



Tese de Doutorado

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE
SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR ATR-FTIR E
DRIFTS EMPREGANDO CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA**

Fabiana Ernestina Barcellos da Silva

PPGQ

Santa Maria, RS - Brasil

2008

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE SULFAMETOXAZOL E
TRIMETOPRIMA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS
POR ATR-FTIR E DRIFTS EMPREGANDO CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA**

por

Fabiana Ernestina Barcellos da Silva

Tese 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 **Doutor em Química**

Santa Maria, RS - Brasil

2008

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 Tese de Doutorado

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR ATR-FTIR E DRIFTS EMPREGANDO
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

elaborada por

Fabiana Ernestina Barcellos da Silva

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

Doutor em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Érico Marlon de Moraes Flores - Orientador (UFSM-RS)

Dr. Marco Flôres Ferrão – Co-orientador (UNISC-RS)

Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval (UFRGS-RS)

Dr. Luciano Marder (UNISC - RS)

Dra. Miracy Muniz de Albuquerque (UFPE-PE)

Santa Maria, 10 de março de 2008.

**Aos meus pais, Luci e Antonio, pela educação.
Ao Alessandro, pelo amor.
À Geneci, pelo apoio.
Ao Érico e ao Ferrão, pelo exemplo profissional.**

AGRADECIMENTOS

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

À URI - Campus de Erechim, pelo incentivo à qualificação de seu corpo docente.

Ao Prof. Dr. **Érico M. M. Flores** pela orientação, amizade e incentivo. Pelo exemplo profissional e firmeza nos propósitos, ensinamentos que serão levados por toda vida.

Ao Prof. Dr. **Marco Flôres Ferrão**, por toda paciência, amizade e ensinamentos. Por me acolher e acreditar que seria possível, pelo convívio agradável. Suas atitudes me fizeram crescer pessoalmente e profissionalmente. Obrigada!

Ao Prof. Dr. **Valderi Luiz Dressler** pela amizade, incentivo e apoio para a minha formação profissional e, também, por participar como banca de qualificação deste trabalho.

Aos amigos do Setor de Química Industrial e Ambiental pela convivência, amizade e incentivo.

Aos amigos **Graciele** e **Edson**, por dividirem comigo seu conhecimento. Obrigada!

Aos colegas **Sandra, Silvane, Arno, Neiva** e **Chicota** pela convivência, amizade e incentivo, demonstrados através do apoio às atividades da Coordenação do Curso.

Ao **Alessandro** e **Geneci**, sem vocês a vida não seria “cor de rosa”. Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	<i>x</i>
LISTA DE TABELAS	<i>xiv</i>
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	<i>xvi</i>
RESUMO	<i>xix</i>
ABSTRACT	<i>xx</i>
1. INTRODUÇÃO	<i>1</i>
2. OBJETIVO	<i>4</i>
3. REVISÃO DA LITERATURA	<i>5</i>
3.1. CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS	<i>5</i>
3.2. FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS	<i>7</i>
3.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	<i>8</i>
3.3.1. Reflexão total atenuada.....	<i>11</i>
3.3.2. Reflexão difusa.....	<i>14</i>
3.4. QUIMIOMETRIA	<i>17</i>
3.4.1. Análise por agrupamentos hierárquicos	<i>19</i>
3.4.2. Análise por componentes principais.....	<i>20</i>
3.5. MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	<i>22</i>
3.5.1. Mínimos quadrados parciais.....	<i>24</i>
3.5.2. Desenvolvimento e avaliação de modelos de regressão	<i>25</i>
3.5.3. Detecção de amostras anômalas	<i>28</i>

3.5.4. Métodos de seleção de variáveis em modelos de regressão	28
3.5.5. Tratamento e pré-processamento dos dados	30
3.6. TESTES DE SIGNIFICÂNCIA PARA COMPARAÇÃO DOS MODELOS	30
3.7. APLICAÇÕES DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COMBINADA COM MÉTODOS MULTIVARIADOS PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS FARMACÊUTICAS.....	31
3.7.1. Espectroscopia no IR associada a controle de processos farmacêuticos	32
3.7.2. Espectroscopia no IR associada a determinações quantitativas	35
3.7.3. Espectroscopia no IR associada a métodos de classificação	38
3.7.4. Validação de métodos multivariados de calibração.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1. INSTRUMENTAÇÃO	44
4.2. REAGENTES	45
4.3. AMOSTRAS	45
4.4. PROGRAMAS COMPUTACIONAIS	47
4.5. DETERMINAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA POR HPLC	47
4.6. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	48
4.6.1. Aquisição dos espectros por reflexão total atenuada	48
4.6.2. Aquisição dos espectros por reflexão difusa	50
4.7. CONSTRUÇÃO DOS MODELOS - ANÁLISE MULTIVARIADA.....	53
4.7.1. Detecção de amostras anômalas	53
4.7.2. Seleção das amostras dos conjuntos de calibração e previsão	53

4.7.3. Desenvolvimento dos modelos para determinação de sulfametoxazol e trimetoprima.....	54
4.7.3.1. Testes preliminares e obtenção do modelo global PLS.....	55
4.7.3.2. Método de seleção de variáveis	55
4.7.3.3. Avaliação dos modelos obtidos	55
4.7.4. Comparação entre os modelos de calibração através de testes de significância	56
4.8. FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DESENVOLVIDAS.....	57
5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	58
5.1. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS FÁRMACOS E ASSOCIAÇÕES	58
5.2. DETECÇÃO DE AMOSTRAS ANÔMALAS - ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS	62
5.3. SELEÇÃO DE AMOSTRAS PARA CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO E PREVISÃO	64
5.4. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES UTILIZADAS NOS MODELOS.....	67
5.5. TESTES PRELIMINARES E OBTENÇÃO DO MODELO GLOBAL	69
5.6. DETERMINAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL POR ATR-FTIR	71
5.7. DETERMINAÇÃO DE TRIMETOPRIMA POR ATR-FTIR	76
5.8. DETERMINAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL POR DRIFTS.....	82
5.9. DETERMINAÇÃO DE TRIMETOPRIMA POR DRIFTS.....	87

5.10. COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE REFLEXÃO ATENUADA E DIFUSA NA DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS	92
5.10.1. Comparação dos erros de previsão entre os modelos selecionados através de teste F	92
5.10.2. Resultados obtidos na determinação de sulfametoxazol	93
5.10.3. Resultados obtidos na determinação de trimetoprima	94
5.10.4. Considerações finais	95
6. CONCLUSÕES	97
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	99
8. REFERÊNCIAS	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema do interferômetro de Michelson	10
Figura 2.	Representação da reflexão em um elemento de reflexão interna	12
Figura 3.	Representação da propagação da radiação infravermelha através de elemento de reflexão interna	13
Figura 4.	Representação de reflexão especular e difusa de uma onda eletromagnética em uma amostra particulada.....	15
Figura 5.	Matriz de dados gerada a partir de um espectro	18
Figura 6.	Princípios da análise por componentes principais.....	21
Figura 7.	Esquema de interpretação 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	22
Figura 8.	Acessório de reflexão total atenuada acoplada ao espectrômetro de infravermelho: a) acessório sem amostra, b) acessório com amostra....	49
Figura 9.	Perfil dos espectros das amostras obtidos por ATR-FTIR.....	50
Figura 10.	Acessório de reflexão difusa acoplado ao espectrômetro de infravermelho: a) acessório com material inerte (KBr), b) acessório com amostra.....	52
Figura 11.	Perfil dos espectros das amostras obtidos por DRIFTS	52

Figura 12. Fluxograma das etapas desenvolvidas na determinação de sulfametoxazol e trimetoprima por ATR-FTIR e DRIFTS.....	57
Figura 13. Fórmulas estruturais do (a) sulfametoxazol e (b) trimetoprima.....	58
Figura 14. Espectro de sulfametoxazol por reflexão total atenuada e reflexão difusa	60
Figura 15. Espectro de trimetoprima por reflexão total atenuada e reflexão difusa	60
Figura 16. Gráfico de diagnóstico de amostras anômalas.....	64
Figura 17. Dendrograma fornecido pela análise por agrupamentos hierárquicos, para a seleção das amostras dos conjuntos de calibração e previsão.....	66
Figura 18. Distribuição das amostras de calibração e validação para a quantificação de sulfametoxazol.....	66
Figura 19. Distribuição das amostras de calibração e validação para a quantificação de trimetoprima.....	67
Figura 20. Número de variáveis latentes vs. RMSECV para modelo PLS – Representação do “mínimo local”	68
Figura 21. Número de variáveis latentes vs. RMSECV para modelo PLS – Representação do comportamento monotônico.	69
Figura 22. Valores de RMSECV para o modelo global (linha tracejada) e para os intervalos (barras) na determinação de sulfametoxazol por ATR-FTIR.....	72
Figura 23. Valores de referência vs. valores previstos do modelo siPLS para sulfametoxazol usando os intervalos 9 e 23 por ATR-FTIR.....	75

- Figura 24.** Erro relativo para as 23 amostras do conjunto de previsão na determinação de sulfametoxazol por siPLS e ATR-FTIR75
- Figura 25.** Histograma da diferença entre o valor médio da concentração pelo método de referência e o valor médio previsto obtido pelo modelo siPLS para 6 amostras comerciais na determinação de sulfametoxazol por ATR-FTIR76
- Figura 26.** Valores de RMSECV para o modelo global (linha tracejada) e para os intervalos (barras) na determinação de trimetoprima por ATR-FTIR.....77
- Figura 27.** Valores de referência vs. valores previstos do modelo siPLS para trimetoprima usando os intervalos 14, 39 e 49 por ATR-FTIR.....80
- Figura 28.** Erro relativo para as 23 amostras do conjunto de previsão na determinação de trimetoprima por siPLS e ATR-FTIR81
- Figura 29.** Histograma da diferença entre o valor médio da concentração pelo método de referência e o valor médio previsto obtido pelo modelo siPLS para 6 amostras comerciais na determinação de trimetoprima por ATR-FTIR82
- Figura 30.** Valores de RMSECV para o modelo global (linha tracejada) e para os intervalos (barras) na determinação de sulfametoxazol por DRIFTS.....83
- Figura 31.** Valores de referência vs. valores previstos do modelo siPLS para sulfametoxazol usando os intervalos 6,7 e 10 por DRIFTS86
- Figura 32.** Erro relativo para as 23 amostras do conjunto de previsão na determinação de sulfametoxazol por siPLS e DRIFTS86

- Figura 33.** Histograma da diferença entre o valor médio da concentração pelo método de referência e o valor médio previsto obtido pelo modelo siPLS para 6 amostras comerciais na determinação de sulfametoxazol por DRIFTS87
- Figura 34.** Valores de RMSECV para o modelo global (linha tracejada) e para os intervalos (barras) na determinação de trimetoprima por DRIFTS88
- Figura 35.** Valores de referência vs. valores previstos do modelo siPLS para trimetoprima usando os intervalos 15 e 17 por DRIFTS.....90
- Figura 36.** Erro relativo para as 23 amostras do conjunto de previsão na determinação de trimetoprima por siPLS e DRIFTS.....91
- Figura 37.** Histograma da diferença entre o valor médio da concentração pelo método de referência e o valor médio previsto obtido pelo modelo siPLS para 6 amostras comerciais na determinação de trimetoprima por DRIFTS92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Regiões espectrais do infravermelho.	8
Tabela 2. Principais características das diferentes composições dos prismas de elementos de reflexão interna disponíveis.....	14
Tabela 3. Parâmetros de validação para métodos multivariados	42
Tabela 4. Composição das amostras sintéticas empregadas	46
Tabela 5. Instrumentação e regiões empregadas na aquisição dos espectros por ATR-FTIR	48
Tabela 6. Instrumentação e regiões empregadas na aquisição dos espectros por DRIFTS	51
Tabela 7. Excipientes das formulações de comprimidos contendo sulfametoxazol e trimetoprima.....	62
Tabela 8. Variância e variância acumulada em função do número de componentes principais utilizadas	63
Tabela 9. Pré-processamentos e tratamentos aplicados aos dados ATR-FTIR para sulfametoxazol.....	70
Tabela 10. Pré-processamentos e tratamentos aplicados aos dados ATR-FTIR para trimetoprima	71
Tabela 11. Parâmetros dos modelos iPLS para sulfametoxazol utilizando ATR-FTIR.....	73

Tabela 12. Parâmetros dos modelos siPLS para sulfametoxazol utilizando ATR-FTIR	74
Tabela 13. Parâmetros dos modelos iPLS para trimetoprima utilizando ATR-FTIR.....	78
Tabela 14. Parâmetros dos modelos siPLS para trimetoprima utilizando ATR-FTIR.....	79
Tabela 15. Parâmetros dos modelos iPLS para sulfametoxazol utilizando DRIFTS.....	83
Tabela 16. Parâmetros dos modelos siPLS para sulfametoxazol utilizando DRIFTS.....	85
Tabela 17. Parâmetros dos modelos iPLS para trimetoprima utilizando DRIFTS	89
Tabela 18. Parâmetros dos modelos siPLS para trimetoprima utilizando DRIFTS.....	89
Tabela 19. Resultados médios da previsão de sulfametoxazol	93
Tabela 20. Resultados médios da previsão de trimetoprima	95
Tabela 21. Principais parâmetros para a determinação de sulfametoxazol e trimetoprima por ATR-FTIR e DRIFTS	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. AMTIR, do inglês *amorphous material transmitting infrared radiation*.
2. ANN, redes neurais artificiais, do inglês *artificial neural networks*.
3. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
4. ASTM, do inglês *American Society for Testing and Materials*.
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. BP, Farmacopéia Britânica, do inglês *British Pharmacopoeia*.
8. BPF, Boas Práticas de Fabricação.
9. CM, centrado na média.
10. CP, componente principal.
11. DRIFTS, espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier e reflectância difusa, do inglês *diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy*.
12. DTGS, detector de sulfato de triglicina deuterada.
13. EP, Farmacopéia Européia, do inglês *European Pharmacopoeia*.
14. FB, Farmacopéia Brasileira.
15. FDA, *Food and Drug Administration*.
16. FIR, infravermelho distante, do inglês *far infrared*.
17. FT, transformada de Fourier, do inglês *Fourier transform*.
18. FTIR, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*.
19. GA, algoritmos genéticos, do inglês *genetic algorithm*.
20. HCA, análise por agrupamentos hierárquicos, do inglês *hierarchical cluster analysis*.
21. HPLC, cromatografia líquida de alto desempenho, do inglês *high performance liquid chromatography*.
22. iPLS, mínimos quadrados parciais por intervalo, do inglês *interval partial least squares*.

23. IR, espectroscopia na região do infravermelho, do inglês *infrared spectroscopy*.
24. IRE, elemento de reflexão interna, do inglês *internal reflection element*.
25. LDA, análise discriminante linear, do inglês *linear discriminant analysis*.
26. MIR, infravermelho médio, do inglês *mid infrared*.
27. MLR, regressão linear múltipla, do inglês *multiple linear regression*.
28. MSC, correção do espalhamento multiplicativo, do inglês *multiplicative scatter correction*.
29. NAS, sinal analítico líquido, do inglês *net analytical signal*.
30. NIR, infravermelho próximo, do inglês *near infrared*.
31. NIRRS, espectroscopia no infravermelho próximo por reflexão difusa, do inglês *near infrared reflectance spectroscopy*.
32. P.A., para análise.
33. PABA, ácido p-aminobenzoico, do inglês *para-aminobenzoic acid*.
34. PAT, tecnologia analítica de processos, do inglês *process analytical technology*.
35. PCA, análise por componentes principais, do inglês *principal component analysis*.
36. PCR, regressão por componentes principais, do inglês *principal component regression*.
37. PLS, mínimos quadrados parciais, do inglês *partial least squares*.
38. R^2 , coeficiente de determinação.
39. RMSE, raiz quadrada dos erros médios, do inglês *root mean square error*.
40. RMSEC, raiz quadrada do erro médio da calibração, do inglês *root mean square error of calibration*.
41. RMSECV, raiz quadrada do erro médio da validação cruzada, do inglês *root mean square error of cross-validation*.
42. RMSEP, raiz quadrada do erro médio de previsão, do inglês *root mean square error of prediction*.
43. RMSEV, raiz quadrada do erro médio da validação, do inglês *root mean square error of validation*.
44. RSEP, erro padrão de predição relativo, do inglês *relative standard error of prediction*.

45. SDV, desvio padrão da validação, do inglês *standard deviation of validation*.
46. SIMCA, modelagem independente de analogia de classes, do inglês *soft independent modelling of class analogy*.
47. siPLS, mínimos quadrados parciais por sinergismo de intervalos, do inglês *synergy partial least squares*.
48. SMZ, sulfametoxazol.
49. TMP, trimetoprima.
50. USP, Farmacopéia dos Estados Unidos, do inglês *United States Pharmacopoeia*.
51. VL, variáveis latentes.

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR ATR-FTIR E DRIFTS EMPREGANDO CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

AUTORA: FABIANA ERNESTINA BARCELLOS DA SILVA
ORIENTADOR: DR. ÉRICO MARLON DE MORAES FLORES
Data e local da defesa: Santa Maria, 10 de março de 2008.

Neste trabalho foram desenvolvidos modelos de calibração por mínimos quadrados parciais (PLS) para a determinação simultânea de sulfametoxazol (SMZ) e trimetoprima (TMP) em medicamentos. Métodos de seleção de variáveis, como o método por mínimos quadrados parciais por intervalo (iPLS) e o método dos mínimos quadrados parciais por sinergismo de intervalos (siPLS) foram aplicados para selecionar região(ões) do espectro no infravermelho que apresente(m) melhor correlação com cada uma das substâncias ativas estudados. Um total de 49 amostras sintéticas e 15 amostras comerciais foi empregado para compor os conjuntos de calibração e de previsão, sendo consideradas as faixas de concentração de 400 a 900 mg g⁻¹ para o sulfametoxazol e de 80 a 240 mg g⁻¹ para a trimetoprima. Os dados espectrais foram adquiridos na faixa de 650 a 4000 cm⁻¹ com resolução de 2 cm⁻¹ por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier empregando-se um acessório de reflectância total atenuada (ATR-FTIR) e 600 a 4000 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹ por espectroscopia no infravermelho por reflexão difusa (DRIFTS). Os dados obtidos foram comparados com o método oficial por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Um erro de previsão (RMSEP) de 13,18 mg g⁻¹ para SMZ e 6,03 mg g⁻¹ para TMP foi obtido após seleção dos melhores intervalos por siPLS para dados obtidos por ATR-FTIR. Um RMSEP de 13,03 mg g⁻¹ para SMZ e 4,88 mg g⁻¹ para TMP foi obtido após seleção dos melhores intervalos por siPLS para dados obtidos por DRIFTS. Os resultados mostraram que modelos de regressão PLS (associados a métodos de seleção de variáveis, como iPLS e siPLS) combinados com ATR-FTIR ou DRIFTS são promissores no desenvolvimento de metodologias mais simples, rápidas e não destrutivas. Estes modelos podem ser aplicados para a determinação simultânea de SMZ e TMP em formulações farmacêuticas.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SULPHAMETHOXAZOLE AND TRIMETHOPRIM IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS BY ATR-FTIR AND DRIFTS USING MULTIVARIATE CALIBRATION

AUTHOR: FABIANA ERNESTINA BARCELLOS DA SILVA
ADVISER: DR. ÉRICO MARLON DE MORAES FLORES
Date and place of defense: Santa Maria, March 10th, 2008.

