f(R_{\infty})$.⁴⁰

Para o tratamento destas informações obtidas pela espectroscopia no infravermelho, muitas vezes complexas, faz-se necessário a utilização de ferramentas de análises multivariadas

2.4. Análise multivariada

De um modo geral, a análise multivariada refere-se a todos os métodos estatísticos que analisam simultaneamente múltiplas medidas de cada objeto sob investigação. Qualquer análise simultânea de mais de duas variáveis pode ser considerada análise multivariada ou quimiometria.⁵⁰

⁸⁰ Pasikatan, M. C. *et al.*, *J. Near Infrared Spectrosc.* 9 (2001) 153-164.

⁴⁰ Ferrão, M. F., *Tecno-lógica* 5 (2001) 63-85.

⁵⁰ Hair, J. F.; Anderson, R. E.; Tatham, R. L.; Black, W. C.; *Análise Multivariada de dados*, 5ª ed. Porto Alegre: Bookman (2005) 593 p.

Uma das características mais interessantes dos instrumentos modernos é o número das variáveis que podem ser medidas em uma única amostra. Pode-se tomar como exemplo a intensidade de absorção em centenas ou milhares de comprimentos de ondas que é rotineiramente registrado em um único espectro. De posse de tal quantidade de dados, a necessidade de ferramentas novas e mais sofisticadas para tratá-los e extrair informações relevantes, cresceu nos últimos anos muito rapidamente, dando origem a quimiometria, que é a área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada.^{19,41}

Sendo assim, a quimiometria é a ciência que utiliza ferramentas matemáticas e estatísticas para definir e selecionar condições ótimas de medidas e experiências, permitindo obter o máximo de informações a partir da análise de dados químicos.¹⁹ Nos últimos anos a quimiometria vem sendo amplamente empregada para modelar propriedades físicas e químicas de sistemas simples e complexos a partir de dados espectroscópicos, para amostras que possuem matrizes diversificadas, tais como, formulações farmacêuticas, produtos naturais, amostras biológicas entre outras.^{33,57,81,82,86,113}

Previamente ao tratamento dos dados, deve-se organizá-los e submetê-los a uma avaliação prévia para se ter conhecimento do tipo de método de análise multivariada mais adequado a ser utilizado. O primeiro passo consiste em organizar as informações na forma de uma matriz, chamada matriz de dados, em que as linhas representam as n-amostras e as colunas as m-variáveis, como mostra o esquema apresentado na Figura 8.⁷²

¹⁹ Bruns, R. E.; Faigle, J. F. G., *Quim. Nova* 4 (1985) 84-99.

⁴¹ Ferreira, M. M. C. *et al.*, *Quim. Nova* 22 (1999) 724-731.

³³ Dou, Y. *et al.*, *Eur. J. Pharm. Sci.* 37 (2007) 193-199.

⁵⁷ Khoshauand, M. R. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part A* 70 (2008) 491-499.

⁸¹ Peinder P. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 688-694.

⁸² Pereira, A. F. C. *et al.*, *Food Res. Int.* 41 (2008) 341-348.

⁸⁶ Qu, N. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part A* 70 (2008) 1146-1151.

¹¹³ Yu, L.; Xiang, B.; *Microchem. J.* 90 (2008) 63-66.

⁷² Neto, J.; M., M.; Moita, G. C., *Quim. Nova* 21 (1998) 467-469.

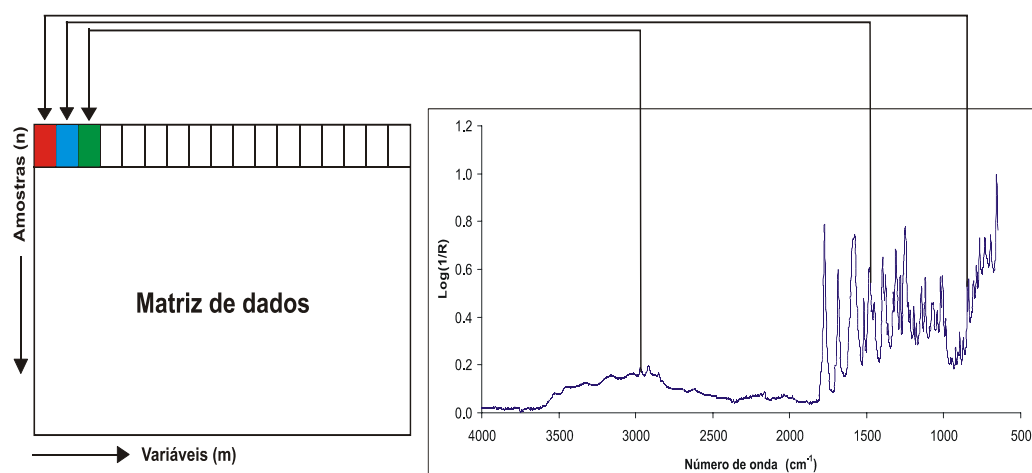


Figura 8. Matriz de dados gerada a partir de um espectro. Adaptação da ref. 60.⁶⁰

Os métodos quimiométricos podem ser divididos em métodos de classificação ou métodos de regressão.

2.4.1. Métodos de classificação

Os métodos de classificação permitem explorar resultados obtidos por meio de análises químicas, a fim de verificar a existência de similaridades entre as amostras que, por sua vez, correspondem as semelhanças na composição química. Estes métodos conhecidos, também, como reconhecimento de padrões, viabiliza a obtenção de mais informações quando comparados com os procedimentos univariados e dividem-se em métodos supervisionados e não supervisionados.^{29,88}

Os métodos supervisionados referem-se àqueles que exigem um conhecimento prévio da amostra, ou seja, as amostras são classificadas em duas ou mais classes previamente definidas. Dentre estes métodos pode-se citar a Análise Discriminante Linear (LDA, do inglês *linear discriminant analysis*) e a Modelagem Independente de Analogia de Classes (SIMCA, do inglês *soft independent modelling of class analogy*).^{43,88}

⁶⁰ Lavine, B. K.; *Clustering and Classification of Analytical Data in the Encyclopedia of Analytical Chemistry: Instrumentation and Applications*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester (2000).

²⁹ Correia, P. R. M.; Ferreira, M. M. C., *Quim. Nova* 30 (2007) 481-487.

⁸⁸ Roggo, Y. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 683-700.

⁴³ Geladi, P., *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 767-782.

Já os métodos não supervisionados referem-se àqueles onde as amostras são classificadas sem um conhecimento prévio, ou seja, a matriz de dados é construída sem um conhecimento da existência de classes. Os métodos de análise exploratória são classificados como método de classificação não supervisionado, visto que nenhuma informação no que se refere à identidade das amostras é levada em consideração.²⁹ Dentre os métodos não supervisionados pode-se destacar a análise por agrupamento hierárquico (HCA) e a análise de componentes principais (PCA).

2.4.1.1. Análise por Componentes Principais (PCA)

A análise por componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*) é uma das principais formas de análise de dados multivariados.³⁴ Este método visa a redução da dimensionalidade do conjunto de dados original, preservando a maior quantidade de informação (variância) possível. Essa redução é obtida por meio do estabelecimento de novas variáveis ortogonais entre si, denominadas componentes principais (CPs).²⁹

A PCA é um método de decomposição de matrizes onde a variância na matriz X (com m observações e n variáveis) é decomposta em novas variáveis denominadas componentes principais (CP). As novas variáveis são ortogonais entre si, sendo que os dados (variáveis) são centrados na média (no novo sistema de coordenadas).

A primeira componente principal (CP1) é definida na direção de máxima variância do conjunto de dados. A segunda componente principal (CP2) é definida na direção que descreve a segunda máxima variância no espaço da PC1 sendo ortogonal a esta componente. Ou seja, cada componente principal (CP1, CP2, CP3, etc.) é responsável por uma fração sucessiva de variâncias de dados em um sistema de coordenadas ortogonais entre si e, portanto, não correlacionadas. Normalmente as primeiras componentes principais, explicam a maior parte da variância total contida nos dados e podem ser usadas para representá-las.⁴²

²⁹ Correia, P. R. M.; Ferreira, M. M. C., *Quim. Nova* 30 (2007) 481-487.

³⁴ Eastment, H. T.; Krzanowski, W. J., *Technometrics* 24 (1982) 73-77.

⁴² Ferreira, M. M. C., *J. Braz. Chem. Soc.* 13 (2002) 742-753.

As novas coordenadas das amostras, no novo sistema de eixos da CP são denominadas de “escores” e “pesos” como pode ser observado na Figura 9.^{16,111}

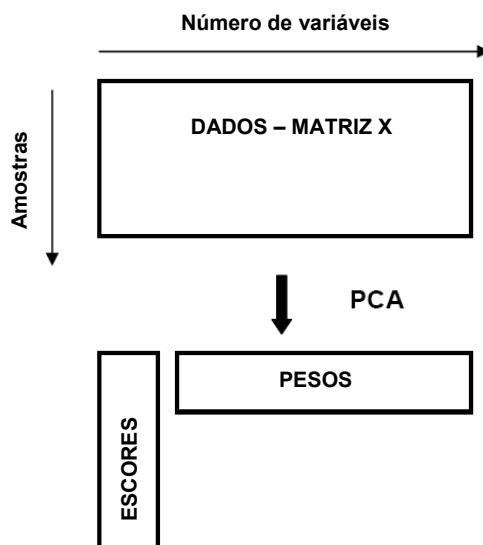


Figura 9. Princípios da análise por componentes principais. Adaptação da ref. 15.¹⁵

O valor de escores (t_n) é dado pela projeção de cada ponto (amostra) no novo sistema de eixos (CPs), medindo a distância t_1 (através da distância Euclidiana) entre o centro do ponto e sua projeção. O valor de pesos ($p'h$) é obtido entre os cossenos do ângulo (θ) entre a linha (CP) e cada eixo, e determina a influência de cada variável. Por exemplo, se o conjunto de dados contém três variáveis, este irá possuir três valores de pesos. Um esquema da interpretação da PCA é mostrado na Figura 10.^{35,44}

¹⁶ Brereton, R. G., *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.

¹¹¹ Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2 (1987) 37-52.

¹⁵ Brereton, R. G.; *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and chemical Plant* (2003).

³⁵ Einax, J. W.; Zwanziger, H. W.; Geiß, S.; *Chemometrics in environmental analysis*, Weinheim: Wiley-VCH (1997) 153-178.

⁴⁴ Geladi, P.; Kowalki, B. R., *Anal. Chim. Acta* 185 (1986) 1-17.

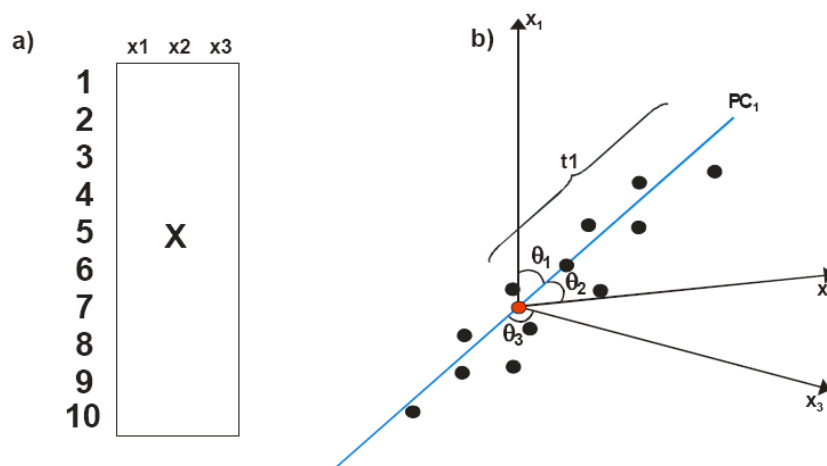


Figura 10. Representação de um modelo de análise por componentes principais: a) conjunto de dados com dez objetos e três variáveis, b) primeira componente principal calculada através do conjunto de dados. Adaptação da ref. 44.⁴⁴

Quando a CP1 é calculada, uma variância permanece sem ser explicada, ou seja, uma quantidade de variância continua não descrita. Esta quantidade de variância não descrita é chamada de resíduos, que podem ser organizados na forma de matriz **E** (matriz dos resíduos), conforme representado na Equação 3:^{15,35}

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \quad (3)$$

Onde:

- **X** é a matriz original
- **T** é chamada de escores e contém o mesmo número de linhas da matriz original
- **P** é chamada de pesos e apresenta o mesmo número de colunas da matriz original
- O número de colunas da matriz **T** é igual o número de linhas da matriz **P**.¹⁵

Depois que a CP1 é calculada, a próxima CP é obtida com a matriz residual **E**, que contém a variância não explicada pela CP1 e, assim, sucessivamente, conforme mostrado na Equação 4.

⁴⁴ Geladi, P.; Kowalki, B. R., *Anal. Chim. Acta* 185 (1986) 1-17.

¹⁵ Brereton, R. G.; *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and chemical Plant* (2003).

³⁵ Einax, J. W.; Zwanziger, H. W.; Geiß, S.; *Chemometrics in environmental analysis*, Weinheim: Wiley-VCH (1997) 153-178.

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1\mathbf{p}'_1 + \mathbf{t}_2\mathbf{p}'_2 + \dots + \mathbf{t}_h\mathbf{p}'_h + \mathbf{E} \quad (4)$$

2.4.1.2. Análise por Agrupamento Hierárquico (HCA)

A análise por agrupamentos hierárquicos (HCA, do inglês *hierarchical cluster analysis*) é um método classificado como exploratório e não supervisionado visto que não requer conhecimento prévio das amostras. Este método permite o agrupamento das amostras em classes, com base na similaridade das amostras de uma mesma classe e nas diferenças entre os membros de classes diferentes.²⁹ Como o número de parâmetros analisados (variáveis) nestes métodos é elevado, o resultado é apresentado na forma gráfica de todo um conjunto de dados facilitando a interpretação dos resultados chamado de dendograma.⁴²

A construção do dendograma é baseada na proximidade entre as amostras, calculada pela distância entre dois vetores (amostras), d_{ab} , no espaço n -dimensional (variáveis) conhecida como distância euclidiana, conforme Equação 5:

$$d_{ab} = \sqrt{\sum_{i=1}^m (x_{ai} - x_{bi})^2} \quad (5)$$

Um padrão de similaridade é calculado para cada amostra, conforme Equação 6.

$$S_{ab} = 1 - \frac{d_{ab}}{d_{\max}} \quad (6)$$

²⁹ Correia, P. R. M.; Ferreira, M. M. C., *Quim. Nova* 30 (2007) 481-487.

⁴² Ferreira, M. M. C., *J. Braz. Chem. Soc.* 13 (2002) 742-753.

Sendo que, d_{ab} corresponde à distância entre os pontos a e b, e d_{\max} é a maior distância de um par de amostras no conjunto de dados. Após as distâncias entre os pares de amostras serem calculados, agrupamentos sucessivos, de acordo com suas similaridades, são formados até não haver mais similaridade entre eles. A similaridade entre os grupos pode ser calculada por 3 modos distintos: construção simples, completa, centróide, incremental, medianas, médias de grupo e flexível. Neste trabalho será utilizada a construção incremental, definida na Equação 7:

$$d_{ab} = \frac{\sqrt{(n_a + n_c)d_{ac}^2 + (n_b + n_c)d_{bc}^2 - n_c d_{bc}^2}}{n_a + n_b + n_c} \quad (7)$$

Onde n_i é o número de amostras no grupo "i".⁸⁴

2.4.2. Métodos de regressão

Os métodos de regressão são utilizados para analisar a relação entre uma variável dependente (concentração) e várias variáveis independentes (amostras). São utilizados para quantificar propriedades de interesse da amostra.^{50,88} Entre os métodos de regressão podem ser citados a regressão por componentes principais (PCR), o método dos mínimos quadrados parciais (PLS) e a regressão linear múltipla (MLR).¹⁶

Neste trabalho dar-se-á destaque para o método de regressão PLS, tendo em vista que este foi utilizado na construção dos modelos.

⁸⁴ Pirouette, *Multivariate Data Analysis*, versão 3.11, Infometrix, Inc. Washington, EUA.

⁵⁰ Hair, J. F.; Anderson, R. E.; Tatham, R. L.; Black, W. C.; *Análise Multivariada de dados*, 5ª ed. Porto Alegre: Bookman (2005) 593 p.

⁸⁸ Roggo, Y. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 683-700.

¹⁶ Breteron, R. G., *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.

2.4.2.1. Mínimos quadrados parciais (PLS)

O método dos mínimos quadrados parciais (PLS) é considerado a maior técnica de regressão e um dos métodos mais populares em análise quantitativa utilizando calibração multivariada.^{15,16}

Este método não requer um conhecimento exato de todos os componentes presentes nas amostras, podendo realizar a previsão de amostras mesmo na presença de interferentes, desde que estes também estejam presentes por ocasião da construção do modelo.

A base dos mínimos quadrados parciais PLS está na decomposição de uma matriz de dados **X** (variáveis independentes) e **Y** (variáveis dependentes), simultaneamente, em uma soma de produtos de dois vetores: **t** (escores) e **p** (pesos) (Equações 8 e 9). A estes vetores soma-se, ainda, mais uma matriz de erros que corresponde à parte não modelada de **X**. Na regressão por PLS, tanto a matriz de dados **X** como a matriz de dados **Y** é decomposta e projetada em um novo sistema de coordenadas.^{16,39,44}

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1\mathbf{p}'_1 + \mathbf{t}_2\mathbf{p}'_2 + \dots + \mathbf{t}_h\mathbf{p}'_h + \mathbf{E} \quad \text{ou} \quad \mathbf{X} = \mathbf{TP} + \mathbf{E} = \sum \mathbf{t}_h\mathbf{p}'_h + \mathbf{E} \quad (8)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}' + \mathbf{F} = \sum \mathbf{u}_h\mathbf{q}'_h + \mathbf{F} \quad (9)$$

Onde, **T** e **U** são matrizes de escores das matrizes **X** e **Y**, respectivamente; **P** e **Q** são as matrizes de pesos das matrizes **X** e **Y**, respectivamente; *h* corresponde o número de fatores (componentes principais ou variáveis latentes) e **E** e **F** correspondem as matrizes de resíduos.

A relação interna dos escores das matrizes **X** e **Y** é obtida através do coeficiente de regressão linear para cada componente principal (*b_h*) de acordo com a Equação 10.⁴⁴

$$\mathbf{u}_h = \mathbf{b}_h \mathbf{t}_h \quad (10)$$

¹⁵ Brereton, R. G.; *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and chemical Plant* (2003).

¹⁶ Brereton, R. G., *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.

³⁹ Ferrão, M. F.; Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2000

⁴⁴ Geladi, P.; Kowalki, B. R., *Anal. Chim. Acta* 185 (1986) 1-17.

Sendo b_h obtido através da Equação 11:

$$\mathbf{b}_h = \mathbf{u}'_h \mathbf{t}_h / \mathbf{t}'_h \mathbf{t}_h \quad (11)$$

Onde u e t são os elementos das matrizes \mathbf{U} e \mathbf{T} respectivamente.

Os valores de b_h são agrupados na matriz diagonal \mathbf{B} (matriz identidade), que contém os coeficientes de regressão entre a matriz de escores \mathbf{U} de \mathbf{Y} e a matriz de escores \mathbf{T} de \mathbf{X} . Entretanto, como cada matriz é decomposta separadamente, pode ocorrer uma relação não linear entre os escores dos dois blocos. A melhor relação linear possível entre os escores das matrizes é obtida através de pequenas rotações das variáveis latentes das matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} , devendo existir um compromisso entre a capacidade de descrever as amostras individuais (modelagem dos blocos \mathbf{X} e \mathbf{Y}) e o aumento da correlação entre \mathbf{T} e \mathbf{U} .⁴⁴

A matriz \mathbf{Y} pode ser calculada através das informações contidas em \mathbf{u}_h (Equação 11), conforme Equação 12.

$$\mathbf{Y} = \mathbf{TBQ}' + \mathbf{F} \quad (12)$$

Onde \mathbf{T} são os escores da matriz \mathbf{X} , \mathbf{B} é a matriz identidade de \mathbf{b}_h , \mathbf{Q}' são os pesos da matriz \mathbf{Y} e \mathbf{F} é a matriz residual de \mathbf{Y} . Desta forma, a concentração das novas amostras pode ser prevista a partir dos novos escores de \mathbf{X} , dado por \mathbf{T}^* , substituído na Equação 13:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T}^* \mathbf{BQ}' \quad (13)$$

Para se obter o melhor modelo referente aos dados sob investigação devem ser avaliados o número de variáveis latentes (VLs) e a raiz quadrada dos erros médios (RMSE, do inglês, *root mean square error*), entre outros fatores. No decorrer deste capítulo serão abordados aspectos importantes referentes a estes parâmetros.

⁴⁴ Geladi, P.; Kowalki, B. R., *Anal. Chim. Acta* 185 (1986) 1-17.

2.4.3. Métodos de seleção de variáveis em modelos de regressão

A utilização da análise multivariada tem por objetivo correlacionar as informações do espectro com as propriedades de interesse da amostra, permitindo o tratamento de um grande número de dados para uma mesma amostra. Os modelos de calibração multivariada vêm contribuindo de forma significativa para a obtenção de modelos de regressão que relacionam um conjunto de variáveis experimentais à propriedade de interesse, como a concentração, por exemplo. Porém, a utilização de toda a faixa espectral pode dificultar a obtenção de suas relações com a propriedade de interesse. Deste modo, a escolha adequada de regiões espectrais pode melhorar significativamente a eficiência do modelo de calibração multivariada.⁷⁷

Os métodos de seleção de variáveis têm por objetivo escolher determinadas regiões do espectro que permitem ao modelo de calibração minimizar os erros de previsão. Porém, há a necessidade de se observar e selecionar somente aquelas regiões que apresentam correlação com o analito em estudo. Como consequência da seleção de variáveis, é possível produzir um modelo mais robusto, simples de interpretar e com menores erros de previsões.^{75,77} Entre os métodos utilizados atualmente, pode-se destacar, o algoritmo genético, o método dos mínimos quadrados parciais por intervalo (iPLS, do inglês *interval partial least squares*), os mínimos quadrados parciais por exclusão de intervalos (biPLS, do inglês *backward interval partial least squares*), os mínimos quadrados parciais por exclusão) e os mínimos quadrados parciais por sinergismo de intervalos (siPLS, do inglês *synergy interval partial least squares*). Neste trabalho dar-se-á destaque aos métodos iPLS, biPLS e siPLS, sendo estes os métodos de seleção de variáveis utilizados.

O iPLS é uma extensão desenvolvida para o PLS, onde é realizada uma regressão por mínimos quadrados parciais em cada intervalo equidistante ao longo de toda a extensão do espectro. Desta forma, é avaliada a relevância da informação nas diferentes sub-divisões espectrais, de onde é possível identificar e selecionar apenas as variáveis que apresentam informações mais relevantes. Para cada

⁷⁷ Osborne, S.D.; Jordan, R.B.; Künnemeyer, R., *Analyst* 122 (1997) 1531-1537.

⁷⁵ Oliveira, F. C. *et al.*, *Quim. Nova* 27 (2004) 218-225.

⁶¹ Leardi, R.; Norgaard, L., *J. Chemom.* 18 (2004) 486-497.

intervalo é construído um modelo PLS, sendo os resultados apresentados na forma gráfica para facilitar a comparação com toda a faixa espectral.^{61,73}

O siPLS é uma extensão do algoritmo iPLS. Este algoritmo consiste na divisão do espectro em regiões eqüidistantes (intervalos) e na combinação dos intervalos possibilitando a obtenção de melhores coeficientes de correlação (R), menores erros de calibração e previsão que aqueles encontrados por iPLS.^{71,73}

O biPLS, também, é uma extensão do iPLS, porém este algoritmo tem por objetivo excluir aqueles intervalos que apresentam regiões espectrais não correlacionadas com o analito.⁶¹

2.4.4. Seleção do conjunto de calibração e previsão

Para a seleção das amostras que irão compor os conjuntos de calibração e previsão a utilização de ferramentas de análise multivariada, em alguns casos, é necessária. Dentre elas destacam-se a análise por componentes principais (PCA) e a análise por agrupamentos hierárquicos (HCA) que têm por objetivo avaliar da similaridade entre as amostras e então facilitar a seleção dos conjuntos de calibração e previsão, como já foram mencionadas anteriormente.

Há ainda o algoritmo de *Kennard-Stone* que seleciona uma amostra média e então as demais amostras são selecionadas com base em sua distância. A primeira amostra selecionada é a que apresenta a maior distância em relação à amostra média. A segunda amostra a ser selecionada será a que apresentar maior distância em relação à primeira amostra selecionada. A próxima amostra a ser selecionada apresentará maior distância em relação à última amostra selecionada, e assim sucessivamente até atingir o número de amostras desejadas.^{31,56}

⁶¹ Leardi, R.; Norgaard, L., *J. Chemom.* 18 (2004) 486-497.

⁷³ Norgaard, L. *et al.*, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 413-419.

⁷¹ Munck, L. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 446 (2001) 171-186.

³¹ Daszykowski, M.; Walczak, B.; Massart, D. L., *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 91-103.

⁵⁶ Kennard, R. W.; Stone, L. A.; *Technometrics* 11 (1969) 137-148.

2.4.5. Tratamento e pré-processamento dos dados

A diferença de unidades e variáveis com diferentes variâncias pode ser algumas das razões que levam os dados experimentais originais a uma distribuição inadequada para análise, dificultando a extração de informações úteis e interpretação das mesmas. Para uma análise adequada transformações dos dados espectrais são necessárias, consistindo em tratamentos e pré-processamentos destes dados.⁴¹

O tratamento dos dados tem por objetivo remover variações sistemáticas não desejadas ao espectro, como mudanças na linha de base, efeitos de espalhamento e fatores externos, não controláveis. Pode-se destacar como tipos de tratamentos a variável normal padrão (SNV, do inglês, *standard normal variate*)⁸⁸, a primeira e segunda derivadas⁸⁸ e a correção do espalhamento de luz (MSC, do inglês *multiplicative scatter correction*)¹⁵. Neste trabalho utilizou-se o tratamento MSC, sendo este um tipo de tratamento que apresenta a finalidade de avaliar a regressão linear entre os espectros e o espectro de referência, retendo os resíduos e as informações químicas. Já a normalização consiste em utilizar os dados adquiridos em uma mesma faixa de amplitude de sinal.¹⁵

O pré-processamento é aplicado quando se deseja comparar variáveis com diferentes dimensões e consiste basicamente em centrar os dados na média ou autoescalar os dados.^{41,45} No primeiro pré-processamento calcula-se a média das intensidades para cada comprimento de onda e subtraem-se cada intensidade do respectivo valor médio. O segundo pré-processamento, autoescalar os dados, significa centrar os dados na média e dividi-los pelo respectivo desvio padrão, sendo um para cada comprimento de onda.^{41,45}

2.4.6. Avaliação dos modelos de regressão

A avaliação de alguns parâmetros resultantes da construção dos modelos permite a escolha e a seleção de modelos mais adequados. Um aspecto importante

⁴¹ Ferreira, M. M. C. *et al.*, *Quim. Nova* 22 (1999) 724-731.

⁸⁸ Roggo, Y. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 683-700.

¹⁵ Breton, R. G.; *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and chemical Plant* (2003).

⁴⁵ Geladi, P.; MacDougall, D.; Martens, H., *Appl. Spectrosc.* 39 (1985) 491-500.

da etapa de validação em calibração multivariada é a decisão sobre a dimensionalidade do modelo. Dessa forma, para obter-se um modelo de fácil interpretação, deve-se explicar o máximo da variância dos dados com um mínimo de variáveis latentes (VLs), minimizando a influência do ruído. O número ótimo de VLs a ser usado para descrever um modelo será o número de VLs para o qual um erro mínimo na previsão seja obtido.⁴⁶

Segundo Gomez-Carracedo *et al.*,⁴⁹ um modelo que contenha número de VLs inferior ao ideal resultará em subajuste e superior ao ideal em sobreajuste. A decisão sobre um número de VLs superior ao ideal ocorre com mais frequência, ocasionando resultados satisfatórios para a previsão da propriedade de amostras do conjunto de calibração, porém, não adequados para a previsão de amostras de um conjunto validação ou previsão devido à informação não necessária incluída no modelo.

Para tanto o cálculo dos erros médio quadráticos (RMSE) podem ser úteis para avaliação dos modelos construídos (Equação 14), são eles: raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração (RMSEC – do inglês, *root mean square error of calibration*), de validação (RMSEV - do inglês, *root mean square error of validation*) e da validação-cruzada (RMSECV – do inglês, *root mean square error of cross validation*), sendo este último erro utilizado para se determinar o número de VLs do modelo.¹⁶

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (14)$$

Onde y_i é o valor de referência para a i -ésima amostra e \hat{y}_i é o valor de previsão para esta mesma amostra, sendo n o número total de amostras utilizadas para a construção do modelo.

⁴⁶ Gemperline, P.; *Practical guide to chemometrics*, 2nd ed.; CRC Press Taylor & Francis, New York (2006) 105-160.

⁴⁹ Gomez-Carracedo, M. P. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 253-265.

¹⁶ Brereton, R. G., *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.

A validação cruzada está baseada na avaliação da magnitude do erro de previsão de um dado modelo de calibração e consiste na remoção de uma ou mais amostras do conjunto de calibração e construção do modelo sem as mesmas. As amostras removidas são previstas no modelo e calcula-se o erro de previsão. Este procedimento ocorre até que todas as amostras do modelo sejam retiradas e previstas. Este erro é denominado de RMSECV.¹⁵

A avaliação da capacidade de previsão do modelo de calibração para amostras externas é realizada através do cálculo da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão RMSEP (do inglês, *root mean square error of prevision*), conforme Equação 14. Seu valor percentual é dado pelo erro padrão de previsão relativo (RSEP - do inglês, *root square error of prevision*), de acordo com Equação 15.⁹

$$RSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i)^2}} \cdot 100 \quad (15)$$

Onde y_i é o valor de referência para a i -ésima amostra e \hat{y}_i é o valor de previsão para esta mesma amostra, sendo n o número total de amostras, utilizadas para a construção do modelo.

2.5. Testes de significância

Quando se propõe uma metodologia nova, há a necessidade de averiguar-se seu desempenho frente ao método de referência. Para que isso seja possível utiliza-se o teste t pareado, que estima o quanto um valor experimental difere significativamente de um valor verdadeiro, devendo ser aplicado quando o conjunto de amostras é limitado, não sendo possível obter replicatas do mesmo.⁴⁶

¹⁵ Brereton, R. G.; *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and chemical Plant* (2003).

⁹ Blanco, M. et al., *Anal. Chim. Acta* 384 (1999) 207-214.

⁴⁶ Gemperline, P.; *Practical guide to chemometrics*, 2nd ed.; CRC Press Taylor & Francis, New York (2006) 105-160.

Primeiramente, deve-se calcular a diferença (d) dos resultados obtidos entre o método 1 e o método 2 para cada amostras e, após, fazer o cálculo da média (\bar{d}) conforme Equação 16.⁶⁶

$$\bar{d} = \frac{\sum d}{n} \quad (16)$$

Onde n é o número de amostras analisadas.

O próximo passo consiste em calcular a variância e o desvio dessas diferenças conforme Equação 17.⁶⁶

$$S_d^2 = \frac{\sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n}}{n-1} = S_d = \sqrt{\frac{\sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n}}{n-1}} \quad (17)$$

Por fim, o valor de t é calculado através da Equação 18.⁶⁶

$$t = \frac{\bar{d}\sqrt{n}}{S_d} \quad (18)$$

Onde t tem $n-1$ graus de liberdade. Após o cálculo do valor de t , este deve ser comparado com o valor de t tabelado, com 95% de confiança. Se o t calculado for maior que o t tabelado existirá diferença significativa entre os dois métodos.^{66,98}

O teste F é baseado na distribuição normal dos dados e é aplicado para determinar se uma população apresenta maior variabilidade que outra. Este teste é

⁶⁶ Miller, J. C.; Miller, J. N.; *Statistics for analytical chemistry*, 3ª ed. New York: Prentice Hall (1993) 233 p.

⁹⁸ Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed. Porto Alegre: Bookman (2002) 836 p.

utilizado, também, para comparar duas variâncias e determinar se dois métodos diferem em precisão.⁶⁵

Através da distribuição de F é possível verificar se as variâncias das populações a que pertence as amostras podem ser consideradas iguais, com nível de confiança desejado. A Equação 19 mostra o modo de cálculo do teste F.

$$F = \frac{S_A^2}{S_B^2}, \text{ sendo } S_A^2 > S_B^2 \quad (19)$$

Onde S_A^2 e S_B^2 são as variâncias dos métodos A e B. O número grau de liberdade é dado pelo número elementos na amostra menos 1. Os valores de F são comparados com os valores de F crítico tabelado com um nível de confiança de 95%. Quando o valor de F calculado for maior que F crítico as variâncias são consideradas estatisticamente diferentes.⁴⁶

Para os modelos multivariados o teste F pode ser utilizado na comparação dos erros de previsão de modelos distintos, conforme Equação 20.⁹³

$$F = \left(\frac{RMSEP_2}{RMSEP_1} \right)^2 \quad (20)$$

2.6. Aplicações da espectroscopia no infravermelho combinada com os métodos multivariados para análise de amostras farmacêuticas

As indústrias do ramo farmacêutico vêm utilizando com maior frequência a técnica de espectroscopia no infravermelho para quantificação de matérias primas e produtos acabados devido à facilidade de obtenção dos espectros, mínimo

⁶⁵ Meier, P. C.; Zünd, R. E.; *Statistical Methods in Analytical Chemistry*, 2ª ed. Canada: John Wiley & Sons, Inc. (2000) 407p.

⁴⁶ Gemperline, P.; *Practical guide to chemometrics*, 2nd ed.; CRC Press Taylor & Francis, New York (2006) 105-160.

⁹³ Silva, F. E. B., Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2008.

manuseio com a amostra, baixo custo da análise e pequena geração de resíduos após análises.^{2,89,90}

Além disso, nos últimos anos a técnica de espectroscopia no infravermelho deixou de apresentar aplicabilidade somente como técnica qualitativa e passou a fazer parte da lista de técnicas quantitativas utilizadas para o controle de qualidade de fármacos e medicamentos. Essa evolução ocorreu graças à combinação desta técnica com métodos de análise multivariados.^{63,88}

Dessa forma, técnicas espectroscópicas na região do infravermelho apresentam-se como alternativas promissoras para métodos oficiais que envolvem etapas prévias de separação e preparo da amostra para posterior análise.

2.6.1. Utilização da espectroscopia na região do infravermelho associada a controle de processos farmacêuticos

A recomendação do FDA para utilização em tecnologia analítica de processos (PAT - do inglês *process analytical technology*) pelas indústrias farmacêuticas no desenvolvimento e emprego de novas tecnologias na produção e qualificação de produtos farmacêuticos tem sido descrita na literatura envolvendo a espectroscopia na região do infravermelho.^{14,24,37,47,101}

Na indústria farmacêutica a necessidade de atestar a qualidade dos produtos inicia-se na chegada da matéria prima ao laboratório. A identificação, a homogeneidade, a análise ou o controle de polimorfismo e isômeros ópticos em matérias primas e em produtos acabados são exemplos de análise qualitativa que podem ser realizadas pela espectroscopia na região do infravermelho.¹⁰

² Alvarenga, L. et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 62-69.

⁸⁹ Rosa, S. S. et al., *Talanta* 75 (2008) 725-733.

⁹⁰ Sarraguça, M. C.; Lopes, J. A., *Vib. Spectrosc.* 49 (2009) 204-210.

⁶³ Luybaert, J.; Massart, D.L.; Heyden, Y. V., *Talanta* 72 (2007) 865-883.

⁸⁸ Roggo, Y. et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 683-700.

¹⁴ Braga, J. W. B.; Poppi, R. J., *Quim. Nova* 27 (2004) 1004-1011.

²⁴ Chen, Y. et al., *Drug Developm. Ind. Pharm.* 27 (2001) 623-631.

³⁷ Eustaquio, A. et al., *Analyst* 123 (1998) 2303-2306.

⁴⁷ Gendrin, C. et al., *Eur. J. Pharm. and Biopharm.* 68 (2008) 828-837.

¹⁰¹ Sulub, Y. et al., *Anal. Chim. Acta* 611 (2008) 143-150.

¹⁰ Blanco, M. et al., *Analyst* 123 (1998) 2307-2312.

Sarraguça *et al.* (2009)⁹⁰ desenvolveram uma metodologia analítica para quantificação simultânea da substância ativa paracetamol e dos excipientes, celulose microcristalina, talco e estearato de magnésio, em formulações farmacêuticas. O método foi construído com amostras de escala laboratorial para conjunto de calibração e validação de amostras denominadas de escala piloto (pó e comprimidos). As amostras foram analisadas no modo de reflexão em um espectrômetro NIR com transformada de *Fourier*. Os erros de validação para as amostras de escala laboratorial e da escala piloto pó ficaram entre 0,4% e 5% para os quatro componentes da formulação. Já para as amostras da escala piloto comprimidos, a mesma diferença ficou entre 1,6% a 9%.

Moes *et al.* (2008)⁶⁸ discute a aplicação da espectroscopia no infravermelho próximo, empregada como uma técnica analítica de processos em três etapas da fabricação de comprimidos: para monitorar a homogeneidade da mistura, para avaliar a uniformidade de conteúdo dos comprimidos e para determinar a espessura do revestimento. Um espectrômetro com arranjo de diodos foi utilizado para monitorar a uniformidade de mistura usando um modelo de calibração com concentração do fármaco na faixa de 2,98 a 9,25% (m/m). Um espectrômetro com transformada de *Fourier* foi utilizado para analisar a uniformidade de conteúdo e a espessura do revestimento. A predição do conjunto de validação composta por comprimidos não presentes no conjunto de calibração produziram um RMSEP de 1,94%. Já a predição dos comprimidos presentes no conjunto de calibração produziu um RMSEP de 1,48%. Segundo os autores, o desempenho do modelo pode ser influenciado pelas propriedades físicas dos comprimidos, porém os resultados obtidos estão em concordância com as medidas de referência de uniformidade da mistura e de conteúdo.

Um método quantitativo *on-line* foi descrito por Sulub *et al.* (2009)¹⁰² para monitoramento de uniformidade de mistura de formas farmacêuticas sólidas contendo 29,4% (m/m) de substância ativa e três excipientes majoritários (celulose, lactose e celulose microcristalina). Um conjunto de 21 amostras foi utilizado para construção de um modelo de calibração utilizando o PLS para predição *on-line* do conteúdo da substância ativa no processo de mistura. Para minimizar as diferenças

⁹⁰ Sarraguça, M. C.; Lopes, J. A., *Vib. Spectrosc.* 49 (2009) 204-210.

⁶⁸ Moes, J. J. *et al.*, *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 108-118.

¹⁰² Sulub, Y. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 48-54.

entre os modos de medidas estáticos e dinâmico, os espectros adquiridos por NIR utilizaram o pré-processamento SNV (variável normal padrão) seguida da aplicação da segunda derivada com filtro de Savitzky-Golay utilizando 21 pontos. O desempenho do modelo de calibração *off-line* foi avaliado em tempo real em 16 misturas de escala laboratorial por 3 meses. Empregando o modelo de calibração (PLS) desenvolvido *off-line*, a predição em tempo real, utilizando NIR, da substância ativa foi de 90 a 110%.

Rosa *et al.* (2008)⁸⁹ descreve a estratégia utilizada para o desenvolvimento e validação de um método utilizando espectroscopia no infravermelho próximo com acessório de reflexão difusa para identificação e quantificação de ranitidina em produtos farmacêuticos *at-line* com um probe de fibra óptica. Este método foi desenvolvido em uma indústria farmacêutica para aplicação de rotina, para substituir o método de referência (HPLC). Para o conjunto de calibração foram utilizadas 59 amostras de produção (comprimidos revestidos) com peso unitário teórico de 300 a 650 mg de ranitidina e 30 amostras feitas em laboratório contendo de 78 a 114% de ranitidina. O conjunto de validação apresentava 124 amostras de produção e 6 amostras de laboratórios. O método desenvolvido utilizando NIR permitiu a identificação e quantificação simultânea de ranitidina em granulado para compressão, produto intermediário e comprimidos revestidos (produto final). Segundo os autores, o método é exato, preciso e linear na faixa de concentração estuda, sendo equivalente ao método de referência.

2.6.2. Espectroscopia no IR associada a determinações quantitativas

A utilização da espectroscopia na região do infravermelho médio e próximo vem crescendo nos últimos anos. Em busca de técnicas rápidas, não destrutivas e com gasto mínimo de reagentes, diversas metodologias vêm sendo desenvolvidas para substituir as técnicas de referências utilizadas no controle de qualidade de fármacos e, dessa forma, ampliar a utilização da espectroscopia no infravermelho associado à análise multivariada na indústria farmacêutica.^{55,62,70}

⁸⁹ Rosa, S. S. *et al.*, *Talanta* 75 (2008) 725-733.

⁵⁵ Ito, M. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 819-827.

⁶² Li, G.; Tocarra, G.; Jing, W.; Wen, Z., *Vib. Spectrosc.* 50 (2009) 152-159.

⁷⁰ Moros, J.; Garrigues, S.; Guardia, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1277-1282.

Um método utilizando espectroscopia no infravermelho próximo foi desenvolvido por Blanco *et al.* (2006)⁷ para a determinação simultânea de diferentes substâncias ativas presentes em uma formulação farmacêutica utilizada para o alívio dos sintomas da gripe. As cinco substâncias ativas (paracetamol, ácido ascórbico, dextrometorfano, cafeína e maleato de clorfeniramina) foram quantificadas utilizando o método de regressão PLS a partir dos espectros das amostras e os resultados obtidos foram validados para seletividade, linearidade, exatidão, precisão e robustez. Obtiveram-se RMSEC entre 1,7 a 3,6% e RMSEP entre 2,1 a 3,4%. O método mostrou-se seletivo, robusto e com linearidade apropriada para a quantificação dos analitos. Dessa forma, o método NIR/PLS atendeu aos requisitos do ICH permitindo que preparações farmacêuticas fossem identificadas e suas cinco substâncias ativas foram determinadas com boa exatidão, precisão e mínimo tratamento da amostra. Com base nos resultados, pode-se verificar que esta técnica é uma alternativa apropriada para substituição da HPLC e volumetria.

Um método analítico simples e rápido foi proposto por Boyer *et al.* (2006)¹³ para a determinação de ácido niflúmico em formulações farmacêuticas na forma de gel. Utilizou-se para isso espectroscopia no infravermelho médio com transformada de *Fourier* e acessório de reflexão total atenuada (ATR). Um modelo de calibração, utilizando o algoritmo PLS foi desenvolvido com 81 amostras e o conjunto de validação composto por 27 amostras para a determinação do conteúdo de ácido niflumico. A faixa espectral utilizada para a construção do modelo de calibração foi de 2300 a 1100 cm^{-1} . Aplicou-se o tratamento de normalização e primeira derivada. O modelo apresentou um coeficiente de correlação igual a 1 e RMSEP de 0,2 mg g^{-1} para o conjunto de validação. A recuperação do método para análise de ácido niflumico foi na faixa de 96 a 101,02%.

Wu *et al.* (2008)¹¹³ analisaram qualitativamente e quantitativamente três componentes: alfa-pineno, metil salicilato e eugenol do óleo *Honghua* (uma formulação oleosa da medicina tradicional chinesa). Utilizou-se a região do infravermelho médio - MIR com acessório de reflexão total atenuada horizontal e infravermelho próximo - NIR para obtenção dos espectros das 48 amostras (36 amostras para calibração e 12 para validação), de diferentes lotes, do óleo *Honghua* disponíveis comercialmente e utilizou-se o algoritmo PLS. Os resultados foram bem

⁷ Blanco M.; Alcalá, M., *Eur. J. Pharm. Sci.* 27 (2006) 280-286.

¹³ Boyer, C. et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 433-437.

¹¹³ Yu, L.; Xiang, B.; *Microchem. J.* 90 (2008) 63-66.

sucedidos para a identificação dos três compostos citados acima, para todas as amostras, utilizando o infravermelho médio. Obteve-se RMSEP de 0,793% (MIR) e 1,554% (NIR) para alfa-pineno, 1,667% (MIR) e 0,957% (NIR) para metil salicilato e 0,360% (MIR) e 0,389% (NIR) para eugenol. Ambos os modelos PLS para MIR e NIR, que utilizaram as áreas dos picos da cromatografia gasosa como referência para calibração, apresentaram boa correlação linear para cada um dos compostos das amostras de óleo de *Honghua*, sendo as técnicas espectroscópicas promissoras para o controle de qualidade das formulações de óleos da medicina tradicional chinesa.

A região do MIR pode, também, ser utilizada para análises quantitativas de misturas complexas, como preparações farmacêuticas. Souza e Ferrão (2006)⁹⁹ desenvolveram uma metodologia analítica associando DRIFTS e calibração multivariada para quantificação de diclofenaco de potássio em comprimidos. Foram utilizadas 20 amostras de diferentes concentrações preparadas em laboratório (14 amostras foram empregadas no conjunto de calibração e 6 amostras no conjunto de validação). Utilizou-se o algoritmo PLS, como pré-processamento os dados autoescalado e tratamento MSC. Os melhores modelos foram selecionados considerando os valores de R e RMSEV.

Parisotto *et al.* (2007),⁷⁹ propôs a associação entre DRIFTS e calibração multivariada para a quantificação de misturas contendo amoxicilina e amido. Utilizou-se para a construção dos modelos o algoritmo PLS, utilizando como tratamento dos dados MSC e como pré-processamento os dados autoescalados. O melhor modelo apresentou coeficiente de correlação de 0,9936, RMSEC de 0,44% e RMSEV de 0,79%. A metodologia desenvolvida é sugerida como alternativa na quantificação do fármaco, durante o processo de produção do mesmo

A espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de *Fourier* e acessório de reflexão total atenuada (FTIR/ATR) combinado com o algoritmo PLS foi utilizada para determinação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em medicamentos. De acordo com Silva *et al.* (2009),⁹⁴ os algoritmos iPLS e siPLS foram aplicados para seleção da faixa espectral com menores erros de previsão em comparação com o modelo construído com o espectro inteiro. Foram empregadas 49 amostras sintéticas e 15 amostras comerciais, sendo o conjunto de

⁹⁹ Souza, J. S.; Ferrão, M. F., *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 42 (2006) 437-445.

⁷⁹ Parisotto, G. *et al.*, *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 43 (2007) 89-96.

⁹⁴ Silva, F. E. B. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 800-805.

calibração construído com 32 amostras sintéticas e 9 amostras comerciais e o conjunto de previsão com 17 amostras sintéticas e 6 amostras comerciais. Os resultados do modelo PLS com o FTIR/ATR é um procedimento relativamente simples, rápido e exato que poderia ser aplicado na determinação simultânea do sulfametoxazol e trimetoprima na rotina do controle de qualidade de medicamentos. O melhor modelo encontrado foi aquele que utilizou o algoritmo siPLS apresentando um RMSEP de 13,18 mg g⁻¹ para sulfametoxazol e 6,03 mg g⁻¹ para trimetoprima. A metodologia proposta possibilitou a análise de cada amostra em menos de 3 minutos. A exatidão foi comparada com o método de referência HPLC apresentando concordância maior que 98,8%.

Segundo Blanco e Alcalá (2006),⁸ a utilização da tecnologia analítica de processos pela indústria farmacêutica requer o desenvolvimento de novas metodologias analíticas. Deste modo, os autores desenvolveram e validaram um método quantitativo utilizando a espectroscopia no infravermelho próximo combinada com a análise multivariada. Assim, foi possível a determinação de parâmetros físicos (dureza de comprimidos) e químicos (uniformidade de substâncias ativas e de conteúdo) de produtos farmacêuticos intactos, sendo que nenhum pré-tratamento foi necessário para determinação da substância ativa nos comprimidos. As amostras foram preparadas pela mistura da substância ativa e dos excipientes e após prensada em comprimidos. A quantificação das amostras foi realizada utilizando o algoritmo PLS com calibração cruzada para construção do modelo de calibração. Os modelos foram avaliados através do RMSEC e RSEP. De acordo com os autores, o método proposto permitiu a determinação de princípios ativos em comprimidos sem nenhum pré-tratamento. O método foi validado de acordo com os guias ICH e EMEA e mostrou-se ser uma alternativa efetiva para o método de referência com UV.

Já Blanco *et al.* (2008)⁶ propuseram a determinação cetoprofeno (25 mg g⁻¹) e metil p-hidroxibenzoato (0,8 mg g⁻¹) e propil p-hidroxibenzoato (0,2 mg g⁻¹) em uma formulação farmacêutica disponível na forma de hidrogel utilizando a espectroscopia NIR combinada com o algoritmo dos mínimos quadrados parciais (PLS). O método de referência HPLC foi utilizado para determinação da substância ativa e dos preservativos. De acordo com a ICH e EMEA o método proposto foi validado apresentando linearidade, seletividade, precisão e robustez apropriadas. Aplicando-

⁸ Blanco, M.; Alcalá M., *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 353-359.

⁶ Blanco M.; Alcalá M.; Bautista M., *Eur. J. Pharm. Sci.* 3 (2008) 409-414.

se teste t não se observou diferença significativa entres os valores obtidos pelo procedimento proposto (NIR/PLS) e os valores obtidos por HPLC. Segundo os autores o método proposto permite a quantificação de conservantes presentes em baixa concentração no hidrogel.

2.7. Validação de métodos de espectroscopia no IR associado a métodos multivariados de calibração

A validação de metodologias analíticas univariadas para a determinação de fármacos presentes em formas farmacêuticas é estabelecida por órgãos internacionais tais como ICH (Conferência Internacional de Harmonização, do inglês *International Conference on Harmonisation*) e ANVISA. Estes órgãos estabelecem critérios que devem ser avaliados como especificidade, linearidade, precisão, exatidão, intervalo de confiança e robustez.

Para as metodologias analíticas multivariadas a validação é realizada com base nas determinações das chamadas figuras de méritos as quais certificam se um modelo multivariado proposto é confiável e atende as especificações dos órgãos regulatórios nacionais e internacionais como a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)⁷⁶ o EMEA (*The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*)⁷⁴ e a ASTM (*American Society for Testing and Materials*).³

A norma ASTM, define os procedimentos para análise quantitativa por espectroscopia no infravermelho e os parâmetros para validação de um modelo multivariado baseado na avaliação do erro padrão de validação, no teste de significância de *bias* através de teste t, na precisão e na exatidão. Para a IUPAC a validação do método pode ser alcançada pela determinação da sensibilidade, seletividade e razão sinal ruído através do conceito de sinal analítico líquido (NAS - do inglês *net analyte signal*), que corresponde ao sinal instrumental que é ortogonal às contribuições de outros possíveis constituintes presentes na amostra. Já o EMEA descreve os principais itens para validação de métodos qualitativos e quantitativos

⁷⁶ Olivieri, A.C. *et al.*, *Pure Appl. Chem.* 78 (2006) 633-661.

⁷⁴ EMEA guidance. EMEA/CVMP/961/01, London, 2003.

³ Annual Book of ASTM Standards, Standard, E1655, 2000.

por NIR baseados nos critérios de especificidade, robustez, linearidade, exatidão e precisão.

Para Moffat *et al.* (2000)⁶⁹ a validação de um procedimento analítico, para determinação de paracetamol em comprimidos utilizando NIR, foi feita utilizando uma adaptação das normas estabelecidas pelo ICH para procedimentos analíticos univariados.

A seguir serão apresentados alguns parâmetros, de acordo com os órgãos regulatórios e com alguns trabalhos científicos, para validação de métodos multivariados de calibração.

Linearidade – avalia se os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um determinado intervalo, ou seja, é a regressão linear entre os valores previstos e os valores medidos.^{69,74,76} A linearidade também pode ser avaliada através da utilização do gráfico de resíduos das amostras de calibração e validação. O comportamento linear é observado quando as amostras utilizadas na construção do modelo apresentarem uma distribuição aleatória.^{14,64,107}

Precisão – expressa o grau de concordância entre uma série de medidas realizadas para uma mesma amostra em determinadas condições. De acordo com ATSM e EMEA^{3,74} para o cálculo da precisão sugere-se a utilização dos valores obtidos a partir da análise em triplicata de 3 amostras com concentrações diferentes.

De acordo com Braga e Poppi¹⁴ a repetitividade de métodos analíticos pode ser entendida como a precisão do mesmo em um curto espaço de tempo e pode ser calculada, também, a partir de nove determinações (três concentrações e três replicatas) cobrindo a faixa útil do modelo de calibração, conforme Equação 21.

⁶⁹ Moffat, A. C. *et al.*, *Analyst* 125 (2000) 1341-1351.

⁷⁴ EMEA guidance. EMEA/CVMP/961/01, London, 2003.

⁷⁶ Olivieri, A.C. *et al.*, *Pure Appl. Chem.* 78 (2006) 633-661.

¹⁴ Braga, J. W. B.; Poppi, R. J., *Quim. Nova* 27 (2004) 1004-1011.

⁶⁴ Martens, H.; Naes, T.; *Multivariate Calibration*, Wiley, Chichester (1989) 419 p.

¹⁰⁷ Valderrama, P.; Braga, J. W. B.; Poppi, R. J., *Quim. Nova* 32 (5) (2009) 1-10.

³ Annual Book of ASTM Standards, Standard, E1655, 2000.

⁷⁴ EMEA guidance. EMEA/CVMP/961/01, London, 2003.

$$precisão = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (\hat{y}_{ji} - \hat{\bar{y}}_i)^2}{n(m-1)}} \quad (21)$$

Onde m é o número de replicatas feitas, n é o número de amostras, $\hat{\bar{y}}_i$ é a média dos valores previstos de cada replicata \hat{y}_{ji} .

Exatidão – é o grau de concordância entre o valor estimado ou medido e o valor verdadeiro ou de referência.^{3,8} Em alguns casos a exatidão é estimada através do erro de previsão (RMSEP).¹⁴

Erro sistemático - Os modelos também devem ser avaliados em relação a ocorrência de erro sistemático (bias). Erros sistemáticos são resultantes de um desvio constante nos resultados, num mesmo sentido. Estes erros afetam a grandeza do resultado em si, o valor médio e estão relacionados com a exatidão.²⁶

Segundo a IUPAC, o termo *bias* (desvios) é definido como a diferença entre a média populacional e o seu valor verdadeiro.³⁰ e pode ser calculado a partir do Equação 22.

$$bias = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)}{n} \quad (22)$$

De acordo com a norma E1655-00 da ASTM³ a utilização de um teste t avalia, quantitativamente, se o bias incluso no modelo é significativo. Para isso, primeiramente estima-se o desvio padrão dos erros de validação (SDV, do inglês *standard deviation validation*), conforme Equação 23:

³ Annual Book of ASTM Standards, Standard, E1655, 2000.

⁸ Blanco, M.; Alcalá M., *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 353-359.

¹⁴ Braga, J. W. B.; Poppi, R. J., *Quim. Nova* 27 (2004) 1004-1011.

²⁶ Cienfuegos, F.; *Estatística Aplicada ao Laboratório*. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência (2005) 337 p.

³⁰ Curie, L. A., *Anal. Chim. Acta* 391 (1999) 105-126.

$$SDV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(y_i - \hat{y}_i) - bias]^2}{n - 1}}$$

(23)

Assim, o valor de t é obtido de acordo com Equação 24:

$$t_{sist} = \frac{|bias|\sqrt{n}}{SDV}$$

(24)

Se o valor de t_{sist} calculado for menor que o seu valor crítico para $n - 1$ (graus de liberdade) com 95% de confiança, sendo n o número de amostras de validação, o erro sistemático incluso no modelo pode ser considerado insignificante.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Instrumentação

As determinações dos fármacos amoxicilina e ácido clavulânico nas formulações farmacêuticas utilizadas no presente trabalho foram efetuadas seguindo a monografia da Farmacopéia Norte Americana¹⁰⁶ que emprega a cromatografia a líquida de alta eficiência (HPLC). Utilizou-se um cromatógrafo com detector por UV/VIS (modelo 844 UV/VIS Compact IC, Metrohm, <http://www.metrohm.com>, Suíça) que possui sistema de diálise (membrana de celulose com diâmetro de 9 cm e poros de 0,2 µm), alça de amostragem de 20 µl e um amostrador automático com capacidade para 36 amostras (modelo 813 Compact Autosampler, Metrohm). Foi utilizada uma coluna de sílica quimicamente modificada ligada a grupo octadecilsilano (C18), X-BridgeTM Columns (Water, <http://www.waters.com>, Irlanda), com comprimento de 4,5 mm, diâmetro interno de 250 mm e tamanho de partícula de 5 µm.

O ajuste do pH da fase móvel foi feito utilizando-se um potenciômetro digital (modelo 781 pH/ion Meter, Metrohm), com resolução de 0,01 unidades de pH e um eletrodo de vidro combinado (modelo 6.0258.10, Metrohm) com sensor de temperatura.

Os espectros de infravermelho por reflexão difusa (DRIFTS) foram obtidos em um espectrômetro PerkinElmer (modelo Spectrum One[®] FTIR, <http://www.perkinelmer.com>, EUA) equipado com acessório reflectância difusa PIKE Technologies, (EasiDiff[®], <http://www.piketech.com>, EUA). Na obtenção dos espectros de infravermelho por reflexão total atenuada (FTIR/ATR) utilizou-se um acessório de reflexão total atenuada com cristal de seleneto de zinco (PerkinElmer). O Argônio foi utilizado como gás de purga para os dois acessórios (99,9% de pureza, White Martins, <http://www.whitemartins.com.br>, Brasil).

¹⁰⁶ United States Pharmacopoeia, USP 31 – NF 26: the official compendia of standards. Rockville (2007).

As amostras foram pesadas com auxílio de uma balança analítica Shimadzu (modelo AY 220, <http://www.shimadzu.com.br>, Brasil), com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g.

As amostras sintéticas e as amostras comerciais foram misturadas e moídas no moinho criogênico Spex Ceriprep (Model 6750 Freezer/Mill, <http://www.spexcsp.com>, EUA) com objetivo de homogeneizar a mistura dos componentes e padronizar o tamanho de partícula. Utilizou-se o seguinte programa para a realização deste processo: ciclo de pré-congelamento de 2 minutos, ciclo de moagem de 2 minutos e velocidade de 15 rpm.

3.2. Reagentes

A água utilizada para dissolução das amostras, bem como para a limpeza das vidrarias, foi previamente purificada em um sistema Milli-Q (Milli-Q® <http://www.millipore.com>, EUA), com resistividade final de 18,2 MΩ cm.

No doseamento da matéria prima amoxicilina, preparou-se uma solução de fosfato de potássio monohidratado (Nuclear, Brasil), com concentração 6,8 g l⁻¹. Ajustou-se o pH dessa solução a pH 5 com uma solução de hidróxido de sódio (pureza 99,8%, Vetec, <http://www.vetecquimica.com.br>, Brasil) 45% (m/v). A fase móvel foi então preparada pela mistura de 96 partes da solução de fosfato de potássio monohidratado com 4 partes de acetonitrila (pureza 99,8%, Carlo Erba, <http://www.caloerbareagenti.com>, Itália).

A fase móvel para o doseamento da matéria prima de ácido clavulânico e das amostras contendo os fármacos amoxicilina e ácido clavulânico, foi preparada a partir da mistura de 5 partes de metanol (pureza 99,8%, Vetec, <http://www.vetecquimica.com.br>, Brasil) e 95 partes de solução de fosfato de sódio dihidrogênio monohidratado (pureza 99%, Merck, <http://www.merck.de>, Alemanha) de concentração de 7,8 g l⁻¹. Utilizou-se, ainda, ácido ortofosfórico 85% (Merck, <http://www.merck.de>, Alemanha) para ajustar o pH a 4,4 da solução acima citada.

Na aquisição dos espectros denominado branco por DRIFTS utilizou-se pó de brometo de potássio (KBr) (Vetec, <http://vetecquimica.com.br>, Brasil) compactado no acessório reflexão difusa. A acetona (pureza 99,5%) foi utilizada para limpeza dos acessórios de ATR e de DRIFTS após a aquisição dos espectros.

A amoxicilina triidratada SQR (substância química de referência da Farmacopéia Brasileira), com pureza 85,1% de amoxicilina, foi utilizada na preparação de uma solução de referência contendo $1,2 \text{ mg ml}^{-1}$ em solução de fosfato de potássio monohidratado. Da mesma forma o padrão de clavulanato de lítio da USP (do inglês, *United States Pharmacopoeia*), com pureza 95,2% de ácido clavulânico, foi empregado na preparação de uma solução de referência contendo $0,25 \text{ mg ml}^{-1}$ em água (estas soluções foram utilizadas para o doseamento do teor das matérias primas).