A partial least-squares calibration (PLS) procedure in combination with infrared spectroscopy has been developed for simultaneous determination of sulphamethoxazole (SMZ) and trimethoprim (TMP) in raw material powder mixtures used in commercial pharmaceutical products. Multivariate calibration modeling procedures, interval partial least squares (iPLS) and synergy partial least squares (siPLS), were applied to select a spectral range that provided the lowest prediction error in comparison to the full-spectrum model. The experimental matrix was constructed using 49 synthetic samples and 15 commercial samples. The considered concentration ranges were 400 to 900 mg g⁻¹ SMZ and 80 to 240 mg g⁻¹ TMP. Spectral data were recorded between 650 and 4000 cm⁻¹ with a 2 cm⁻¹ resolution by Fourier transform infrared spectroscopy coupled with attenuated total reflectance (ATR-FTIR) and 600 and 4000 cm⁻¹ with a 4 cm⁻¹ resolution by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS). The proposed procedures were compared with conventional procedure by high performance liquid chromatography (HPLC). A root mean square error of prediction (RMSEP) of 13.18 mg g⁻¹ for SMZ and 6.03 mg g⁻¹ for TMP was obtained after selection of better intervals by *si*PLS for ATR-FTIR and 13.03 mg g⁻¹ for SMZ and 4.88 mg g⁻¹ for TMP after selection of better intervals by *si*PLS for DRIFTS. Results showed that PLS regression model (associated with iPLS and siPLS regression models) combined to ATR-FTIR or DRIFTS are relatively simple, rapid and accurate procedures. These procedures could be applied to the simultaneous determination of SMZ and TMP in routine quality control of powder mixtures.

1. INTRODUÇÃO

O conceito de controle de qualidade de produtos farmacêuticos consiste no esforço organizado dentro de uma empresa, no sentido de projetar, produzir, manter e assegurar as características especificadas em cada unidade do produto distribuído para comercialização¹¹⁶. 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 formas farmacêuticas.

Diversos parâmetros no controle de qualidade de medicamentos podem ser controlados empregando a espectroscopia no infravermelho (IR). Suas vantagens têm sido reconhecidas, principalmente após a iniciativa do FDA em promover discussões a respeito da Tecnologia Analítica de Processos (PAT, do inglês “*Process Analytical Technology*”), que consiste em um sistema para controle de qualidade através de análises durante o processo de produção, com o objetivo de garantir a qualidade final do produto. Para tanto, são necessários métodos analíticos, que possam fornecer informações imediatas^{90,11,139}. A espectroscopia no IR possui as vantagens descritas acima, principalmente quando associada às técnicas de reflectância. Esta técnica permite redução do uso de solventes, menor pré-tratamento da amostras e maior rapidez na análise. Neste contexto, os métodos por reflexão difusa no IR próximo (NIRRS, do inglês “*near infrared reflectance spectroscopy*”), reflexão difusa no IR médio (DRIFTS, do inglês “*diffuse reflectance Fourier transform spectroscopy*”) e reflexão total atenuada no IR médio (ATR-FTIR, do inglês “*Fourier transform infrared – attenuated total reflectance*”) são apontados como alternativas aos métodos oficiais, em função destes não empregarem reagentes químicos, serem rápidos, não destrutivos e utilizarem poucos miligramas de amostra para a sua realização¹³¹. Além disso, em virtude da natureza do sinal, a

¹¹⁶ Pinto, T. J. A.; Kaneko, T. M.; Ohara, M. T.; *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*, 2000, 15-42.

⁹⁰ Lundstedt-Enkel, K. *et al*, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 84 (2006) 201-207.

¹¹ Blanco, M.; Alcalá, M.; *Eur. J. Pharm. Sci.* 27 (2006) 280-286.

¹³⁹ Wold, S. *et al*, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 84 (2006) 159-163.

¹³¹ Souza, J. S.; Ferrão, M. F., *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 42 (2006) 437-445.

espectroscopia no IR ainda permite a determinação simultânea de parâmetros físicos e químicos, para um mesmo conjunto de dados^{16,135}.

A determinação de analitos por espectroscopia no IR de misturas complexas requer o uso de métodos de calibração multivariada, em virtude do tipo de informação espectral fornecida (espectros com sobreposição de sinais) e do grande número de variáveis (o que dificulta a utilização de métodos de regressão linear múltipla)⁶⁵. Desta forma, métodos de calibração multivariada como Regressão por Componentes Principais (PCR, do inglês "*Principal Component Regression*") ou regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS, do inglês "*Partial Least Squares*") podem ser utilizados, pois proporcionam a obtenção de informação útil em um conjunto complexo de dados. Esta informação pode, ainda, ser otimizada através de métodos de seleção de variáveis, na qual um subconjunto de números de onda com informações pertinentes ao sistema analisado é selecionado e as informações nulas ou redundantes são descartadas, gerando modelos mais estáveis. Entre os métodos de seleção de variáveis, descritos na literatura, aqueles que têm por princípio dividirem o espectro em regiões eqüidistantes e buscar a informação através da construção de modelos de calibração com os subintervalos ou, a partir da combinação destes, se destacam pela facilidade na aplicação e possibilidade de interpretação da relação entre o modelo e a composição da amostra.

A informação obtida a partir de espectros na região do IR médio pode facilitar a interpretação da relação existente entre a região do espectro selecionada para construção de um modelo de calibração multivariada e a composição química da amostra, quando comparada à espectroscopia no IR próximo. Porém, em virtude da natureza do sinal, as sobreposições espectrais entre analito e interferentes podem dificultar esta interpretação. Atribui-se ao exposto acima, o fato da espectroscopia no IR médio ser, ainda, pouco explorada na literatura para a quantificação de fármacos, principalmente quando estes estão presentes em associações nas formas farmacêuticas, formando misturas complexas^{6,27, 90,126}.

A associação entre sulfametoxazol (SMZ) e trimetoprima (TMP) é utilizada para o tratamento de infecções, sendo comercializada na forma de comprimidos,

¹⁶ Blanco, M. *et al.*, *Analyst* 123 (1998) 2307-2312.

¹³⁵ Wartewig, S.; Neubert, R. H. H., *Adv. Drug Deliver. Rev.* 57 (2005)1144-1170.

⁶⁵ Gemperline, P., *Practical guide to chemometrics*, New York, 2006, 140-145.

⁶ Armenta, S. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 545 (2005) 99-106.

²⁷ Boyer, C. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 433-437.

⁹⁰ Lundstedt-Enkel, K. *et al.*, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 84 (2006) 201-207.

¹²⁶ Salari, A.; Young, R. E., *Int. J. Pharm.* 163 (1998) 157-166.

suspensões e soluções intravenosas. Segundo os códigos oficiais vigentes no país, a determinação simultânea dos fármacos pode ser realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês “*High performance liquid chromatography*”), sendo este o procedimento adotado pelas indústrias farmacêuticas, de uma forma geral, para a quantificação dos fármacos. Porém, este tipo de análise não permite a correção de possíveis defeitos no produto final, ou durante o processo de fabricação do mesmo, sem a necessidade de manipulação de solventes e preparos que podem consumir tempo.

Até o presente momento, a determinação simultânea por ATR-FTIR (a partir de um mesmo conjunto de dados) de associações contendo SMZ e TMP na forma sólida, não foi descrita na literatura, sendo o uso da técnica de reflexão atenuada pouco difundida na análise de pós, de uma forma geral. A espectroscopia no IR por refletância difusa é mais utilizada na análise de pós farmacêuticos, principalmente na região do infravermelho próximo (NIRRS)^{18,19,25,36,51,92,122} e na determinação de amostras sólidas por infravermelho médio (DRIFTS)^{87,107,118,131}. Entretanto, o desenvolvimento de um método para a determinação dos fármacos em questão, (na forma de pó) por DRIFTS, permanece pouco explorado na literatura⁴².

¹⁸ Blanco, M. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22 (2000) 139-148.

¹⁹ Blanco, M.; Gozález Bañó, R.; Bertran, E., *Talanta* 56 (2002) 203-212.

²⁵ Bogomolov, A.; Hachey, M., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 88 (2007) 132-142.

³⁶ Chalus, P. *et al.*, *Talanta*, 66 (5) (2005) 1294-1302.

⁵¹ Feng, Y.; Hu, C., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 373-384.

⁹² McGoverin, C. M. *et al.*, *Vib. Spectrosc.* 41 (2006) 225-231.

¹²² Roggo, Y. *et al.*, *Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 683-700.

⁸⁷ Li, W.; Worosila, G. D., *Int. J. Pharm.* 295 (2005) 213-219.

¹⁰⁷ Parisotto, G. *et al.*, *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 43 (2007) 89-96.

¹¹⁸ Pöllänen, K. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 544 (2005) 108-117.

¹³¹ Souza, J. S.; Ferrão, M. F., *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 42 (2006) 437-445.

⁴² Cordeiro, G. A., Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2006.

2. OBJETIVO

Esta tese tem por objetivo o desenvolvimento de métodos analíticos alternativos para a determinação simultânea dos fármacos SMZ e TMP em amostras de comprimidos, através da utilização de espectroscopia no infravermelho médio, associada com técnicas de reflexão (DRIFTS e ATR-FTIR). Para tal procedimento foram utilizados dois algoritmos de seleção de variáveis, o método dos mínimos quadrados parciais por intervalo (iPLS, do inglês “*Interval Partial Least Squares*”)¹⁰² e o método dos mínimos quadrados parciais por sinergismo de intervalos (siPLS, do inglês “*Synergical Interval Partial Least Squares*”)⁹⁷.

¹⁰² Norgaard, L. *et al.*, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 413-419.

⁹⁷ Munck, L. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 446 (2001) 169-184.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Controle de qualidade de produtos farmacêuticos

O controle de qualidade em indústrias farmacêuticas faz parte de um conjunto de ações denominada Boas Práticas de Fabricação (BPF), dirigida no sentido de diminuir os riscos inerentes a cada etapa do processo e pode ser dividido em duas etapas bem características: o controle de qualidade da formulação durante o processo de produção e o controle de qualidade do produto final. Para as duas etapas, há exigência, por parte dos órgãos reguladores, de métodos de análise confiáveis e robustos e que possam ser utilizados na rotina para assegurar a qualidade do produto final³⁰.

Entre as técnicas mais utilizadas pela indústria farmacêutica no controle de qualidade do produto final, destaca-se a cromatografia líquida, devido principalmente a capacidade de separação dos analitos, permitindo a análise de misturas complexas.

A associação entre dois ou mais fármacos é um recurso terapêutico bastante comum, utilizado na maioria das vezes, com o objetivo de potencializar a ação esperada do medicamento. Vários exemplos de associações de fármacos estão descritas na literatura, como hormônios, vitaminas, antimicrobianos, entre outros. Geralmente, estes fármacos são estruturas químicas com forte absorção na região do ultravioleta e/ou infravermelho, sendo necessária uma etapa de separação anterior à quantificação dos mesmos. Como mencionado anteriormente, a cromatografia líquida é considerada uma técnica apropriada para a análise deste tipo de associação, já que promove a separação física dos compostos e permite a quantificação dos mesmos através de uma única resposta do detector (também conhecido como método de calibração univariada). Atualmente, os avanços instrumentais na área da cromatografia líquida permitem análises mais eficientes e robustas. Entretanto, tal método envolve o uso de reagentes tóxicos, além de

³⁰ BRASIL. RDC 210, de 04 de agosto de 2003. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2003.

tempos de análise relativamente longos, não sendo adequada para inclusão na etapa de controle do processo de produção.

Métodos de análise para preparações farmacêuticas contendo a associação entre SMZ e TMP são descritos nas farmacopéias norte-americana (USP, do inglês “United States Pharmacopoeia”), britânica (BP, do inglês “British Pharmacopoeia”), brasileira (FB, Farmacopéia Brasileira) e européia (EP, do inglês “European Pharmacopoeia”). Segundo a Farmacopéia Brasileira 4^a edição⁵⁰, três métodos são descritos para o doseamento de comprimidos contendo a associação:

- 1) Por espectrofotometria de absorção no ultravioleta: este procedimento é sugerido para o doseamento da trimetoprima na associação e envolve duas etapas de extração (com clorofórmio e ácido acético) antes da medida da absorvância da solução resultante.
- 2) Por titulação em meio não-aquoso: este procedimento é sugerido para o doseamento do sulfametoxazol na associação e envolve a solubilização da amostra com ácido acético glacial e titulação com nitrito de sódio.
- 3) Por cromatografia líquida de alta eficiência: este procedimento é sugerido para o doseamento da associação e envolve a separação dos analitos por cromatografia em fase reversa, utilizando coluna de sílica ligada a grupo octadecilsilano e fase móvel formada pela mistura de água, acetonitrila e trietilamina.

Diversos métodos analíticos alternativos têm sido desenvolvidos para a determinação de SMZ e TMP em preparações farmacêuticas. Nestas quantificações têm sido empregados métodos simples, através da espectrofotometria (baseados na formação de um derivado avermelhado pela diazotação de sulfonamidas)⁹⁸, cromatografia líquida^{3,61}, espectrofotometria derivativa⁶⁹ e voltametria³⁴. Para todos os métodos acima citados, existe a necessidade de uma etapa prévia de preparo da amostra.

Métodos alternativos que possam ser utilizados em controle de processo são úteis, uma vez que substituem uma das etapas no controle destes produtos, permitindo determinações em menor tempo e reduzindo os custos referentes ao

⁵⁰ Farmacopéia Brasileira: parte II, quarto fascículo. 4. ed, 2003.

⁹⁸ Nagaraja, P. *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53 (2002) 187-192.

³ Akay, C.; Ozkan, S. A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 1207-1213.

⁶¹ Garcia-Alvarez-Coque, M. C. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 237-245.

⁶⁹ Granero, G.; Garneró, C.; Longhi, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 51-59.

³⁴ Carapuça, H. M.; Cabral, D. J.; Rocha, L. S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 364-369.

consumo de reagentes. As técnicas de refletância no IR permitem a análise de amostras sem necessidade de preparo da mesma, sendo que, para alguns equipamentos o acoplamento de sensores permite determinações in-line, ou seja, o sensor encontra-se em contato direto com a linha do processo¹³³. Estas técnicas fornecem informações qualitativas e quantitativas importantes a respeito de sistemas complexos (como mistura de fármacos) e possibilitam a análise de amostras no estado sólido, semi-sólido e líquido sem a necessidade de utilização de uma etapa prévia de diluição com brometo de potássio (KBr), como em análises por transmissão, sendo considerada promissora quando aplicada em rotinas de controle de qualidade em indústrias²⁶.

3.2. Fármacos antimicrobianos

O termo quimioterapia refere-se ao uso de compostos químicos sintéticos capazes de destruir agentes infecciosos. O termo inclui os chamados agentes antimicrobianos, que são capazes de destruir ou inibir o crescimento de microorganismos. Entre os diferentes modos de ação dos fármacos antimicrobianos, as sulfonamidas e a trimetoprima se caracterizam por interferirem na síntese ou na ação do folato, impedindo o crescimento bacteriano por interrupção de uma etapa metabólica essencial⁷⁹.

As sulfonamidas antimicrobianas clinicamente úteis derivam da sulfanilamida por substituição do componente amida (SO_2NHR). A sulfanilamida é um análogo estrutural do ácido p-aminobenzóico (PABA), que é essencial para a síntese de ácido fólico nas bactérias. As sulfonamidas competem com o PABA pela enzima diidropteroato sintetase, inibindo o metabolismo das bactérias. O SMZ constitui um exemplo de sulfonamida com ação antimicrobiana que é administrado associado à TMP. A TMP tem ação antimicrobiana em etapa metabólica posterior às sulfonamidas agirem em tal via¹²⁰.

A associação entre SMZ e TMP é comercializada na forma de comprimidos, suspensões e soluções intravenosas, sendo indicada no tratamento de bronquites, otites, infecções urinárias, gastrintestinais e outros tipos de infecções¹⁰⁴. Segundo a ANVISA, estão disponíveis no mercado nacional 7 apresentações da associação

¹³³ Trevisan, M. G.; Poppi, R. J., *Quim. Nova*, 29 (2006) 1065-1071.

²⁶ Borin, A.; Poppi, R. J., *Vib. Spectrosc.* 37 (2005) 27-32.

⁷⁹ Katzung, B. G.; Voeux, P. L.; *Farmacologia básica & clínica*. Rio de Janeiro, 2003, 15-25.

¹²⁰ Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; *Farmacologia*, Rio de Janeiro, 2001, 15-32.

¹⁰⁴ O'Neil, M. J.; Smith, A.; Heckelman, P. E.; Budavari, S.; *The Merck Index*, USA, 2001, 1151-1198.

classificadas como medicamento genérico e outras 45 apresentações classificadas como medicamento similar, além da associação produzida por laboratório multinacional, classificada como medicamento de referência⁵.

3.3. Espectroscopia no infravermelho

A região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho se estende de, aproximadamente, 12800 a 10 cm^{-1} (0,78 μm a 1000 μm). A região compreendida entre 10 e 200 cm^{-1} é conhecida como infravermelho distante (do inglês *Far IR - FIR*), a região compreendida entre 200 e 4000 cm^{-1} é conhecida como infravermelho médio (do inglês *Mid IR - MIR*) e a região compreendida entre 4000 e 12800 cm^{-1} corresponde à região conhecida como infravermelho próximo (do inglês *Near IR - NIR*) (Tabela 1)¹³⁰.

Tabela 1. Regiões espectrais do infravermelho¹³⁰.