3.3. Amostras de ácido clavulânico, amoxicilina e mistura de excipientes

As matérias primas amoxicilina triidratada (lote nº CAX1174083), clavulanato de potássio (lote nº CA007-7171014) e a mistura de excipientes foram adquiridas em uma farmácia de manipulação (Santa Maria, RS). Estas matérias-primas e a mistura de excipientes foram utilizados na confecção das amostras sintéticas conforme item abaixo. A pureza das matérias primas foi verificada por HPLC (item 3.4.) antes da confecção das amostras sintéticas.

Em virtude das amostras comerciais serem proveniente de diversas indústrias farmacêuticas e apresentarem, dessa forma, em sua composição diferentes tipos de excipientes (Tabela 3) optou-se, para o preparo das amostras sintéticas, pela utilização de uma mistura de excipientes considerados básicos e que são amplamente utilizados em farmácia de manipulação, conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 3. Excipientes presentes nas formulações de comprimidos contendo amoxicilina e ácido clavulânico.

Amostra comercial	Excipientes
A	Povidona, amidogliconato, hipromelose+macrogol, etilcelulose, silicato de magnésio, cloreto de metileno, estearato de magnésio, dióxido de titânio, celulose microcristalina, dióxido de silício
B	Celulose microcristalina, croscarmelose sódica, dióxido de silício coloidal, estearato de magnésio, laurilsulfato de sódio
C	Povidona, amidogliconato, hipromelose+macrogol, etilcelulose, silicato de magnésio, cloreto de metileno, estearato de magnésio, dióxido de titânio, celulose microcristalina, dióxido de silício
D	Celulose microcristalina, amidogliconato de sódio, dióxido de silício coloidal, povidona, eudragit, álcool isopropílico, estearato de magnésio, opadry branco, cloreto de metileno, macrogol
E	Celulose microcristalina, dióxido de silício coloidal, estearato de magnésio, povidona, dióxido de titânio, hipromelose, macrogol
F	Gliconato de amido sódico, dióxido de silício coloidal, estearato de magnésio, hidroxipropilmetilcelulose, etilcelulose, polietilenoglicol, celulose microcristalina, opaspray branco K1-7000.
G	Celulose microcristalina, dióxido de silício coloidal, croscarmelose sódica, butil hidroxitolueno, talco, estearato de magnésio, hidroxipropil metilcelulose, dióxido de titânio, polietilenoglicol
F	Estearato de magnésio, talco, povidona, croscamelose sódica, celulose microcristalina, trietil citrato, etilcelulose, hipromelose, dióxido de titânio
G	Povidona, celulose microcristalina, dióxido de silício, estearato de magnésio, etilcelulose, dióxido de titânio, amidogliconato de sódio, talco, hipromelose+macrogol

Tabela 4. Composição da mistura de excipientes utilizada na formulação das amostras sintéticas.

Excipiente	Teor (% , m/m)
Estearato de magnésio	1
Dióxido de silício coloidal	1
Talco	20
Celulose microcristalina	78

3.3.1. Preparo das amostras sintéticas

Foram preparadas 17 amostras sintéticas, a partir da mistura das matérias primas e excipientes, com massa total de 5 g. As concentrações destas amostras sintéticas variaram de 381,5 a 686,1 mg g⁻¹ para amoxicilina e 75,6 a 185,3 mg g⁻¹ para ácido clavulânico, de acordo com as determinações realizadas por HPLC (Tabela 5).

Cabe destacar que para a preparação das amostras sintéticas variou-se a concentração em aproximadamente 20% acima e 20% abaixo do maior valor nominal da amoxicilina e do ácido clavulânico presentes nos comprimidos comerciais. A mistura de excipientes variou de 2,6 a 42,8% do total da mistura das amostras sintéticas.

3.3.2. Amostras comerciais

As amostras comerciais adquiridas apresentavam valor nominal de 500 e 875 mg de amoxicilina e 125 mg de ácido clavulânico. Inicialmente, determinou-se o peso médio de 20 comprimidos, em seguida estas amostras foram moídas em moinho criogênico e quantificadas por HPLC para obtenção dos valores reais de amoxicilina e ácido clavulânico, conforme Tabela 5. Os excipientes presentes nestas formulações representavam no mínimo 29,7 e no máximo 60,7% do total da mistura, valor este encontrado após a determinação do peso médio dos comprimidos.

Tabela 5. Composição obtida por HPLC para as amostras dos conjuntos de calibração e previsão.

Amostras	Conjuntos	Classificação	AC (mg g ⁻¹)	AMO (mg g ⁻¹)
1	C*	comercial	89,93	375,71
2	C	comercial	80,51	498,68
3	C	comercial	105,45	407,17
4	C	comercial	116,39	464,67
5	C	comercial	83,83	525,47
6	C	comercial	107,05	419,48
7	P**	comercial	89,02	552,74
8	C	comercial	69,40	411,48
9	P	comercial	80,45	509,27
10	C	comercial	101,68	422,05
11	C	comercial	85,29	540,74
12	C	comercial	81,33	514,77
13	P	comercial	100,02	387,54
14	C	comercial	86,94	555,62
15	C	comercial	83,09	551,61
16	C	comercial	-***	737,21
17	C	comercial	-***	701,33
18	C	comercial	-***	578,75
19	P	comercial	86,14	520,17
20	C	sintética	108,77	684,06
21	P	sintética	127,66	686,07
22	C	sintética	102,49	583,85
23	C	sintética	126,72	584,24
24	C	sintética	146,67	584,76
25	P	sintética	167,59	580,70
26	C	sintética	185,29	568,88
27	C	sintética	75,57	523,71
28	C	sintética	89,58	521,73
29	C	sintética	144,78	535,54
30	P	sintética	154,61	493,63
31	C	sintética	180,28	517,20
32	C	sintética	98,13	470,19
33	C	sintética	119,61	473,12
34	C	sintética	139,59	472,85
35	P	sintética	159,38	473,16
36	C	sintética	84,21	381,52

* C calibração.

** P previsão.

*** Formulações contendo apenas o fármaco AMO.

3.4. Determinação de amoxicilina e ácido clavulânico por HPLC

A determinação do teor da matéria prima amoxicilina, utilizada para elaboração das amostras sintéticas, foi realizada por HPLC com detecção no comprimento de onda de 230 nm, de acordo com a Farmacopéia Norte Americana.¹⁰⁶ Para tanto, pesou-se aproximadamente 60 mg da matéria prima e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml. Adicionou-se, aproximadamente 25 ml de solução de fosfato de potássio monohidratado e agitou-se manualmente até completa solubilização. Em seguida completou-se o volume, filtrou-se a solução com filtro de membrana de politetrafluoretileno com poro de 0,22 µm de diâmetro. Em seguida injetou-se uma alíquota de 20 µl no sistema cromatográfico. Utilizou-se a fase móvel composta de solução fosfato de potássio monobásico e acetoneitrila (96:4).

Na determinação do teor da matéria prima de ácido clavulânico pesou-se aproximadamente 12,5 mg da amostra, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml, solubilizou-se e completou-se o volume com água MilliQ, conforme Farmacopéia Norte Americana. Injetou-se 10 µl da solução em sistema cromatográfico e a eluição foi feita utilizando-se a fase móvel composta de solução de fosfato de sódio dihidrogênio monohidratado e metanol (95:5). A detecção foi feita utilizando-se de detector UV/VIS em 220 nm.

A determinação dos fármacos amoxicilina e ácido clavulânico nas amostras comerciais e sintéticas foram realizadas a partir da obtenção de soluções contendo aproximadamente 0,5 mg ml⁻¹ de amoxicilina em água, conforme Farmacopéia Norte Americana.¹⁰⁶ Obteve-se uma solução padrão de aproximadamente 0,5 mg ml⁻¹ de amoxicilina padrão SQR e 0,2 mg ml⁻¹ de clavulanato de lítio padrão USP em água. A eluição das amostras e da solução padrão foi realizada utilizando uma mistura de solução de fosfato de sódio dihidrogênio monohidratado e metanol (95:5). Injetou-se 20 µl de cada solução e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 220 nm.

Todas as quantificações foram feitas em triplicata com comparação das áreas da amostra e dos padrões de amoxicilina e ácido clavulânico injetados nas mesmas condições das amostras.

¹⁰⁶ United States Pharmacopoeia, USP 31 – NF 26: the official compendia of standards. Rockville (2007).

3.5. Análise utilizando espectroscopia no infravermelho

Os espectros das amostras sintéticas e comerciais moídas foram obtidos em espectrômetro de infravermelho médio utilizando acessórios de reflexão difusa e reflexão total atenuada, de acordo com os parâmetros especificados a seguir.

3.5.1. Aquisição dos espectros por reflexão difusa (DRIFTS)

Para otimização da quantidade de massa de amostra apropriada que seria utilizada para obtenção dos espectros, transferiu-se uma quantidade de amostra suficiente para preencher o acessório de DRIFTS. A partir do valor dessa massa obtida (25 mg) obtiveram-se, também, os espectros de massas de amostras de 30 e 35 mg. Os espectros obtidos foram avaliados visualmente no que se refere à intensidade de bandas e razão sinal/ruído. Esta padronização teve por fim determinar a quantidade mínima de amostra que produz espectros com maior razão sinal/ruído e com bandas que apresentem melhores contornos, não prejudicando a identificação dos fármacos em estudo. Não se observaram diferenças significativas nas massas estudadas. Assim, para obtenção dos espectros por DRIFTS utilizaram-se massas de amostras compreendidas entre 25 e 35 mg.

As amostras foram transferidas e prensadas no acessório com auxílio de uma espátula. Na Tabela 6 estão apresentados os parâmetros utilizados para aquisição dos espectros.

Tabela 6. Parâmetros empregados para aquisição dos espectros por DRIFTS.

Parâmetros	Condições
Região espectral	600-4000 cm^{-1}
Detector	DTGS – sulfato de triglicina deuterada
Divisor de feixes	KBr
Varreduras	16
Resolução	4 cm^{-1}
Aplicativo	Spectrum v 5.0.1 [®]

Anteriormente, à obtenção do espectro de cada amostra, foi coletado um espectro de referência (*background*) através da aquisição de um espectro utilizando KBr, disposto no interior do acessório.

Adquiriram-se os espectros em triplicata para cada amostra. Estes então foram normalizados e posteriormente obteve-se o espectro médio, cujo perfil pode-se observar na Figura 11.

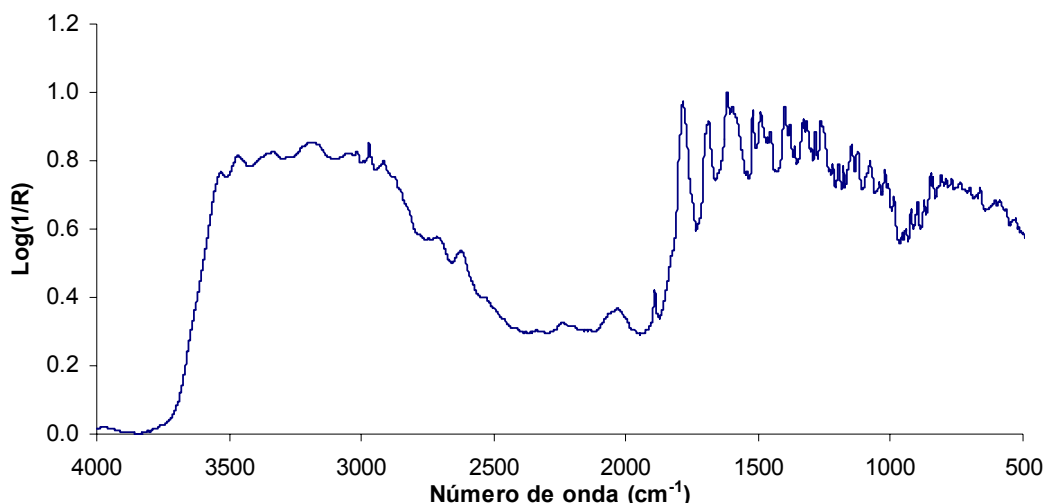


Figura 11. Perfil dos espectros das amostras obtidos por DRIFTS.

Após a obtenção dos espectros de cada amostra, o compartimento do acessório foi cuidadosamente limpo, primeiramente com água de MilliQ, em seguida com acetona e, posteriormente, seco com ar frio.

3.5.2. Aquisição dos espectros por reflexão total atenuada (FTIR/ATR)

Da mesma forma que na obtenção dos espectros por reflexão difusa, primeiramente, obteve-se a massa apropriada para o acessório de reflexão total atenuada. Foram obtidos espectros para massas de amostras de 20 a 30 mg. Novamente, não se observaram diferenças significativas nos espectros das massas estudadas. Assim, para as análises das amostras por ATR convencionou-se a pesagem de massa de amostras compreendidas entre 20 e 30 mg.

Na Tabela 5 estão apresentados os parâmetros utilizados na aquisição dos espectros por FTIR/ATR.

Tabela 7. Parâmetros empregados na aquisição dos espectros por FTIR/ATR.

Parâmetros	Condições
Região espectral	650-4000 cm^{-1}
Detector	DTGS – detector de sulfato de triglicina deuterada
Divisor de feixes	KBr
Varreduras	16
Resolução	4 cm^{-1}
Aplicativo	Spectrum v 5.0.1 [®]
Pressão aplicada	100 N/m^2

Coletou-se um espectro de referência (*background*), sem a amostra na superfície do IRE, anteriormente a aquisição de cada espectro da amostra. Logo, após a aquisição do espectro de referência, as amostras foram pesadas e dispostas no compartimento do acessório sobre o cristal e submetidas à análise. O equipamento foi purgado continuamente com argônio para eliminar qualquer contribuição da umidade do ar e do CO_2 na obtenção dos espectros.

Os espectros das amostras foram obtidos em triplicata, normalizados e em seguida obteve-se o espectro médio, cujo perfil pode ser observado na Figura 12.

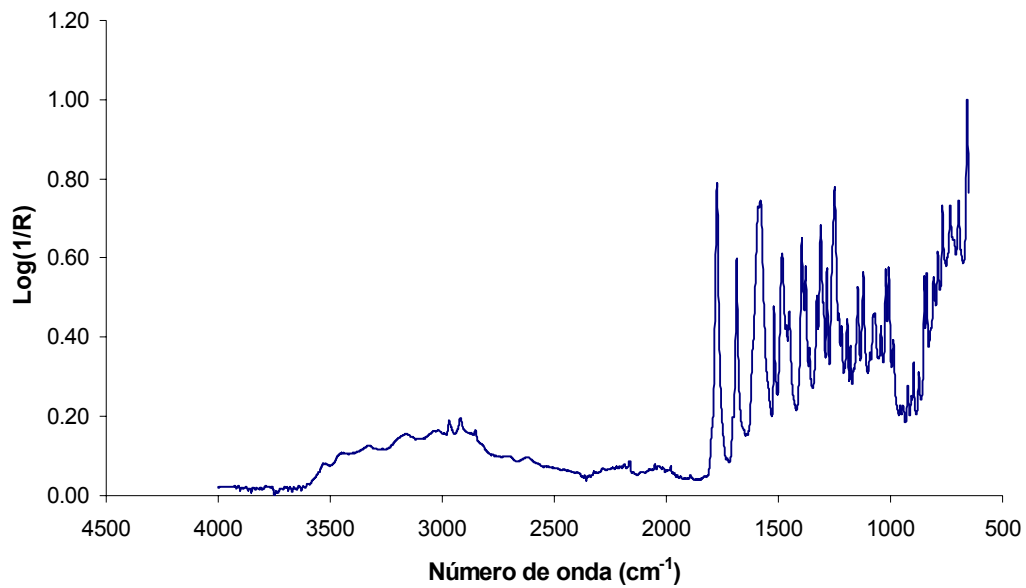


Figura 12. Perfil dos espectros das amostras obtidos por FTIR/ATR.

Posteriormente a obtenção dos espectros de cada amostra, o compartimento do acessório foi cuidadosamente limpo com acetona e seco com ar frio.

3.6. Programas computacionais

Utilizaram-se dois programas computacionais para o tratamento dos dados: o Pirouette[®] versão 3.11 (<http://www.infometrix.com>, EUA), utilizando o algoritmo HCA; e o MATLAB[®] versão 6.5 (The Math Works, <http://www.mathworks.com>, EUA), sendo utilizado o pacote “iToolbox” versão 2.0 desenvolvido por Lars Norgaard (iToolbox for MATLAB, <http://www.model.kvl.dk>, EUA), para a seleção das variáveis (algoritmos iPLS, biPLS e siPLS) e do algoritmo *Kennard-stone* para a seleção das amostras do conjunto de calibração e previsão.

3.7. Análise multivariada – Construção dos modelos

Primeiramente, foram selecionadas as amostras dos conjuntos de calibração e previsão, utilizando os algoritmos *Kennard-Stone* (MATLAB) e HCA (Pirouette 3.11) O modelo utilizando PLS foi obtido com auxílio do programa MATLAB empregando-se toda a faixa espectral dos espectros FTIR/ATR e DRIFTS. Para o modelo PLS verificou-se o desempenho dos pré-processamentos autoescalado e centrado na média e do tratamento MSC a partir dos valores de erro de calibração e previsão, coeficiente de correlação de calibração (R_{cal}) e número de VLs. Uma vez selecionados os melhores pré-processamento e tratamento utilizou-se na seqüência os métodos de seleção de variáveis: iPLS, biPLS, siPLS, disponíveis no pacote “iToolbox” versão 2.0, desenvolvido por Norgaard⁷³ para ambiente MATLAB.

3.7.1. Seleção das amostras dos conjuntos de calibração e previsão

O objetivo principal da seleção das amostras para constituição dos conjuntos de calibração e previsão foi a construção de conjuntos que contivessem a maior variabilidade possível em relação à faixa de concentração e que apresentasse a informação da matriz de dados utilizados neste estudo.

Primeiramente, para a construção dos modelos de calibração as amostras foram separadas, entre conjunto de calibração e de previsão, através do algoritmo de *Kennard-Stone*, baseado nas distâncias das amostras em relação à amostra média.⁵⁶

Utilizou-se, também, o HCA na seleção dos conjuntos de calibração e previsão através da observação da similaridade das amostras sintéticas e amostras comerciais fornecidas pelo dendograma. Dos diferentes grupos formados pelo dendograma, selecionou-se, no mínimo, uma amostra de cada grupo para fazer parte do conjunto de previsão. Além disso, teve-se o cuidado para que o conjunto de previsão contivesse as amostras com valores intermediários e que as amostras com valores extremos de concentrações ficassem alocadas no conjunto de calibração. Também, observou-se que as amostras de mesmo laboratório ficassem dispostas em conjuntos diferentes.

⁷³ Norgaard, L. *et al.*, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 413-419.

⁵⁶ Kennard, R. W.; Stone, L. A.; *Technometrics* 11 (1969) 137-148.

A partir destes critérios, obteve-se o conjunto de calibração com 14 amostras sintéticas e 14 amostras comerciais, e o conjunto de previsão formado por 4 amostras sintéticas e 4 amostras comerciais.

3.7.2. Desenvolvimento dos modelos para a determinação de amoxicilina e ácido clavulânico

Na determinação de amoxicilina e ácido clavulânico nas amostras em estudo, o desenvolvimento dos modelos de calibração foi dividido em 3 etapas. Na primeira etapa foram testados os pré-processamentos autoescalados e centrado na média e tratamento MSC na construção de modelos utilizando PLS. Na segunda etapa, foram utilizados os algoritmos iPLS, biPLS e siPLS para a seleção dos números de ondas correlacionados com a quantidade dos fármacos presentes nas amostras. Finalmente, a seleção dos melhores modelos foi realizada a partir da avaliação dos valores de RMSEP, R_{cal} , número de VLs e número de variáveis independentes. Estes foram ainda comparados através do erro relativo (%) e RSEP.

3.7.2.1. Otimização do modelo global

O modelo global foi construído utilizando todos os números de onda do espectro das amostras adquiridos por FTIR/ATR e DRIFTS. A partir das combinações de pré-processamento e tratamento obtiveram-se 8 modelos para cada técnica de reflexão. A escolha dos melhores modelos, deu-se em função dos menores valores de RMSEC e RMSEP e maiores valores de R_{cal} . Aplicou-se, também, teste F (95% de confiança) para verificar a existência de diferença significativa entre os valores de RMSEP obtidos para os melhores modelos. Para evitar-se o sobreajuste (“*overfitting*”) optou-se por modelos que apresentaram valores de RMSEC e RMSEP com menor diferença entre si. Uma vez selecionados os melhores pré-processamento e tratamento estes foram adotados para todos os modelos desenvolvidos nos estudos posteriores.

3.7.2.2. Métodos de seleção de variáveis

Selecionaram-se as variáveis espectrais a partir do emprego dos métodos de seleção de variáveis, iPLS, biPLS e siPLS. Nesta etapa os modelos iPLS, biPLS e siPLS foram obtidos a partir da divisão dos espectros FTIR/ATR e DRIFTS em 10, 20, 30, 40 e 50 intervalos. No caso dos modelos siPLS os intervalos foram combinados utilizando 2 e 3 intervalos concomitantemente. Utilizou-se a combinação de 4 intervalos apenas para espectros divididos em 10 intervalos devido à exigência de um grande tempo de processamento.

Após a geração da rotina dos algoritmos iPLS, biPLS e siPLS, informações gráficas foram obtidas, indicando o número de variáveis latentes utilizadas em cada intervalo e seu respectivos valores de RMSECV.

3.7.2.3. Avaliação dos modelos obtidos por iPLS, biPLS e siPLS

Num primeiro momento, os modelos foram avaliados através do número de variáveis latentes (VLs), RMSEP e pelo coeficiente de correlação do conjunto de calibração. Após a construção dos modelos utilizando o método de seleção de variáveis (iPLS, biPLS e siPLS) comparou-se o desempenho destes frente ao modelo PLS global. Além disso, o desempenho dos melhores modelos construídos através do iPLS, siPLS e biPLS foi avaliada através do RSEP. Avaliaram-se os melhores modelos através do erro relativo (%) individual de cada amostra. Calculou-se, também, o erro sistemático das amostras do conjunto de previsão para o modelo escolhido para a determinação dos fármacos AC e AMO por FTIR/ATR e DRIFTS.³

Para avaliação dos melhores modelos obtidos por FTIR/ATR e DRIFTS, aplicou-se teste F (95% de confiança) nos valores de RMSEP obtidos.

Por fim, através do teste t pareado compararam-se os valores obtidos pelos melhores modelos e os valores obtidos por HPLC.

3.7.2.4. Avaliação dos resultados frente a parâmetros farmacopeicos

Os resultados obtidos pelos melhores modelos foram avaliados frente aos critérios especificados na Farmacopéia Norte Americana a qual estabelece que comprimidos contendo AC e AMO devem apresentar teores entre 90% e 120% em relação ao valor nominal. No presente estudo, adotaram-se como valores nominais, aqueles obtidos por HPLC.

3.8. Fluxograma das etapas desenvolvidas na determinação de AC e AMO

Na Figura 13 é possível observar um fluxograma com as principais etapas desenvolvidas durante o trabalho.

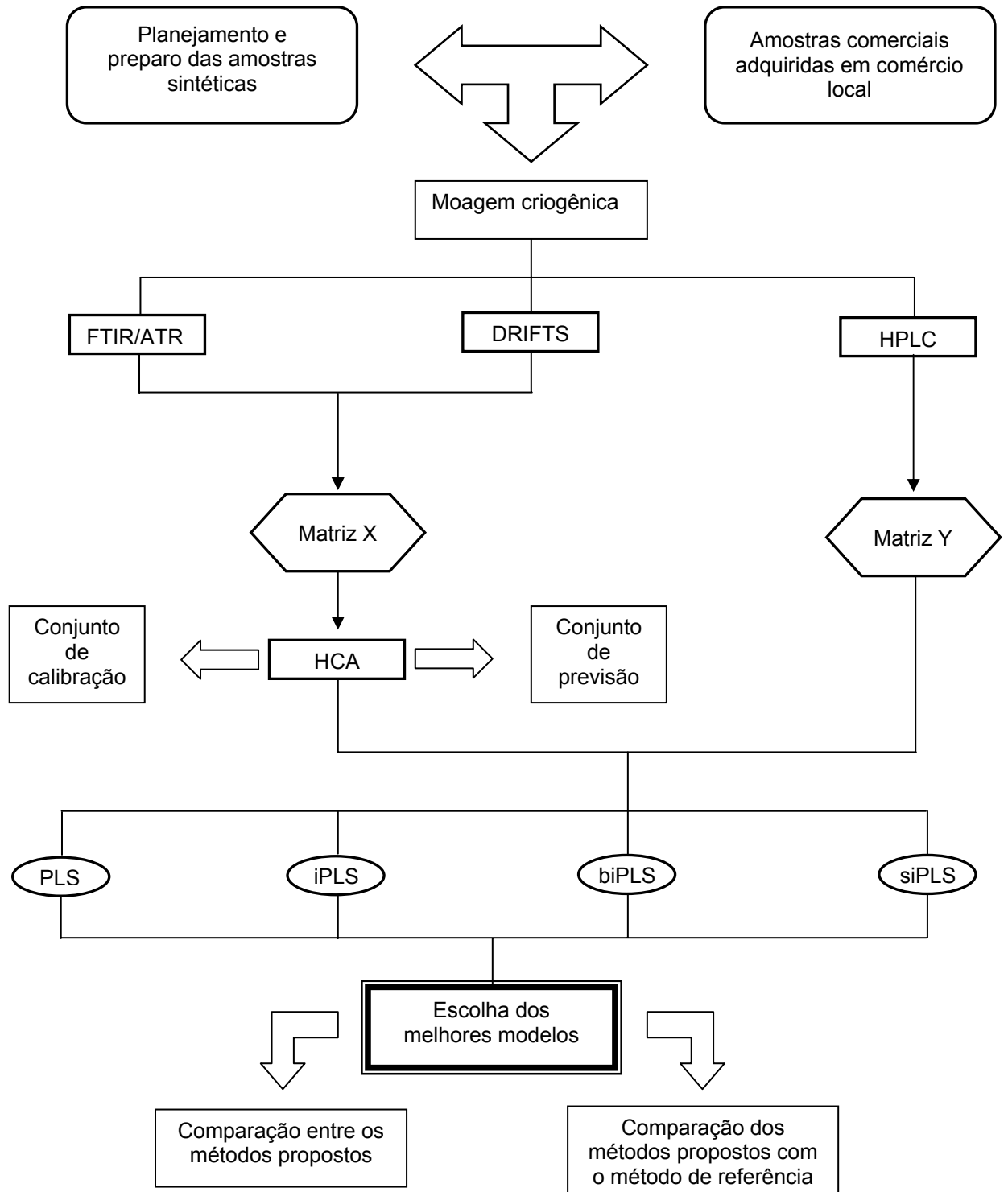


Figura 13. Fluxograma das etapas desenvolvidas na determinação de AC e AMO por FTIR/ATR e DRIFTS.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. Características gerais dos fármacos AC e AMO

A determinação simultânea de medicamentos contendo a associação dos fármacos AC e AMO foi realizada através da cromatografia a líquido de alta eficiência, segundo a metodologia descrita na monografia da Farmacopéia Norte Americana.¹⁰⁶ As diversas formulações utilizadas neste estudo foram quantificadas por esta técnica, inclusive os padrões sintéticos.

Os espectros no infravermelho médio, por reflexão total atenuada e reflexão difusa, dos fármacos AC e AMO estão apresentados nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

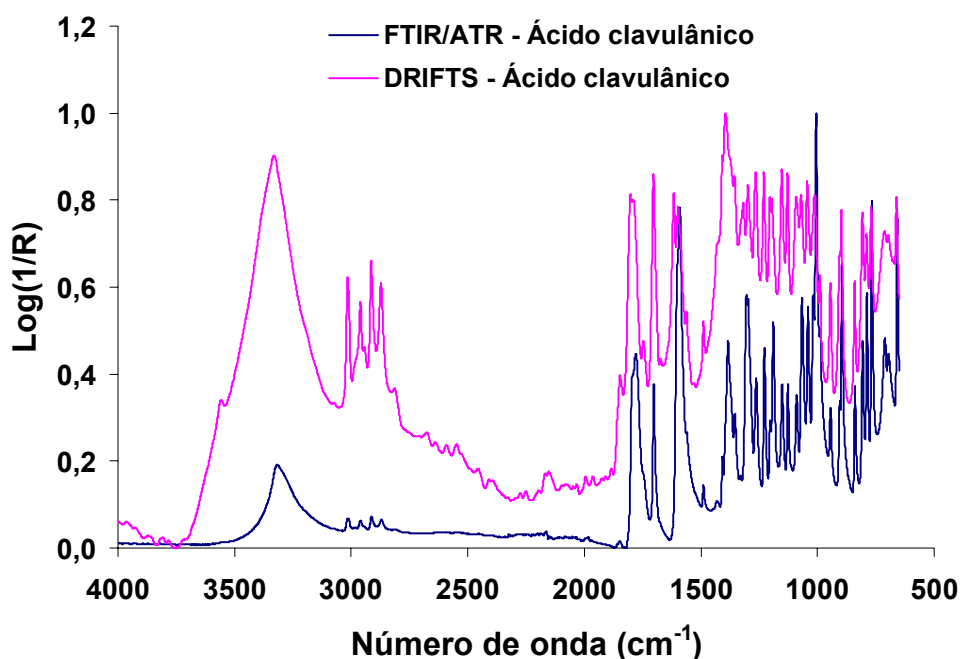


Figura 14. Espectros no infravermelho médio do fármaco AC por reflexão total atenuada e reflexão difusa.

¹⁰⁶ United States Pharmacopoeia, USP 31 – NF 26: the official compendia of standards. Rockville (2007).