Região	Faixa de número de onda (cm^{-1})	Faixa de comprimento de onda (μm)
Próximo	12800 a 4000	0,78 a 2,5
Médio	4000 a 200	2,5 a 50
Distante ou longínquo	200 a 10	50 a 1000

A absorção da radiação no infravermelho está restrita a espécies moleculares que apresentam pequena diferença de energia entre os diversos estados vibracionais ou rotacionais, já que não possui energia suficiente para promover transições eletrônicas como a radiação ultravioleta ou visível. Portanto, para que uma molécula absorva radiação no infravermelho é necessário que exista alteração do momento de dipolo elétrico como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional, resultando em absorção da energia radiante¹³⁰.

Dois tipos principais de vibrações podem ocorrer a partir da absorção da radiação no infravermelho: deformações axiais (estiramentos) e deformações angulares. Uma vibração de deformação axial consiste na mudança contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos, aumentando e

⁵ ANVISA. Bulário Eletrônico Nacional, 2007.

¹³⁰ Skoog, D.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Principles of instrumental analysis*, Orlando, 1998, 380-403.

diminuindo alternadamente, podendo ser de dois tipos: o estiramento simétrico (v_s) que provoca um movimento harmônico da distância interatômica e o estiramento assimétrico (v_{as}) que promove um movimento desarmônico da distância interatômica¹³⁰. As vibrações de deformação angular consistem na mudança do ângulo entre duas ligações, podendo ser classificadas em quatro tipos de vibrações fundamentais (que apresentam denominações características em relação ao movimento): deformação angular simétrica no plano (ρ , balanço) e fora do plano (ω , sacudida), e deformação angular assimétrica no plano (δ , tesoura) e fora do plano (τ , torção)¹³⁰. Para a região NIR, os sinais consistem basicamente de sobretons e bandas de combinação de estiramentos e deformações das vibrações fundamentais da região MIR.

Durante muitos anos, os espectrômetros de infravermelho eram do tipo dispersivo. Os espectros eram obtidos com o auxílio de um feixe de luz infravermelho passado através da amostra e a radiação transmitida por dispersão em uma rede de difração¹²⁹. Estes espectrômetros estão em desuso, sendo gradualmente substituídos por espectrômetros com transformada de Fourier (FT)⁷. A combinação de FT e da nova geometria dos espectrômetros com a utilização do interferômetro de Michelson permitiu a obtenção de espectros com enorme ganho de tempo e menos ruidosos. Estes fatores, aliados ao grande desenvolvimento da eletrônica e da informática, possibilitaram o desenvolvimento de novos algoritmos, tornando os espectrômetros mais rápidos e robustos¹³⁰.

A Figura 1 mostra o esquema do interferômetro de Michelson, onde a radiação emitida pela fonte passa por um divisor de feixe, que direciona 50% da radiação para um espelho fixo e outros 50% da radiação para um espelho móvel. A radiação é refletida pelos espelhos, retornando ao divisor de feixes, onde se recombinam e sofrem interferência. A diferença na distância seguida pelas duas ondas no interferômetro é chamada de atraso (δ) e o gráfico da intensidade da radiação registrada pelo detector versus o atraso é denominada interferograma¹³⁴.

¹³⁰ Skoog, D.; Höller, F. J.; Nieman, T. A.; *Principles of instrumental analysis*, Orlando, 1998, 380-403.

¹²⁹ Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemlle, D. J.; *Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos*, Rio de Janeiro, 2006, 138-141.

⁷ Barbosa, L. C. A.; *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, 2007, 25-43.

¹³⁴ Voort, F. R., *Food Res. Int.* 25 (1992) 397-403.

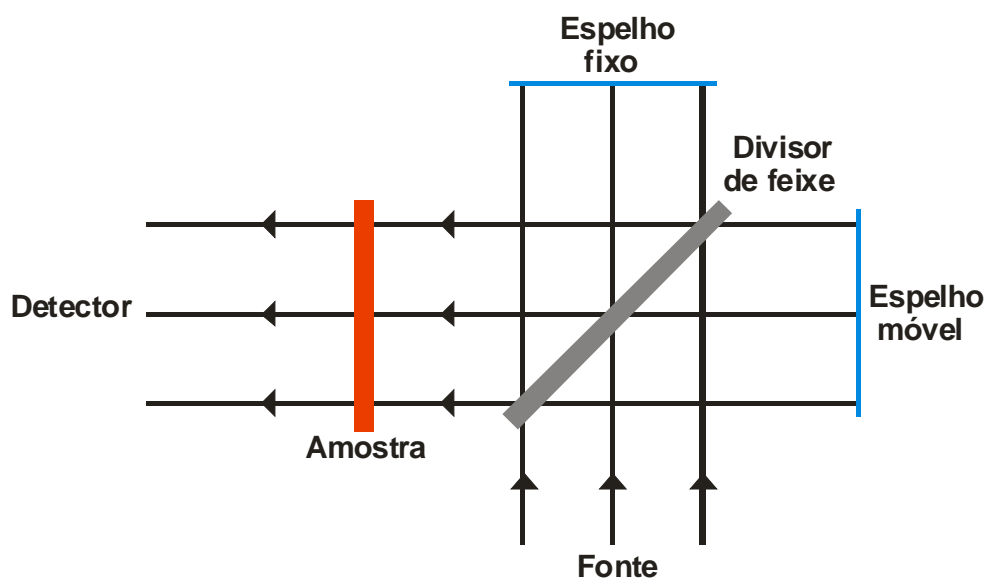


Figura 1. Esquema do interferômetro de Michelson (adaptada da ref. 134).

Após a construção do interferograma, utiliza-se um procedimento matemático, a FT para a obtenção de um espectro convencional, passível de interpretação^{7,134}. A partir do tratamento matemático do sinal pela FT, os espectros apresentam melhor razão sinal-ruído, sendo obtidos em poucos segundos, com maior resolução e precisão nas medidas de número de onda⁷¹.

Espectrômetros que operam na região do infravermelho médio podem fornecer espectros a partir de dois modos distintos, relacionados à forma como a radiação atinge a amostra: transmissão ou reflexão⁷.

No modo de transmissão, a radiação atravessa a amostra, sendo parte absorvida e parte transmitida. A amostra é preparada na forma de pastilhas prensadas juntamente com um material inerte, geralmente brometo de potássio (KBr). Este método é o mais utilizado para identificação de compostos químicos, sendo indicado por códigos oficiais como método de escolha para identificação de matérias-primas farmacêuticas, na forma sólida. Para fins quantitativos, este método pode apresentar dificuldade de utilização em função da necessidade de preparo da amostra (confeção da pastilha) e reprodutibilidade dos resultados. Além disso, existe uma limitação do uso deste modo para amostras semi-sólidas e líquidas⁷.

No modo de reflexão, o feixe incidente penetra a superfície da amostra interagindo com a matriz e retornando a superfície da mesma, após absorção parcial

¹³⁴ Voort, F. R., *Food Res. Int.* 25 (1992) 397-403.

⁷ Barbosa, L. C. A.; *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, 2007, 25-43.

⁷¹ Harris, C. D.; *Análise Química Quantitativa*, Rio de Janeiro, 1999, 225-248.

da radiação. Desta forma, as técnicas de reflexão não exigem preparo da amostra e podem ser utilizadas para amostras sólidas ou líquidas. Pode ser aplicada também para obtenção de espectros de materiais altamente absorventes, sendo úteis tanto em análises qualitativas como quantitativas. As técnicas de reflexão mais utilizadas para obtenção de espectros são: reflexão especular, reflexão difusa e reflexão total atenuada⁷.

Tendo em vista que, para a realização deste trabalho foram utilizados os acessórios de reflexão total atenuada e reflexão difusa, a seguir serão abordadas características relevantes a estas técnicas.

3.3.1. Reflexão total atenuada

A técnica de reflexão total atenuada (ATR, do inglês “*attenuated total reflection*”), desenvolvida simultânea e independentemente por Harrick⁷⁰ e Fahrenfort⁴⁹, é um tipo de espectroscopia de reflexão no qual a amostra é colocada em contato com um elemento de reflexão interna (IRE, do inglês “*internal reflection element*”) de alto índice de refração. A radiação infravermelha é focada no IRE, refletida através dele e, então, direcionada ao detector⁷⁴. A técnica está baseada na reflexão total da energia a partir da incidência da radiação no material com alto índice de refração (prismas de seleneto de zinco ou germânio, entre outros materiais) sob determinado ângulo. O IRE deve ser composto por um material de alto índice de refração, para que somente uma pequena parte do feixe de radiação incidente seja refletido ao atingir o prisma.

A luz infravermelha refletida pelo prisma consegue interagir com a superfície da amostra colocada sobre este. Nas frequências em que tal material absorver energia ocorre a atenuação de intensidade (também denominada atenuação do campo evanescente), responsável pela geração do espectro.

A Figura 2 ilustra a reflexão total atenuada através do emprego de um IRE⁵².

⁷ Barbosa, L. C. A.; Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos, 2007, 25-43.

⁷⁰ Harrick, N. J., *J. Phys. Chem. US*, (64) (1960) 60-71.

⁴⁹ Fahrenfort, J., *Spectrochim. Acta* 17 (1961) 698-709.

⁷⁴ Hind, A. R., *Adv. Colloid Interfac.* 93 (2001) 91-114.

⁵² Ferrão, M. F.; Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2000.

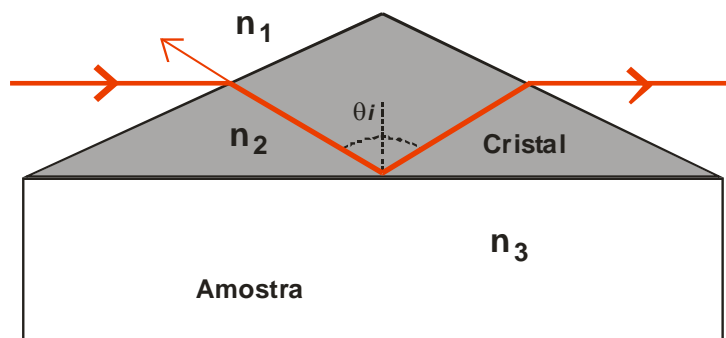


Figura 2. Representação da reflexão em um elemento de reflexão interna (adaptado da ref. 52)

A principal vantagem da técnica é que, por refletir a radiação, praticamente dispensa preparo de amostra, permitindo análise de sólidos e de líquidos⁹⁴. Além disso, permite a obtenção de espectros de materiais espessos e fortemente absorventes, difíceis de serem analisados através da espectroscopia por transmissão, possibilitando a obtenção de espectros com boa qualidade e tornando possível sua utilização em diversas aplicações analíticas⁵².

Algumas condições são necessárias para que o fenômeno de reflexão interna seja observado. No momento em que a radiação entra no prisma, esta será refletida internamente⁵⁴. Aplicando-se a lei de Snell, para um índice de refração tal que $n_2 > n_3$, o ângulo de refração é imaginário para valores do ângulo de incidência tal que satisfaça a Equação 1.

$$\theta_i > \text{sen}^{-1}(n_3 / n_2) \quad (1)$$

O ângulo acima do qual esta onda refratada deixa de ser real é denominado de ângulo crítico (θ_c) e é expresso conforme Equação 2.

$$\theta_c = \text{sen}^{-1}(n_3 / n_2) \quad (2)$$

Nestas condições o feixe é totalmente refletido na interface n_3/n_2 . Porém, parte da radiação penetra determinada distância no meio menos denso (n_3), caracterizando o fenômeno denominado “decaimento do campo ou onda

⁵² Ferrão, M. F.; Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2000.

⁹⁴ Mirabella, F. M., *Appl. Spectrosc. Rev.* 21 (1985) 45-178.

⁵⁴ Ferrão, M. F., *Tecno-lóg.* 5 (2001) 63-85.

evanescente”⁷⁴. Na região do infravermelho onde a amostra absorve energia, a onda evanescente será atenuada e o espectro da amostra em contato com o IRE pode então ser obtido. As propriedades do campo evanescente são mostradas na Figura 3.

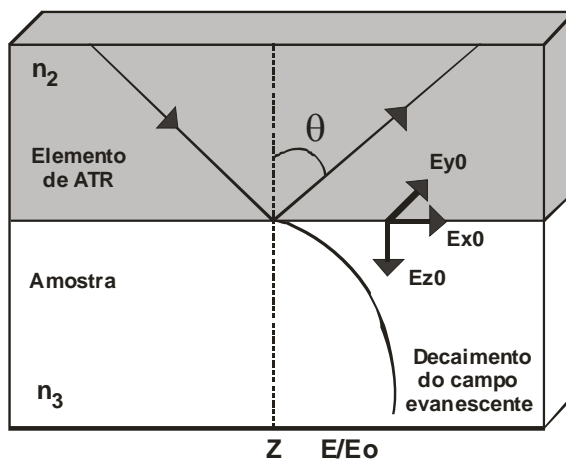


Figura 3. Representação da propagação da radiação infravermelha através de um elemento de reflexão interna (adaptado da ref. 94).

A profundidade de penetração da onda evanescente no segundo meio pode ser quantitativamente definida em termos da distância requerida para que a intensidade do campo elétrico decaia de um fator e^{-1} (37%) do valor inicial, sendo calculada conforme Equação 3⁷.

$$D_p = \frac{\lambda}{2\pi n_2 \sqrt{\sin^2 \theta} (n_3/n_2)^2} \quad (3)$$

Em que:

D_p = profundidade de penetração, geralmente em μm ;

λ = comprimento de onda, geralmente em μm ;

n_3/n_2 = razão entre os índices de refração da amostra n_3 e do IRE n_2 ;

θ = ângulo de incidência da radiação.

Existem inúmeros prismas de IRE e uma variedade de acessórios desenvolvidos para obter espectros de materiais líquidos, sólidos e viscosos para

⁷⁴ Hind, A. R., *Adv. Colloid Interfac.* 93 (2001) 91-114.

⁹⁴ Mirabella, F. M., *Appl. Spectrosc. Rev.* 21 (1985) 45-178.

⁷ Barbosa, L. C. A.; *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, 2007, 25-43.

diversos tipos de amostras. Na Tabela 2 são apresentadas as diferentes composições dos prismas de IRE disponíveis, e características a eles relacionadas, sendo determinante para sua escolha a amostra que se deseja analisar. Um dos materiais mais comumente utilizados é o seleneto de zinco^{94,115}.

Tabela 2. Principais características das diferentes composições dos prismas de elementos de reflexão interna disponíveis. *

Composição	Dureza, kg/mm ²	Faixa espectral, cm ⁻¹	Índice de reflectância	Profundidade de penetração 45°, 1000 cm ⁻¹ , μ	Faixa de pH
AMTIR**	170	11000 - 630	2,5	1,7	1 - 9
Diamante	5700	30000 - 250	2,4	2,00	1 - 14
Diamante / ZnSe	5700	30000 - 525	2,4	2,00	1 - 14
Ge	780	5500 - 570	4,0	0,66	1 - 14
Si / ZnSe	1150	8900 - 550	3,4	0,85	1 - 12
Si	1150	8900 - 1500 475 - 40	3,4	0,85	1 - 12
ZnSe	120	15000 - 520	2,4	2,00	5 - 9

* Adaptado de PIKE Technologies¹¹⁵

** AMTIR (do inglês, *amorphous material transmitting infrared radiation*)⁷⁴

A reprodutibilidade dos espectros por ATR pode ser afetada por alguns fatores como variação da pressão aplicada sobre a amostra e a área de contato. Portanto, a pressão aplicada deve ser padronizada durante a coleta do espectro, para fins quantitativos³⁵. Um outro fator que influencia a intensidade das bandas e, portanto, a reprodutibilidade dos espectros, é a área de contato entre o prisma e a amostra. Deve-se tomar o cuidado de cobrir toda a área do prisma, garantindo a reprodutibilidade necessária para análises com fins quantitativos⁹⁴.

3.3.2 Reflexão difusa

A espectroscopia por refletância difusa é, principalmente, utilizada na análise de materiais sólidos pulverizados, sendo sua aplicação muito difundida na

⁹⁴ Mirabella, F. M., *Appl. Spectrosc. Rev.* 21 (1985) 45-178.

¹¹⁵ PIKE Technologies, <http://www.piketch.com>, acessado em 23/11/2007.

⁷⁴ Hind, A. R., *Adv. Colloid Interfac.* 93 (2001) 91-114.

³⁵ Carlsson, D. J.; Wiles D. M., *Can. J. Chem.* 48 (1970) 2397-2406.

literatura^{29,113,118,132}. Pode ser utilizada associada a espectrômetros que operam na região do infravermelho próximo, conhecido como NIRRS⁵¹ ou associados a espectrômetros que operam no infravermelho médio com Transformada de Fourier, conhecido como DRIFTS¹⁰⁷.

No processo de reflexão difusa, o feixe incidente penetra na superfície da amostra interagindo com a matriz. Quando a radiação infravermelha incide sobre a amostra, uma parte da radiação é refletida prontamente na sua superfície (fenômeno denominado reflexão especular, onde o ângulo de incidência e o ângulo refletido pela superfície são equivalentes). Uma segunda parte da radiação incidente penetra a superfície da amostra onde é parcialmente absorvida, sofre múltiplos espalhamentos nas interfaces das partículas individuais, retornando a superfície da mesma, conforme ilustrado na Figura 4⁵⁴.

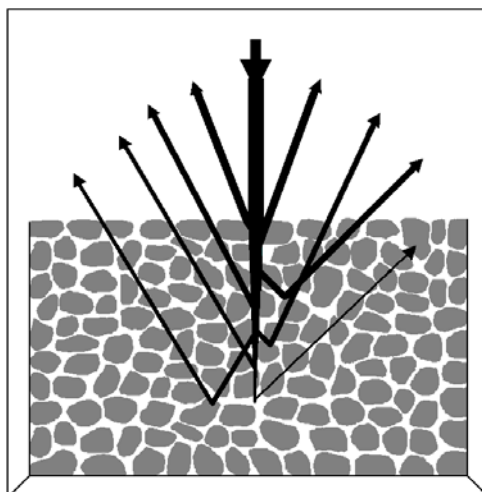


Figura 4. Representação de reflexão especular e difusa de uma onda eletromagnética em uma amostra particulada (adaptada da ref. 54).

Neste processo, o caminho óptico percorrido pela radiação não é constante e depende da estrutura microscópica do material. Além disso, a amostra não é homogênea, provocando espalhamento da radiação¹⁰⁹.

A atenuação de parte da radiação por absorção no meio é dada pela lei de Lambert-Burger, conforme Equação 4:

²⁹ Braga, J. W. B.; Poppi, R. J., *Quim. Nova*, 27 (6) (2004) 1004-1011.

¹¹³ Patel, A. D.; Luner, P. E.; Kemper, M. S., *Int. J. Pharm.* 206 (2000) 63-74.

¹¹⁸ Pöllänen, K. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 544 (2005) 108-117.

¹³² Spinacé, M. A. S. *et al.*, *Talanta*, 69 (2006) 643-649.

⁵¹ Feng, Y.; Hu, C., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 373-384.

¹⁰⁷ Parisotto, G. *et al.*, *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 43 (2007) 89-96.

⁵⁴ Ferrão, M. F., *Tecno-lóg.* 5 (2001) 63-85.

¹⁰⁹ Pasikatan, M. C. *et al.*, *J. Near Infrared Spectrosc.* 9 (2001) 153-164.

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon \cdot \delta} \quad (4)$$

onde I representa a intensidade da radiação, I_0 corresponde à intensidade da radiação incidente, ε representa o coeficiente de extinção molar da amostra e δ a espessura média da camada.

O tamanho, a forma das partículas e o grau de compactação afetam a quantidade do material através do qual a radiação é refletida e absorvida. Uma aproximação para descrever o comportamento da radiação que incide sobre partículas é dada pela teoria de Kubelka-Munck⁵⁴.

O modelo de Kubelka-Munck relaciona o coeficiente de absorção (k) (que expressa a informação química do sistema) e o espalhamento (s) (que expressa informação relacionada ao tamanho da partícula) com a reflectância difusa da amostra para uma espessura infinita (R_∞), de acordo com a Equação 5:

$$F(R_\infty) = \frac{(1 - R_\infty)^2}{2R_\infty} = \frac{k}{s} \quad (5)$$

Este modelo assume que: (a) a radiação espalhada é isotropicamente distribuída, (b) as partículas são randomicamente distribuídas e de tamanho inferior à espessura da camada e (c) a camada está sujeita somente à reflexão difusa. O modelo é usado para estimar as propriedades de absorção ou espalhamento de um determinado material a partir da medida dos dados de reflectância. A teoria demonstra que a reflectância depende da razão entre k e s e é inversamente proporcional ao tamanho da partícula¹⁰⁹.

Segundo Ferrão (2001)⁵⁴ o efeito de diferentes tamanhos de partículas sobre a reflectância pode ser minimizado através de transformações no espectro como aplicação de primeira ou segunda derivada ou, ainda, a correção por espalhamento multiplicativo (MSC). É importante salientar que a reflexão especular tem maior intensidade na região onde a amostra apresenta forte absorção e, neste caso, podem ocorrer severas distorções no espectro obtido⁹⁴.

Para coleta do espectro por reflexão difusa, a amostra pode ser analisada diretamente ou dispersa em um meio transparente como KBr. O espectro das

⁵⁴ Ferrão, M. F., *Tecno-lóg.* 5 (2001) 63-85.

¹⁰⁹ Pasikatan, M. C. *et al.*, *J. Near Infrared Spectrosc.* 9 (2001) 153-164.

⁹⁴ Mirabella, F. M., *Appl. Spectrosc. Rev.* 21 (1985) 45-178.

amostras são similares aos obtidos através do modo de transmissão (com confecção de pastilhas). Os resultados são expressos em $\log(1/R)$ ou unidades Kubelka-Munck¹⁰⁹.

3.4 Quimiometria

O termo quimiometria foi proposto em meados de 1970 para descrever o uso de modelos matemáticos, princípios estatísticos e outros métodos baseados em lógica, no campo da química e, em especial, a dados químicos que apresentam natureza multivariada^{52,65}. Dados de natureza multivariada são aqueles onde duas ou mais respostas instrumentais estão relacionadas com a propriedade de interesse.

Uma das áreas da quimiometria refere-se à aplicação de ferramentas matemáticas e estatísticas para extração de informação relevante a partir de dados multivariados de primeira ordem, isto é, dados que podem ser representados por um vetor para cada amostra²⁸. Como dados espectrais consistem, basicamente, de informação relevante (relacionada à estrutura química dos analitos) e informação não relevante (“ruído”), as técnicas quimiométricas têm por objetivo extrair as informações mais relevantes a partir do conjunto de dados. Este objetivo é conseguido de forma indireta, a partir da descrição da variabilidade dos dados por um número reduzido de variáveis. Estas variáveis buscam informação relevante para a construção do modelo, sendo denominadas “componentes principais”⁸⁴.

A Figura 5 ilustra como uma matriz de dados pode ser construída a partir de um vetor de medidas instrumentais, onde “n” linhas correspondem a diferentes amostras e as “m” colunas às variáveis (absorvância de um composto em diferentes números de onda).

¹⁰⁹ Pasikatan, M. C. *et al.*, *J. Near Infrared Spectrosc.* 9 (2001) 153-164.

⁵² Ferrão, M. F.; Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2000.

⁶⁵ Gemperline, P., *Practical guide to chemometrics*, New York, 2006, 140-145.

²⁸ Braga, J. W. B., Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2004.

⁸⁴ Lavine, B. K.; Clustering and Classification of Analytical Data in the Encyclopedia of Analytical Chemistry, Chichester, 2000, 35-42.

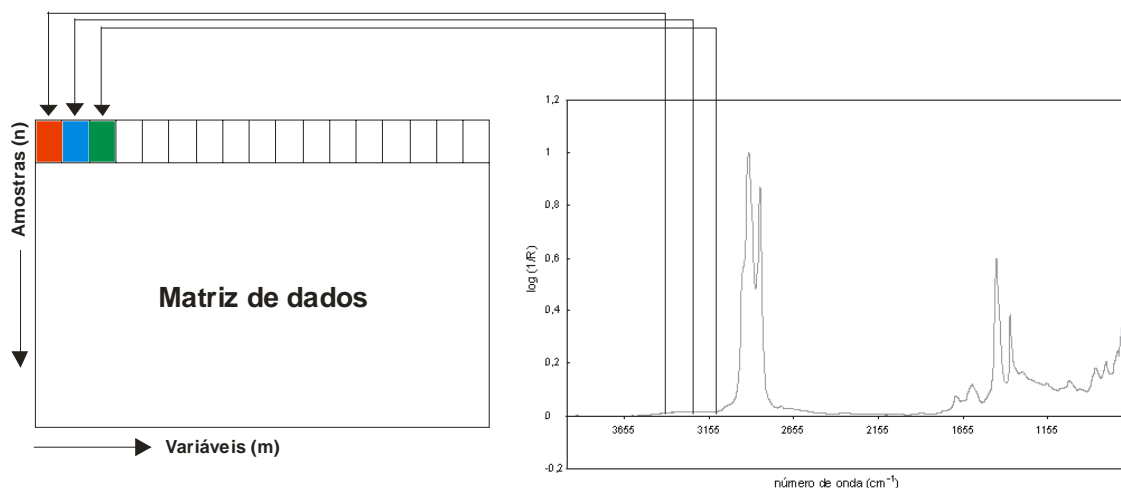


Figura 5. Matriz de dados gerada a partir de um espectro (adaptada da ref. 58)

Desta forma, para amostras que possuem matrizes diversificadas (como, por exemplo, formulações farmacêuticas), é possível modelar propriedades físicas e químicas, a partir de seus dados espectroscópicos^{59,84,110}.

A aplicação de ferramentas quimiométricas a dados multivariados é descrita na literatura a partir do termo “métodos de análise multivariada”. Estes podem ser divididos como métodos de classificação e de regressão¹²². Os métodos de classificação, também conhecidos como métodos de reconhecimento de padrões, podem ser agrupados em supervisionados e não supervisionados⁶².

Métodos supervisionados referem-se àqueles onde as amostras são classificadas em duas ou mais classes previamente definidas, podendo ser citados 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*”)¹²².

Métodos não supervisionados referem-se àqueles onde a matriz de dados é construída sem o conhecimento prévio da existência de classes. Os métodos de análise exploratória são métodos de classificação não supervisionados que permitem verificar a existência de similaridade entre as amostras. Estes, por sua vez, correspondem às semelhanças na composição química a partir da exploração de resultados obtidos por meio de análises químicas. Estas ferramentas tornam

⁵⁸ Foot, M.; Mulholland, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 397-407.

⁵⁹ Gabrielsson, J.; Lindberg, N.; Lundstedt, T., *J. Chemom.* 16 (2002) 141-160.

⁸⁴ Lavine, B. K.; Clustering and Classification of Analytical Data in the Encyclopedia of Analytical Chemistry, Chichester, 2000, 35-42.

¹¹⁰ Pasquini, C., *J. Braz. Chem. Soc.* 14 (2003) 198-219.

¹²² Roggo, Y. et al., *Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 683-700.

⁶² Geladi, P., *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 767-782.

explícitas as inter-relações entre as variáveis, permitindo a visualização de informações latentes que não seriam observadas através de um tratamento univariado. Entre os métodos de análise exploratória, pode ser citada a análise por componentes principais (PCA) e a análise por agrupamentos hierárquicos (HCA)⁴³.

Por outro lado, os métodos de regressão multivariada desenvolvem um modelo preditivo que correlaciona a propriedade de interesse de uma espécie com os múltiplos sinais instrumentais¹⁰³. 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)³³.

Tendo em vista que o método por PCA, por HCA e por PLS foram utilizados no presente trabalho, estes serão abordados de forma preferencial.

3.4.1 Análise por agrupamentos hierárquicos (HCA)

A HCA é uma técnica que tem o objetivo de descrever e identificar grupos de amostras dentro dos dados originais, agrupando-os de modo que permitam a identificação das semelhanças entre estes. Através da aplicação desta técnica pretende-se aumentar a compreensão do conjunto de dados, examinando a presença ou ausência de agrupamentos naturais entre as amostras, à semelhança de uma classificação taxonômica^{31,43,46}. O resultado é apresentado na forma gráfica e é denominado dendrograma, onde a faixa de similaridade varia de zero a um e onde se podem visualizar os agrupamentos entre as amostras^{46,56,84}.

A construção do dendrograma 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 6.

$$d_{ab} = \sqrt{\sum_{i=1}^m (x_{ai} - x_{bi})^2} \quad (6)$$

Um padrão de similaridade é calculado para cada amostra, conforme Equação 7:

⁴³ Correia, P. R. M.; Ferreira, M. M. C., *Quim. Nova* 30 (2007) 481-487.

¹⁰³ Olivieri, A. C. *et al.*, *Pure and Applied Chemistry* (IUPAC Technical Report) 78 (2006) 633-661.

³³ Brereton, R. G., *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.

³¹ Bratchell, N., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 6 (1987) 105-125.

⁴⁶ Einax, J. W.; Zwanziger, H. W.; Geiß, S.; *Chemometrics in environmental analysis*, Weinheim, 1997, 153-178.

⁵⁶ Ferreira, M. M. C., *J. Braz. Chem. Soc.* 13 (2002) 742-753.

⁸⁴ Lavine, B. K.; *Clustering and Classification of Analytical Data in the Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Chichester, 2000, 35-42.

$$S_{ab} = 1 - \frac{d_{ab}}{d_{\text{máx}}} \quad (7)$$

Sendo que, d_{ab} corresponde à distância entre os pontos a e b, e $d_{\text{máx}}$ 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 8¹¹⁷.

$$d_{ab} \tilde{=} = \frac{[(n_a + n_c)d_{ac}^2 + (n_b + n_c)d_{bc}^2 - n_c d_{ab}^2]^{1/2}}{n_a + n_b + n_c} \quad (8)$$

onde n_i é o número de amostras no grupo i.

3.4.2 Análise por componentes principais (PCA)

A base fundamental da maioria dos métodos modernos para tratamento de dados multivariados é a PCA, a qual tem por objetivo reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original, a partir de combinações lineares dessas variáveis, preservando a maior quantidade de informação possível (variância). Esta análise vetorial permite descrever a variação ou dispersão de um determinado conjunto de dados^{43, 55, 84}.

A PCA é um método conhecido de decomposição de matrizes bidimensionais^{33,46,140}, onde a variância na matriz X (com m observações e n variáveis) é decomposta em novas variáveis denominadas componentes principais (CP). A primeira CP formada é uma função que descreve o máximo de variância das observações no espaço X. As novas coordenadas das amostras, no novo sistema de

¹¹⁷ Pirouette, *Multivariate Data Analysis*, versão 3.11, Infometrix..

⁴³ Correia, P. R. M.; Ferreira, M. M. C., *Quim. Nova* 30 (2007) 481-487.

⁵⁵ Ferreira M. M. C. *et al.*, *Quim. Nova* (22) (1999) 724-731.

⁸⁴ Lavine, B. K.; *Clustering and Classification of Analytical Data in the Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Chichester, 2000, 35-42.

³³ Brereton, R. G., *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.

⁴⁶ Einax, J. W.; Zwanziger, H. W.; Geiß, S.; *Chemometrics in environmental analysis*, Weinheim, 1997, 153-178.

¹⁴⁰ Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2 (1987) 37-52.

eixos das CP são denominadas de “*scores*” e “*loadings*”, como pode ser observado na Figura 6.

A próxima CP é ortogonal em relação à primeira CP (e, assim, sucessivamente) e é calculada a partir da informação não explicada, sendo estimada para descrever a máxima variação restante (não explicada pela CP anterior)⁵⁵.

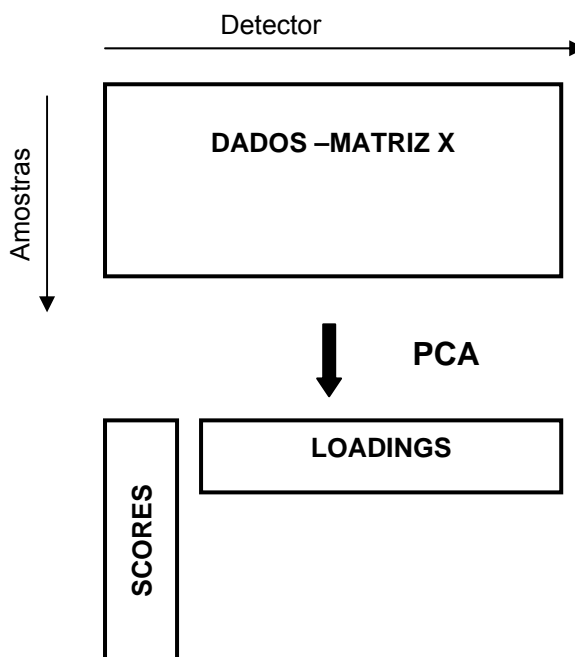


Figura 6. Princípios da análise por componentes principais (adaptado da ref. 33).

O valor de *scores* (t_n) é dado pela projeção de cada ponto (amostra) no novo sistema de eixos (CPs), medindo a distância θ (através da distância Euclidiana) entre o centro do ponto e sua projeção. O valor de *loadings* (p'_h) é obtido entre os cossenos do ângulo (θ) entre a linha (CP) e cada eixo e determina a influência de cada variável. Um esquema da interpretação da PCA é mostrado na Figura 7⁴⁶.

⁵⁵ Ferreira M. M. C. *et al.*, *Quim. Nova* (22) (1999) 724-731.

³³ Brereton, R. G., *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.

⁴⁶ Einax, J. W.; Zwanziger, H. W.; Geiß, S.; *Chemometrics in environmental analysis*, Weinheim, 1997, 153-178.

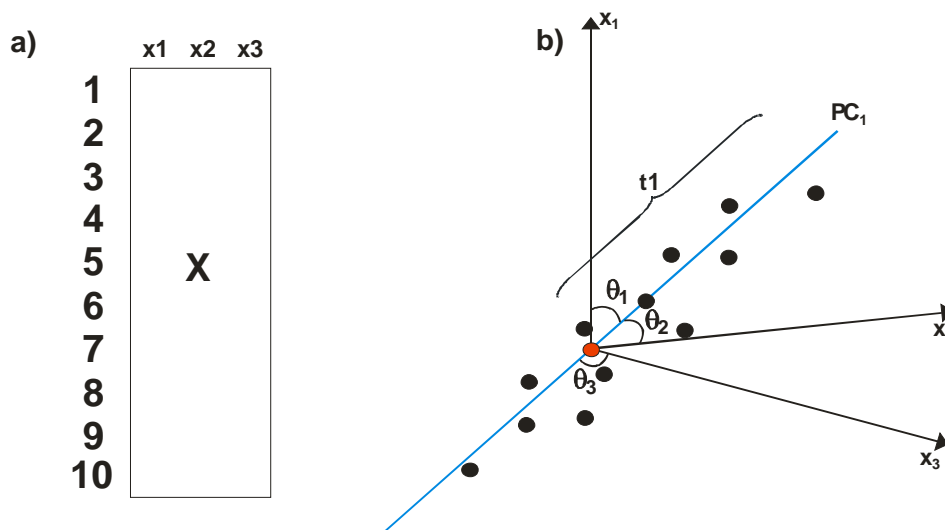


Figura 7. Esquema da interpretação de um modelo de análise por componentes principais: a) conjunto de dados com dez objetos e três variáveis, b) primeira componente principal calculada através do conjunto de dados⁶³.

A variância não explicada é chamada de matriz E, conforme Equação 9⁴⁶.

$$X = TP' + E \quad (9)$$

Depois que a CP₁ é calculada, a próxima CP é obtida com a matriz residual E, que contem a variância não explicada pela CP₁ e, assim, sucessivamente, conforme Equação 10.

$$X = t_1p'_1 + t_2p'_2 + \dots + t_h p'_h + E \quad (10)$$

3.5 Métodos de calibração multivariada

Métodos de calibração multivariados podem ser usados para tratar dados complexos, gerados por técnicas como cromatografia ou espectroscopia, cuja resposta fornece um vetor de dados. Estes métodos têm sido empregados de forma bastante efetiva, justamente nos casos onde existem problemas de superposição de sinais analíticos, quando os componentes presentes numa mistura necessitam ser determinados simultaneamente, mas a informação analítica disponível não

⁶³ Geladi, P.; Kowalski B. R., *Anal. Chim. Acta* 185 (1986) 1-17.

⁴⁶ Einax, J. W.; Zwanziger, H. W.; Geiß, S.; *Chemometrics in environmental analysis*, Weinheim, 1997, 153-178.

apresenta seletividade. Isto é, quando em uma mistura não é possível identificar os componentes individuais, a partir da resposta instrumental^{60, 62}.

Um aspecto importante da análise química envolvendo dados multivariados é o conceito de “modelo”. Modelo pode ser entendido como uma simplificação de um sistema sob investigação, sendo uma representação matemática de um sistema complexo, dentro de uma região limitada (necessariamente a região investigada). Em uma análise envolvendo quimiometria, os modelos são construídos de maneira a simplificar a informação a partir de dados multivariados. Desta maneira é possível correlacionar a informação com a propriedade de interesse³³. Quando o modelo desenvolvido é obtido a partir de uma técnica de regressão, é possível prever a propriedade de interesse em amostras desconhecidas. Desta forma, os modelos desenvolvidos devem ser sempre validados, com o objetivo de garantir uma representação segura dos dados, ou seja, garantir que os resultados possam ser extrapolados a dados novos⁶⁵.