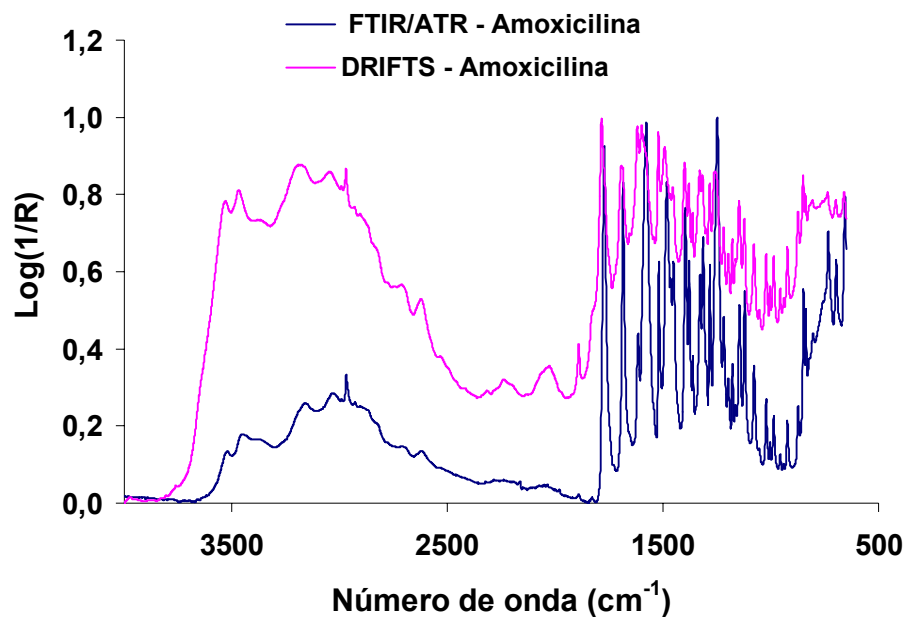


Figura 15. Espectros no infravermelho médio do fármaco AMO por reflexão total atenuada e reflexão difusa.

Pode-se observar que os espectros adquiridos por FTIR/ATR e DRIFTS apresentam perfis de absorção muito semelhantes, tanto para o fármaco AC como para o AMO, embora com intensidades diferentes. Estas características são de suma importância, pois possibilitam que estas técnicas, juntamente com métodos de calibração multivariada e seleção de variáveis, sejam utilizadas na determinação de associações de fármacos de forma simultânea, mesmo na ocorrência de sobreposição espectral.

A partir da análise da composição das formulações farmacêuticas, declarada pelos laboratórios fabricantes, determinou-se quais excipientes seriam utilizados na confecção das amostras sintéticas. As informações contidas nestes excipientes foram importantes para a construção de modelos que apresentem características mais próximas possíveis com as amostras que serão previstas e para construção de modelos robustos.

Optou-se pela moagem criogênica como procedimento para homogeneização e uniformização do tamanho de partícula das amostras comerciais e sintéticas. A variação do tamanho de partícula em amostras que são submetidas à análise por técnicas de reflexão pode causar alteração no espectro, podendo provocar o

deslocamento da linha base. Esse comportamento torna-se mais pronunciado em comprimentos de onda nos quais a radiação sofre grande absorção pela amostra.²⁸

A seguir, serão apresentados os critérios utilizados para a escolha do conjunto de calibração e previsão e os parâmetros utilizados para o desenvolvimento e avaliação dos modelos de calibração para determinação dos fármacos AC e AMO presentes nas formulações sintéticas e comerciais, utilizando os algoritmos iPLS, siPLS e biPLS.

4.2. Conjunto de calibração e previsão: seleção das amostras

Segundo Sena *et al.* (2004),⁹¹ as amostras que contemplam o conjunto de calibração devem apresentar as mesmas informações das amostras que fazem parte do conjunto de previsão (amostras comerciais). Ou seja, a não inclusão de informações representativas no conjunto de calibração pode comprometer a capacidade de preditiva do modelo de calibração.

Em um primeiro momento, utilizou-se o algoritmo *Kennard-Stone*⁵⁶ para selecionar as amostras do conjunto de calibração e previsão. Foram obtidos conjuntos de calibração e previsão compostos por 25 e 10 amostras, respectivamente. Porém, após a construção dos modelos globais com diferentes pré-processamentos e tratamento foram obtidos valores de RMSEP três vezes superior aos valores de RMSECV.

Como os resultados para os modelos obtidos com as amostras selecionadas pelo algoritmo *Kennard-Stone* não atenderam as expectativas, utilizou-se HCA para a seleção dos conjuntos de calibração e previsão. A HCA gerou um dendrograma (Figura 16) a partir do qual foram selecionadas as amostras de calibração e previsão.

²⁸ Cordeiro, G. A., Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2006.

⁹¹ Sena, M. M. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 743-749.

⁵⁶ Kennard, R. W.; Stone, L. A.; *Technometrics* 11 (1969) 137-148.

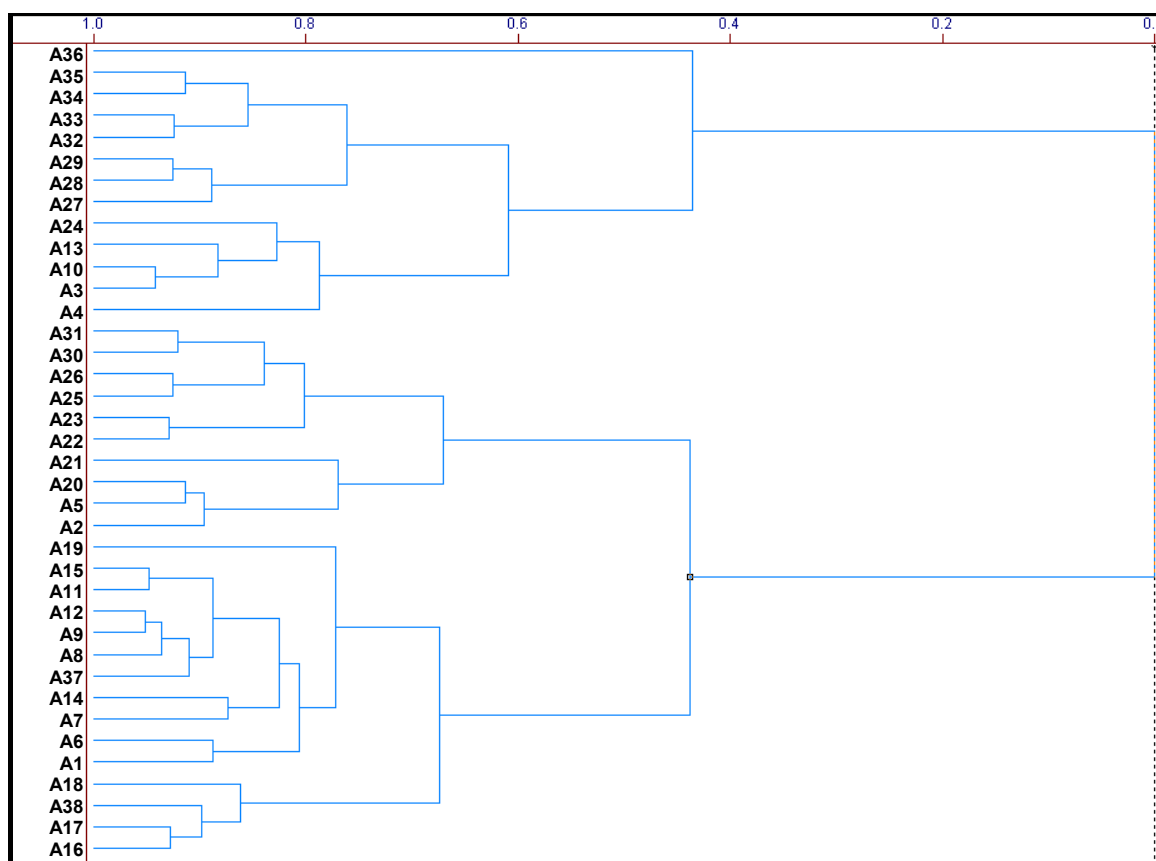


Figura 16. Dendrograma fornecido pela HCA, para a seleção das amostras dos conjuntos de calibração e previsão.

Outro critério utilizado para seleção das amostras para os conjuntos de calibração e previsão foi a análise da informação contida na variável Y, referente às determinações do teor dos fármacos por HPLC. Dessa forma, levando em consideração estes fatores (HCA e teor dos fármacos) as amostras sintéticas e comerciais foram distribuídas entre o conjunto de calibração e previsão de forma a garantir a maior variabilidade possível tanto no primeiro como no segundo conjunto.

Assim, os conjuntos de calibração e previsão ficaram compostos por 28 e 10 amostras, respectivamente. A distribuição das concentrações das amostras de calibração e de previsão para a quantificação dos fármacos AC e AMO encontra-se representada nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

Iñon *et al.* (2003)⁵⁴ utilizaram, também, a HCA para seleção das amostras do conjunto de calibração e de previsão na determinação da acidez em óleo de oliva a partir dos espectros obtidos FTIR/ATR. Segundo os autores a aplicação da HCA na seleção das amostras do conjunto de calibração permite incluir dentro do modelo a

⁵⁴ Iñon, F. A. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 489 (2003) 59-75.

representação completa das amostras consideradas. Além disso, se a análise por agrupamento é realizada em conjunto com uma nova amostra desconhecida, é possível observar graficamente se o conjunto de calibração é representativo ou não para esta nova amostra.

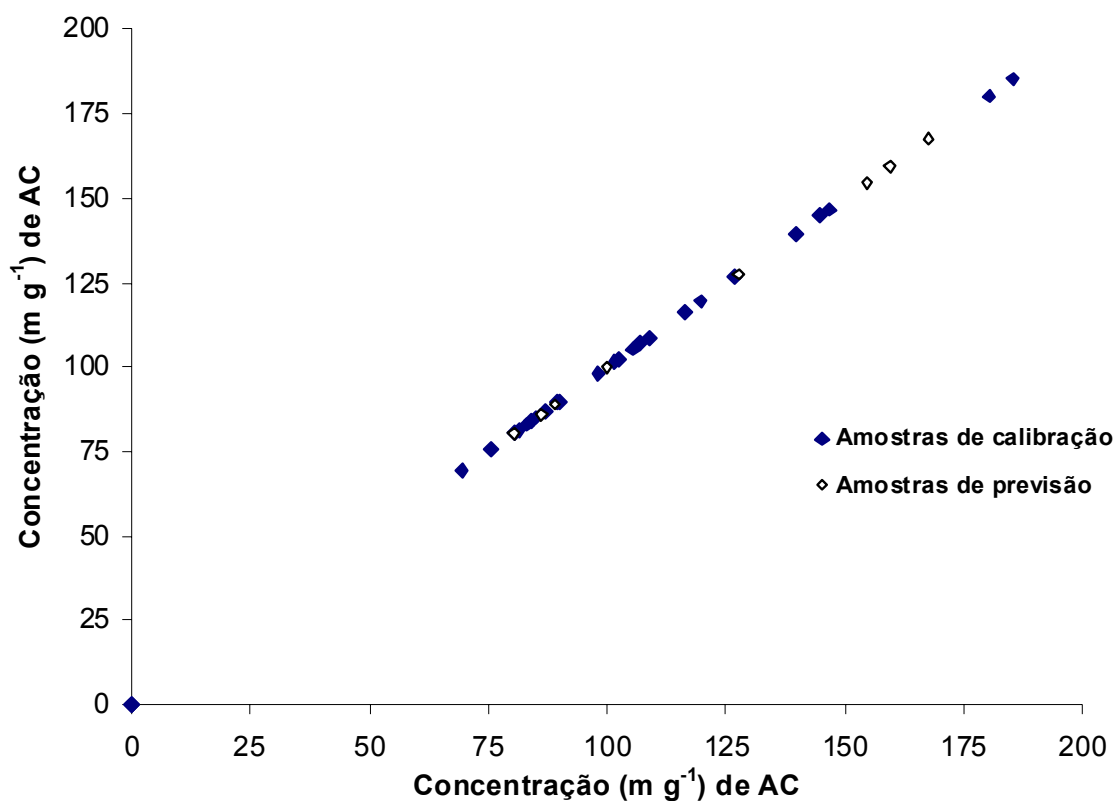


Figura 17. Distribuição das amostras de calibração e previsão para quantificação do fármaco AC.

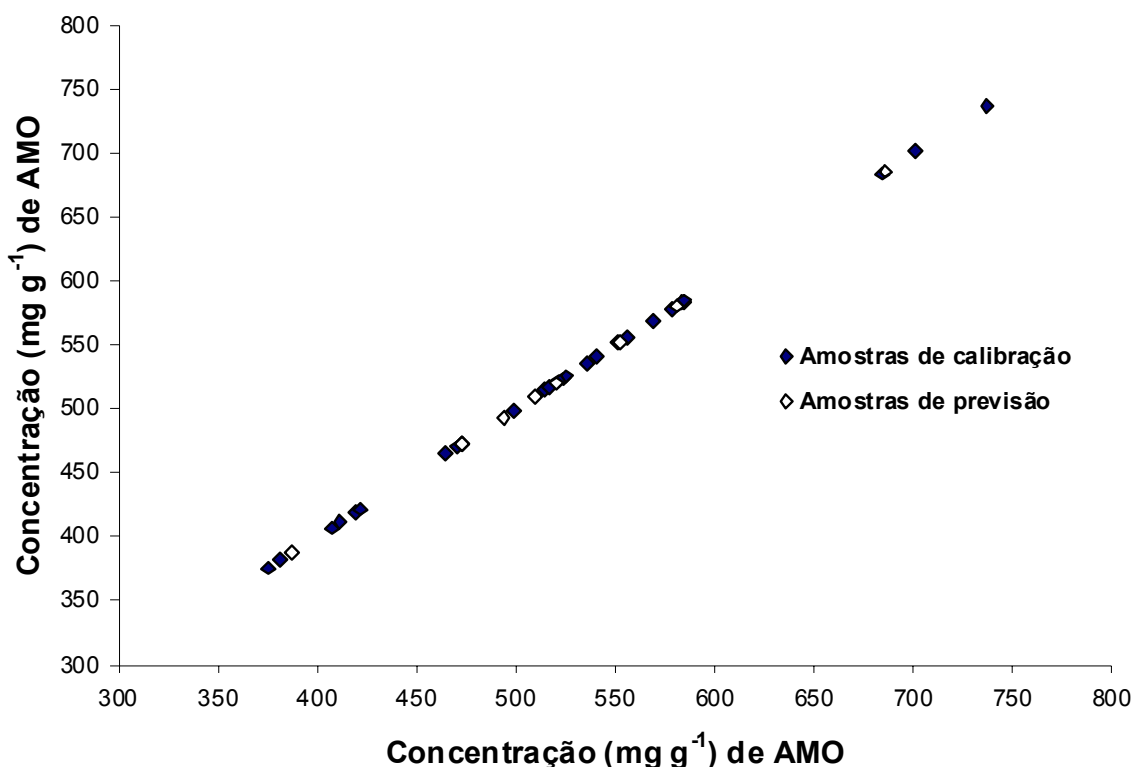


Figura 18. Distribuição das amostras de calibração e previsão para quantificação do fármaco AMO.

4.3. Identificação de amostras anômalas

A análise para identificação de amostras anômalas (*outliers*) tem o objetivo de eliminar amostras com comportamento muito diferente das demais amostras do conjunto de dados. A presença de amostras anômalas pode fazer com que o modelo de calibração apresente uma baixa capacidade de previsão com altos valores de erro. Quando presentes no conjunto de previsão podem levar a resultados que indicam que o modelo não é adequado ou que a sua capacidade é inferior à que poderia ser apresentada na ausência destas amostras anômalas.

Deste modo, a identificação de amostras anômalas no conjunto de calibração e previsão foi realizada com base nos valores de resíduos espectrais não modelados.⁶⁴ Após a exclusão das amostras anômalas (2 amostras do conjunto de previsão) os conjuntos de calibração e previsão ficaram constituídos de 28 e 8 amostras, respectivamente.

⁶⁴ Martens, H.; Naes, T.; Multivariate Calibration, Wiley, Chichester (1989) 419 p.

4.4. Determinação do número de variáveis latentes utilizados na construção dos modelos.

A escolha do número de variáveis latentes é baseada na avaliação da magnitude dos erros de previsão dos modelos de calibração utilizando-se a validação cruzada.¹⁶ Neste trabalho foi empregada a validação cruzada por exclusão de uma amostra por vez. Este método consiste em:

- a) Remover uma amostra por vez e construir novamente o modelo de calibração com as amostras restantes;
- b) Utilizar o modelo assim construído para prever as amostras removidas.

Geralmente, os valores de RMSECV atingem um mínimo, correspondendo ao número ideal de variáveis latentes. Uma vez obtido o número ótimo de variáveis latentes, geralmente, a adição de mais variáveis latentes não promove a diminuição significativa dos valores de RMSECV. Em alguns casos um aumento do RMSECV pode ser observado com a adição de variáveis latentes além do número ótimo. Este aumento pode corresponder à incorporação de informações não significativas (ruídos) ao modelo. Assim, a avaliação do valor de RMSECV pode ser útil na determinação do número de variáveis latentes ideais na construção de um modelo de regressão multivariado.

No presente trabalho, adotou-se como procedimento para escolha do número de variáveis latentes a análise do menor RMSECV, conforme recomenda o pacote iToolbox.⁷³ Pode-se observar como exemplo do procedimento adotado para determinação do número ideal de variáveis latentes a Figura 19, onde o RMSECV atinge um estado de mínimo local ou platô.

¹⁶ Brereton, R. G., *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.

⁷³ Norgaard, L. *et al.*, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 413-419.

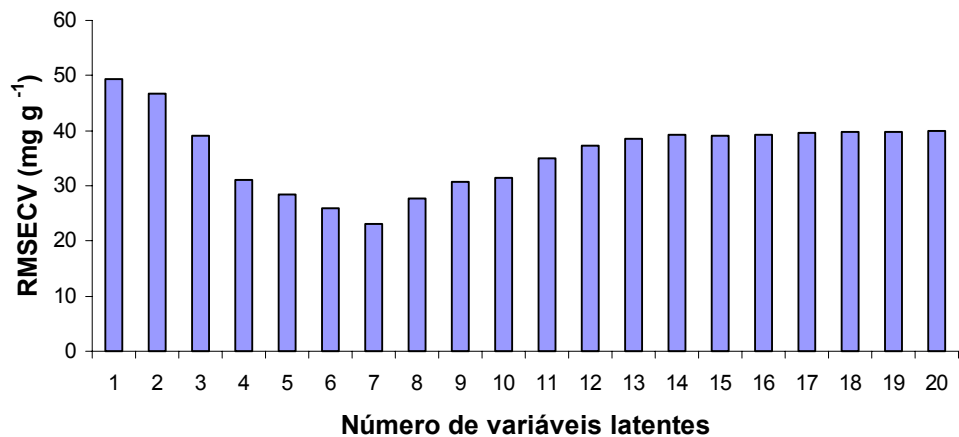


Figura 19. Gráfico utilizado para a seleção das VLs em função do RMSECV. Comportamento do “mínimo local”. Valores de RMSECV para AC utilizando PLS.

Com base no gráfico acima, o algoritmo determina 7 VLs, pois não há mais redução do RMSECV em relação ao valor de RMSECV da variável latente posterior. Porém, em muitas situações, o número de VLs pode apresentar uma evolução monotônica a partir de determinadas variáveis latentes como pode-se verificar na Figura 20.

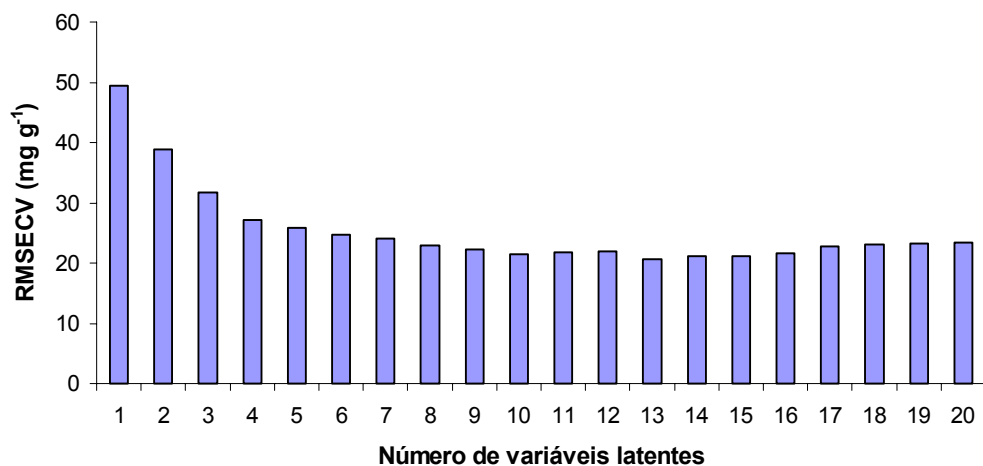


Figura 20. Gráfico utilizado para a seleção das VLs em função do RMSECV. Comportamento monotônico. Valores de RMSECV para AC utilizando PLS.

Neste caso, ao invés de utilizar 10 VLs, como indicado pelo pacote iToolbox,⁷³ pode-se utilizar 8 ou 9 VLs, tendo em vista que os valores de RMSECV não apresentam diferença significativa entre si.

A partir da avaliação destes critérios, adotou-se, para avaliação da dimensionalidade do modelo, o menor número de variáveis latentes que produz um valor de RMSECV na mesma ordem de grandeza que o sugerido pelos algoritmos de seleção de variáveis aplicados (iPLS, biPLS e siPLS).

4.5. Otimização do modelo global para os diferentes tipos de dados adquiridos (FTIR/ATR e DRIFTS)

Primeiramente foram obtidos modelos utilizando o método de regressão PLS. Estes modelos foram construídos com as informações de todos os números de onda dos espectros obtidos por FTIR/ATR e DRIFTS denominados de modelos PLS globais. Avaliou-se, também, o desempenho dos diferentes pré-processamentos, autoescalado e centrado na média, e do tratamento para correção do espalhamento de luz (MSC)⁴⁵ na construção dos modelos. Para facilitar a visualização dos resultados nas tabelas, optou-se pela utilização de siglas: MSC para correção do espalhamento de luz, a letra A para autoescalado e a letra M para centrado na média.

4.5.1. Modelos globais para AC e AMO utilizando dados FTIR/ATR

Os modelos para o fármaco AC foram construídos utilizando os pré-processamentos autoescalado e centrado na média, isoladamente ou combinados com o tratamento MSC. A partir da construção dos quatro modelos para cada fármaco, foram obtidos os valores de RMSEP, VLs e R_{cal} conforme apresentado na Tabela 8.

⁷³ Norgaard, L. *et al.*, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 413-419.

⁴⁵ Geladi, P.; MacDougall, D.; Martens, H., *Appl. Spectrosc.* 39 (1985) 491-500.

Tabela 8. Resultados dos modelos globais obtidos para o fármaco AC por FTIR/ATR.

Modelo	TV ^a	Intervalo	VLs ^b	R _{cal}	RMSEP (mg g ⁻¹)
PLS (M)	3351	Todos	9	0,9874	25,02
PLS (A)	3351	Todos	6	0,9746	26,54
PLS (MSC e A)	3351	Todos	11	0,9572	17,64
PLS (MSC e M)	3351	Todos	8	0,9886	18,00

^a TV: número total de variáveis^b VLs: variáveis latentes

Através da Tabela 8, observa-se que os modelos que utilizaram o tratamento MSC apresentaram os menores valores de RMSEP. Segundo Gempeline⁴⁶ o tratamento MSC tem por objetivo a correção do efeito de espalhamento de luz causado pela diferença do tamanho de partículas da amostra, dessa forma, havendo uma melhora na linha base.

Com relação ao pré-processamento, analisando-se os valores de RMSEP obtidos para os modelos que utilizaram os dados autoescalado e centrado na média, não se observou diferença significativa entre os mesmos (teste F, 95% de confiança). Porém, optou-se pelo modelo que utiliza os dados centrado na média, visto que este emprega menor número de variáveis latentes e apresenta melhor coeficiente de correlação para calibração.

Na Tabela 9 são apresentados os valores para os modelos PLS globais construídos a partir dos dados adquiridos por FTIR/ATR para o fármaco AMO.

Da mesma forma que para o fármaco AC, os modelos obtidos para AMO utilizando tratamento MSC apresentaram os menores valores de RMSEP. Não se observou diferença significativa (teste F, 95% de confiança) entre os modelos que utilizam os dados centrados na média ou autoescalados. Deste modo, optou-se em utilizar o modelo com os dados centrados na média, já que este também foi o pré-processamento utilizado para o fármaco AC.

⁴⁶ Gemperline, P.; *Practical guide to chemometrics*, 2nd ed.; CRC Press Taylor & Francis, New York (2006) 105-160.

Tabela 9. Resultados dos modelos globais obtidos para o fármaco AMO por FTIR/ATR.

Modelo	TV ^a	Intervalo	VLs ^b	R _{cal}	RMSEP (mg g ⁻¹)
PLS (M)	3351	Todos	6	0,9374	41,23
PLS (A)	3351	Todos	4	0,9000	42,05
PLS (MSC e A)	3351	Todos	6	0,9572	38,16
PLS (MSC e M)	3351	Todos	7	0,9671	39,60

^a TV: número total de variáveis^b VLs: variáveis latentes

Os modelos posteriormente criados para os fármacos AC e AMO, utilizando dados FTIR/ATR, empregaram o pré-processamento dos dados centrados na média e o tratamento de correção do espalhamento de luz.

De maneira semelhante, Silva *et al.* (2009),⁹⁴ obtiveram os menores valores de RMSEP, utilizando o MSC na determinação de sulfametoxazol e trimetoprima em formulações farmacêuticas a partir de espectros adquiridos por FTIR/ATR. Os autores também não observaram diferenças significativas ao utilizar os dados autoescalados ou centrados na média.

4.5.2. Modelos globais para AC e AMO utilizando dados DRIFTS

Para a obtenção dos modelos PLS globais, os dados obtidos por DRIFTS foram, também, modelados utilizando PLS, toda a faixa espectral, dados autoescalados ou centrados na média e MSC. A Tabela 10 apresenta os resultados dos quatro modelos PLS globais obtidos para AC, para os dados obtidos por DRIFTS.

Assim como Rosa *et al.* (2008),⁸⁹ encontraram menores valores de erros de previsão quando utilizaram tratamento MSC e pré-processamento dos dados centrados na média para a determinação de ranitidina em produtos farmacêuticos

⁹⁴ Silva, F. E. B. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 800-805.

⁸⁹ Rosa, S. S. *et al.*, *Talanta* 75 (2008) 725-733.

utilizando espectroscopia por reflexão difusa no infravermelho próximo, o modelo para a determinação do fármaco AC por DRIFTS que utilizou este mesmo tratamento e pré-processamento foi escolhido como sendo o melhor modelo PLS global. Este modelo apresentou menor RMSEP e utilizou menor número de VLs na sua construção, quando comparado com o modelo que utiliza somente o pré-processamento autoescalado.

Tabela 10. Resultados dos modelos globais obtidos para o fármaco AC por DRIFTS.

Modelo	TV ^a	Intervalo	VLs ^b	R _{cal}	RMSEP (mg g ⁻¹)
PLS (M)	3351	Todos	5	0,9578	21,56
PLS (A)	3351	Todos	6	0,9759	14,36
PLS (MSC e A)	3351	Todos	3	0,9329	24,22
PLS (MSC e M)	3351	Todos	4	0,9470	14,14

^a TV: número total de variáveis

^b VLs: variáveis latentes

Na Tabela 11 é possível observar os resultados dos modelos obtidos para os dados adquiridos por DRIFTS para o fármaco AMO. Os modelos que utilizaram o MSC apresentaram menores valores de RMSEP. Além disso, a partir do teste F (95% de confiança) não foi possível observar diferença significativa entre os modelos que empregaram os pré-processamentos autoescalado e centrado na média. Deste modo, optou-se em utilizar o modelo com os dados centrados na média, visto que este foi, também, o pré-processamento utilizado para o fármaco AC.

Tabela 11. Resultados dos modelos globais obtidos para o fármaco AMO por DRIFTS.

Modelo	TV ^a	Intervalo	VLS ^b	R _{cal}	RMSEP (mg g ⁻¹)
PLS (M)	3351	Todos	9	0,9922	47,71
PLS (A)	3351	Todos	10	0,9946	47,36
PLS (MSC e A)	3351	Todos	9	0,9932	42,68
PLS (MSC e M)	3351	Todos	9	0,9926	41,97

^a TV: número total de variáveis^b VLS: variáveis latentes

Após a análise dos modelos PLS globais obtidos, para os dados adquiridos por FTIR/ATR e DRIFTS, verificou-se que o pré-processamento centrado na média e o tratamento MSC apresentaram os melhores resultados. Assim, os modelos utilizando os algoritmos iPLS, biPLS e siPLS foram construídos aplicando-se este tratamento e pré-processamento nos dados espectrais.

4.6. Determinação do fármaco AC por FTIR/ATR utilizando os métodos de seleção de variáveis

Na construção dos modelos para determinação do fármaco AC por FTIR/ATR utilizaram-se previamente os algoritmos iPLS, biPLS e siPLS. Dessa forma, foi possível a seleção de regiões do espectro que apresentam informações relevantes e que melhor estão correlacionadas com a concentração deste fármaco nas formulações farmacêuticas utilizadas, possibilitando uma minimização dos erros frente ao modelo global.

4.6.1. Modelos iPLS

O algoritmo iPLS tem como princípio a divisão do espectro em sub-regiões eqüidistantes e a partir destas construir modelos para cada intervalo. Utilizando o

tratamento MSC e o pré-processamento com os dados centrados na média, os espectros adquiridos por FTIR/ATR foram divididos em 10, 20, 30, 40 e 50 intervalos. Os modelos obtidos foram avaliados em função dos valores de RMSEP, R_{cal} , VLs e totais de variáveis (TV) conforme apresentado na Tabela 12.

Tabela 12. Resultados dos modelos iPLS obtidos para o fármaco AC por FTIR/ATR.

Modelo	TV ^a	Intervalo	VLs ^b	R_{cal}	RMSEP (mg g ⁻¹)
PLS	3351	Todos	8	0,9886	18,00
iPLS10	335	9	3	0,9284	24,38
iPLS20	168	19	3	0,9263	10,99
iPLS30	112	30	5	0,9660	21,99
iPLS40	84	40	6	0,9716	20,87
iPLS50	66	43	2	0,9085	18,90

^a TV: número total de variáveis

^b VLs: variáveis latentes

Os dois modelos que apresentaram menor RMSEP, iPLS20 (20 intervalos) e iPLS50 (50 intervalos), possuem erros de previsão sem diferença significativa de acordo com teste F (95% de confiança). Apesar de possuir menor RMSEP o modelo iPLS20 apresentou baixo valor no coeficiente de correlação em relação ao modelo global, não sendo apropriado, desta forma, para quantificação do fármaco AC nas formulações farmacêuticas. Todavia, este modelo utilizou o intervalo 19, conforme mostrado na Figura 21, que corresponde à região entre 818 a 986 cm⁻¹ onde ocorre absorção correspondente à ligação =C-H (deformação angular fora do plano da ligação C=C-H) presente na estrutura molecular do fármaco AC.⁵

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

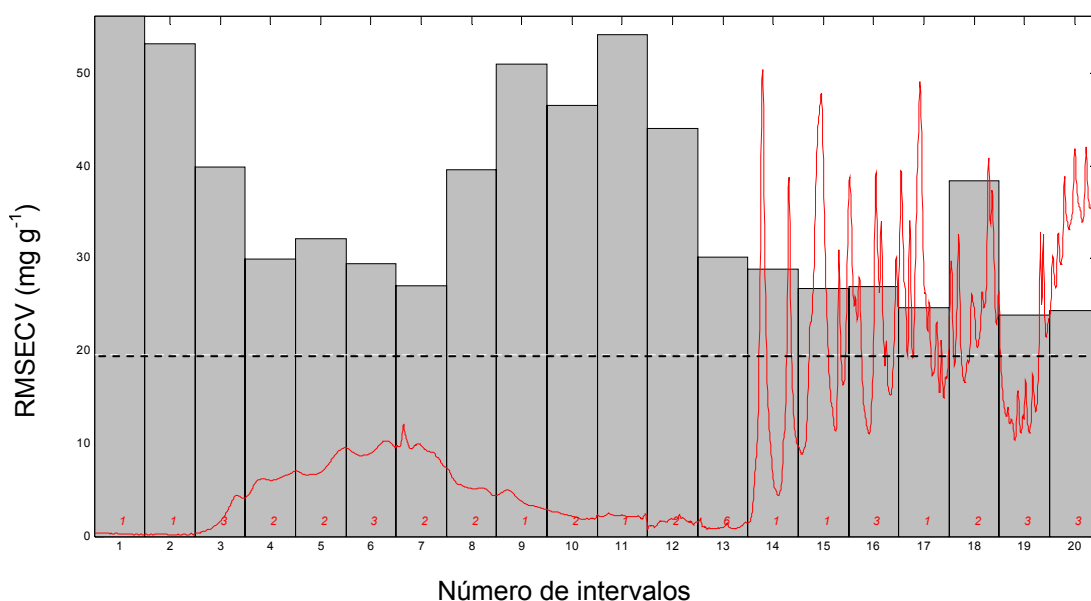


Figura 21. Espectro dividido em 20 intervalos para a determinação do fármaco AC por FTIR/ATR. As barras correspondem aos valores de RMSECV para cada intervalo e a linha tracejada para o modelo global. Os números internos apresentados no interior de cada intervalo correspondem às variáveis latentes.

4.6.2. Modelos siPLS

Para a construção dos modelos siPLS, os espectros foram divididos em 10, 20, 30, 40 e 50 intervalos com combinações de 2 e 3 intervalos. Os espectros divididos em 10 intervalos, além das combinações anteriores apresentaram, também, combinações de 4 intervalos. Já para os espectros divididos em 50 intervalos obtiveram-se modelos com combinações somente de 2 intervalos.

Na Tabela 13 observa-se os resultados dos modelos obtidos por siPLS para o fármaco AC. Os quatro melhores modelos, si2PLS10 (10 intervalos, com 2 intervalos combinados), si4PLS10 (10 intervalos, com 4 intervalos combinados), si2PLS40 (40 intervalos, com 2 intervalos combinados) e si2PLS50 (50 intervalos, com 2 intervalos combinados), não apresentaram diferença significativa (teste F, limite de confiança de 95%) entre os valores de RMSEP.

O modelo si2PLS40 apresentou coeficiente de correlação equivalente e menor erro de previsão quando comparado ao modelo PLS global. Neste modelo foram utilizados os intervalos 13 e 29 correspondentes as regiões entre 2918 a 3002

cm^{-1} e 1574 a 1658 cm^{-1} , respectivamente. No intervalo 13 a absorção é devido à ligação C-H do grupamento $-\text{CH}_2$ (estiramento assimétrico) provavelmente relacionada ao anel β -lactâmico presente no fármaco AC, enquanto o intervalo 29 refere-se à absorção da radiação infravermelha referente ao estiramento da ligação C=C, possivelmente, do alqueno presente na estrutura do fármaco AC.⁵

Tabela 13. Resultados dos modelos siPLS obtidos para o fármaco AC por FTIR/ATR.

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLs ^b	R _{cal}	RMSEP (mg g ⁻¹)
PLS	3351	Todos	8	0,9886	18,00
si2PLS10	670	4, 10	5	0,9673	13,41
si3PLS10	1005	3, 4, 7	6	0,9724	35,85
si4PLS10	1340	2, 4, 5, 9	8	0,9894	17,76
si2PLS20	336	2, 20	7	0,9916	23,70
si3PLS20	504	2, 9, 20	9	0,9943	25,35
si2PLS30	224	3, 30	7	0,9890	27,74
si3PLS30	336	6, 10, 21	5	0,9704	34,04
si2PLS40	168	13, 29	4	0,9548	12,13
si3PLS40	252	4, 39, 40	7	0,9910	22,58
si2PLS50	132	17, 44	5	0,9630	17,55

^a TV: número total de variáveis

^b VLs: variáveis latentes

Quando os valores de RMSEP do modelo PLS global foi comparado com os valores de RMSEP obtidos para os melhores modelos utilizando os algoritmos iPLS e siPLS, não se observou melhora significativa destes, justificando a utilização de um terceiro algoritmo de seleção de variáveis, o biPLS.

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

4.6.3. Modelo biPLS

Na construção dos modelos utilizando o algoritmo biPLS dividiu-se, também, o espectro em 10, 20, 30, 40 e 50 intervalos. Com este algoritmo, o espectro é dividido em intervalos e aquelas regiões não relevantes são excluídas do espectro e um novo modelo é construído agora sem as mesmas.⁶¹ A Tabela 14 apresenta os resultados dos modelos obtidos utilizando biPLS, para determinação do fármaco AC por FTIR/ATR.

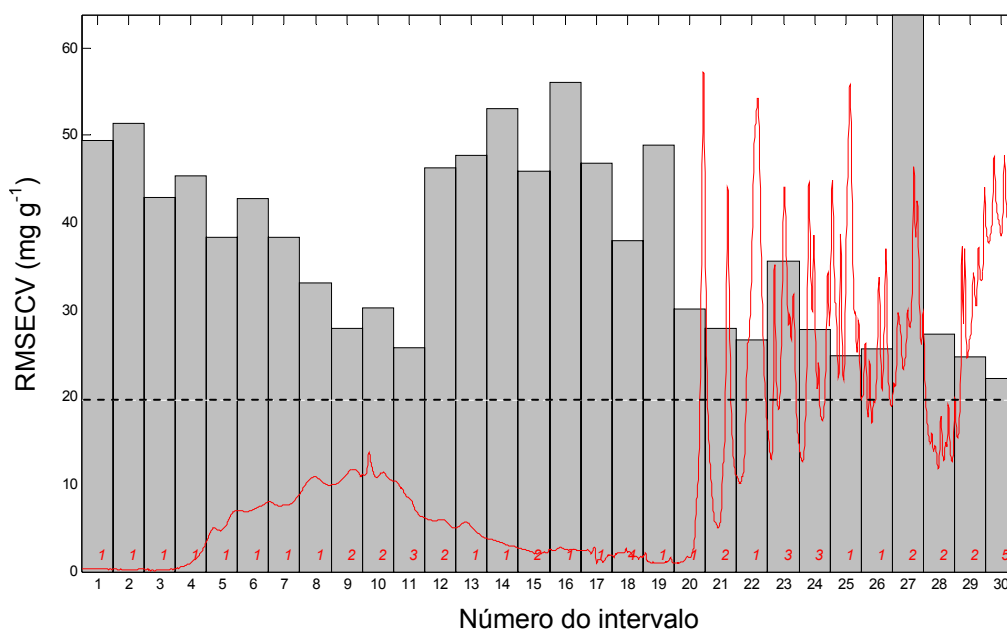
O melhor modelo, utilizando biPLS, apresentou RMSEC de 8,78 mg g⁻¹ e RMSECV de 16,05 mg g⁻¹. Este modelo dividiu o espectro em 30 intervalos (Figura 22) sendo selecionados os intervalos 10, 21, 23 e 27. O modelo apresentou RMSEP com diferença significativa (teste F, 95% de confiança) quando comparado com o modelo PLS global. Também se observou uma redução no número de variáveis envolvidas na construção do modelo, com a conseqüente eliminação das regiões não correlacionadas com a concentração do fármaco AC.

A Figura 23 mostra os valores do fármaco AC obtidos por HPLC *versus* valores previstos para o modelo biPLS utilizando os intervalos 10, 21, 23 e 27 por FTIR/ATR.

⁶¹ Leardi, R.; Norgaard, L., *J. Chemom.* 18 (2004) 486-497.

Tabela 14. Resultados dos modelos biPLS obtidos para o fármaco AC por FTIR/ATR.

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLS ^b	R _{cal}	RMSEP (mg g ⁻¹)
PLS	3351	Todos	8	0,9886	18,00
biPLS10	1675	2, 4, 5, 6, 7	6	0,9743	29,23
biPLS20	671	2, 7, 9, 18	11	0,9933	24,91
biPLS30	446	10, 21, 23, 27	8	0,9838	6,17
biPLS40	503	6, 13, 18, 19, 28, 36	8	0,9836	29,36
biPLS50	469	5, 6, 8, 17, 23, 35, 45	7	0,9809	23,51

^a TV: número total de variáveis^b VLS: variáveis latentes**Figura 22.** Espectro dividido em 30 intervalos para a determinação do fármaco AC por FTIR/ATR. As barras correspondem aos valores de RMSECV para cada intervalo e a linha tracejada para o modelo global. Os números internos apresentados no interior de cada intervalo correspondem às variáveis latentes.

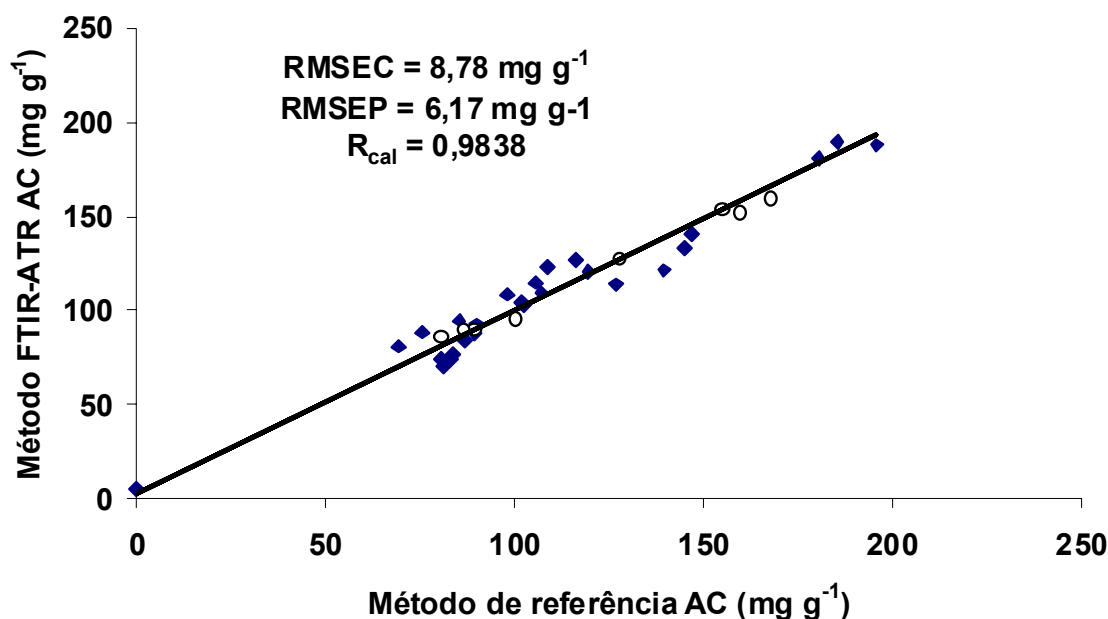


Figura 23. Valores de referência *versus* valores previstos para o modelo biPLS30 do fármaco AC utilizando os intervalos 10, 21, 23 e 27 por FTIR/ATR.

A Tabela 15 apresenta os intervalos selecionados para a determinação do fármaco AC por FTIR/ATR e as vibrações, provavelmente, correspondentes à estrutura deste fármaco.

Tabela 15. Intervalos e vibrações correspondentes à determinação do fármaco AC por FTIR/ATR.⁵

Intervalo	Número de onda (cm ⁻¹)	Vibração
10	2890 a 3002	Estiramento simétrico -CH ₂
21	1658 a 1770	Estiramento C=C
23	1434 a 1546	Deformação angular da ligação =C-H, no plano da ligação C=C
27	986 a 1098	Deformação angular da ligação =C-H, fora do plano da ligação C=C

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

O estiramento simétrico $-\text{CH}_2$ corresponde, provavelmente, a ligação dos H ligados ao C do anel β -lactâmico presente na estrutura do fármaco AC. A absorção da radiação infravermelha referente à ligação C=C, bem como a absorção da ligação =C-H referente às deformações angulares no plano e fora do plano das ligações do H ao C da dupla ligação C=C correspondem, possivelmente, as estruturas presentes no fármaco AC.⁵

Na Figura 24 observa-se que os menores erros relativos na determinação do fármaco AC nas amostras de previsão são obtidos quando utilizado o modelo biPLS30. Para este modelo o erro relativo, avaliado para cada amostra individualmente, foi menor que aproximadamente 8%. Destaca-se que este erro pode não traduzir a real habilidade preditiva do modelo sendo mais apropriado, desta forma, avaliar os valores do erro padrão de predição relativo (RSEP). Assim, os modelos iPLS, siPLS e biPLs apresentaram erro padrão de predição relativo de 9,9; 9,8 e 3,6% respectivamente.

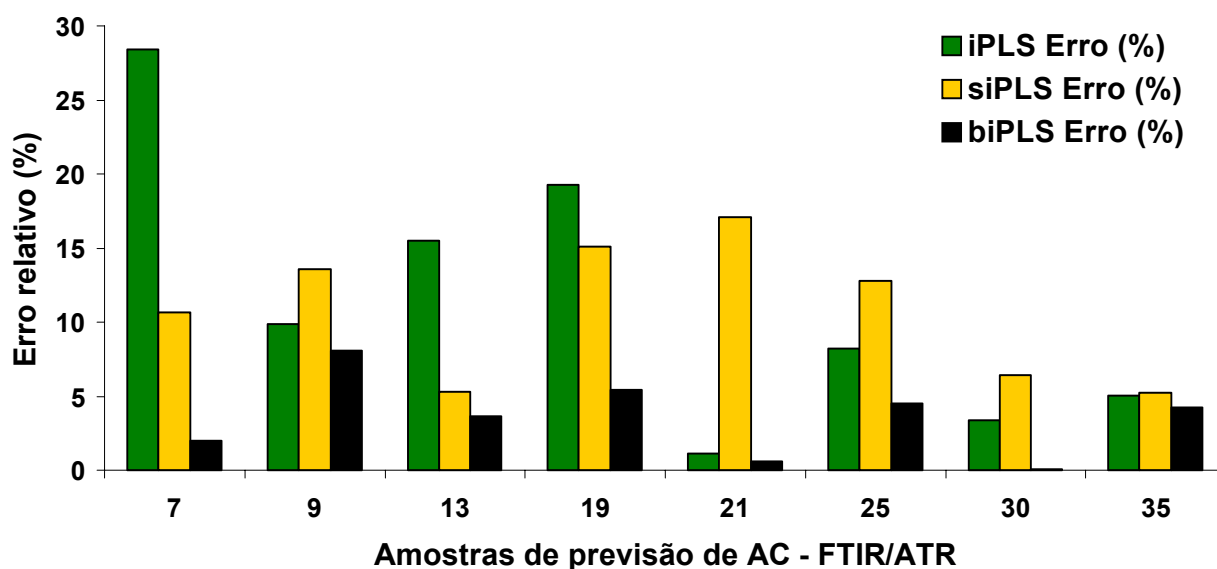


Figura 24. Comparação dos erros relativos dos melhores modelos (iPLS20, si2PLS40 e biPLS30) obtidos para cada uma das amostras de previsão na determinação do fármaco AC a partir de dados obtidos por FTIR/ATR.

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

Na Figura 25 é possível observar a boa concordância entre os valores de referência obtidos por HPLC e os valores previstos pelo modelo biPLS30 – FTIR/ATR.

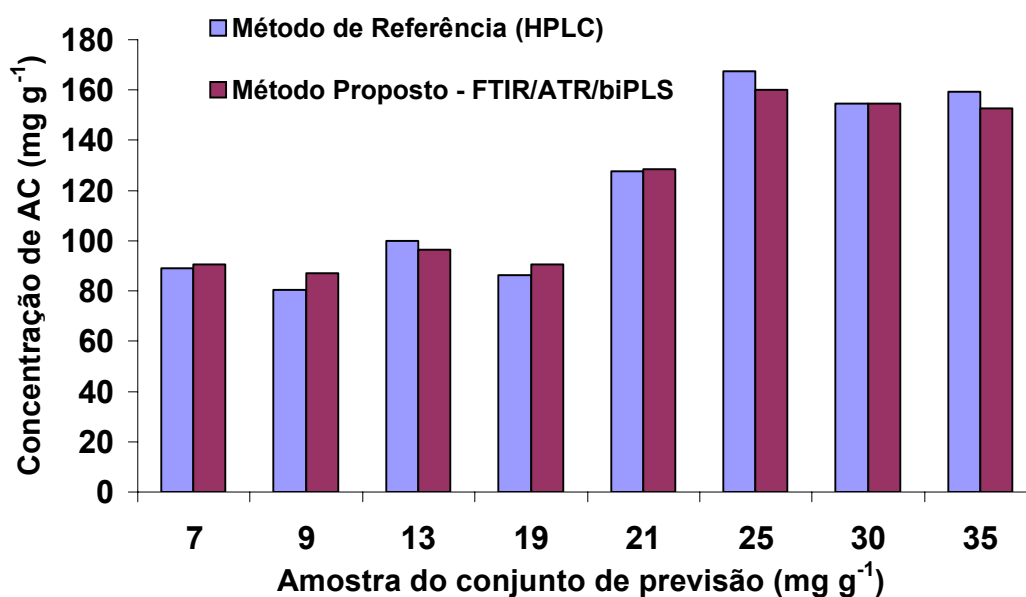


Figura 25. Histograma da diferença entre o valor de concentração do fármaco AC (mg g⁻¹) obtido pelo método de referência e o valor previsto pelo modelo biPLS30.

O erro sistemático incluso no modelo biPLS30 foi insignificante ($bias = 0,5176$ e $t_{sist} < t_{crit}$) evidenciando, dessa forma, que os valores de previsão não apresentam tendências.

Assim, o melhor modelo para determinação do fármaco AC por FTIR/ATR utiliza espectro dividido em 30 intervalos, dados centrados na média, correção do espalhamento de luz e regiões 2890 a 3002 cm⁻¹, 1658 a 1770 cm⁻¹, 1434 a 1546 cm⁻¹ e 986 a 1098 cm⁻¹.

4.7. Determinação do fármaco AMO por FTIR/ATR utilizando os métodos de seleção de variáveis

Da mesma forma que o procedimento adotado para a determinação do fármaco AC, a construção dos modelos para AMO por FTIR/ATR foi realizada a partir da utilização dos algoritmos de seleção de variáveis iPLS, biPLS e siPLS para a construção dos modelos e posterior comparação com o modelo PLS global. Por fim, os melhores modelos obtidos para cada um desses algoritmos de seleção de variáveis foram avaliados em função dos valores de RMSEP, R_{cal} e VLs.

4.7.1. Modelos iPLS

Utilizando o tratamento MSC e os dados centrados na média, os espectros adquiridos por FTIR/ATR foram divididos em 10, 20, 30, 40 e 50 intervalos. Os modelos obtidos foram avaliados em função dos valores RMSEP, R_{cal} e VLs, conforme apresentado na Tabela 16.

Tabela 16. Resultados dos modelos iPLS obtidos para o fármaco AMO por FTIR/ATR.

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLs ^b	R_{cal}	RMSEP (mg g ⁻¹)
PLS	3351	Todos	7	0,9671	39,60
iPLS10	335	9	3	0,8971	49,98
iPLS20	168	16	4	0,9192	57,78
iPLS30	112	26	5	0,9085	45,91
iPLS40	84	31	5	0,9324	49,16
iPLS50	66	41	4	0,8242	50,58

^a TV: número total de variáveis

^b VLs: variáveis latentes

O modelo que apresentou menor RMSEP, iPLS30 (30 intervalos), possui erro de previsão equivalente ao modelo PLS global e pior coeficiente de correlação, não sendo, dessa forma, apropriado para quantificação do fármaco AC nas formulações farmacêuticas. Contudo, este modelo utilizou o intervalo 26 que corresponde à região entre 1080 a 1210 cm^{-1} do espectro onde ocorre, possivelmente, absorção da ligação C-N (estiramento) presente no fármaco AMO, conforme Figura 26.⁵

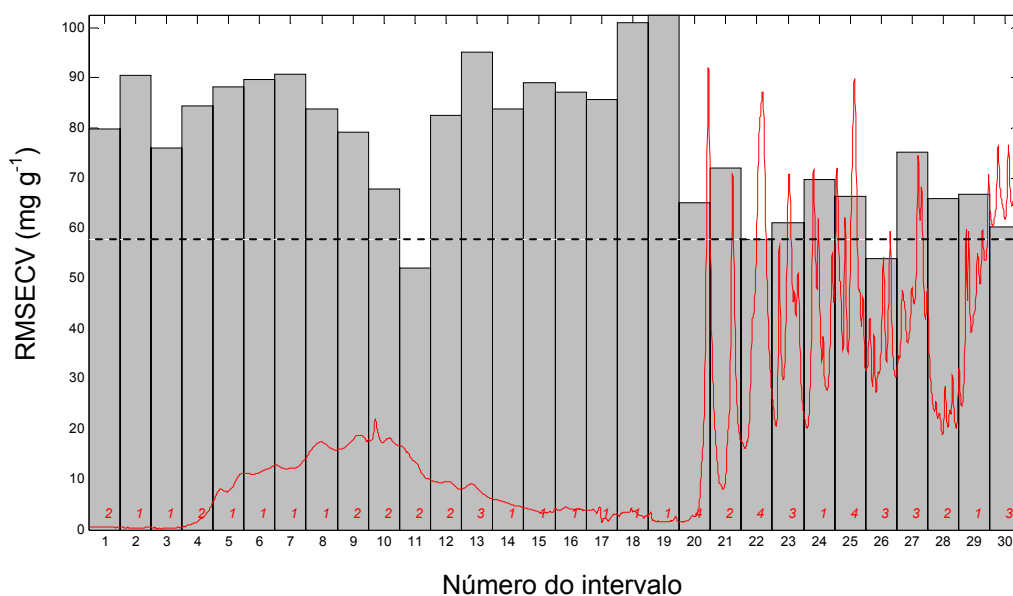


Figura 26. Espectro dividido em 30 intervalos para a determinação do fármaco AMO por FTIR/ATR. As barras correspondem aos valores de RMSECV para cada intervalo e a linha tracejada para o modelo global. Os números internos apresentados no interior de cada intervalo correspondem às variáveis latentes.

4.7.2. Modelos siPLS

O algoritmo siPLS foi utilizado, também, para a construção dos modelos de determinação do fármaco AMO nas formulações farmacêuticas. Os modelos si2PLS10 (espectro dividido em 10 intervalos e 2 intervalos combinados) e o modelo si2PLS30 (espectro dividido em 30 intervalos e 2 intervalos combinados) apresentaram RMSEP menor que o modelo PLS global e coeficientes de correlação

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

equivalentes. Também, não se observou diferença significativa (teste F, limite de confiança de 95%) nos valores de RMSEP destes dois modelos obtidos. No modelo si2PLS30, que apresentou RMSEP de 35,14 mg g⁻¹, foram utilizados os intervalos 11 e 26 correspondentes as regiões entre 1098 a 1210 cm⁻¹ e 1574 a 1658 cm⁻¹, respectivamente. No intervalo 11 a absorção é devida, possivelmente, ao estiramento da ligação C-N presente no anel β -lactâmico da estrutura do fármaco AMO, enquanto que no intervalo 26 a absorção é devida, provavelmente, à ligação NH₂ (deformação angular no plano), também presente em grupamentos da estrutura do fármaco AMO. A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos para os modelos siPLS do AMO.⁵

Tabela 17. Resultados dos modelos siPLS obtidos para o fármaco AMO por FTIR/ATR.

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLs ^b	R _{cal}	RMSEP (mg g ⁻¹)
PLS	3351	Todos	7	0,9671	39,60
si2PLS10	670	4, 10	6	0,9538	36,62
si3PLS10	1005	3, 4, 9	4	0,9274	43,16
si4PLS10	1340	3, 4, 5, 10	7	0,9661	53,81
si2PLS20	336	7, 11	8	0,9966	83,60
si3PLS20	504	7, 8, 11	7	0,9925	74,87
si2PLS30	224	11, 26	7	0,9659	35,14
si3PLS30	336	10, 11, 16	10	0,9987	79,79
si2PLS40	168	22, 31	10	0,9952	54,56
si3PLS40	252	21, 22, 31	12	0,9992	54,14
si2PLS50	132	12, 43	8	0,9677	55,69

^a TV: número total de variáveis

^b VLs: variáveis latentes

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

4.7.3. Modelos biPLS

Na determinação do fármaco AMO, utilizando o algoritmo biPLS, os espectros foram divididos, também, em 10, 20, 30, 40 e 50 intervalos. Observa-se que os modelos que foram divididos em 30, 40 e 50 intervalos apresentaram menores valores de RMSEP quando comparados com o modelo global, conforme apresentado na Tabela 18.

Não se observou diferença significativa (teste F, limite de confiança de 95%) entre os modelos que apresentaram menor RMSEP que o modelo PLS global. Optou-se, deste modo, pelo modelo biPLS50, por utilizar menor número de variáveis (268) e cujos intervalos selecionados foram 12, 35, 38, 42 (Figura 27). Este modelo apresentou RMSEC 21,83 mg g⁻¹ e RMSECV de 44,41 mg g⁻¹.

Tabela 18. Resultados dos modelos biPLS obtidos para o fármaco AMO por FTIR/ATR.

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLs ^b	R _{cal}	RMSEP (mg g ⁻¹)
PLS	3351	Todos	7	0,9671	39,60
biPLS10	1005	3, 4, 9	4	0,9274	43,16
biPLS20	503	4, 7, 17	4	0,9381	44,57
biPLS30	557	1, 21, 23, 25, 26	10	0,9851	33,86
biPLS40	418	22, 28, 31, 34, 38	8	0,9822	38,28
biPLS50	268	12, 35, 38, 42	8	0,9698	33,58

^a TV: número total de variáveis

^b VLs: variáveis latentes

Os intervalos selecionados incluem as regiões entre 3197 a 3264 para o intervalo 12, entre 1656 a 1723 para o intervalo 35, entre 1522 a 1455 para o intervalo 38 e entre 1254 a 1187 para o intervalo 42, conforme mostrado na Tabela 19.

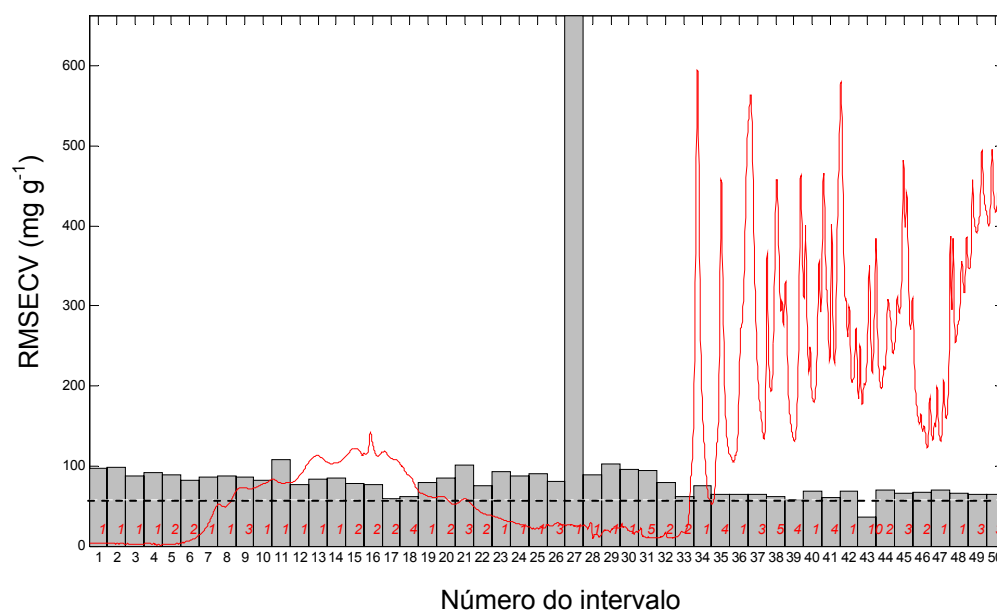


Figura 27. Espectro dividido em 50 intervalos para a determinação do fármaco AMO por FTIR/ATR. As barras correspondem aos valores de RMSECV para cada intervalo e a linha tracejada para o modelo global. Os números internos apresentados no interior de cada intervalo correspondem às variáveis latentes.

Tabela 19. Intervalos e vibrações correspondentes à determinação do fármaco AMO por FTIR/ATR.⁵

Intervalo	Número de onda (cm ⁻¹)	Vibração
12	3197 a 3254	Estiramento da ligação do H ligado ao O do fenol
35	1656 a 1723	Deformação angular no plano da ligação NH ₂
38	1455 a 1522	Deformação angular da ligação NH (amida II) ou estiramento C=C (aromático)
42	1187 a 1254	Estiramento C-N (amina primária)

Todas as regiões selecionadas correspondem às diferentes absorções das ligações presentes na estrutura do fármaco AMO. Essas ligações apresentam

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

vibrações e absorvem no infravermelho médio correlacionado-se, provavelmente, a estrutura do fármaco AMO.

A Figura 28 mostra os valores do fármaco AMO obtidos por CLAE *versus* valores previstos para o modelo biPLS utilizando os intervalos 12, 35, 38 e 42 por FTIR/ATR.