Para o desenvolvimento de um método de calibração é necessária a construção de três conjuntos de amostras: amostras de calibração, amostras de validação (ou amostras teste) e amostras de previsão. Para casos onde o número de amostras é insuficiente (ou não disponível), podem ser construídos dois conjuntos (calibração e previsão). No entanto, o erro para o conjunto de calibração deve ser calculado por validação cruzada³³. O conjunto de calibração deve ser construído com amostras representativas da região a ser modelada, sendo que, durante essa etapa, dois fatores são considerados essenciais: o número de componentes principais (ou variáveis latentes, para modelos de regressão), e detecção de amostras anômalas (*outliers*)⁵⁵.

A capacidade preditiva do modelo deve ser avaliada durante a etapa de validação. A validação consiste em testar o modelo com amostras externas (conjunto de validação), das quais se tem conhecimento prévio das propriedades (ou concentrações) que se desejam medir^{33, 43}.

⁶⁰ Gabrielsson, J.; Trygg, J., *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006) 243-255.

⁶² Geladi, P., *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 767-782.

³³ Breton, R. G., *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.

⁶⁵ Gemperline, P., *Practical guide to chemometrics*, New York, 2006, 140-145.

⁵⁵ Ferreira M. M. C. *et al.*, *Quim. Nova* (22) (1999) 724-731.

⁴³ Correia, P. R. M.; Ferreira, M. M. C., *Quim. Nova* 30 (2007) 481-487.

3.5.1 Mínimos quadrados parciais

A técnica dos mínimos quadrados parciais (PLS)¹⁴² é considerada a principal técnica de regressão para dados multivariados, tendo numerosas aplicações em diferentes campos da química analítica^{32,141}. A regressão por PLS utiliza as respostas analíticas, bem como as informações de interesse, para capturar a variância dos dados da matriz X e da matriz dependente Y, através de suas decomposições sucessivas e simultâneas, correlacionando-as.

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. Uma função (a partir dos *scores* de cada matriz) é então obtida de forma que descreva a variância entre as matrizes X e Y, bem como, maximize a correlação entre elas. Deste primeiro ajuste nos dados é gerada a primeira variável latente (VL) do PLS. O conjunto de variáveis latentes no novo sistema de coordenadas é então usado para a calibração^{33, 63}.

Desta forma, a construção de um modelo PLS consiste de uma regressão entre os *scores* das matrizes X e Y em uma soma de “h” variáveis latentes, através de uma relação externa, que descreve a matriz X e Y individualmente (Equações 11 e 12) e uma relação interna (Equação 13), que correlaciona as duas matrizes⁶³.

$$X = TP' + E = \sum t_h p_h' + E \quad (11)$$

$$Y = UQ' + F = \sum u_h q_h' + F \quad (12)$$

Nas Equações 13 e 14, T e U são matrizes de *scores* das matrizes X e Y, respectivamente; P e Q são as matrizes de *loadings* das matrizes X e Y, respectivamente; e E e F são os resíduos, respectivamente.

A relação interna dos *scores* das matrizes X e Y são obtidas através do coeficiente regressão linear (b_h), como descrito na Equação 15:

$$u_h = b_h t_h \quad (13)$$

¹⁴² Wold, S., *Technometrics* 20 (1978) 397-405.

³² Brereton, R. G.; *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and chemical Plant*, 2003, 297-306.

¹⁴¹ Wold, S.; Sjöström, M.; Eriksson, L., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 58 (2001) 109-130.

³³ Brereton, R. G., *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.

⁶³ Geladi, P.; Kowalski B. R., *Anal. Chim. Acta* 185 (1986) 1-17.

onde $b_h = u_h' t_h / t_h' t_h$, para h variáveis latentes. Os valores de b_h são agrupados na matriz diagonal B (matriz identidade), que contém os coeficientes de regressão entre a matriz de scores U de Y e a matriz de scores T de X . Entretanto, como cada matriz é decomposta separadamente, pode ocorrer uma relação não linear entre os scores dos dois blocos. A melhor relação linear possível entre os scores das matrizes é obtida através de pequenas rotações das variáveis latentes das matrizes X e Y , devendo existir um compromisso entre a capacidade de descrever as amostras individuais (modelagem dos blocos X e Y) e o aumento da correlação entre T e U .

A matriz Y pode ser calculada através das informações contidas em u_h , conforme a Equação 14:

$$Y = TBQ' + F \quad (14)$$

onde T são os scores da matriz X , B é a matriz identidade de b_h , Q' são os *loadings* da matriz Y e F é a matriz residual de Y . Desta forma, a concentração das novas amostras pode ser prevista a partir dos novos scores de X , dado por T^* , substituídos na Equação 15:

$$Y = T^*BQ' \quad (15)$$

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. A seguir serão abordados aspectos importantes referentes a estes parâmetros.

3.5.2 Desenvolvimento e avaliação de modelos de regressão

Segundo Brereton (2000)³³, um dos aspectos mais importantes no desenvolvimento de metodologias de análise envolvendo calibração multivariada está relacionado à validação do modelo proposto. A definição de quantas VLs (ou CPs) são necessárias para explicar a variância dos dados, qual a capacidade do modelo em prever amostras desconhecidas e, ainda, qual a representatividade do conjunto de dados utilizados para construir o modelo são passos importantes na construção de uma metodologia robusta e com aplicabilidade no dia-a-dia.

³³ Brereton, R. G., *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.

Habitualmente, os métodos de calibração multivariada utilizam diferentes estratégias para determinar o nível do erro de um modelo, sendo estes parâmetros úteis na validação do mesmo.

Um aspecto importante da etapa de validação em calibração multivariada é a decisão sobre a dimensionalidade do modelo. Para obtenção de um modelo de fácil interpretação, deve-se explicar o máximo da variância dos dados com um mínimo de VLs, minimizando a influência do ruído⁶⁵. 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 é produzido⁶⁵.

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 freqüência, 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 externo (conjunto de validação ou conjunto de previsão) devido à informação não necessária incluída no modelo⁶⁷.

O cálculo do RMSE pode ser útil na avaliação dos modelos obtidos, conforme Equação 16. Este erro pode ser avaliado através do conjunto de calibração (RMSEC), de validação (RMSEV) e, também, através da validação-cruzada (RMSECV), sendo este último recomendado para determinação do número de VL^{32, 45}.

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (16)$$

Onde, y_i é o valor de referência para a i -ésima amostra, e \hat{y}_i é a previsão para o valor desta amostra, sendo n igual ao número total de amostras modeladas.

A determinação do erro por validação cruzada consiste na retirada de uma amostra do conjunto de dados e construção do modelo com as amostras restantes, sendo que, após este procedimento, a amostra removida é prevista pelo modelo. O processo é repetido até que todas as amostras retiradas tenham sido previstas,

⁶⁵ Gemperline, P., *Practical guide to chemometrics*, New York, 2006, 140-145.

⁶⁷ Gomez-Carracedo, M. P. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 253-265.

³² Brereton, R. G.; *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and chemical Plant*, 2003, 297-306.

⁴⁵ Eastment, H. T.; Krzanowski, W. J., *Technometrics* 24 (1982) 73-77.

sendo o erro, neste caso, denominado como RMSECV. O RMSECV é indicado para avaliar dimensionalidade de modelos de calibração, podendo ser considerado um valor mais relevante que o RMSEC³².

A habilidade preditiva de um modelo de calibração multivariada pode ser avaliada a partir do cálculo do RMSEP, conforme Equação 16³². Seu valor percentual é o erro padrão de previsão relativo (RSEP) (conforme Equação 17)¹⁴.

$$RSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n y_i^2}} \times 100 \quad (17)$$

Onde, y_i é o valor de referência para a i -ésima amostra, e \hat{y}_i é a previsão para o valor desta amostra, sendo n igual ao número total de amostras modeladas.

Erros sistemáticos podem ser definidos como a parcela de erros não randômicos em uma medida química, ou seja, a presença de tendência. A presença de erro sistemático (“bias”) pode ser calculada a partir da Equação 18²⁸:

$$bias = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)}{n} \quad (18)$$

Para avaliar se o erro incluso no modelo é significativo, deve ser calculado o SDV (do inglês, *standard deviation of validation*) conforme Equação 19²⁸.

$$SDV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(y_i - \hat{y}_i) - bias]^2}{n - 1}} \quad (19)$$

Segundo a norma E1655-00 da ASTM⁴, um teste t deve ser aplicado, de acordo com a Equação 20:

³² Brereton, R. G.; *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, Chemical Analysis Series, 2003, 297-306.

¹⁴ Blanco, M. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 384 (1999) 207-214.

²⁸ Braga, J. W. B., *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2004.

⁴ Annual Book of ASTM Standards, E1655, 2000.

$$t_{sist} = \frac{|bias| \sqrt{n}}{SDV} \quad (20)$$

Para valores de t_{sist} menores que o valor crítico (t_{crit}) para $n-1$ graus de liberdade (95% de confiança), o erro sistemático incluído no modelo deve ser considerado insignificante.

A repetibilidade de métodos analíticos pode ser entendida como a precisão do mesmo em um curto espaço de tempo e pode ser calculada a partir de nove determinações (três concentrações e três replicatas), cobrindo a faixa útil do modelo de calibração²⁹, conforme Equação 21.

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

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

3.5.3 Detecção de amostras anômalas

Amostras anômalas (também denominadas *outliers*) são aquelas que possuem comportamento diferente das demais que compõem o conjunto de calibração e/ou previsão. A presença destas amostras no conjunto de calibração pode diminuir a capacidade de previsão dos modelos e a presença no conjunto de validação pode influenciar os resultados dos testes de validação. Alguns procedimentos são recomendados para detecção de amostras anômalas, entre eles pode-se citar o cálculo do resíduo de Student. Neste cálculo são analisados os resíduos das concentrações, sendo eliminadas as amostras com valores altos⁵⁵.

3.5.4 Métodos de seleção de variáveis em modelos de regressão

A calibração multivariada é, normalmente, utilizada com o objetivo de correlacionar a informação espectral com a propriedade de interesse, através da construção de modelos que contém a informação necessária para fins de previsão. Muitos procedimentos (aplicados aos dados espectrais) têm sido propostos com o

²⁹ Braga, J. W. B.; Poppi, R. J., *Quim. Nova*, 27 (6) (2004) 1004-1011.

⁵⁵ Ferreira M. M. C. *et al.*, *Quim. Nova* (22) (1999) 724-731.

objetivo de reduzir o efeito das variações no espectro que não estão relacionadas às variações químicas nas amostras. Porém, estes procedimentos não consideram as possíveis regiões espectrais que não contêm informação sobre a variação química nas amostras, e que podem ser eliminadas sem qualquer prejuízo na capacidade de previsão do modelo.

Alguns métodos têm sido descritos na literatura para seleção de regiões espectrais, com o objetivo de melhorar o desempenho dos modelos em relação àqueles que utilizam informação do espectro inteiro. Estes métodos são denominados “métodos de seleção de variáveis” e consistem basicamente em um sistema de procura de um subconjunto de dados que produzirá modelos com baixos erros de previsão¹⁴³. Entre os métodos utilizados atualmente, pode-se destacar o método dos mínimos quadrados parciais por intervalo (iPLS, do inglês *interval partial least squares*) e o método dos mínimos quadrados parciais por sinergismo de intervalos (siPLS, do inglês *synergy interval partial least squares*).

O método iPLS divide o espectro em intervalos equidistantes e constrói um modelo PLS para cada intervalo. O erro obtido para cada intervalo é comparado ao erro produzido pelo modelo desenvolvido com toda a informação espectral, devendo ser escolhida a região que apresente menor erro. Uma limitação deste método reside no fato que a informação pode estar distribuída por toda a região espectral ou, ainda, em mais que um intervalo simultaneamente, o que gera modelos com erros de previsão superiores ao modelo com informação de toda faixa espectral¹¹². Para contornar esta limitação, Norgaard *et al.* (2000)¹⁰² propôs o método siPLS, que consiste na divisão do espectro em regiões equidistantes e combinações destes intervalos para a construção dos modelos²³.

Artigos recentes têm sido publicados utilizando o algoritmo iPLS^{24,26,99,101,112,114,138,143} e siPLS³⁸, em diferentes amostras.

¹⁴³ Xiaobo, Z.; Jiewen, Z.; Yanxiao, L., *Vib. Spectrosc.* 44 (2007) 220-227.

¹¹² Pataca, L. M. *et al.*, *Talanta* 71 (2007) 1926-1931.

¹⁰² Norgaard, L. *et al.*, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 413-419.

²³ Bodson, C. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 783-790.

²⁴ Bogomolov, A.; Hachey, M., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 88 (2007) 132-142.

²⁶ Borin, A.; Poppi, R. J., *Vib. Spectrosc.* 37 (2005) 27-32.

⁹⁹ Navea, S.; Tauler, R.; Juan, A., *Anal. Biochem.* 336 (2005) 231-242.

¹⁰¹ Norgaard, L. *et al.*, *Int. Dairy J.* 15 (2005) 1261-1270.

¹¹⁴ Pereira, A. F. C. *et al.*, *Food Res. Int.* (2008), in press.

¹³⁸ Winning, H. *et al.*, *Food Hydrocoll.* 21 (2007) 256-266.

³⁸ Chen, Q. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 3 (2008) 568-573.

3.5.6 Tratamento e pré-processamento dos dados

Uma etapa anterior à utilização dos dados para construção de modelos de calibração refere-se à transformação dos mesmos, com o objetivo de distribuí-los adequadamente, possibilitando a extração de informações úteis e facilitando a interpretação⁵⁶. A transformação de dados multivariados consiste basicamente em:

(a) tratamentos, ou seja, remoção de variáveis não desejadas como efeitos de espalhamento, mudanças na linha de base ou fatores externos não controláveis. Entre os tratamentos mais utilizados, pode-se destacar o MSC, correção do espalhamento multiplicativo (do inglês *multiplicative scatter correction*), que consiste em remover informação referente ao processo de difusão da radiação, permanecendo a informação relativa à absorbância do composto⁶⁴.

(b) pré-processamentos, que permitem comparar variáveis em diferentes dimensões. Os pré-processamentos mais utilizados consistem em centrar os dados na média, ou seja, subtrair cada intensidade do respectivo valor médio, para cada comprimento de onda, e autoescalar os dados, ou seja, centrar os dados na média e dividir pelo respectivo desvio padrão⁶³.

3.6 Testes de significância para comparação de modelos

Segundo Gemperline (2006)⁶⁵ a validação de modelos multivariados pode ser realizada através da comparação de valores estimados com valores reais (determinados por um método de referência). A comparação entre metodologias pode ser feita através de um teste t pareado, que estima 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. Para aplicação do teste, deve-se considerar y_A como o vetor que contém o resultado obtido por um método de análise A para n amostras e y_B os resultados fornecidos pelo método B. Define-se y_D como o vetor que contém a diferença entre os dois resultados, \bar{y}_D como a média das diferenças e S_D como o desvio padrão das diferenças. A partir do cálculo destes vetores, o parâmetro t pode ser calculado como descrito na Equação 22:

⁵⁶ Ferreira, M. M. C., *J. Braz. Chem. Soc.* 13 (2002) 742-753.

⁶⁴ Geladi, P.; MacDougall, D.; Martens, H., *Appl. Spectrosc.* 39 (1985) 491-500.

⁶³ Geladi, P.; Kowalski B. R., *Anal. Chim. Acta* 185 (1986) 1-17.

⁶⁵ Gemperline, P., *Practical guide to chemometrics*, New York, 2006, 140-145.

$$t = \frac{\bar{y}_{D\sqrt{n}}}{S_D} \quad (22)$$

onde t tem (n-1) graus de liberdade. Caso o valor de t calculado através da Equação 21 seja menor que o valor de t tabelado, com 95% de confiança, não existirá uma diferença estatística entre os dois métodos.

Uma forma de comparar alguns parâmetros obtidos a partir de diferentes modelos desenvolvidos, relacionados à precisão dos dados, ou seja, a variância dos mesmos pode ser obtida através da aplicação de um teste F⁵². O teste-F é um teste de significância, utilizado na comparação entre variâncias (s^2), na qual i e j representam os graus de liberdade, conforme Equação 23:

$$F_{(i,j)} = \frac{s_i^2}{s_j^2} \quad (23)$$

Os valores de F(i, j) são comparados com um valor de F crítico tabelado com um nível de confiança de 95%. Quando este valor for maior que F crítico, as variâncias são consideradas estatisticamente diferentes⁶⁵. Para modelos multivariados, o teste F pode ser utilizado na comparação dos valores obtidos para erros de previsão, conforme Equação 24:

$$F_{(i,j)} = \left(\frac{RMSEP_i}{RMSEP_j} \right)^2 \quad (24)$$

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

A espectroscopia no infravermelho tem extensa aplicação na identificação de compostos químicos, sendo a região entre 1200 a 700 cm^{-1} do espectro conhecida como “região de impressão digital”. Indústrias de diferentes setores fazem uso da espectroscopia no infravermelho médio para identificação de matérias-primas, principalmente devido à facilidade de obtenção dos espectros, manuseio mínimo da

⁵² Ferrão, M. F.; Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2000.

⁶⁵ Gemperline, P., *Practical guide to chemometrics*, New York, 2006, 140-145.

amostra e baixo custo da análise quando comparado às técnicas clássicas de química úmida¹³⁶.

Para análises quantitativas, métodos espectroscópicos no MIR têm sido uma alternativa aos métodos oficiais que envolvem etapas prévias de separação. Neste contexto, os métodos por reflectância possuem, além das vantagens citadas acima, a possibilidade do uso direto da amostra, sem a necessidade de preparo^{53,131}. Diferentes técnicas envolvendo IR têm sido investigadas nos últimos anos na análise de medicamentos^{121,122,135}.

3.7.1. Espectroscopia no IR associada a controle de processos farmacêuticos

Várias aplicações qualitativas e quantitativas em controle de processos farmacêuticos têm sido descritas na literatura envolvendo a região do NIR^{23,29,40,47,83,89,93,105,127}. As áreas de controle e monitoramento de processos estão entre as de maior interesse, principalmente quando o equipamento é dotado de fibra óptica e pode produzir resultados imediatos^{88,133}.

Na produção de comprimidos, o processo de mistura dos componentes (fármacos e excipientes) é fundamental para garantir a uniformidade de dose das unidades. Para tanto, é necessária a coleta de frações da mistura durante o processo e posterior análise, geralmente por técnicas convencionais como HPLC e direcionadas apenas para o doseamento do fármaco. Neste contexto, a espectroscopia no NIR é uma ferramenta útil, pois permite a análise das misturas de forma rápida e não invasiva, assegurando a uniformidade da mistura como um todo e analisando o grau de mistura de cada componente isoladamente, incluindo os excipientes^{86,87}.

¹³⁶ Watson, D. G., *Pharmaceutical Analysis*, UK, 1999, 93-117.

⁵³ Ferrão, M. F.; Davanzo, C. U., *Anal. Chim. Acta* 540 (2005) 411-415.

¹³¹ Souza, J. S.; Ferrão, M. F., *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 42 (2006) 437-445.

¹²¹ Reich, G., *Adv. Drug Deliver. Rev.* 57 (2005) 1109-1143.

¹²² Roggo, Y. *et al.*, *Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 683-700.

¹³⁵ Wartewig, S.; Neubert, R. H. H., *Adv. Drug Deliver. Rev.* 57 (2005) 1144-1170.

²³ Bodson, C. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 783-790.

²⁹ Braga, J. W. B.; Poppi, R. J., *Quim. Nova*, 27 (6) (2004) 1004-1011.

⁴⁰ Chen, Y. *et al.*, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27 (2001) 623-631.

⁴⁷ Eustaquio, A. *et al.*, *Analyst* 123 (1998) 2303-2306.

⁸³ Kirsch, J. D.; Drennen, J. K., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 351-362.

⁸⁹ Lopes, J. A. *et al.*, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 74 (2004) 269-275

⁹³ Meza, C. P.; Santos, M. A.; Romañach, R. J., *AAPS PharmSciTech* 7 (2006) Article 29.

¹⁰⁵ Paris, I. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1171-1178.

¹²⁷ Sekulic, S. S. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 1285-1309.

⁸⁸ Lin, Z. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 99-104.

¹³³ Trevisan, M. G.; Poppi, R. J., *Quim. Nova*, 29 (2006) 1065-1071.

⁸⁶ Li, W. *et al.*, *Int. J. Pharm.* (2006) 182-185.

⁸⁷ Li, W.; Worosila, G. D., *Int. J. Pharm.* 295 (2005) 213-219.

Segundo Hicks *et al.* (2003)⁷³ o monitoramento do conteúdo de água durante a manipulação de doxorrubicina pode ser realizada por espectroscopia no NIR, sendo que a principal vantagem do método reside na mínima manipulação da amostra (potencialmente tóxica) quando comparada a métodos convencionais (como Karl-Fischer), o que garante segurança ao manipulador.

Segundo Rosa *et al.* (2008)¹²³, a quantificação simultânea de grânulos, núcleos (produto intermediário) e comprimidos revestidos (produto final) de ranitidina em um mesmo processo de produção, por aplicação do algoritmo PLS associado ao NIR, pode ser considerada como um primeiro passo para estabelecer um sistema de liberação paramétrica na produção de formas sólidas na indústria farmacêutica, já que a metodologia desenvolvida permite medições em tempo real, monitoramento e controle de parâmetros de qualidade críticos no processo, como a quantificação do fármaco. Estudo semelhante foi conduzido por Blanco *et al.* (1998)¹⁷ associando espectroscopia no NIR (com acessório de reflexão difusa) e PLS na determinação do fármaco genfibrozila, em diferentes etapas do ciclo de produção.

O uso do NIR permite, ainda, avaliar o polimorfismo presente em determinados fármacos, pois possibilita o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada com a capacidade de quantificar polimorfos em uma mistura^{15,22,29}. Segundo McGoverin *et al.* (2006)⁹² a quantificação dos polimorfos do cloridrato de ranitidina (Forma I e II) é possível com a associação de NIR e métodos de calibração multivariada como PCR e PLS, porém os autores consideram que a espectroscopia Raman apresenta maior exatidão. Entretanto, para prever o conteúdo de lactose cristalina na presença de lactose amorfa (um excipiente comum em formulações farmacêuticas), a espectroscopia por NIR apresentou menor erro de predição quando comparada à espectroscopia Raman¹⁰¹. Diversas aplicações da espectroscopia no NIR no controle de processos farmacêuticos são discutidas em artigos de revisão recentes^{121,122}, sendo mais restrita a aplicação do MIR para este fim.

⁷³ Hicks, M. B. *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 495-501.

¹²³ Rosa S. S. *et al.*, *Talanta* (2008) in press.

¹⁷ Blanco, M. *et al.*, *Analyst* 123 (1998) 2307-2312.

¹⁵ Blanco, M. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 407 (2000) 247-254.

²² Blanco, M. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 502 (2004) 221-227.

²⁹ Braga, J. W. B.; Poppi, R. J., *Quim. Nova*, 27 (6) (2004) 1004-1011.

⁹² McGoverin, C. M. *et al.*, *Vib. Spectrosc.* 41 (2006) 225-231.

¹⁰¹ Norgaard, L. *et al.*, *Int. Dairy J.* 15 (2005) 1261-1270.

¹²¹ Reich, G., *Adv. Drug Deliver. Rev.* 57 (2005) 1109-1143.

¹²² Roggo, Y. *et al.*, *Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 683-700.

Estudos envolvendo o monitoramento de reações de síntese de fármacos, bem como o controle de impurezas nestes processos podem ser desenvolvidos através da aplicação do MIR associado à calibração multivariada. Segundo Pöllänen *et al.* (2005)¹¹⁹ a ATR-FTIR pode ser utilizada no monitoramento da cristalização de sulfatiazol permitindo o desenvolvimento de modelos para previsão da concentração do fármaco em diferentes etapas do processo. Os mesmos autores descrevem um método para determinar a composição de misturas contendo as formas polimórficas e a forma cristalina do fármaco sulfatiazol por DRIFTS. O erro associado ao método convencional (difração por raios X) não permite que a metodologia seja utilizada como única fonte na determinação da composição polimórfica da mistura, sendo recomendado que as duas técnicas (DRIFTS e difração por raios-X) sejam utilizadas complementarmente¹¹⁸.

A utilização do acessório de reflexão atenuada pode apresentar vantagem na quantificação de polimorfos em misturas por MIR em relação ao acessório de reflexão difusa. Neste contexto, Salari & Young (1998)¹²⁶ determinaram polimorfos do fármaco ganciclovir por associação entre ATR-FTIR e PLS. A metodologia desenvolvida forneceu informação qualitativa e quantitativa da mistura e se mostrou adequada para a determinação da pureza polimórfica de lotes do fármaco.

Segundo Bertacche *et al.* (2006)¹⁰, através de espectros de transmitância na região do MIR é possível construir modelos, utilizando o algoritmo PLS, com capacidade preditiva na determinação quantitativa de ciclosporina amorfa em amostras de ciclosporina cristalina. A ciclosporina amorfa pode ser considerada uma impureza obtida do processo de síntese do fármaco e que possui propriedades no estado sólido diferentes da forma cristalina, podendo afetar a biodisponibilidade do mesmo. Os modelos PLS desenvolvidos permitiram a quantificação da ciclosporina amorfa em uma faixa de concentração entre 0 e 10% em relação à ciclosporina cristalina. Valores abaixo de 5% são considerados adequados para a impureza.

A análise quantitativa de polimorfos da carbamazepina por DRIFTS associado à calibração multivariada é discutido por Kipouros *et al.* (2005)⁸¹ e Kipouros *et al.* (2006)⁸². Através do desenvolvimento de modelos multivariados foi possível prever

¹¹⁹ Pöllänen, K. *et al.*, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 76 (2005) 25-35.

¹¹⁸ Pöllänen, K. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 544 (2005) 108-117.

¹²⁶ Salari, A.; Young, R. E., *Int. J. Pharm.* 163 (1998) 157-166.

¹⁰ Bertacche, V. *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 159-166.

⁸¹ Kipouros, K. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 550 (2005) 191-198.

⁸² Kipouros, K. *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 2419-2431.

quantitativamente a forma polimórfica IV da carbamazepina, presente como impureza na forma III (polimorfo com ação farmacológica). Estudo semelhante foi conduzido por Kachrimanis *et al.* (2007)⁷⁸, na determinação de polimorfos do paracetamol em misturas associando espectroscopia Raman e PLS.

Segundo Lee & Lin (2004)⁸⁵, o monitoramento da homogeneidade de misturas de fármacos com excipientes farmacêuticos pode ser conduzida usando espectroscopia no MIR associada à análise de imagem (mapeamento microespectroscópico). Neste processo, a imagem de cada alíquota retirada da mistura é analisada em diferentes pontos. Segundo os autores, a informação fornecida por IR associado ao mapeamento por imagem é superior à informação fornecida por análises envolvendo um único ponto, permitindo a determinação do tempo final do processo de mistura de forma mais exata. A espectroscopia no MIR com o uso de imagem associada ao PLS pode fornecer informação importante sobre o perfil de dissolução de fármacos, a partir da observação direta do processo de difusão dos mesmos¹³⁷.

Um outro processo utilizado na indústria farmacêutica refere-se ao revestimento de comprimidos, com o objetivo de mascarar sabor e/ou controlar a liberação do fármaco no trato digestivo. Segundo Kauffman *et al.* (2007)⁸⁰, um modelo multivariado pode ser construído relacionando a informação do espectro Raman e a espessura do revestimento, objetivando o controle deste processo.

3.7.2. Espectroscopia no IR associada a determinações quantitativas

Vários estudos têm sido publicados nos últimos anos em relação à determinação quantitativa de compostos químicos (como fármacos ou excipientes) em produtos farmacêuticos por NIR¹²². As diferentes ofertas de acessórios permitem a análise de formas farmacêuticas sólidas, líquidas e/ou semi-sólidas, possibilitando a utilização do NIR, no desenvolvimento de metodologias analíticas quantitativas para amostras complexas, ampliando o uso da técnica na indústria farmacêutica¹³. Segundo Feng & Hu (2006)⁵¹ um modelo universal, produzido com amostras de diferentes indústrias, pode ser construído para a quantificação de fármacos como

⁷⁸ Kachrimanis, K.; Braun, D. E.; Griesser, U. J., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 407-412.

⁸⁵ Lee, T.; Lin, S., *Eur. J. Pharm. Sci.* 23 (2004) 117-122.

¹³⁷ Weerd, J.; Kazarian, S. G., *J. Control. Release* 98 (2004) 295-305.

⁸⁰ Kauffman, J. F.; Dellibovi, M.; Cunningham, C. R., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 39-48.

¹²² Roggo, Y. *et al.*, *Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 683-700.

¹³ Blanco, M. *et al.*, *Analyst* 124 (1999) 1089-1092.

⁵¹ Feng, Y.; Hu, C., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 373-384.

roxitromicina e eritromicina, na forma de comprimidos, usando NIR e métodos de calibração multivariada. Neste estudo, as amostras foram selecionadas por HCA e permitiram a construção de um modelo de calibração que apresentou especificidade, linearidade, exatidão, precisão e robustez. A construção de conjuntos de calibração que representem a variabilidade química e física do sistema foi discutido por Blanco *et al.* (2004)²⁰.

Segundo Blanco *et al.* (2006)¹¹, o uso da espectroscopia no NIR com acessório de reflexão difusa pode ser utilizado no desenvolvimento de metodologia analítica para a quantificação de 5 fármacos diferentes, responsáveis pelos sintomas da gripe e geralmente comercializados em comprimidos na forma associada. A metodologia desenvolvida apresentou vantagens em relação às metodologias convencionais (HPLC e titulação), principalmente em relação à produção de resíduos tóxicos.

Para Gottfries *et al.* (1996)⁶⁸, o modo de transmitância se mostrou mais adequado para o desenvolvimento de modelos de calibração multivariado (na região do NIR), na determinação de comprimidos de metoprolol, quando comparado ao modo de reflectância. Os autores atribuem o fato a maior sensibilidade dos espectros coletados por reflectância em relação à homogeneidade da amostra, o que pode ocasionar erros superiores quando comparados ao modelo obtido por transmitância. Segundo Blanco & Romero (2002)²¹, utilizando o modo de transreflectância é possível desenvolver modelos de calibração para a determinação do fármaco dexcetoprofeno na forma de gel, com erro relativo de 1,6% para as amostras de previsão. Berntsson *et al.* (2000)⁹, descreveram a influência do tamanho de partículas em misturas binárias, na determinação de dois componentes por NIRRS.

Na determinação de fármacos em baixa dosagem por NIR, pode ser necessária uma etapa prévia de tratamento do espectro (por remoção ou compressão dos dados) com o objetivo de extrair informação relevante^{12,37}. Para Goicoechea & Olivieri (2001)⁶⁶, o cálculo do sinal analítico líquido (NAS, do inglês

²⁰ Blanco, M.; Romero, M. A.; Alcalá, M., *Talanta* 64 (2004) 597-602.

¹¹ Blanco, M.; Alcalá, M., *Eur. J. Pharm. Sci.* 27 (2006) 280-286.

⁶⁸ Gottfries, J. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1495-1503.

²¹ Blanco, M.; Romero, M. A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 467-472.

⁹ Berntsson, O. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 419 (2000) 45-54.

¹² Blanco, M. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 581 (2007) 318-323.

³⁷ Chalus, P.; Walter, S.; Ulmschneider, M., *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 219-224.

⁶⁶ Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 56 (2001) 73-81.

net analytical signal) a partir do espectro e seu uso como técnica de pré-processamento antes da aplicação do algoritmo PLS pode ser útil no desenvolvimento de modelos de calibração apropriados. Neste estudo, os autores aplicam o pré-processamento proposto na quantificação de tetraciclina em amostras de soro humano e na quantificação de nafazolina em formulações farmacêuticas. Segundo Abrahamsson *et al.* (2003)¹, os métodos de seleção de variáveis podem auxiliar na construção de modelos PLS com melhor capacidade preditiva. Para amostras de chá verde, os métodos de seleção de variáveis como iPLS e siPLS podem ser úteis na quantificação de compostos fenólicos por NIR, permitindo a construção de modelos mais robustos e com melhor capacidade preditiva quando comparados com modelos envolvendo informação do espectro inteiro^{38,39}.

Uma aplicação recente da espectroscopia no NIR descreve como o fármaco testosterona pode ser determinado em adesivos transdérmicos⁵⁷. Os autores referem que, embora a metodologia recomendada (por espectroscopia no ultravioleta) tenha apresentado melhor coeficiente de correlação, a metodologia proposta por IR mostrou-se mais rápida e não destrutiva, apresentando um potencial para uso no controle de qualidade desta forma farmacêutica.

A região do MIR pode, também, ser utilizada para análises quantitativas de misturas complexas, como preparações farmacêuticas. Souza & Ferrão (2006)¹³¹ desenvolveram uma metodologia analítica associando DRIFTS e calibração multivariada para quantificação de diclofenaco de potássio em comprimidos. Para Parisotto *et al.* (2007)¹⁰¹, a associação entre DRIFTS e calibração multivariada permite a quantificação de misturas contendo amoxicilina e amido, com erros de validação considerados satisfatórios. A metodologia desenvolvida é sugerida como alternativa na quantificação do fármaco, durante o processo de produção do mesmo. Segundo Agatonovic-Kustrin *et al.* (2001)² a construção de um modelo de calibração, com dados combinados das técnicas de difração por raios-X e DRIFTS, permitiu a determinação da pureza polimórfica do fármaco ranitidina, através da aplicação de algoritmos de calibração multivariada para dados não lineares, como redes neurais artificiais (ANN, do inglês *artificial neural networks*).

¹ Abrahamsson, C. *et al.*, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 69 (2003) 3-12.

³⁸ Chen, Q. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 3 (2008) 568-573.

³⁹ Chen, Q. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 572 (2006) 77-84.

⁵⁷ Fontain, W. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 181-189.

¹³¹ Souza, J. S.; Ferrão, M. F., *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 42 (2006) 437-445.

¹⁰¹ Norgaard, L. *et al.*, *Int. Dairy J.* 15 (2005) 1261-1270.

² Agatonovic-Kustrin, S. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 741-750.

De uma forma geral, a espectroscopia no MIR (e, conseqüentemente a aplicação da técnica de reflexão atenuada) é pouco descrita na literatura para análise quantitativa, em comparação ao NIR, devido, principalmente, a natureza do sinal, fortemente sobreposto. Segundo Boyer *et al.* (2006)²⁷, o ácido niflúmico na forma de gel pode ser quantificado por ATR-FTIR, com mínimo preparo da amostra, sendo que a metodologia apresentou precisão adequada para rotinas de controle de qualidade em indústrias farmacêuticas. Uma outra aplicação para amostras semi-sólidas refere-se à quantificação de dois fármacos (tetrametrina e butóxido de piperonil) em loção para pediculose, por reflexão atenuada e por transmitância na região do MIR⁹⁶.

Segundo Hartauer & Guillory (1989)⁷², a quantificação de formas farmacêuticas líquidas contendo SMZ e TMP é possível por associação entre ATR-FTIR (com acessório de reflexão para amostras líquidas - CircleCell[®]) e calibração multivariada. A seleção de variáveis foi conduzida através da identificação de regiões onde o espectro possuía maior intensidade, quando comparado ao espectro de amostra placebo, sendo selecionadas as regiões entre 900 e 1270 cm⁻¹ e 1390 a 1510 cm⁻¹. Neste estudo, os autores obtiveram erros relativos de 1,5% e 1,0%, para SMZ e TMP, respectivamente, para análise de 6 amostras comerciais (contendo os fármacos na forma líquida).

A espectroscopia Raman também é descrita na literatura, em análises quantitativas de fármacos por associação com calibração multivariada^{44,91}. Segundo Mazurek & Szostak (2006)⁹¹, a espectroscopia Raman é um método analítico efetivo na quantificação de misturas complexas, incluindo preparações farmacêuticas. Os autores descrevem um método para quantificação de diclofenaco sódico e aminofilina em soluções injetáveis, por calibração multivariada utilizando o algoritmo PLS.

3.7.3. Espectroscopia no IR associada a métodos de classificação

Segundo Chen *et al.* (2006)³⁹, espectros de compostos fenólicos extraídos de variedades de chás e analisados na região do NIR, associados com métodos de

²⁷ Boyer, C. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 433-437.

⁹⁶ Moros, J.; Garrigues, S.; Guardia, M., *Anal. Chim. Acta* 582 (2007) 174-180.

⁷² Hartauer, K. J.; Guillory, J. K., *Pharmaceut. Res.* 6 (1989) 608-611.

⁴⁴ De Beer, T. R. M. *et al.*, *Eur. J. Pharm. Sci.* 23 (2004) 355-362.

⁹¹ Mazurek, S.; Szostak, R., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 1235-1242.