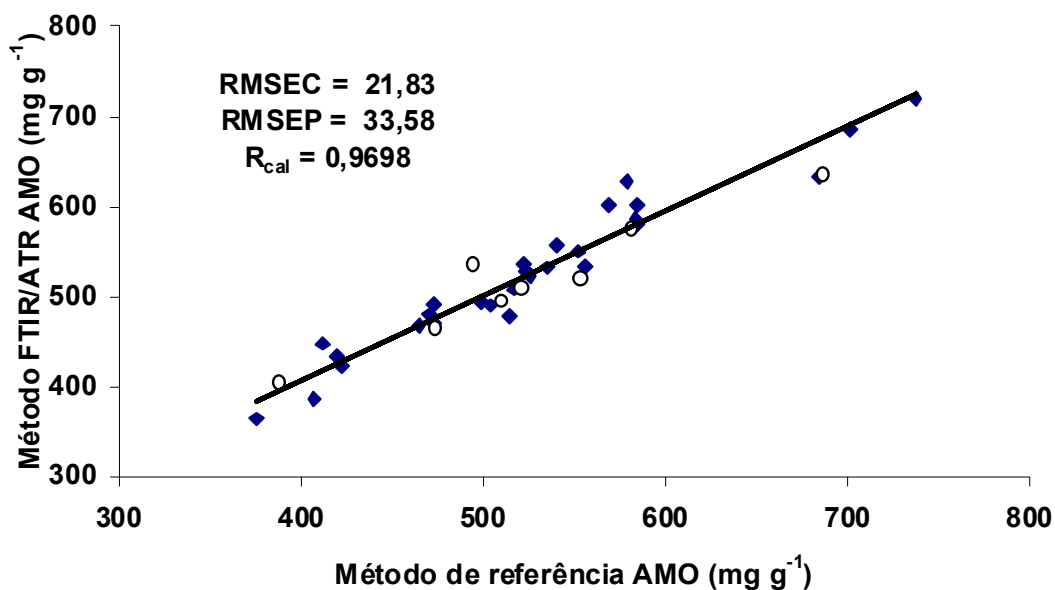


Figura 28. Valores de referência *versus* valores previstos para o modelo biPLS do fármaco AMO utilizando os intervalos 12, 35, 38, 42 por FTIR/ATR.

Na Figura 29 observa-se que os menores erros relativos na determinação do fármaco AMO nas amostras de previsão são obtidos quando utilizado o modelo biPLS50. Para este modelo, o erro relativo (diferença entre HPLC e valor previsto), avaliado para cada amostra individualmente, foi menor que 10%. Além disso, pode destacar que os modelos iPLS, siPLS e biPLS apresentaram erro padrão de predição relativo (RSEP) de 8,8; 7,0; 5,1% respectivamente, sendo estes valores aqueles que melhor expressam a capacidade preditiva de um modelo.

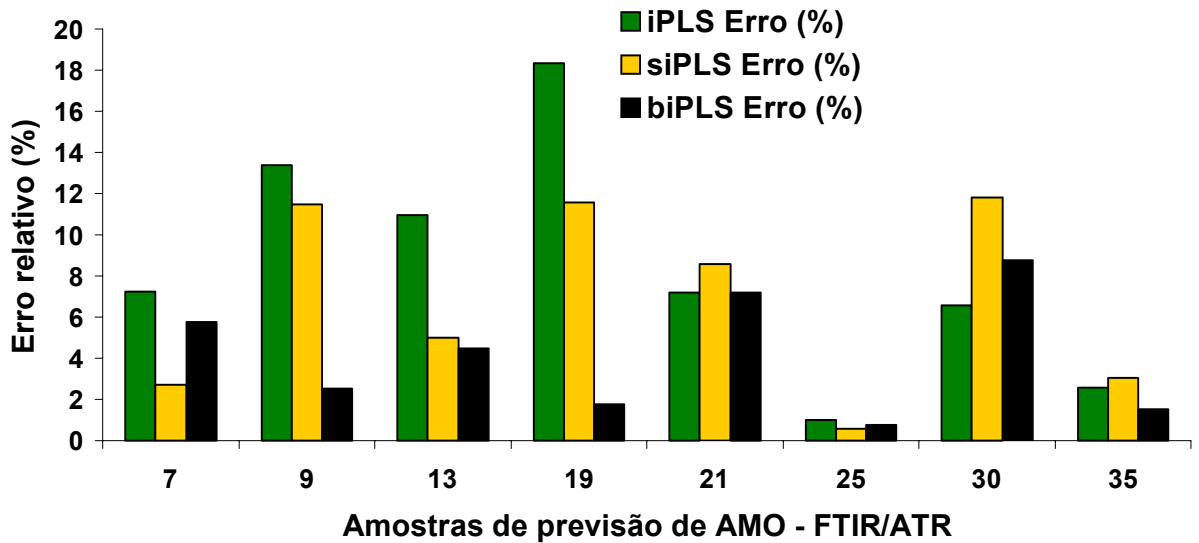


Figura 29. Comparação dos erros relativos dos melhores modelos (iPLS30, si2PLS30 e biPLS50) obtidos para cada uma das amostras de previsão na determinação do fármaco AMO a partir de dados obtidos por FTIR/ATR.

Na Figura 30 é possível observar a boa concordância entre os valores de referência obtidos por HPLC e os valores previstos pelo modelo FTIR/ATR/biPLS50.

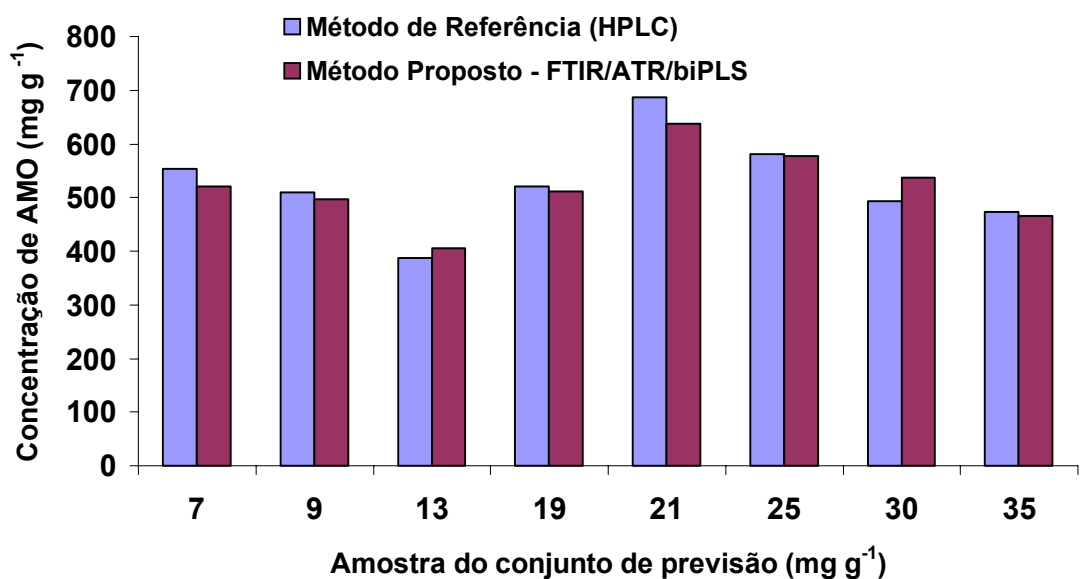


Figura 30. Histograma da diferença entre o valor de concentração do fármaco AMO (mg g⁻¹) obtido pelo método de referência e o valor previsto pelo modelo biPLS50.

O erro sistemático incluso no modelo biPLS50 foi insignificante ($bias = 6,77$ e $t_{sist} < t_{crit}$) evidenciando, dessa forma, que os valores de previsão não apresentam tendências. Visualmente é possível observar que os valores previstos pelo modelo biPLS50 comportam-se de forma aleatória em relação aos valores do método de referência.

Desta forma, o melhor modelo para determinação do fármaco AMO por FTIR/ATR utiliza o espectro dividido em 50 intervalos, dados centrados na média, correção do espalhamento de luz e regiões de 3197 a 3264 cm^{-1} , 1656 a 1723 cm^{-1} , 1455 a 1522 cm^{-1} e 1187 a 1254 cm^{-1} .

4.8. Determinação do fármaco AC por DRIFTS utilizando os métodos de seleção de variáveis

Os dados adquiridos por DRIFTS, como já havia sido mencionado anteriormente utilizaram, também, MSC e os dados centrados na média. Com o objetivo de selecionar regiões espectrais com menores erros associados e informações relevantes, foram empregados os métodos de seleção de variáveis (iPLS, biPLS e siPLS). O critério para a determinação do número de VLs foi o mesmo adotado para os dados coletados por FTIR/ATR.

4.8.1. Modelos iPLS

O algoritmo iPLS, utilizado para a construção dos modelos de determinação do fármaco AC por DRIFTS, dividiu o espectro em 10, 20, 30, 40 e 50 intervalos. Em cada situação um modelo PLS era desenvolvido para cada intervalo nos quais os espectros estavam divididos e o melhor intervalo era escolhido de acordo com o menor erro médio quadrático de calibração (RMSEC).

O modelo iPLS20 (20 intervalos) não apresentou melhora em relação ao modelo PLS global quando os valores de RMSEP e coeficiente de correlação foram comparados, não sendo, assim, apropriado para quantificação do fármaco AC nas formulações farmacêuticas (Tabela 20). Todavia, este modelo utilizou o intervalo 18 que corresponde à região entre 986 a 1154 cm^{-1} onde ocorre, provavelmente, a

absorção da ligação =C-H (deformação angular fora do plano da ligação C=C) presente na estrutura do fármaco AC, conforme apresentado na Figura 31.⁵

Tabela 20. Resultados obtidos para os melhores modelos iPLS para o fármaco AC utilizando DRIFTS.

Modelo	TV ^a	Intervalo	VLs ^b	R _{cal}	RMSEP (mg g ⁻¹)
PLS	3351	Todos	4	0,9470	14,14
iPLS10	335	9	6	0,9697	25,99
iPLS20	168	18	4	0,9458	19,76
iPLS30	112	26	5	0,9599	27,21
iPLS40	84	34	4	0,9329	23,93
iPLS50	66	16	4	0,9396	27,44

^a TV: número total de variáveis

^b VLs: variáveis latentes

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

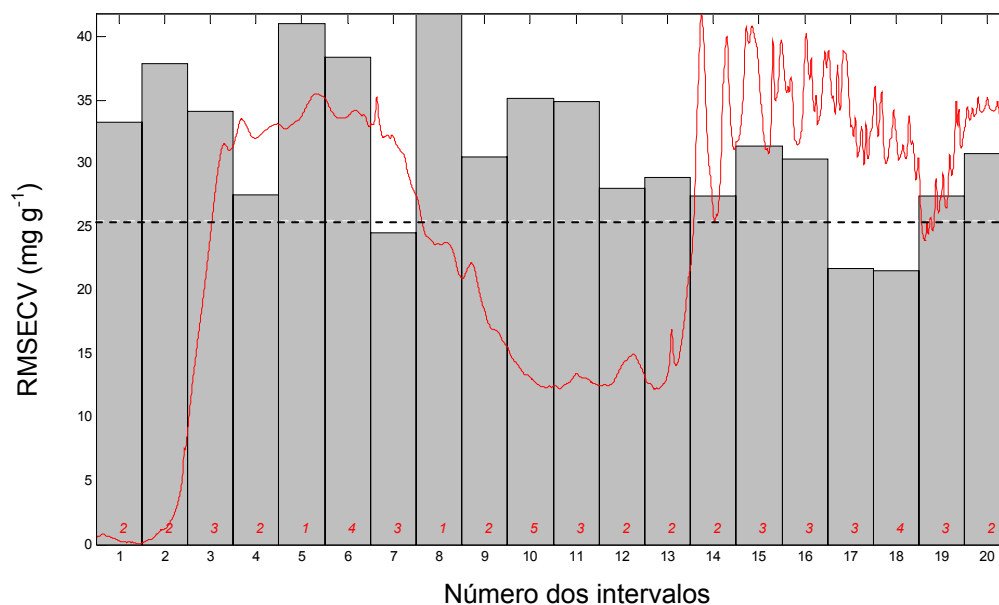


Figura 31. Espectro dividido em 20 intervalos para a determinação do fármaco AC por DRIFTS. As barras correspondem aos valores de RMSECV para cada intervalo e a linha tracejada para o modelo global. Os números internos apresentados no interior de cada intervalo correspondem às variáveis latentes.

4.8.2. Modelos biPLS

Os modelos biPLS foram construídos a partir da divisão dos espectros DRIFTS em 10, 20, 30, 40 e 50 intervalos equidistantes com a exclusão dos intervalos que não estavam correlacionados com a concentração do fármaco AC nas formulações farmacêuticas empregadas. Os resultados obtidos para os melhores modelos utilizando o algoritmo biPLS estão demonstrados na Tabela 21.

O modelo biPLS10 (10 intervalos) não apresentou diferença significativa (teste F, 95% de confiança) quando o valor de RMSEP foi comparado com aquele do modelo PLS global. Além disso, não houve melhora do coeficiente de correlação em relação ao modelo PLS global, desta forma, não sendo apropriado para quantificação do fármaco AC nas formulações farmacêuticas.

Tabela 21. Resultados obtidos para os melhores modelos iPLS para o fármaco AC utilizando DRIFTS.

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLs ^b	R _{cal}	RMSEP (mg g ⁻¹)
PLS	3351	Todos	4	0,9470	14,14
biPLS10	1005	7, 8, 10	3	0,9468	12,53
biPLS20	668	13, 14, 15, 20	2	0,9426	16,61
biPLS30	334	3, 22, 30	7	0,9796	17,47
biPLS40	587	4, 10, 11, 25, 27, 29, 40	5	0,9751	16,89
biPLS50	469	6, 13, 14, 33, 36, 45, 49	4	0,9638	18,22

^a TV: número total de variáveis^b VLs: variáveis latentes

Este modelo utilizou os intervalos 7, 8 e 10, cujas vibrações e números de onda estão descritos na Tabela 22.

Tabela 22. Intervalos e vibrações correspondentes à determinação do fármaco AC por DRIFTS.⁵

Intervalo	Número de onda (cm ⁻¹)	Vibração
7	1656 a 1991	Estiramento C=C
8	1321 a 1656	Deformação angular da ligação C-H, no plano da ligação C=C
10	650 a 986	Deformação angular da ligação C-H, fora do plano da ligação C=C

As regiões 1321 a 1656 e 650 a 986 correspondem a vibrações de deformação angular (no plano e fora do plano) da ligação do H ao C da dupla ligação C=C que absorve radiação infravermelha. Já na região de 1656 a 1991

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

ocorre estiramento da ligação C=C e consequente absorção da radiação infravermelha.⁵ Essas absorções acontecem por esse tipo de ligação fazer parte da estrutura do fármaco AC e dessa forma estão presentes no espectro no infravermelho médio.

4.8.3. Modelos siPLS

Os modelos desenvolvidos a partir da utilização do siPLS, para determinação do fármaco AC utilizaram espectros divididos em 10, 20, 30, 40 e 50 intervalos e combinações de 2 e 3 intervalos. A Tabela 23 apresenta os intervalos combinados, o número de variáveis latentes, os erros médios de calibração e previsão, e o coeficiente de correlação obtidos para os melhores modelos siPLS.

O melhor modelo utilizando siPLS dividiu o espectro em 30 intervalos (Figura 32) e utilizou combinações de 2 intervalos, sendo selecionados os intervalos 13 e 18. O modelo apresentou RMSEP menor e melhor coeficiente de correlação quando comparados com o modelo PLS global. Observou-se uma redução de aproximadamente 94% no número de variáveis envolvidas na construção do modelo, com a conseqüente eliminação das regiões não correlacionadas com a concentração do fármaco AC. O modelo si2PLS30 apresentou RMSECV de 13,75 mg g⁻¹ e RMSEC de 8,89 mg g⁻¹ sendo que este modelo apresenta erros de calibração e previsão na mesma ordem de grandeza.

A Figura 33 mostra os valores do fármaco AC obtidos por HPLC *versus* valores previstos para o modelo siPLS utilizando os intervalos 13 e 18 por DRIFTS. O intervalo 13 corresponde à faixa espectral de 2554 a 2666 cm⁻¹. Neste intervalo a absorção é devida, provavelmente, ao estiramento da ligação C-H do C ligado ao N presente na estrutura do fármaco AC.⁵

Na Figura 34 observa-se que os menores erros relativos na determinação do fármaco AC nas amostras de previsão são obtidos quando utilizado o modelo si2PLS30. Para este modelo o erro relativo, avaliado de forma individual, foi de aproximadamente 8%. Cabe destacar que este erro pode não traduzir a real capacidade preditiva do modelo sendo mais apropriado desta forma avaliar os valores do erro padrão de predição relativo (RSEP). Os modelos iPLS, biPLS e

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

siPLs apresentaram erro padrão de predição relativo de 14,8; 13,1; 4,9%, respectivamente.

Tabela 23. Resultados obtidos para os melhores modelos siPLS para o fármaco AC utilizando DRIFTS.

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLS ^b	R _{cal}	RMSEP (mg g ⁻¹)
PLS	3351	Todos	4	0,9470	14,14
si2PLS10	670	4, 10	6	0,9771	13,02
si3PLS10	1005	4, 7, 8	6	0,9704	22,85
si4PLS10	1340	4, 7, 8, 9	7	0,9834	16,49
si2PLS20	336	10, 19	10	0,9965	8,87
si3PLS20	504	10, 13, 19	12	0,9986	12,22
si2PLS30	224	13, 18	7	0,9910	8,44
si3PLS30	336	17, 22, 28	8	0,9874	14,51
si2PLS40	168	31, 37	9	0,9878	17,50
si3PLS40	252	3, 5, 38	8	0,9735	18,61
si2PLS50	132	40, 47	7	0,9868	16,65

^a TV: número total de variáveis

^b VLS: variáveis latentes

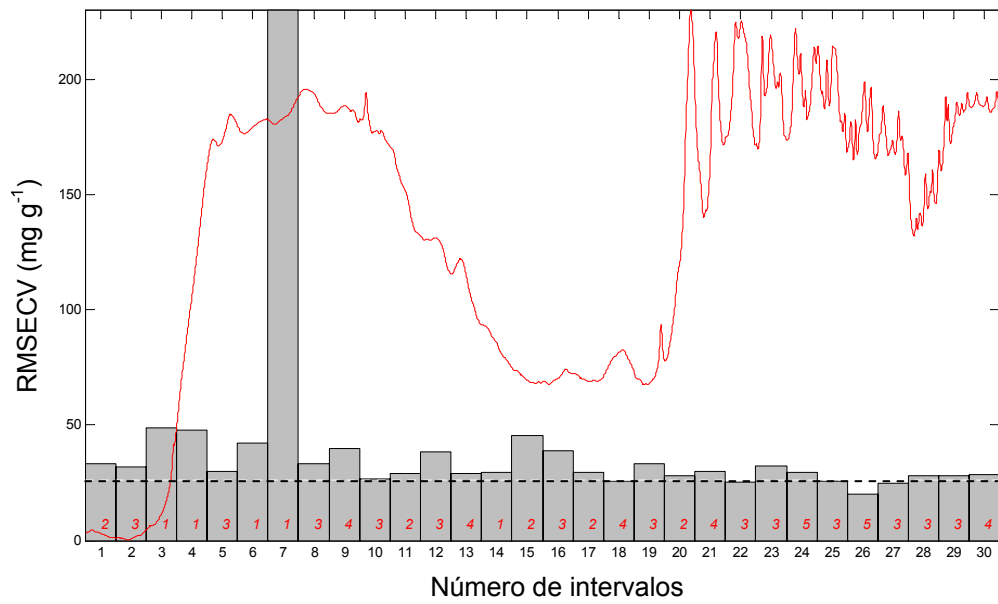


Figura 32. Espectro dividido em 30 intervalos para a determinação do fármaco AC por DRIFTS. As barras correspondem aos valores de RMSECV para cada intervalo e a linha tracejada para o modelo global. Os números internos apresentados no interior de cada intervalo correspondem às variáveis latentes.

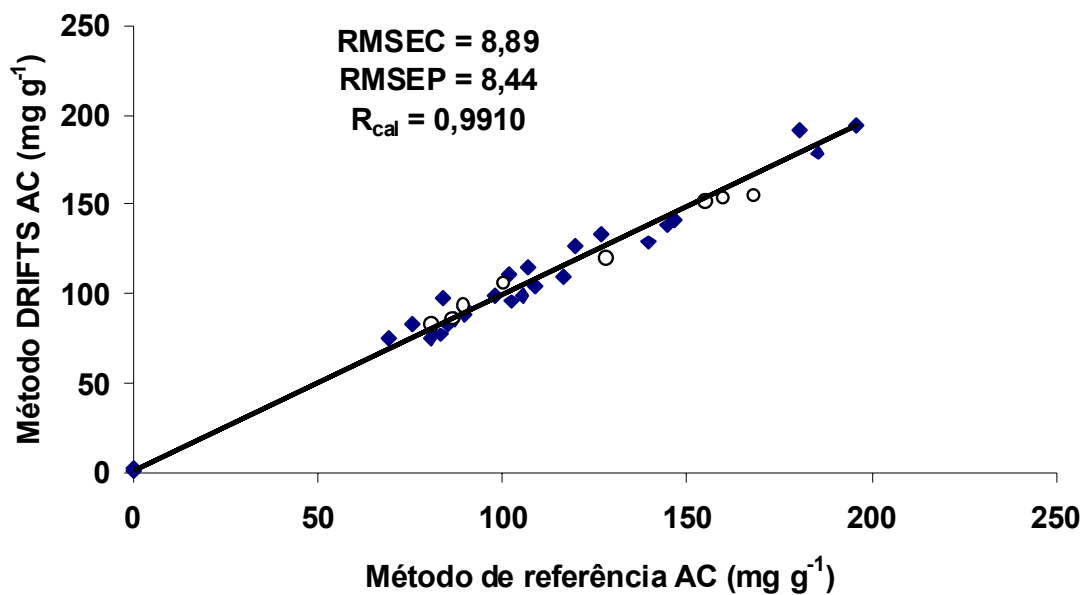


Figura 33. Valores de referência *versus* valores previstos para o modelo siPLS do fármaco AC utilizando os intervalos 13 e 18 por DRIFTS.

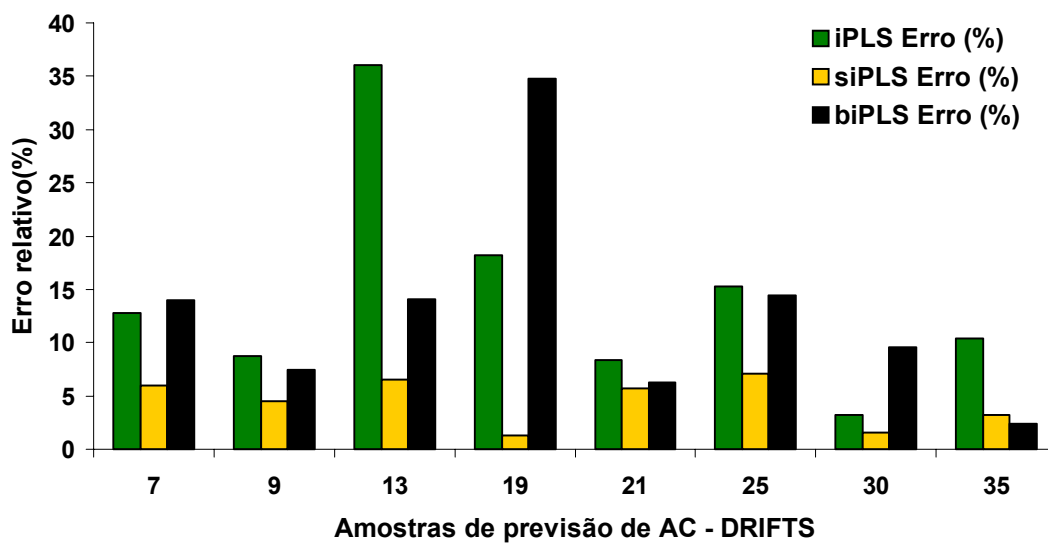


Figura 34. Comparação dos erros relativos dos melhores modelos obtidos para cada uma das amostras de previsão na determinação do fármaco AC a partir de dados obtidos por DRIFTS.

A Figura 35 mostra a boa concordância entre os valores de referência obtidos por HPLC e os valores previstos pelo modelo si2PLS30 – DRIFTS.

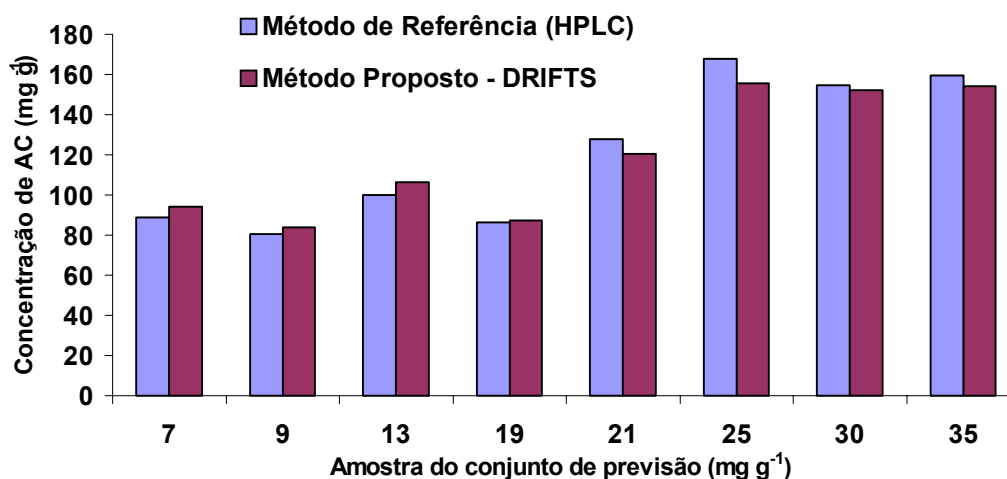


Figura 35. Histograma da diferença entre o valor de concentração do fármaco AC (mg g⁻¹) obtido pelo método de referência e o valor previsto pelo modelo si2PLS30.

O erro sistemático incluso no modelo si2PLS30 foi insignificante ($bias = 1,28$ e $t_{sist} < t_{crit}$) evidenciando, dessa forma, que os valores de previsão não apresentam tendências.

Desta forma, o melhor modelo para determinação do fármaco AC por DRIFTS utiliza espectro dividido em 30 intervalos, combinações de 2 intervalos, dados centrados na média, correção do espalhamento de luz e as regiões de 2554 a 2666 cm^{-1} e 1994 a 2106 cm^{-1} .

4.9. Determinação do fármaco AMO por DRIFTS utilizando os métodos de seleção de variáveis

A determinação do fármaco AMO por DRIFTS, da mesma forma que para o fármaco AC, empregou os métodos de seleção de variáveis (iPLS, biPLS e siPLS) para a construção dos modelos. Os melhores modelos de cada um destes métodos foram, posteriormente, avaliados e, desta forma, selecionou-se o melhor modelo para a determinação deste fármaco em formulações farmacêuticas que apresentavam, além do fármaco AC, diferentes excipientes.

4.9.1. Modelo iPLS

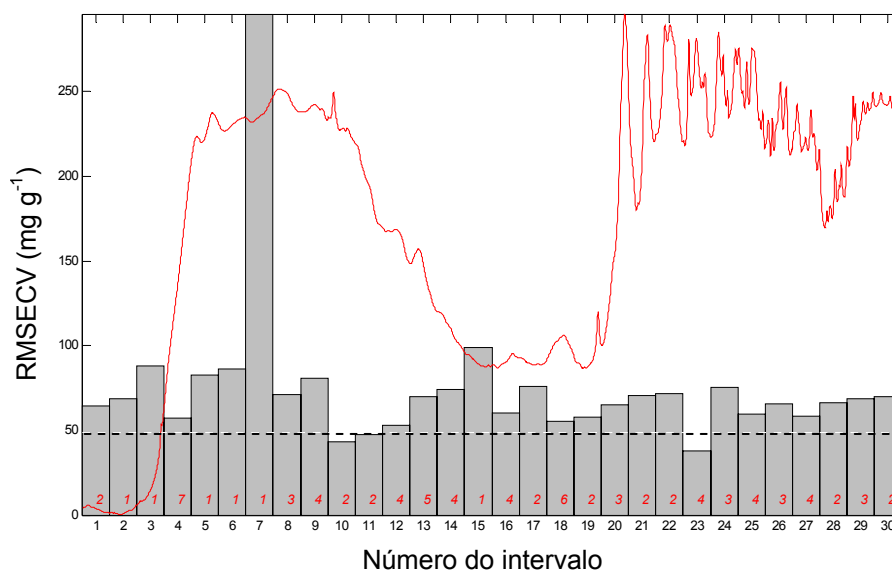
Os modelos iPLS foram desenvolvidos a partir da divisão dos espectros em 10, 20, 30, 40, 50 intervalos e seus resultados (variáveis totais, intervalos, variáveis latentes, coeficiente de correlação e RMSEP) são mostrados na Tabela 24.

O modelo iPLS30 (30 intervalos) que apresentou menor número de VLs e coeficiente de correlação equivalente ao modelo PLS global, não apresentou diferença significativa no valor de RMSEP frente a este. Assim, modelo foi considerado inapropriado para quantificação do AMO nas formulações farmacêuticas. Contudo, este modelo utilizou o intervalo 23 que corresponde à região entre 1434 a 1546 cm^{-1} do espectro onde ocorre, provavelmente, absorção da ligação C-N (estiramento) do fármaco AMO, conforme Figura 36.⁵

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

Tabela 24. Resultados obtidos para os melhores modelos iPLS para o fármaco AMO utilizando DRIFTS.

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLs ^b	R _{cal}	RMSEP (mg g ⁻¹)
PLS	3351	Todos	9	0,9926	41,97
iPLS10	335	4	2	0,9174	53,33
iPLS20	168	12	8	0,9945	53,30
iPLS30	112	23	4	0,9653	38,62
iPLS40	84	13	2	0,8888	62,73
iPLS50	66	38	3	0,9442	39,30

^a TV: número total de variáveis^b VLs: variáveis latentes**Figura 36.** Espectro dividido em 30 intervalos para a determinação do fármaco AMO por DRIFTS. As barras correspondem aos valores de RMSECV para cada intervalo e a linha tracejada para o modelo global. Os números internos apresentados no interior de cada intervalo correspondem às variáveis latentes.

4.9.2. Modelo biPLS

A partir da divisão dos espectros em 10, 20, 30, 40 e 50 intervalos e da exclusão de regiões pouco significativas, os modelos biPLS foram desenvolvidos para determinação do fármaco AMO por DRIFTS. Os modelos construídos (total de 5 modelos) foram avaliados de acordo com os valores de RMSEP, R_{cal} , VLs e número de variáveis totais conforme apresentado na Tabela 25.