³⁹ Chen, Q. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 572 (2006) 77-84.

classificação supervisionados como SIMCA são adequados para classificação destas amostras e posterior identificação. A quantificação de compostos fenólicos aplicando o algoritmo PLS é possível, porém apresenta um erro de previsão maior quando comparado ao método PLS desenvolvido para a quantificação de cafeína isoladamente. Os autores atribuem este fato à menor exatidão do método de referência para quantificação de compostos fenólicos (determinação fotométrica) quando comparada à determinação de cafeína (por HPLC).

O uso de análise exploratória associado a espectros no IR médio (utilizando acessório de reflexão difusa) foi utilizado por Parisotto *et al.* (2005)¹⁰⁸, com o objetivo de avaliar a similaridade entre diferentes formas sólidas contendo piroxicam. Neste estudo, a utilização do HCA permitiu a distinção de grupos a partir da informação do excipiente. O mesmo método de classificação (HCA) foi utilizado por Sabin *et al.* (2004)¹²⁵, para estudo de fármacos antidepressivos. A metodologia utilizada no estudo possibilitou avaliar a similaridade das amostras contendo os diferentes fármacos

Segundo Foot & Mulholland (2005)⁵⁸, usando os métodos de classificação SIMCA, HCA e PCA, é possível identificar diferentes fármacos pertencentes à classe de compostos conhecida como glicosaminoglicanos. Neste estudo, os autores citam que, entre as regiões do espectro estudadas para a classificação dos compostos, a região conhecida como “impressão digital” (inferior a 2000 cm⁻¹) produziu a melhor discriminação.

3.7.4 Validação de métodos multivariados de calibração

Validação segundo a ANVISA (2003) refere-se ao processo que engloba o estabelecimento e a execução de procedimentos de análise que visam garantir a qualidade de um produto, para as condições experimentais definidas. A validação dos métodos analíticos univariados é regulamentada através da Resolução – RE nº. 899, de 29 de maio de 2003, a qual determina que a validação deva garantir, através de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

¹⁰⁸ Parisotto, G. *et al.*, *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 41 (2005) 499-505.

¹²⁵ Sabin, J. G.; Ferrão, M. F.; Furtado, M. F., *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 40 (2004) 387-396.

⁵⁸ Foot, M.; Mulholland, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 397-407.

Na validação de metodologias analíticas para a determinação de fármacos presentes em formas farmacêuticas, órgãos internacionais como ICH⁷⁵ (Conferência Internacional de Harmonização, do inglês *International Conference on Harmonisation*) e a ANVISA estabelecem os itens que devem ser avaliados, como especificidade, linearidade, precisão, exatidão, intervalo e robustez.

Para métodos de calibração multivariada, a validação pode ser conseguida através da determinação de figuras de mérito, as quais certificam que o método proposto é confiável e atende às exigências de órgãos regulatórios. Com este objetivo, a IUPAC¹⁰³ (International Union of Pure and Applied Chemistry), o EMEA¹⁰⁰ (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) e a ASTM⁴ (American Society for Testing and Materials) estabeleceram, recentemente, guias definindo as características de procedimentos de calibração multivariada e os parâmetros mínimos para avaliação do método proposto. Na norma ASTM, são definidos os procedimentos para análise quantitativa por espectroscopia no infravermelho e os parâmetros para validação de um modelo multivariado. Para a IUPAC, a validação do método pode ser alcançada pela determinação da sensibilidade, seletividade e razão sinal ruído. Estas figuras podem ser definidas através do conceito de NAS (Sinal Analítico Líquido, do inglês *Net Analyte Signal*), que corresponde ao sinal instrumental que é ortogonal às contribuições de outros possíveis constituintes presentes na amostra. Nos guias desenvolvidos pelo EMEA para a indústria farmacêutica, estão descritos os principais itens para validação de métodos qualitativos e quantitativos por NIR.

Para Braga & Poppi (2004)²⁹ e Sena *et al.* (2004)¹²⁸ figuras de mérito como sensibilidade, seletividade, razão sinal-ruído e limite de detecção podem ser calculados através do NAS.

Diversos autores têm sugerido parâmetros adaptados aos descritos para métodos univariados, que propiciem a validação de tal procedimento em produtos farmacêuticos. Segundo Moffat *et al.* (2000)⁹⁵, as normas estabelecidas pelo ICH para validação de procedimentos analíticos univariados podem ser adaptadas para determinações por espectroscopia no NIR. Neste estudo é feita uma sugestão de

⁷⁵ ICH Harmonised Tripartite Guideline, Q2 (R1), USA, 2005.

¹⁰³ Olivieri, A. C. *et al.*, *Pure and Applied Chemistry* (IUPAC Technical Report) 78 (2006) 633-661.

¹⁰⁰ EMEA guidance. EMEA/CVMP/961/01, London, 2003.

⁴ Annual Book of ASTM Standards, E1655, 2000.

²⁹ Braga, J. W. B.; Poppi, R. J., *Quim. Nova*, 27 (6) (2004) 1004-1011.

¹²⁸ Sena, M. M. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 743-749.

⁹⁵ Moffat, A. C. *et al.*, *Analyst* 125 (2000) 1341-1351.

como deve ser conduzido o procedimento para determinação de parâmetros como especificidade, linearidade, intervalo, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez para a quantificação de comprimidos de paracetamol.

Para Blanco & Alcalá (2006)¹¹, a validação de um método multivariado pode ser realizada a partir dos parâmetros recomendados para métodos univariados, segundo preconiza o ICH. Neste estudo, foi desenvolvido e validado um método para a determinação simultânea de cinco fármacos em uma preparação farmacêutica, por espectroscopia no NIR.

Ainda não estão descritos na literatura, normas ou sugestões de órgãos oficiais do setor farmacêutico para a validação de métodos multivariados utilizando espectroscopia no infravermelho médio.

Na Tabela 3 é possível observar os principais parâmetros discutidos em estudos sobre validação de métodos multivariados de calibração, bem como um resumo de como os autores e/ou órgãos reguladores sugerem a realização dos testes.

¹¹ Blanco, M.; Alcalá, M., *Eur. J. Pharm. Sci.* 27 (2006) 280-286.

Tabela 3. Parâmetros de validação para métodos multivariados.

Parâmetro	Condução do teste	Autor ou Órgão regulador
Especificidade (seletividade)	Adição de possíveis interferentes nas amostras; comparação com espectros de referência.	Moffat <i>et al.</i> (2000) ⁹⁵ .
	Produção de amostras com possíveis interferentes;	Norma EMEA (2003) ¹⁰⁰ .
	Verificação do uso de informação espectral referente ao analito, para os números de onda utilizados na calibração.	
	Estimativa do sinal perdido por ortogonalidade, através do cálculo do NAS.	Braga & Poppi (2004) ²⁹ ; Norma IUPAC (2006) ¹⁰³ .
	— ^a	Norma ASTM E-1655 (2005) ⁴
	Comparação do espectro das amostras com espectros de referência	Blanco <i>et al.</i> (1999) ¹³ ; Blanco <i>et al.</i> (2002) ¹⁹ ; Blanco <i>et al.</i> (2004) ²⁰ ; Blanco <i>et al.</i> (2006) ¹¹ .
Linearidade	Regressão linear entre valores previstos vs. valores medidos	Moffat <i>et al.</i> (2000) ⁹⁵ ; Norma EMEA (2003) ¹⁰⁰ ; Blanco <i>et al.</i> (1999) ¹³ ; Blanco <i>et al.</i> (2002) ¹⁹ ; Blanco <i>et al.</i> (2004) ²⁰ ; Blanco <i>et al.</i> (2006) ¹¹ .
	— ^a	Braga & Poppi (2004) ²⁹ ; Norma ASTM E-1655 (2005) ⁴ ; Norma IUPAC (2006) ¹⁰³ .
Precisão (repetibilidade)	Nove determinações (três replicatas de três concentrações diferentes)	Moffat <i>et al.</i> (2000) ⁹⁵ ; Norma EMEA (2003) ¹⁰⁰ ; Norma ASTM E-1655 (2005) ⁴ .
	Dezoito determinações (seis replicatas de três concentrações diferentes).	Norma IUPAC (2006) ¹⁰³
	— ^a	Blanco <i>et al.</i> (1999) ¹³ ; Blanco <i>et al.</i> (2002) ¹⁹ ; Blanco <i>et al.</i> (2004) ²⁰ ; Blanco <i>et al.</i> (2006) ¹¹
Exatidão	Cálculo do erro de previsão.	Moffat <i>et al.</i> (2000) ⁹⁵ ; Norma EMEA (2003) ¹⁰⁰ ;
	Comparação entre valores previstos e valores medidos.	Blanco <i>et al.</i> (1999) ¹³ ; Blanco <i>et al.</i> (2002) ¹⁹ ;
	Aplicação de teste t pareado.	Blanco <i>et al.</i> (2004) ²⁰ ; Blanco <i>et al.</i> (2006) ¹¹ .
	Cálculo do erro médio quadrático de previsão.	Braga & Poppi (2004) ²⁹ .
	Comparação entre valores previstos e valores medidos.	Norma ASTM E-1655 (2005) ⁴ .
	— ^a	Norma IUPAC (2006) ¹⁰³ .

Tabela 3. Parâmetros de validação para métodos multivariados (cont.)

Robustez	Variações no ambiente (por ex. temperatura ou umidade); variações instrumentais (por ex. lâmpadas); variações no modelo de calibração (por ex. número de VL)	Moffat <i>et al.</i> (2000) ⁹⁵ ; Norma EMEA (2003) ¹⁰⁰ .
	Amostras analisadas em um intervalo de tempo. Comparação dos valores previstos vs. valores medidos	Blanco <i>et al.</i> (1999) ¹³ ; Blanco <i>et al.</i> (2002) ¹⁹ ; Blanco <i>et al.</i> (2004) ²⁰ ; Blanco <i>et al.</i> (2006) ¹¹
	— ^a	Braga & Poppi (2004) ²⁹ ; Norma ASTM E-1655 (2005) ⁴ ; Norma IUPAC (2006) ¹⁰³ .

^a Não discutido na norma ou artigo

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Instrumentação

As determinações de SMZ e TMP nas amostras através do método de referência foram feitas empregando um cromatógrafo líquido Série Agilent 1100 equipado com bomba Agilent modelo G1311A, detector por arranjo de diodos Agilent modelo G1315B e amostrador automático modelo G133A ALS. O comprimento de onda utilizado foi de 254 nm e as áreas dos picos integradas (automaticamente) pelo computador através do programa CHEMSTATION[®]. A separação foi feita à temperatura ambiente usando coluna Zorbax[®] SBC-18 (d.i. 250 mm x 4,5 mm, tamanho de partícula 5 µm). Coluna Zorbax[®] SBC-18 (d.i. 12,5 mm x 4,5 mm, tamanho de partícula 5 µm) foi utilizada como coluna guarda.

Para aquisição dos espectros de infravermelho por reflexão total atenuada, foi utilizado um espectrômetro PerkinElmer (modelo Spectrum One[®] FTIR, <http://www.perkinelmer.com>, EUA), equipado com IRE de seleneto de zinco. Argônio foi utilizado como gás de purga (99,998% de pureza, White Martins, <http://www.whitemartins.com.br>, Brasil).

Para a etapa de aquisição dos espectros de infravermelho por reflexão difusa, foi utilizado um espectrofotômetro NICOLET (modelo Magna 550, <http://www.thermo.com>, EUA) com acessório de refletância difusa PIKE Technologies (EasiDiff[®], <http://www.piketech.com>, EUA).

Para a pesagem das amostras foi utilizada uma balança analítica Shimadzu (modelo AY220, <http://www.shimadzu.com.br>, Brasil), com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g. Todas as amostras foram misturadas em moinho criogênico Spex Certiprep (Model 6750 Freezer/Mill, <http://www.spexcsp.com>, EUA).

4.2. Reagentes

A água utilizada foi destilada e deionizada em uma coluna trocadora de íons convencional (condutividade máxima de 0,6 µS cm⁻¹) e purificada em um sistema Milli-Q (Milli-Q[®], <http://www.millipore.com>, EUA), com resistividade final de 18,2 MΩ cm.

Os solventes utilizados na determinação das amostras por HPLC, foram: metanol grau HPLC (Merck, www.merckla.com, Alemanha), acetonitrila grau HPLC

(Merck, www.merckla.com, Alemanha) e trietilamina (Vetec, www.vetecquimica.com.br, Brasil). Também, foram utilizados, hidróxido de sódio P.A. (Vetec, www.vetecquimica.com.br, Brasil), ácido acético glacial P.A. (Vetec, www.vetecquimica.com.br, Brasil) e brometo de potássio (Vetec, www.vetecquimica.com.br, Brasil) (utilizado para aquisição do espectro denominado “branco”, na determinação das amostras por DRIFTS).

4.3. Amostras

Sulfametoxazol SQR (substância química de referência) e Trimetoprima SQR foram cedidas pela Farmacopéia Brasileira. Matérias-primas sulfametoxazol (lote n° 22960805) e trimetoprima (lote n° 200504246) foram adquiridas da empresa Henrifarma (São Paulo, Brasil). Amido e estearato de magnésio (excipientes) foram cedidos pelo laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFSM. Estas matérias-primas foram utilizadas para construção do conjunto denominado “amostras sintéticas”. As concentrações das amostras sintéticas variaram de 400 a 900 mg g⁻¹ para SMZ e 80 a 240 mg g⁻¹ para TMP (abrangendo uma faixa de concentração em torno de 25% do valor médio encontrado para amostras comerciais), conforme Tabela 4. Amostras comerciais contendo os fármacos foram adquiridas no comércio local (drogarias), na forma de comprimidos contendo 400 e 80 mg, ou 800 e 160 mg de SMZ e TMP por comprimido, respectivamente.

Tabela 4. Composição das amostras sintéticas empregadas.

Amostra	SMZ (mg g ⁻¹)	TMP (mg g ⁻¹)	Excipiente (mg g ⁻¹)
1 ^c	400	120	480
2 ^c	400	140	460
3 ^c	400	160	440
4 ^c	400	180	420
5 ^c	400	200	400
6 ^c	400	240	360
7 ^c	600	80	320
8 ^c	600	120	280
9 ^c	600	140	260
10 ^c	600	160	240
11 ^c	600	180	220
12 ^c	600	200	200
13 ^c	600	240	160
14 ^c	700	80	220
15 ^c	700	120	180
16 ^c	700	140	160
17 ^c	700	160	140
18 ^c	700	200	100
19 ^c	700	240	60
20 ^c	800	80	120
21 ^c	800	120	80
22 ^c	800	140	60
23 ^c	800	160	40
24 ^c	800	180	20
25 ^c	800	200	0
26 ^c	850	80	70
27 ^c	850	120	30
28 ^c	850	140	10
29 ^c	850	150	0
30 ^c	900	80	20
31 ^c	900	90	10
32 ^c	900	100	0
33 ^p	500	125	375
34 ^p	500	175	325
35 ^p	500	220	280
36 ^p	650	100	250
37 ^p	650	150	200
38 ^p	650	175	175
39 ^p	650	220	130
40 ^p	750	100	150
41 ^p	750	125	125
42 ^p	750	150	100
43 ^p	750	175	75
44 ^p	750	220	30
45 ^p	825	100	75
46 ^p	825	125	50
47 ^p	825	175	0
48 ^p	875	100	25
49 ^p	875	125	0

c: amostras sintéticas utilizadas no conjunto de calibração

p: amostras sintéticas utilizadas no conjunto de previsão.

4.4. Programas computacionais

Para o tratamento dos dados foram utilizados dois programas computacionais: Pirouette[®] versão 3.11 (<http://www.infometrix.com>, EUA), sendo usado o PCA e HCA; e MATLAB[®] versão 6.5 (The Math Works, <http://www.mathworks.com>, EUA), sendo usado o pacote “iToolbox” versão 2 desenvolvido por Lars Norgaard (iToolbox for MATLAB, <http://www.models.kvl.dk>, EUA), para a seleção das variáveis (algoritmos iPLS e siPLS).

4.5. Determinação de sulfametoxazol e trimetoprima por HPLC

A quantificação de SMZ e TMP nas amostras (sintéticas e comerciais) foi feita por HPLC, segundo metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 4^a edição⁵⁰. Para a determinação foi utilizado um cromatógrafo a líquido provido de detector ultravioleta a 254 nm, uma coluna de sílica quimicamente modificada ligada a grupo octadecilsilano (5 µm), mantida à temperatura ambiente. Para preparar a fase móvel, foram misturados 1400 mL de água, 400 mL de acetonitrila e 2 mL de trietilamina (pH da mistura ajustado para 5,9±0,1 com hidróxido de sódio 0,2 M ou ácido acético glacial) e o volume completado com água. A quantidade de SMZ e TMP nos comprimidos foi calculada a partir das respostas obtidas para as *soluções padrão* e *amostra*. O mesmo procedimento foi adotado para quantificação de SMZ e TMP nas matérias-primas utilizadas na construção das amostras produzidas no laboratório (amostras sintéticas).

Estudo adicional referente aos parâmetros recomendados pela ANVISA para validação de metodologias analíticas, como linearidade, precisão, exatidão e robustez foram aplicados durante a quantificação dos fármacos por HPLC, com o objetivo de verificar possíveis alterações no resultado obtido, oriundos de falhas no equipamento e/ou procedimento. Os demais testes descritos na Farmacopéia Brasileira 4^a edição⁵⁰ para as monografias dos fármacos e monografia dos comprimidos foram aplicados, com o objetivo de verificar a qualidade das amostras em estudo.

⁵⁰ Farmacopéia Brasileira: parte II, quarto fascículo. 4. ed, 2003.

4.6. Análise por espectroscopia no infravermelho

Antes da aquisição dos espectros, as amostras (sintéticas e comerciais) foram submetidas à moagem criogênica com o objetivo de promover a mistura dos componentes e padronizar o tamanho da partícula, utilizando o seguinte programa: ciclo de pré-congelamento de 2 min, ciclo de moagem de 2 min e velocidade de 15 rpm. Os espectros foram obtidos na região do infravermelho médio (por reflexão total atenuada e reflexão difusa), conforme parâmetros descritos a seguir.

4.6.1. Aquisição dos espectros por reflexão total atenuada

As amostras foram transferidas para a superfície do IRE. Após aplicação da pressão do braço mecânico, o espectro foi adquirido. A quantidade de amostra a ser disposta no acessório, foi prevista por meio da aquisição de um conjunto de espectros com quantidade crescente da mistura, sendo utilizado para este fim, a amostra sintética contendo 700 mg de SMZ, 140 mg de TMP e 160 mg de excipiente (amostra esta com concentração dos fármacos aproximada às amostras comerciais utilizadas no estudo). A padronização deste procedimento teve por fim determinar a quantidade mínima de amostra que produz espectros com menor ruído, favorecendo a produção de bandas espectrais com melhores contornos, de modo a não prejudicar a identificação dos fármacos. Neste caso, a massa de amostra escolhida foi $35 \pm 0,3$ mg.