O modelo que apresentou mais baixo RMSEP, biPLS20 (20 intervalos), não apresentou diferença significativa (teste F, 95% de confiança) frente ao modelo PLS global. Dessa forma, o melhor modelo biPLS não é apropriado para quantificação do fármaco AMO nas formulações farmacêuticas. Este modelo utilizou os intervalos 7, 13 e 17, cujas respectivas vibrações e números de onda estão descritos na Tabela 26.

Tabela 25. Resultados obtidos para os melhores modelos biPLS para o fármaco AMO utilizando DRIFTS.

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLs ^b	R_{cal}	RMSEP (mg g ⁻¹)
PLS	3351	Todos	9	0,9926	41,97
biPLS10	1676	1, 3, 4, 8, 7	7	0,9856	48,25
biPLS20	504	7, 13, 17	8	0,9826	34,63
biPLS30	671	6, 20, 22	5	0,9435	64,78
biPLS40	587	8, 20, 26, 37	10	0,9908	44,79
biPLS50	537	6, 10, 35	6	0,9664	50,79

^a TV: número total de variáveis

^b VLs: variáveis latentes

Tabela 26. Intervalos e vibrações correspondentes à determinação do fármaco AMO por DRIFTS.⁵

Intervalo	Número de onda (cm ⁻¹)	Vibração
7	2832 a 2999	Estiramento assimétrico C-H
13	1826 a 1994	Bandas harmônicas ou de combinação (aromáticos)
17	986 a 1154	Estiramento C-N (aminas)

O estiramento assimétrico da ligação C-H e as bandas harmônicas, possivelmente, correspondem às ligações presentes no anel aromático do fármaco AMO. Já a vibração de estiramento C-N refere-se à ligação do grupamento amina, também, presente na estrutura do fármaco AMO.⁵ Cabe salientar que todas estas ligações absorvem radiação infravermelha.

4.9.3. Modelo siPLS

Para a determinação do fármaco amoxicilina por DRIFTS utilizou-se, ainda, o algoritmo siPLS. Como o algoritmo PLS apresentou RMSEP de 41,97 mg g⁻¹, utilizando 9 VLs, o objetivo da aplicação da ferramenta siPLS foi selecionar regiões com menores erros associados e com informações relevantes a estrutura deste fármaco. A Tabela 27 apresenta os resultados obtidos para o modelo PLS global e para os melhores modelos siPLS.

Dos 10 modelos construídos com o algoritmo siPLS, 4 modelos apresentaram menores valores de RMSEP que o modelo PLS global (si4PLS10 – 10 intervalos e combinações de 4 intervalos, si3PLS30 – 30 intervalos e combinações de 3 intervalos, si2PLS40 – 40 intervalos e combinações de 2 intervalos, e si3PLS40 – 40 intervalos e combinações de 3 intervalos). Não se observou diferença significativa (teste F, limite de confiança de 95%) entre os valores de RMSEP destes quatro modelos e optou-se pelo si4PLS10 que apresentou menor valor de RMSEP. O modelo si4PLS10 dividiu o espectro em 10 intervalos, sendo utilizadas combinações

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

de 4 intervalos (Figura 37), apresentou RMSECV de 28,61 mg g⁻¹ e RMSEC de 11,25 mg g⁻¹. As absorções e as faixas espectrais dos intervalos 2, 4, 5 e 6 são apresentados na Tabela 28.

A Figura 38 mostra os valores do fármaco AMO obtidos por HPLC *versus* valores previstos para o modelo siPLS utilizando os intervalos 2, 4, 5 e 6 por DRIFTS.

Tabela 27. Resultados obtidos para os melhores modelos siPLS para o fármaco AMO utilizando DRIFTS.

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLS ^b	R _{cal}	RMSEP (mg g ⁻¹)
PLS	3351	Todos	9	0,9926	41,97
si2PLS10	670	2, 4	5	0,9505	52,23
si3PLS10	1005	1, 4, 6	7	0,9871	46,72
si4PLS10	1340	2, 4, 5, 6	9	0,9940	23,31
si2PLS20	336	2, 7	3	0,9441	50,79
si3PLS20	504	7, 13, 16	10	0,9933	49,52
si2PLS30	224	11, 17	5	0,9814	44,36
si3PLS30	336	5, 11, 17	10	0,9974	32,11
si2PLS40	168	14, 22	5	0,9779	36,44
si3PLS40	252	14, 25, 37	11	0,9975	36,99
si2PLS50	132	18, 32	9	0,9926	44,08

^a TV: número total de variáveis

^b VLS: variáveis latentes

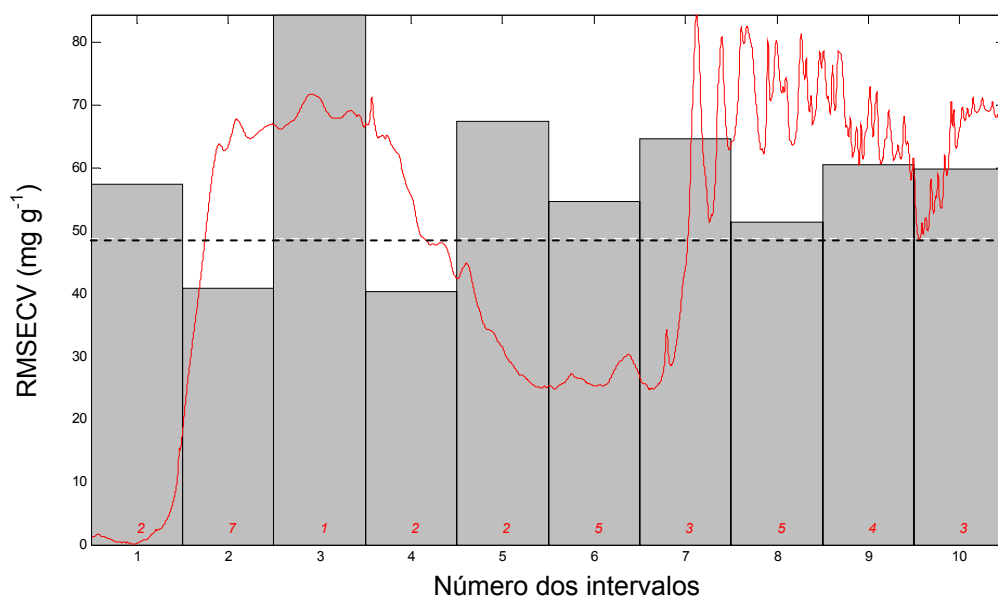


Figura 37. Espectro dividido em 10 intervalos, combinando 4 intervalos, para a determinação do fármaco AMO por DRIFTS. As barras correspondem aos valores de RMSECV para cada intervalo e a linha tracejada para o modelo global. Os números internos apresentados no interior de cada intervalo correspondem às variáveis latentes.

Tabela 28. Intervalos e vibrações correspondentes à determinação do fármaco AMO por DRIFTS.⁵

Intervalo	Número de onda (cm ⁻¹)	Vibração
2	3331 a 3666	Estiramento assimétrico NH ₂
4	2661 a 2996	Estiramentos simétricos CH ₃
5	2326 a 2661	Estiramento O-H (ácido carboxílico)
6	1991 a 2326	Bandas harmônicas ou de combinação (aromáticos)

O estiramento assimétrico que ocorre na ligação N-H do grupo NH₂, e que absorve radiação infravermelha, está presente na estrutura do fármaco AMO. Os estiramentos simétricos das ligações C-H são devido à presença dos grupamentos CH₃. A provável absorção da ligação hidroxila (O-H), presente no grupamento de ácido carboxílico, pode ser em decorrência à presença desse grupo funcional no

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

fármaco AMO. Já as bandas harmônicas ou de combinação ocorrem no anel aromático.⁵ Todos estes grupamentos estão presentes no fármaco AMO e provavelmente estão correlacionadas com os sinais selecionados.

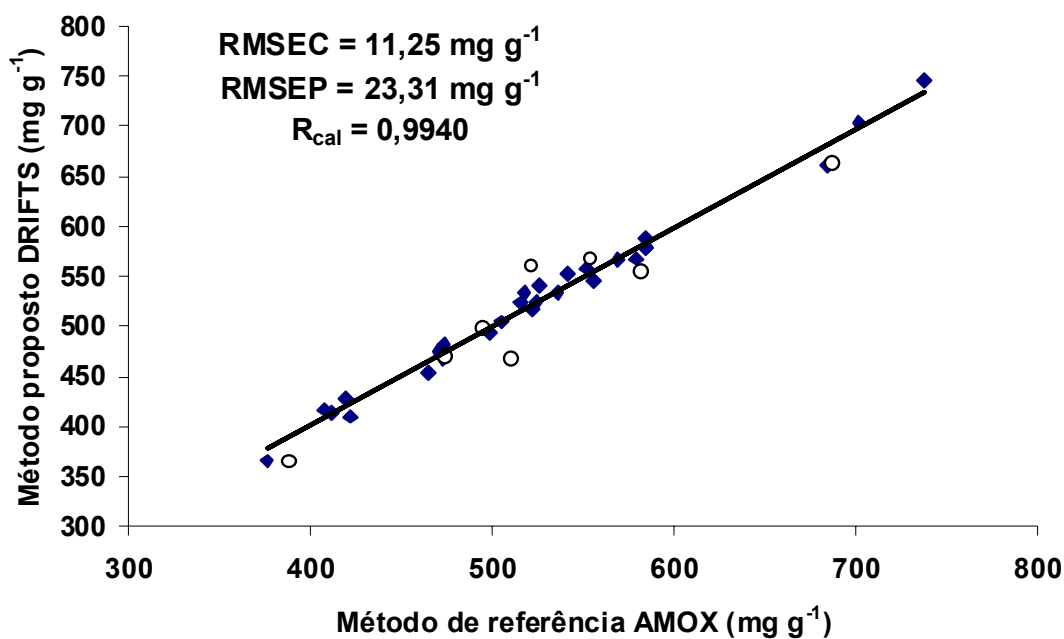


Figura 38. Valores de referência *versus* valores previstos para o modelo siPLS do fármaco AMO utilizando os intervalos 2, 4, 5 e 6 por DRIFTS.

Na Figura 39 observa-se que os menores erros relativos na determinação do fármaco AMO nas amostras de previsão são obtidos quando utilizado o modelo si4PLS10. Para este modelo o erro relativo (diferença entre HPLC e valor previsto), avaliado para cada amostra de previsão individualmente, foi de aproximadamente 8%. Os modelos iPLS, biPLS e siPLs apresentaram erro padrão de predição relativo (RSEP) de 10,2; 6,8; 4,8% respectivamente, lembrando que estes valores melhor expressam a capacidade preditiva do modelo.

Chen *et al.* (2008),²³ também observou que os modelos que utilizaram o algoritmo siPLS apresentaram melhor desempenho que aqueles que utilizaram PLS e iPLS para a determinação de polifenóis em chá verde por espectroscopia NIR.

⁵ Barbosa, L. C. A., *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa (2007) 189 p.

²³ Chen, Q. et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 568-573.

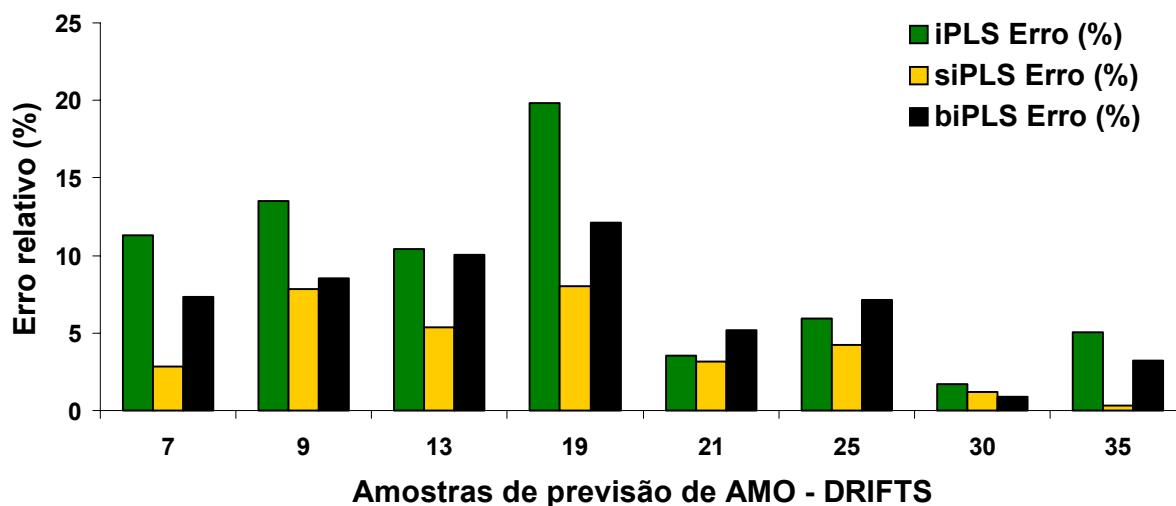


Figura 39. Comparação dos erros relativos dos melhores modelos (iPLS30, si4PLS10 e biPLS20) obtidos para cada uma das amostras de previsão na determinação do fármaco AMO a partir de dados obtidos por DRIFTS.

A Figura 40 apresenta a boa concordância entre os valores de referência obtidos por HPLC e os valores previstos para o fármaco AMO pelo modelo si4PLS10 – DRIFTS.

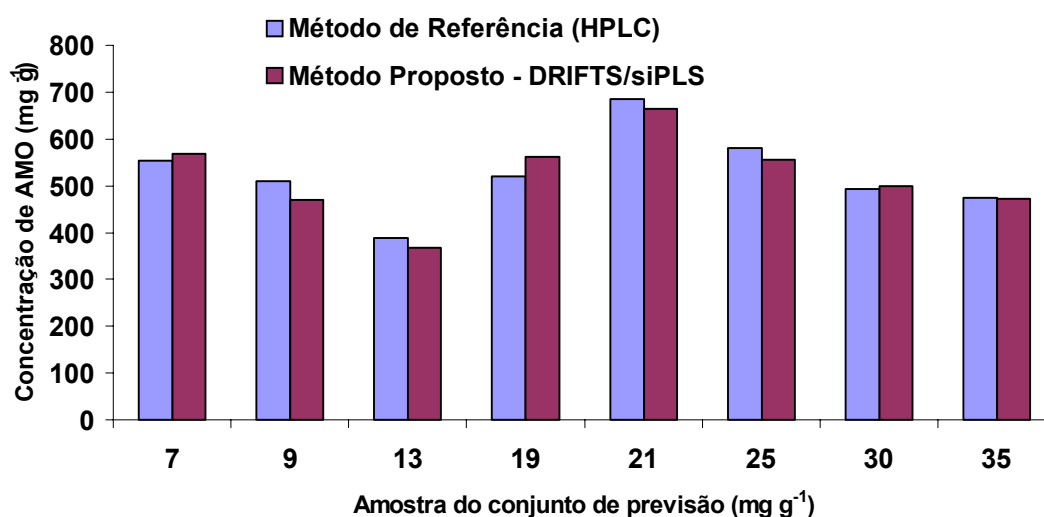


Figura 40. Histograma da diferença entre o valor de concentração do fármaco AMO (mg g⁻¹) obtidos pelo método de referência e o valor previsto pelo modelo si4PLS10.

O erro sistemático incluso no modelo si4PLS10 foi insignificante ($bias = 5,63$ e $t_{sist} < t_{crit}$) evidenciando, dessa forma, que os valores de previsão não apresentam tendências.

Desta forma, o melhor modelo para determinação do fármaco AMO por DRIFTS utiliza espectro dividido em 10 intervalos e combinações de 4 intervalos, dados centrados na média, correção do espalhamento de luz e as regiões 3331 a 3666, 2661 a 2996, 2326 a 2661 e 1991 a 2326.

4.10. Comparação entre as metodologias empregadas no estudo (FTIR/ATR e DRIFTS) para determinação dos fármacos AC e AMO

Com o objetivo de avaliar se havia diferença entre os modelos desenvolvidos para cada uma das metodologias propostas individualmente (FTIR/ATR e DRIFTS), aplicou-se teste F (95% de confiança) comparando-se os erros médios de previsão obtidos para cada uma delas.

Ainda, os valores das amostras de previsão foram empregados para comparação entre as metodologias propostas e a metodologia referência (HPLC) através da aplicação de teste t pareado, conforme descrito nos itens 4.10.2. e 4.10.3.

4.10.1. Avaliação dos erros médios de previsão dos melhores modelos e comparação através do teste F

Todos os modelos desenvolvidos para determinação dos fármacos AC e AMO utilizaram como tratamento MSC e como pré-processamento os dados centrados na média. O melhor modelo construído para determinação destes fármacos por FTIR/ATR foi utilizando o algoritmo biPLS e por DRIFTS o algoritmo siPLS.

Com o objetivo de determinar se havia diferença significativa entre os erros médios de previsão de cada modelo aplicou-se teste F, conforme Tabela 29 e 30. O valor de F crítico extraído foi de 3,79 para o nível de confiança de 95% e utilizaram-se 7 graus de liberdade.

Tabela 29. Teste F aplicado na comparação dos erros médios de previsão para os melhores modelos desenvolvidos na determinação do fármaco ácido clavulânico por FTIR/ATR e DRIFTS.

Técnica	Modelo	Erro de previsão (mg g ⁻¹)	Valor de F
FTIR/ATR	biPLS	6,17	1,87
DRIFTS	siPLS	8,44	

Tabela 30. Teste F aplicado na comparação dos erros médios de previsão para os melhores modelos desenvolvidos na determinação do fármaco amoxicilina por FTIR/ATR e DRIFTS.

Técnica	Modelo	Erro de previsão (mg g ⁻¹)	Valor de F
FTIR/ATR	biPLS	33,58	2,08
DRIFTS	siPLS	23,31	

Tanto para o fármaco AC (F=1,87) como para o fármaco AMO (F=2,08) não houve diferença significativa entre valores de erros médios de previsão dos modelos propostos para determinação destes fármacos por FTIR/ATR e DRIFTS. Deste modo, pode-se afirmar que os erros médios de previsão obtidos para as duas técnicas e para ambos os fármacos são equivalentes.

4.10.2. Análise dos resultados obtidos na determinação do fármaco AC

Segundo a Farmacopéia Norte Americana¹⁰⁶ os comprimidos contendo AC e AMO não podem apresentar teores abaixo de 90% e acima de 120% frente ao valor nominal. No presente estudo, adotou-se como valor nominal, aquele obtido por HPLC para cada amostra, tendo em vista que foram estes valores que foram

¹⁰⁶ United States Pharmacopoeia, USP 31 – NF 26: the official compendia of standards. Rockville (2007).

utilizados para a construção dos modelos. Assim, a variação para os valores obtidos por DRIFTS e por FTIR-ATR foi calculada a partir deste valor nominal.

A Tabela 31 apresenta os valores da determinação do fármaco AC pela da metodologia de referência (HPLC) e os valores das metodologias propostas (FTIR/ATR e DRIFTS).

Tabela 31. Valores obtidos pela metodologia oficial, FTIR/ATR e DRIFTS na determinação do fármaco AC.

Amostras de previsão	Metodologia de referência HPLC (mg g ⁻¹)	Ácido Clavulânico	
		FTIR-ATR/modelo biPLS (mg g ⁻¹)	DRIFTS/modelo siPLS (mg g ⁻¹)
7	89,02	90,78	94,28
9	80,45	86,90	84,04
13	100,02	96,35	106,51
19	86,14	90,75	87,18
21	127,66	128,45	120,44
25	167,59	160,09	155,69
30	154,61	154,71	152,19
35	159,38	152,62	154,24

Na determinação do fármaco AC nas formulações farmacêuticas, obteve-se recuperações de 95,5 a 108,0% para a metodologia utilizando FTIR/ATR e 92,9 a 106,5% para a metodologia utilizando DRIFTS. Destaca-se que as amostras de previsão apresentaram valores médios de concordância de 100,5% e 100,1% na determinação do fármaco AC por FTIR/ATR e DRIFTS, respectivamente, em relação ao HPLC.

Aplicou-se teste t pareado (95% de confiança) não se observando diferença significativa entre os valores da metodologia de referência *versus* as metodologias

propostas. Além disso, as metodologias propostas apresentaram variação dentro da faixa permitida (90 a 120%) pela Farmacopéia Norte Americana, indicando que sua aplicação no controle de qualidade de medicamentos pode ser confiável.

4.10.3. Análise dos resultados obtidos na determinação do fármaco AMO

Na determinação do fármaco AMO nas formulações farmacêuticas obtiveram-se as seguintes recuperações: 92,8 a 108,7% para a metodologia utilizando FTIR/ATR e 92,2 a 108,0% para a metodologia utilizando DRIFTS em relação ao valor de referência (HPLC). Cabe salientar que as amostras de previsão apresentaram valores médios de concordância de 99,2% e 98,9% na determinação do fármaco AMO por FTIR/ATR e DRIFTS, respectivamente, em relação ao HPLC.

A Tabela 32 apresenta os valores obtidos do fármaco AMO, para as amostras de previsão pelas metodologias: oficial (HPLC), FTIR/ATR e DRIFTS.

Tabela 32. Valores obtidos pela metodologia oficial, FTIR/ATR e DRIFTS na determinação do fármaco AMO.

Amostras de previsão	Metodologia de referência HPLC (mg g ⁻¹)	Amoxicilina	
		FTIR/ATR/ modelo biPLS (mg g ⁻¹)	DRIFTS/modelo siPLS (mg g ⁻¹)
7	552,74	520,97	568,39
9	509,27	496,52	469,47
13	387,54	404,91	366,69
19	520,17	510,96	561,85
21	686,07	636,71	664,49
25	580,70	576,31	556,12
30	493,63	536,78	499,55
35	473,16	465,96	471,70

Após aplicação de teste t (pareado, 95% de confiança) não se observou diferença significativa entre os valores das metodologias propostas frente à metodologia oficial.

Deste modo, é possível verificar que as metodologias propostas para determinação do fármaco AMO em formulações farmacêuticas apresentaram variação dentro da faixa permitida, conforme especificação dos códigos oficiais.

4.11. Considerações finais

As técnicas FTIR/ATR e DRIFTS associadas aos métodos de regressão multivariados apresentaram as seguintes vantagens na determinação dos fármacos AC e AMO: maior rapidez nas análises, mínimo preparo da amostra, eliminação do uso de solventes orgânicos e menor exposição do analista a estes tipos de compostos tóxicos.

A Tabela 33 apresenta, resumidamente, os melhores modelos obtidos por ATR/FTIR e DRIFTS na determinação de AC e AMO. Na determinação de AC, para os dados obtidos por ATR/FTIR, o melhor modelo foi aquele utilizando o algoritmo biPLS e com divisão do espectro em 30 intervalos sendo que destes, 4 intervalos estavam correlacionados com a estrutura do fármaco em questão. Na determinação de AMO para os dados obtidos por ATR/FTIR o melhor modelo foi, também, aquele que utilizou o algoritmo biPLS dividindo o espectro em 50 intervalos sendo 4 intervalos correlacionados com a estrutura de AMO. Já para a determinação de AC para os dados obtidos por DRIFTS o melhor modelo foi aquele utilizou o algoritmo siPLS, dividiu o espectro em 30 intervalos e combinou 2 intervalos. Na determinação de AMO para os dados DRIFTS, o melhor modelo obtido foi aquele que utilizou, também, o algoritmo siPLS, com divisão do espectro em 10 intervalos e combinou 4 intervalos.

Tabela 33. Melhores modelos obtidos para os fármacos AC e AMO para os dados obtidos por ATR/FTIR e DRIFTS.

Técnica proposta	Modelos/intervalos			
	AC		AMO	
ATR/FTIR	biPLS30	10, 21, 23, 27	biPLS50	12, 35, 38, 42
DRIFTS	si2PLS30	13, 18	si4PLS10	2, 4, 5, 6

A seguir serão apresentados os principais parâmetros de mérito obtidos para os melhores modelos de regressão multivariada utilizando as técnicas de FTIR/ATR e DRIFTS.

4.11.1 Linearidade

A linearidade de um modelo de regressão multivariada pode ser determinada mediante a obtenção de gráficos de resíduos (ou erro relativo) ou através da análise dos coeficientes angular e do intercepto da equação linear obtida a partir dos valores da técnica de referência e os valores previstos pelo modelo.

De acordo com a análise do gráfico dos erros relativos das amostras os modelos são considerados lineares quando as amostras apresentarem erros com comportamento aleatório. Observando-se as Figuras 41, 42, 43 e 44 verifica-se que as amostras de calibração e previsão apresentam erros com distribuição aleatória para os melhores modelos utilizados na determinação de AC e AMO por FTIR/ATR e DRIFTS.^{14,59,64,107}

¹⁴ Braga, J. W. B.; Poppi, R. J., *Quim. Nova* 27 (2004) 1004-1011.

⁵⁹ Laasonen, M. et al., *Anal. Chem.* 75 (2003) 754-760.

⁶⁴ Martens, H.; Naes, T.; *Multivariate Calibration*, Wiley, Chichester (1989) 419 p.

¹⁰⁷ Valderrama, P.; Braga, J. W. B.; Poppi, R. J., *Quim. Nova* 32 (5) (2009) 1-10.

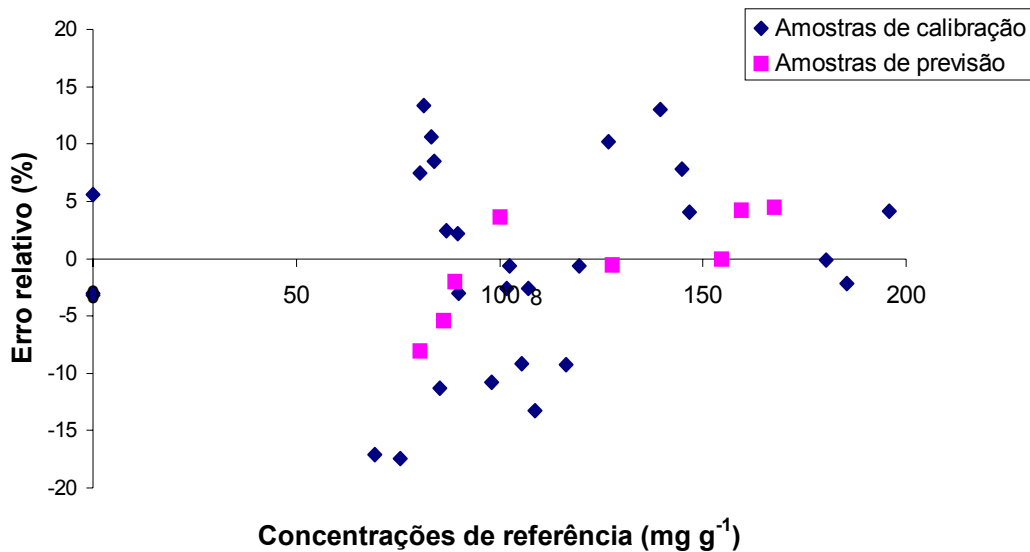


Figura 41. Resíduos do modelo biPLS30 para determinação do fármaco AC por FTIR/ATR.

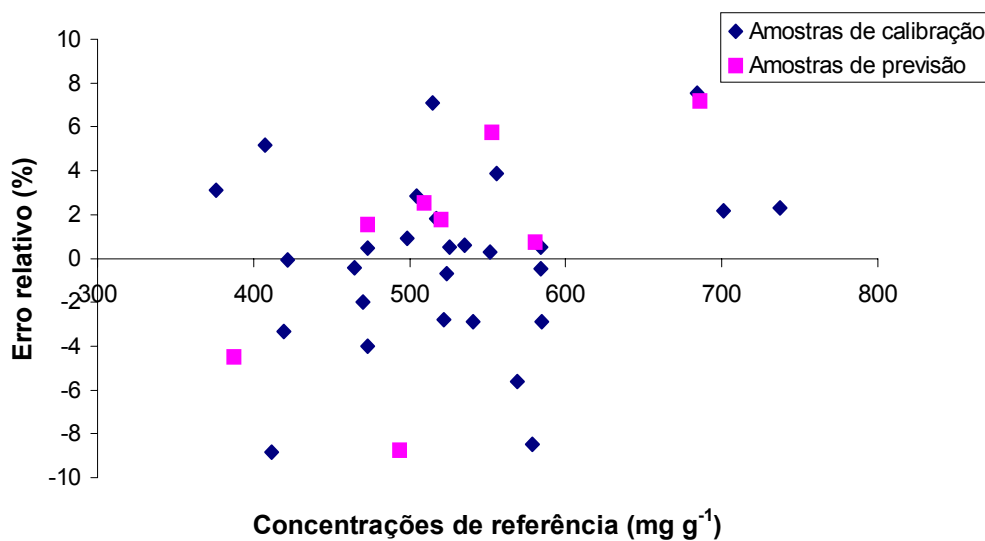


Figura 42. Resíduos do modelo biPLS50 para determinação do fármaco AMO por FTIR/ATR.

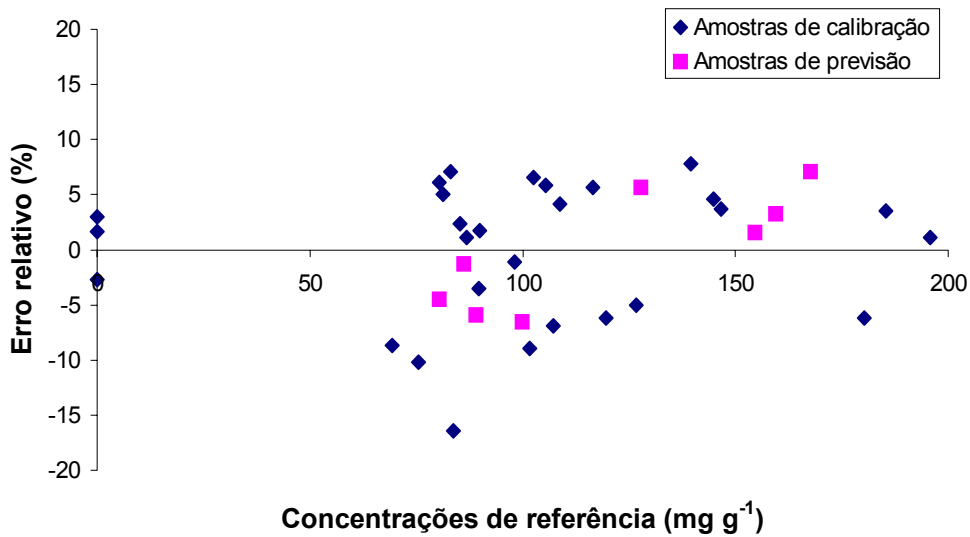


Figura 43. Resíduos do modelo si2PLS30 para determinação do fármaco AC por DRIFTS.

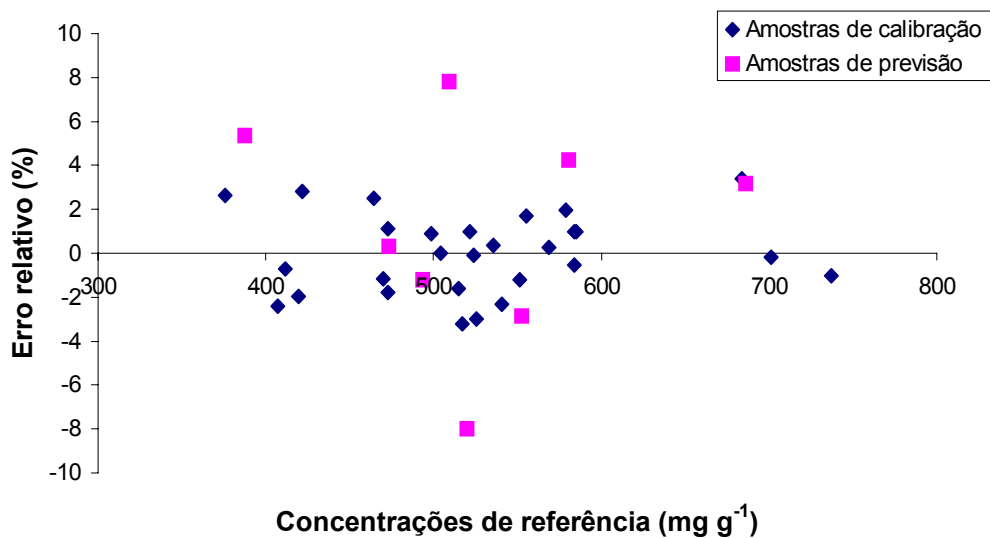


Figura 44. Resíduos do modelo si4PLS10 para determinação do fármaco AMO por DRIFTS.

Utilizando-se a segunda análise para linearidade, através da avaliação da regressão linear entre os valores previstos e os valores medidos por HPLC, para os modelos serem considerados lineares o intervalo de confiança (95%) do coeficiente

angular deve conter o número 1, ao passo que o intervalo de confiança (95%) do intercepto deve incluir o valor zero.^{59,69,89}

De acordo com a Tabela 33 é possível verificar que os melhores modelos obtidos para determinação de AC e AMO, foram considerados lineares, independentemente da técnica de reflexão utilizada, pois apresentaram intervalos de confiança dos coeficientes angulares e do intercepto nos quais estavam inseridos os valores 1 e zero, respectivamente.

Foram obtidos coeficientes de correlação melhores que 0,97 na determinação de AC e AMO, conforme Tabela 34.

Tabela 34. Parâmetros de mérito obtidos para as amostras de calibração na determinação dos fármacos AC e AMO por FTIR/ATR e DRIFTS.

Parâmetros	AC		AMO	
	FTIR/ATR	DRIFTS	FTIR/ATR	DRIFTS
Intervalo de confiança do coeficiente angular	[0,89;1,03]	[0,93; 1,03]	[0,85; 1,03]	[0,95; 1,03]
Intervalo de confiança do intercepto	[-4,7; 11,1]	[-4,1; 7,7]	[-19,7; 82,1]	[-22,8; 23,8]
Coeficiente de correlação	0,98	0,99	0,97	0,99

4.11.2 Exatidão, precisão e erro sistemático

A exatidão dos modelos obtidos utilizando FTIR/ATR e DRIFTS é expressa em termos de RMSEP e RSEP (Tabela 34). Para a determinação de AC os modelos que utilizaram FTIR/ATR mostraram-se mais exatos quando comparados com os modelos obtidos com dados de DRIFTS. No caso da determinação de AMO obtiveram-se modelos mais exatos quando da utilização de dados obtidos por DRIFTS.

⁵⁹ Laasonen, M. et al., *Anal. Chem.* 75 (2003) 754-760.

⁶⁹ Moffat, A. C. et al., *Analyst* 125 (2000) 1341-1351.

⁸⁹ Rosa, S. S. et al., *Talanta* 75 (2008) 725-733.

A precisão por sua vez foi determinada em termos de repetitividade, conforme Tabela 34. Não se observa diferença significativa em termos de precisão quando comparados os valores de repetitividade obtidos para FTIR/ATR e DRIFTS na determinação de AC. Também, não se verifica diferença quando avaliados os valores de repetitividade obtidos na determinação de AMO pelas duas técnicas de reflexão utilizadas.

Independentemente da técnica de reflexão utilizada, não se observou erro sistemático na determinação de AC e AMO após a aplicação de teste t apropriado (Tabela 35).

Tabela 35. Parâmetros de mérito obtidos para as amostras de previsão na determinação dos fármacos AC e AMO por FTIR/ATR e DRIFTS

Parâmetros	AC		AMO	
	FTIR/ATR	DRIFTS	FTIR/ATR	DRIFTS
RMSEP (mg g ⁻¹)	6,17	8,44	33,58	23,31
RSEP (%)	3,6	4,9	5,1	4,8
Repetitividade (mg g ⁻¹)	8,47	8,24	17,14	17,45
Erro sistemático	Não observado	Não observado	Não observado	Não observado

Assim, a utilização dos métodos de seleção de variáveis na construção dos modelos para determinação dos fármacos AC e AMO por FTIR/ATR e DRIFTS permitiu o desenvolvimento de modelos robustos quando comparados com aqueles modelos construídos com a utilização de toda a faixa espectral.

De forma geral, as metodologias propostas apresentaram resultados satisfatórios, sendo consideradas apropriadas para a implantação em rotinas de controle de qualidade de medicamentos.

5. CONCLUSÃO

A espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier e os acessórios de reflexões, total atenuada (FTIR/ATR) e difusa (DRIFTS), mostraram-se técnicas apropriadas quando associadas a métodos de regressão multivariados para determinação simultânea dos fármacos ácido clavulânico e amoxicilina em amostras sólidas de formulações farmacêuticas. Estas técnicas apresentam algumas vantagens quando comparadas a HPLC, utilizada normalmente para o doseamento destes fármacos.

Os melhores modelos construídos utilizaram o pré-processamento centrado na média associado ao tratamento MSC, visto que estes tratamentos apresentaram melhores resultados quando utilizados para a construção dos modelos PLS globais para os dados adquiridos por FTIR/ATR e DRIFTS.

Na determinação do fármaco AC por FTIR/ATR, o modelo construído com todas as variáveis independentes (modelo PLS global com 3351 número de ondas do espectro de infravermelho médio) apresentou valor de RMSEP de 18 mg g^{-1} , coeficiente de correlação de 0,9886 e utilizou 8 variáveis latentes (VLs). Com a aplicação do método de seleção variáveis biPLS obteve-se um modelo com RMSEP de $6,17 \text{ mg g}^{-1}$ (65% menor que o modelo PLS global), coeficiente de correlação de 0,9838 e que utilizou 9 VLs e 446 variáveis independentes.

Na determinação do fármaco AMO por FTIR/ATR, o modelo utilizando todas as variáveis independentes forneceu um valor de RMSEP de $39,6 \text{ mg g}^{-1}$, um coeficiente de correlação de 0,9671 e 7 VLs. O modelo que utilizou o algoritmo biPLS apresentou RMSEP de $33,58 \text{ mg g}^{-1}$, coeficiente de correlação de 0,9698 e 8 VLs. Este modelo foi construído com apenas 268 variáveis independentes, ou seja, 92% a menos que o modelo PLS global.

Quando se aplicou os métodos de seleção de variáveis para os dados adquiridos por DRIFTS observou-se melhor desempenho nos modelos que utilizaram o algoritmo siPLS. Na determinação de AC, o modelo desenvolvido com todas as variáveis independentes apresentou valor de RMSEP de $14,14 \text{ mg g}^{-1}$, coeficiente de correlação de 0,9470 e utilizaram-se 4 VLs. Contudo, com a utilização do método de seleção de variáveis siPLS obteve-se RMSEP de $8,44 \text{ mg g}^{-1}$ (40%

menor que o modelo global) coeficiente de correlação de 0,9910 e foram utilizadas 7 VLs e 224 variáveis independentes, aproximadamente 94% a menos que o modelo PLS global.

Na determinação de AMO por DRIFTS, o modelo utilizando todas as variáveis independentes forneceu valor de RMSEP de 41,97 mg g⁻¹, coeficiente de correlação de 0,9926 e utilizaram-se 9 VLs. Já com a utilização do algoritmo siPLS obteve-se um modelo com valor de RMSEP de 23,31 mg g⁻¹ (45% menor que o modelo PLS global), coeficiente de correlação de 0,9940 e que utilizou 9 VLs e 1340 variáveis independentes.

Os métodos de seleção de variáveis mostraram-se ferramentas eficientes na redução do número de variáveis independentes utilizadas e promoveram melhora da exatidão em relação ao modelo PLS global. A partir da comparação dos resultados obtidos pelos melhores modelos e por HPLC não se observou diferença significativa (teste t pareado para 95% de confiança) entre os mesmos. Assim, os melhores modelos apresentaram concordância superior a aproximadamente 93% na determinação dos fármacos ácido clavulânico e amoxicilina por DRIFTS e FTIR/ATR quando comparados a HPLC.

De uma forma geral, as duas metodologias propostas (FTIR/ATR e DRIFTS) caracterizaram-se por serem menos onerosas, por apresentar maior rapidez em suas análises, bem como a facilidade no manuseio das amostras e dos instrumentos, quando comparados com o método de referência utilizado para a determinação destes fármacos. Por fim não se verificou diferença entre as estas duas metodologias, tendo em vista que ambas forneceram resultados semelhantes na determinação dos fármacos AC e AMO.

Assim, as técnicas de análise por espectroscopia no infravermelho médio podem ser consideradas apropriadas para a determinação simultânea de fármacos em formulações farmacêuticas por apresentarem boa precisão e exatidão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aghazadeh, A.; Kazemifard, G. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in pharmaceutical dosage forms by LC with amperometric detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 325-329.
2. Alvarenga, L.; Ferreira, D.; Altekruise, D.; Menezes, J.C.; Lochmann D.; Tablet identification using near-infrared spectroscopy (NIRS) for pharmaceutical quality control, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 62-69.
3. Annual Book of ASTM Standards, Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis, E1655, vol. 03.06, ASTM International West Conshohocken, Pennsylvania, USA, 2000.
4. Bagglley, K. H.; Brown, A. G.; Schofield, C. J.; Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavans, *Nat. Prod. Rep.*, 14 (4) (1997) 309-333.
5. Barbosa, L. C. A.; *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (2007) 189 p.
6. Blanco M.; Alcalá M.; Bautista M.; Pharmaceutical gel analysis by NIR spectroscopy: Determination of the active principle and low concentration of preservatives, *Eur. J. Pharm. Sci.* 3 (2008) 409-414.
7. Blanco M.; Alcalá, M.; Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation: Development and validation of a near infrared spectroscopic method, *Eur. J. Pharm. Sci.* 27 (2006) 280-286.
8. Blanco, M.; Alcalá M.; Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by near infrared spectroscopy. A contribution to process analytical technologies, *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 353-359.
9. Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S.; Pagès, J.; Calibration in nonlinear near infrared reflectance spectroscopy: a comparison of several methods, *Anal. Chim. Acta* 384 (1999) 207-214.
10. Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S.; Pezuela, C.; Near-infrared analytical control of pharmaceuticals. A single calibration model from mixed phase to coated tablets, *Analyst* 123 (1998) 2307-2312.
11. Bobrowska-Grzesik, E. Determination of amoxicillin and clavulanic acid in some pharmaceutical preparations by derivative spectrophotometry, *Mikrochim. Acta* 136 (2001) 31-34.
12. Borer, M. W.; Zhou, X.; Hays, D. M.; Hofer, J. D.; White, K. C.; Evaluation of key sources of variability in the measurement of pharmaceutical drug products by near infrared reflectance spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 641-650.
13. Boyer, C.; Brégère, B.; Crouchet, S.; Gaudin, K.; Dubost, J. P.; Direct determination of niflumic acid in a pharmaceutical gel by ATR/FTIR spectroscopy and PLS calibration, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 433-437.
14. Braga, J. W. B.; Poppi, R. J.; Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo, *Quím. Nova* 27 (2004) 1004-1011.
15. Brereton, R. G.; *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and chemical Plant, Chemical Analysis Series*, Chichester: John Wiley & Sons, Ltda (2003).
16. Brereton, R. G.; Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry, *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.

17. British Pharmacopoeia Commission (Org.). British Pharmacopoeia 2001. London: The Stationery Office (2001).
18. Brown A. G.; Butterworth. D.; Cole, M.; Hanscomb, G.; Hood. J. D.; Naturally occurring β -Lactam inhibitors with antibacterial activity, *The J. Antibiotics* 29 (6) (1976) 668-669.
19. Bruns, R. E.; Faigle, J. F. G.; Quimiometria, *Quím. Nova* 4 (1985) 84-99.
20. Burns, D. A.; Ciurczak, E. W.; *Handbook of Near-Infrared Analysis*. New York: Marcel Dekker (2001) 814 p.
21. Carlsson, D. J.; Wiles D. M.; Surface studies by attenuated total reflection spectroscopy. I Corona treatment of polypropylene, *Canadian J. Chem.* 48 (1970) 2397-2406.
22. Chalus, P.; Roggo, Y.; Walter, S.; Ulmschneider, M.; Near-infrared determination of active substance content in intact low-dosage tablets, *Talanta* 66 (5) (2005) 1294-1302.
23. Chen, Q.; Zhao, J.; Liu, M.; Cai, J.; Liu, J.; Determination of polyphenols content in green tea using FT-NIR spectroscopy and different PLS algorithms, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 568-573.
24. Chen, Y.; Thosar, S. S.; Forbess, R. A.; Kemper, M. S.; Rubinovitz, R. L.; Shukla, A. J.; Prediction of drug content and hardness of intact tablets using artificial neural network and near-infrared spectroscopy, *Drug Developm. Ind. Pharm.* 27 (2001) 623-631.
25. Chong , X. M.; Hu, C. Q.; Feng, Y. C.; Pang, H. H.; Construction of a universal model for non-invasive identification of cephalosporins for injection using near-infrared diffuse reflectance spectroscopy, *Vib. Spectrosc.* 49 (2009) 196-203.
26. Cienfuegos, F.; *Estatística Aplicada ao Laboratório*. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência (2005) 337 p.
27. Coleman, K.; Athalie, M.; Clancey, A.; Davison, M.; Payne, D. J.; Perry, C. R.; Chopra, I. Bacterial Resistance Mechanism as Therapeutic Targets, *Journal of Antimicrobial Chemother.* 33 (1994) 1091-1116.
28. Cordeiro, G. A.; *Desenvolvimento de metodologias espectroscópicas multivariadas para a quantificação de fármacos em formas farmacêuticas*, Curitiba: UFPR. Programa de Pós-Graduação em Química, 2006. Dissertação (Mestrado).
29. Correia, P. R. M.; Ferreira, M. M. C.; Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos, *Quím. Nova* 30 (2007) 481-487.
30. Curie, L. A.; Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995), *Anal. Chim. Acta* 391 (1999) 105-126.
31. Daszykowski, M.; Walczak, B.; Massart, D. L.; Representative subset selection, *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 91-103.
32. Demain, A. L.; Elander, R. P.; The β -lactam antibiotics: past, present, and future, *Antonie van Leeuwenhoek* 75 (1999) 5-19.
33. Dou, Y.; Qu, N.; Wang B.; Chi Y.Z.; Ren, Y.L. Simultaneous determination of two active components in compound aspirin tablets using principal component artificial neural networks (PC-ANNs) on NIR spectroscopy; *Eur.J. Pharm. Sci.* 37 (2007) 193-199.

34. Eastment, H. T.; Krzanowski, W. J.; Cross-validatory choice of the number components from a principal components analysis, *Technometrics* 24 (1982) 73-77.
35. Einax, J. W.; Zwanziger, H. W.; Geiß, S.; Chemometrics in environmental analysis, Weinheim: Wiley-VCH (1997) 153-178.
36. European Pharmacopoeia 2002. 4. ed Strasbourg: Council of Europe, 2001. 2416p.
37. Eustaquio, A.; Graham, P.; Jee, R. D.; Moffatt, A. C.; Trafford, A. D.; Quantification of paracetamol in intact tablets using near-infrared transmittance spectroscopy, *Analyst* 123 (1998) 2303-2306.
38. Fahrenfort, J.; Attenuate Total Reflection, *Spectrochim. Acta* 17 (1961) 698-709.
39. Ferrão, M. F.; Aplicação de técnicas espectroscópicas de reflexão no infravermelho no controle de qualidade de farinha de trigo. Campinas: UNICAMP. Programa de Pós-Graduação em Química, 2000. Tese (Doutorado).
40. Ferrão, M. F.; Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos, *Tecno-lógica* 5 (2001) 63-85.
41. Ferreira, M. M. C.; Antunes, M. A.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O.; Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial, *Quím. Nova* 22 (1999) 724-731.
42. Ferreira, M. M. C.; Multivariate QSAR, *J. Braz. Chem. Soc.* 13 (2002) 742-753.
43. Geladi, P.; Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics; *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 767-782.
44. Geladi, P.; Kowalki, B. R.; Partial least-squares: a tutorial, *Anal. Chim. Acta* 185 (1986) 1-17.
45. Geladi, P.; MacDougall, D.; Martens, H.; Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat, *Appl. Spectrosc.* 39 (1985) 491-500.
46. Gemperline, P.; *Practical guide to chemometrics*, 2nd ed.; CRC Press Taylor & Francis, New York (2006) 105-160.
47. Gendrin, C.; Roggo, Y.; Spiegel, C.; Collet, C.; Monitoring galenical process development by near infrared chemical imaging: One case study, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.* 68 (2008) 828-837.
48. Gilpin, R. K.; Zhou, W.; Infrared of the thermal conversion of mefenamic acid between polymorphic states, *Vib. Spectrosc.* 37 (2005) 53-59
49. Gomez-Carracedo, M. P.; Andrade, J. M.; Rutledge, D. N.; Faber, N. M.; Selecting the optimum number of partial least squares components for the calibration of attenuated total reflectance-mid-infrared spectra of undersigned kerosene samples, *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 253-265.
50. Hair, J. F.; Anderson, R. E.; Tatham, R. L.; Black, W. C.; Análise Multivariada de dados, 5ª ed. Porto Alegre: Bookman (2005) 593 p.
51. Harman, J. G.; Limbird, L. E.; Gilman, A. G. (Ed.). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica* 10ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill do Brasil (1996) 1647 p.
52. Harris, C. D.; *Análise Química Quantitativa*, 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC Editora (2005) 876 p.
53. Hind, A. R.; Bhargava S. K.; McKinnon A.; At the solid/liquid interface: FTIR/ATR - the tool of choice, *Adv. Colloid Interface Sci.* 93 (2001) 91-114.
54. Iñon, F. A.; Garrigues, J. M.; Garrigues, S.; Molina, A.; Guardia, M.; Selection of calibration set samples in determination of olive oil acidity by partial least squares-attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy, *Anal. Chim. Acta* 489 (2003) 59-75.

55. Ito, M.; Suzuki, T.; Yada, S.; Kusai, A.; Nakagami, H.; Yonemochi, E.; Terada, K.; Development of a method for the determination of caffeine anhydrate in various designed intact tablets by near-infrared spectroscopy: A comparison between reflectance and transmittance technique, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 819-827.
56. Kennard, R. W.; Stone, L. A.; Computer aided design of experiments, *Technometrics* 11 (1969) 137-148.
57. Khoshauand, M. R.; Abdollahi, H.; Shariatpanahi, M.; Saadatfard, A.; Moharmmedi, A.; Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, ibuprofen and caffeine in pharmaceutical by chemometric methods, *Spectrochim. Acta Part A* 70 (2008) 491-499.
58. Kojima, T.; Yamauchi, Y.; Onoue, S.; Tsuda, Y.; Evaluation of hydrate formation of a pharmaceutical solid by using diffuse reflectance infrared Fourier-transform spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 788-791.
59. Laasonen, M.; Harmia-Pulkkinen, T.; Simard, C.; Rasanen, M.; Vuorela, H.; Development and validation of a near-infrared method for the quantification of caffeine in intact single tablets. *Anal. Chem.* 75 (2003) 754-760.
60. Lavine, B. K.; *Clustering and Classification of Analytical Data in the Encyclopedia of Analytical Chemistry: Instrumentation and Applications*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester (2000).
61. Leardi, R.; Norgaard, L.; Sequential application of backward interval partial least squares and genetic algorithms for the selection of relevant spectral regions, *J. Chemom.* 18 (2004) 486-497.
62. Li, G.; Tocarra, G.; Jing, W.; Wen, Z.; Applications of FTIR em identification of foreign materials for biopharmaceutical clinical manufacturing, *Vib. Spectrosc.* 50 (2009) 152-159.
63. Luypaert, J.; Massart, D.L.; Heyden, Y. V.; Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis, *Talanta* 72 (2007) 865-883.
64. Martens, H.; Naes, T.; *Multivariate Calibration*, Wiley, Chichester (1989) 419 p.
65. Meier, P. C.; Zünd, R. E.; *Statistical Methods in Analytical Chemistry*, 2^a ed. Canada: John Wiley & Sons, Inc. (2000) 407p.
66. Miller, J. C.; Miller, J. N.; *Statistics for analytical chemistry*, 3^a ed. New York: Prentice Hall (1993) 233 p.
67. Mirabella, F. M.; Internal reflection spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 21 (1985) 45-178.
68. Moes, J. J.; Ruijken, M. M.; Gout, E.; Frijlink, H. W.; Ugwoke, M.; Application of process analytical technology in tablet process development using NIR spectroscopy: Blend uniformity, content uniformity and coating thickness measurements, *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 108-118.
69. Moffat, A. C.; Trafford, A. D.; Jee, R. D.; Graham, P.; Meeting the International Conference on Harmonisation's Guidelines on Validation Procedures: Quantification as exemplified by a near-infrared reflectance assay of paracetamol in intact tablets, *Analyst* 125 (2000) 1341-1351.
70. Moros, J.; Garrigues, S.; Guardia, M.; Quality control Fourier transform infrared determination of diazepam in pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1277-1282.
71. Munck, L.; Nielsen, J. P.; Moller, B.; Jacobsen, S.; Sondergaard, I.; Engelsen, S. B.; Norgaard, L.; Bro, R.; Exploring the phenotypic expression of a regulatory proteomealtering gene by spectroscopy and chemometrics, *Anal. Chim. Acta* 446

- (2001) 171-186.
72. Neto, J.; M., M.; Moita, G. C.; Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados, *Quím. Nova* 21 (1998) 467-469.
 73. Norgaard, L.; Saudland, A.; Wagner, J.; Nielsen, J. P.; Munck, L.; Engelsen, S. B.; Interval Partial Least-Squares Regression (iPLS): A comparative chemometric study with an example from near-infrared spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 413-419.
 74. Note for guidance on the use of near-infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations, *The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*. CPMP/QWP/3309/01, EMEA/CVMP/961/01, 2003, London. Disponível em: <http://www.emea.eu.int/pdf/shuman/qwp/330901.en.pdf>. Acesso em: 5 dez. 2008.
 75. Oliveira, F. C.; Souza, A. T. P. C.; Dias, J. A.; Dias, S. C. L.; Rubim, J. C. A escolha da faixa espectral no uso combinado de métodos espectroscópicos e quimiométricos, *Quím. Nova* 27 (2004) 218-225.
 76. Olivieri, A.C.; Faber, N.K.M.; Ferré, J.; Boqué, R.; Kalivas, J.H.; Mark, H.; Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration, *Pure Appl. Chem.* 78 (2006) 633-661.
 77. Osborne, S.D.; Jordan, R.B.; Künnemeyer, R. Method of wavelength selection for partial least square, *Analyst* 122 (1997) 1531-1537.
 78. Pajchel, G.; Borowiecka, B.; Chojnowski, W.; Comparison of spectrophotometric and colorimetric methods in determination of clavulanic acid, *Acta Poloniae Pharm.* 49 (1992) 17-21.
 79. Parisotto, G.; Ferrão, M. F.; Furtado, J. C.; Molz, R. F.; Determination of amoxicillin content in powdered pharmaceutical formulations using DRIFTS and PLS, *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 43 (2007) 89-96.
 80. Pasikatan, M. C.; Steele, J. L.; Spillman, C. K.; Haque, E. Near infrared reflectance spectroscopy for online particle size analysis of powders and ground materials, *J. Near Infrared Spectrosc.* 9 (2001) 153-164.
 81. Peinder P.; Vredenbregt M.J.; Visser T.; Kaste D.; Detection of Lipitor® counterfeits: A comparison of NIR and Raman spectroscopy in combination with chemometrics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 688-694.
 82. Pereira, A. F. C.; Pontes, M. J. C.; Gambarra, F. F. N.; Santos, S. R. B.; Galvão, R. K. H.; Araújo, M. C. U.; NIR spectrometric determination of quality parameters in vegetable oils using iPLS and variable selection, *Food Res. Int.* 41 (2008) 341-348.
 83. Pinto, T. J. A.; Kaneko, T. M.; Ohara, M. T.; *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*, 2ª ed. São Paulo: Atheneu (2000) 325 p.
 84. Pirouette, *Multivariate Data Analysis*, versão 3.11, Infometrix, Inc. Washington, EUA.
 85. Pöllänen, K.; Häkkinen, A.; Huhtanen, M.; Reinikainen, S.; Karjalainen, M.; Rantanen, J.; Louhi-Kultanen, M.; Nyström, L.; DRIFT-IR for quantitative characterization of polymorphic composition of sulfathiazole, *Anal. Chim. Acta* 544 (2005) 108-117.
 86. Qu, N.; Zhu, M.; Mi, H.; Dou, Y.; Ren, Y.; Nondestructive determination of amoxicillin powder by NIR spectroscopy with the aid of chemometrics, *Spectrochim. Acta Part A* 70 (2008) 1146-1151.
 87. Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; *Farmacologia*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2001) 703 p.

88. Roggo, Y.; Chalus, P.; Maurer, L.; Lema-Martinez, C.; Edmond, A.; Jent, N.; A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 683-700.
89. Rosa, S. S.; Barata, P. A.; Martins, J. M.; Menezes, J. C.; Development and validation of a method for active drug identification and content determination of ranitidine in pharmaceutical products using near-infrared reflectance spectroscopy: A parametric release approach, *Talanta* 75 (2008) 725-733.
90. Sarraguça, M. C.; Lopes, J. A.; Quality control pharmaceutical with NIR: From lab to process line, *Vib. Spectrosc.* 49 (2009) 204-210.
91. Sena, M. M.; Chaudhry, Z. F.; Collins, C. H.; Poppi, R. J.; Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 743-749.
92. Settle, F. A.; Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry, Upper Saddle River: Prentice Hall, (1997) 995 p.
93. Silva, F. E. B.; Determinação de simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em formulações farmacêuticas por FTIR/ATR e DRIFTS empregando calibração multivariada. Santa Maria: UFSM. Programa de Pós-Graduação em Química, 2008. Tese (Doutorado).
94. Silva, F. E. B.; Ferrão, M. F.; Parisotto G.; Müller, E. I.; Flores E. M. M.; Simultaneous determination of sulphamethoxazole and trimethoprim in powder mixtures by attenuated total reflection-Fourier transform infrared and multivariate calibration, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 800-805.
95. Silva, P.; Farmacologia, 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2002) 1374 p.
96. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; *Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos*, 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos (2006) 490 p.
97. Singh, P.; Premkumar, L.; Mehrotra, R.; Kaldpal, H. C.; Bakhshi, A. K.; Evaluation of thermal stability of indinavir sulphate using reflectance infrared spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 248-254.
98. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed. Porto Alegre: Bookman (2002) 836 p.
99. Souza, J. S.; Ferrão, M. F.; Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I: Dosagem por regressão multivariada, *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 42 (2006) 437-445.
100. Stuart B.; *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Chichester: John Wiley (2004) 224 p.
101. Sulub, Y.; LoBrutto, R.; Vivilecchia R.; Wabuyele, B. W.; Content uniformity determination of pharmaceutical tablets using five near-infrared reflectance spectrometers: A process analytical technology (PAT) approach using robust multivariate calibration transfer algorithms, *Anal. Chim. Acta* 611 (2008) 143-150.
102. Sulub, Y.; Wabuyele, B.; Gargiulo, P.; Pazdan, J. Berry, J.; Gupta, A.; Shah, R.; Wu, H.; Khan, M.; Real-time on-line uniformity monitoring using near-infrared reflectance spectrometry: A noninvasive off-line calibration approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 48-54.
103. Sweetmenn, S. C.; Martindale, W.; *Martindale: the complete drug reference*. 33. ed. London: Pharmaceutical Press, 2002. 2483 p.

104. Trevisan M.; Poppi, R. J.; Química Analítica de Processos, *Quím. Nova* 29 (2006) 1065-1071.
105. Tsou, T. L.; Wu, J. R.; Young, C. D.; Wang, T. M.; Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in pharmaceutical products by HPLC with fl-cyclodextrin stationary phase, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1197-1205.
106. United States Pharmacopoeia, USP 31 – NF 26: the official compendia of standards. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention (2007).
107. Valderrama, P.; Braga, J. W. B.; Poppi, R. J.; Estado da arte de figura de mérito em calibração multivariada, *Quím. Nova* 32 (5) (2009) 1-10.
108. Voort, V.; Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis, *Food Res. Int.* 25 (1992) 397-403.
109. Vredenburgt, M.J.; Blok-Tip, L.; Hoogerbrugge, R.; Barends, D.M.; Kaste, D.; Screening suspected counterfeit Viagra® and imitations of Viagra® with near-infrared spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 840-849
110. Wilson, R. H.; Fourier transform mid-infrared spectroscopy for food analysis, *Trends Anal. Chem.* 9 (1990) 127-131.
111. Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P.; Principal component analysis, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2 (1987) 37-52.
112. Wu, Y. W.; Sun, S. Q.; Zhou, Q.; Leung, H. W.; Fourier transform mid-infrared (MIR) and near-infrared (NIR) spectroscopy for rapid quality assessment of Chinese medicine preparation Honghua Oil, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 498-504.
113. Yu, L.; Xiang, B.; Quantitative determination of acyclovir in plasma by near-infrared spectroscopy, *Microchem. J.* 90 (2008) 63-66.