Na Tabela 5 são apresentados os parâmetros utilizados na aquisição dos espectros.

Tabela 5. Instrumentação e regiões empregadas na aquisição dos espectros por ATR-FTIR.

Parâmetros	Condições
Região espectral	650-4000 cm^{-1}
Detector	DTGS – detector de sulfato de triglicina deuterada
Divisor de feixes	KBr
Varreduras	16
Resolução	2 cm^{-1}
Acessório	Reflexão Total Atenuada
Aplicativo	Spectrum v 5.0.1 [®]

Anteriormente a obtenção do espectro de cada amostra, foi coletado um espectro de referência (*background*). Para tal, foi adquirido um espectro sem amostra na superfície do IRE. Após cada espectro de referência, as amostras foram dispostas no compartimento do acessório e submetidas à análise, conforme ilustrado na Figura 8. Este procedimento foi adotado para três pesagens de cada amostra, obtendo-se desta forma o espectro em triplicata. O equipamento foi continuamente purgado com argônio para eliminar qualquer contribuição da umidade do ar e do CO₂ na aquisição dos espectros.

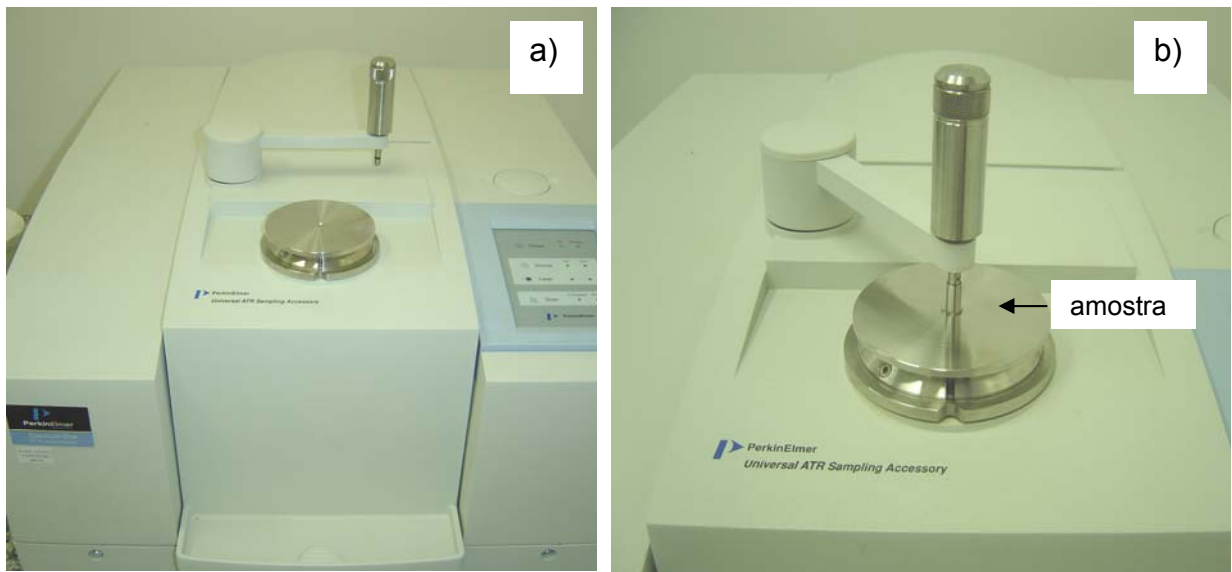


Figura 8. Acessório de reflexão total atenuada acoplado ao espectrômetro de infravermelho: a) acessório sem amostra, b) acessório com amostra.

Os espectros das amostras coletados em triplicata, foram normalizados e, em seguida, obteve-se o espectro médio. O perfil dos espectros de uma amostra sintética, antes do processo de normalização, pode ser observado na Figura 9.

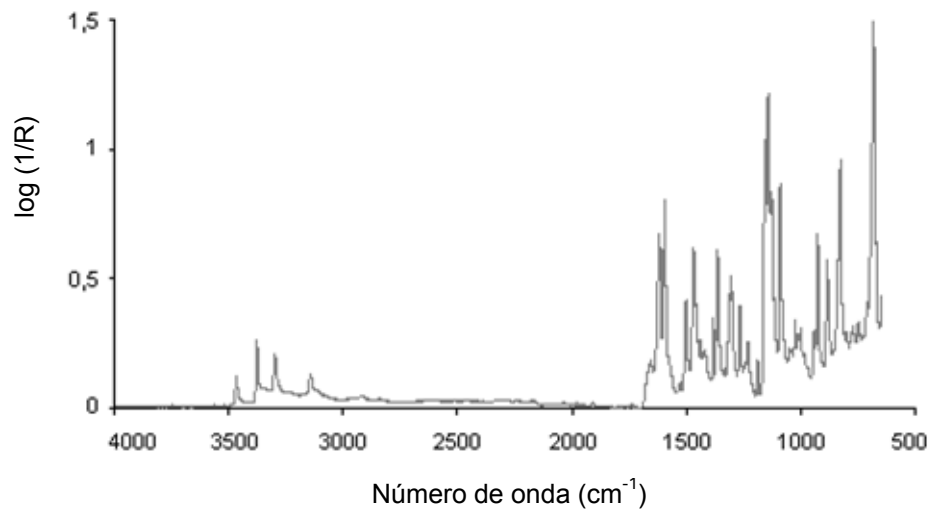


Figura 9. Perfil dos espectros das amostras obtidos por ATR-FTIR.

Após a aquisição dos espectros de cada amostra, o IRE foi cuidadosamente limpo com acetona, e seco com ar quente.

4.6.2 Aquisição dos espectros por reflexão difusa

As amostras foram transferidas para a superfície do acessório, prensadas e em seguida, o espectro foi coletado. A quantidade de amostra a ser disposta no acessório de reflexão difusa, foi prevista por meio da aquisição de um conjunto de espectros com quantidade crescente da mistura (sendo utilizado para este, a amostra sintética contendo 700 mg de SMZ, 140 mg de TMP e 160 mg de excipiente). A massa de amostra que apresentou espectros com menor ruído foi $34 \pm 0,3$ mg. Com o objetivo de melhorar a reprodutibilidade dos espectros, foi utilizado um sistema de prensagem das amostras. Este sistema consiste de um material em polietilfluoretileno, que permite o depósito da amostra na parte superior do amostrador, mantendo a superfície uniforme e a aquisição do espectro mais reprodutível.

Na Tabela 6 são apresentados os parâmetros utilizados na aquisição dos espectros.

Tabela 6. Instrumentação e regiões empregadas na aquisição dos espectros por DRIFTS.

Parâmetros	Condições
Região espectral	600-4000 cm^{-1}
Detector	DTGS – detector de sulfato de triglicina deuterada
Divisor de feixes	KBr
Varreduras	16
Resolução	4 cm^{-1}
Acessório	Reflexão Difusa
Aplicativo	OMNIC [®]

Anteriormente à obtenção do espectro de cada amostra, foi coletado um espectro de referência (*background*). Para tal, foi adquirido um espectro de KBr, disposto na superfície do acessório. Após cada espectro de referência, as amostras foram dispostas no compartimento e submetidas à análise, conforme ilustrado na Figura 10. Este procedimento foi adotado para três pesagens de cada amostra, obtendo-se desta forma o espectro em triplicata.

Os espectros das amostras foram normalizados, e em seguida obteve-se o espectro médio.

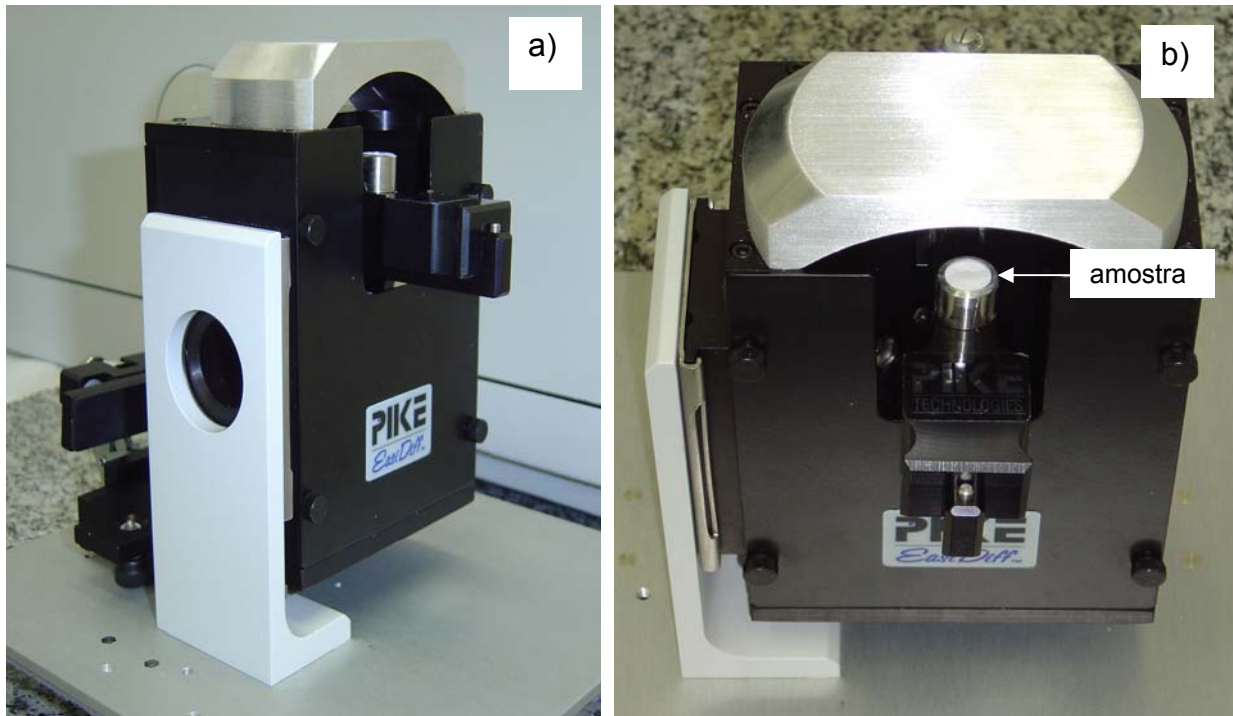


Figura 10. Acessório de reflexão difusa acoplado ao espectrômetro de infravermelho: a) acessório com material inerte (KBr), b) acessório com amostra.

O perfil dos espectros de uma amostra sintética, antes do processo de normalização, pode ser observado na Figura 11.

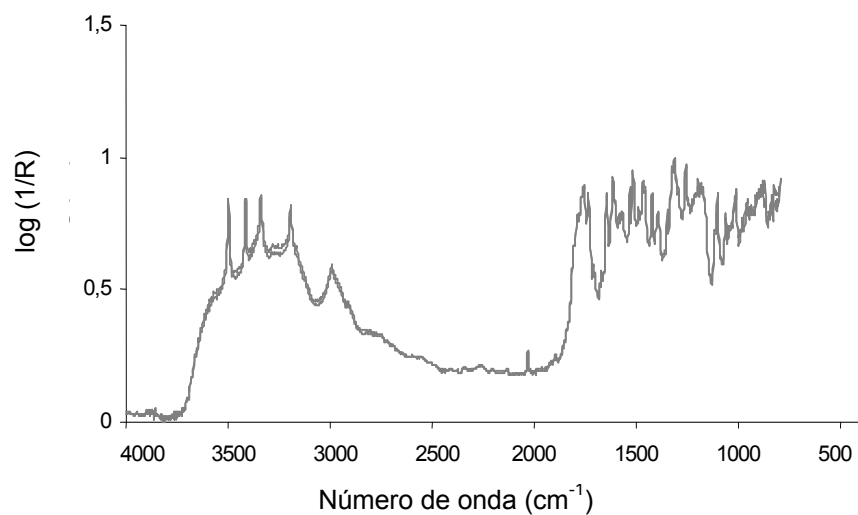


Figura 11. Perfil dos espectros das amostras obtidos por DRIFTS.

4.7. Construção dos modelos – Análise multivariada

Antes da construção dos modelos, foi feita a detecção de amostras anômalas e a seleção das amostras que constituíram os conjuntos de calibração e previsão, através da PCA e da HCA, disponíveis no programa Pirouette[®] versão 3.11. A seguir, foi construído o modelo global utilizando PLS empregando toda a faixa espectral. Por fim, foram construídos os modelos de calibração através de 2 diferentes algoritmos: iPLS e siPLS, disponíveis no pacote “iToolbox” versão 2, desenvolvido por Lars Norgaard¹⁰² para ambiente MATLAB[®].

4.7.1. Detecção de amostras anômalas

Para assegurar a qualidade dos conjuntos de calibração e previsão, foi feita a detecção de amostras anômalas. Para tal procedimento, foi utilizada a PCA, através da análise do gráfico dos resíduos de Student vs. a distância de Mahalanobis¹¹⁷, o qual permite verificar a influência de cada amostra em particular no modelo. Amostras com alto resíduo foram descartadas.

4.7.2 Seleção das amostras dos conjuntos de calibração e previsão

A seleção das amostras para constituição dos conjuntos de calibração e previsão teve dois objetivos principais: construir conjuntos que contenham a informação da matriz de dados utilizados neste estudo e que contenha a maior variabilidade possível em relação à faixa de concentração.

Para a seleção das amostras que constituíram os conjuntos de calibração e previsão foi adotado o seguinte procedimento:

a) Produção de amostras sintéticas com excipientes considerados “universais” (presentes nas misturas das formulações de comprimidos disponíveis no mercado). Os excipientes escolhidos foram amido e estearato de magnésio, na proporção de 99+1. A mistura contendo sulfametoxazol e trimetoprima foi completada até 1 grama, com a mistura de excipientes.

b) Aplicação do algoritmo HCA, para o conjunto formado por amostras sintéticas e amostras comerciais. Esta etapa de seleção para os conjuntos de calibração e previsão foi feita através da observação da similaridade entre as

¹⁰² Norgaard, L. *et al.*, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 413-419.

¹¹⁷ Pirouette, *Multivariate Data Analysis*, versão 3.11, Infometrix.

amostras (dendrograma), fornecido pela HCA. Dentre os grupos similares fornecidos pelo HCA (índice de similaridade de 0,5) foi selecionada, no mínimo, uma amostra para compor o conjunto de previsão. O critério para seleção das amostras sintéticas em cada grupo foi a informação contida na variável Y, referente à concentração das amostras. Assim, foram selecionadas amostras com valores intermediários de concentração para o conjunto de previsão, a fim de garantir que as amostras com valores extremos estariam presentes no conjunto de calibração. Para amostras comerciais similares, o critério de escolha adotado foi a inclusão de amostras do mesmo fabricante, porém lotes diferentes em cada conjunto.

O conjunto de calibração foi formado por 32 amostras sintéticas e 9 amostras comerciais e o conjunto de previsão por 17 amostras sintéticas e 6 amostras comerciais. Para as amostras produzidas no laboratório, as substâncias ativas foram manipuladas de forma a obter um conjunto com diferentes concentrações, através de pesagem e diluição com excipiente. Os conjuntos de calibração e previsão assim definidos foram utilizados para o desenvolvimento dos modelos por ATR-FTIR e DRIFTS.

4.7.3. Desenvolvimento dos modelos para a determinação de sulfametoxazol e trimetoprima

O desenvolvimento dos modelos de calibração para a determinação do SMZ e TMP nas amostras foi dividido em 3 etapas. Na primeira etapa foi testado o tratamento MSC associado aos pré-processamentos autoescalado e centrado na média, na construção de modelos utilizando PLS e todas as variáveis independentes (item 4.7.3.1). Um teste F (95% de confiança) foi aplicado para fim de comparação entre os erros de previsão obtidos para os diferentes modelos. Na segunda etapa foram utilizados os algoritmos iPLS e siPLS para a seleção dos números de onda correlacionados com os fármacos (item 4.7.3.2) e na terceira etapa, os melhores modelos foram escolhidos a partir dos valores de RMSECV, RMSEP e R^2 (item 4.7.3.3). Nesta etapa foi aplicado um teste F (95% de confiança) para comparação entre os erros de previsão dos modelos escolhidos.

O número de VL escolhida para cada modelo foi baseado no menor RMSECV, o qual não apresentava diferença na ordem de grandeza em relação ao RMSECV atribuído a VL anterior.

4.7.3.1. Testes preliminares e obtenção do modelo global PLS

O modelo global foi constituído a partir do espectro inteiro e foi testado como recurso de tratamento dos dados, o MSC. Como pré-processamentos foram avaliados, os dados centrados na média e autoescalados. Foram obtidos cinco modelos para cada fármaco, dos quais foi escolhido o modelo com menores valores de RMSECV, RMSEP e maior valor de R^2 . Para evitar sobreajuste (“*overfitting*”) preferiram-se modelos com valores de RMSECV e RMSEP semelhantes. O mesmo tratamento e o mesmo pré-processamento foram adotados para todos os modelos desenvolvidos no estudo, o que permitiu a comparação posterior entre estes.

4.7.3.2. Método de seleção de variáveis

As variáveis espectrais foram selecionadas através do emprego dos métodos de seleção de variáveis, iPLS e siPLS.

Na etapa de seleção de variáveis, tanto nos modelos iPLS, quanto nos modelos siPLS, os espectros foram divididos em 10, 25 e 50 intervalos. Quando da aplicação do siPLS, foram combinados até 5 intervalos para os modelos construídos por divisão do espectro em 10 intervalos. Para os modelos construídos por divisão do espectro em 25 e 50 intervalos, foram combinados até 3 intervalos (combinações possíveis para 4 e 5 intervalos não foram adotadas devido ao tempo necessário para construção dos modelos).

A rotina dos algoritmos iPLS e siPLS gera informações gráficas, indicando o número de variáveis latentes usadas em cada intervalo e os valores de RMSECV. O subintervalo que apresenta o menor valor de RMSECV deve ser selecionado para posterior comparação com valores de RMSECV de modelos construídos com a informação de toda a faixa espectral (modelo global PLS)¹⁰².

4.7.3.3. Avaliação dos modelos obtidos

Os modelos foram avaliados em termos do número de variáveis latentes (VLs), RMSECV, RMSEP¹⁰² e, por fim, através do coeficiente de determinação entre valores previstos e medidos do conjunto de calibração (R^2_{cal}).

As regiões com valores de RMSECV menores que o modelo global PLS foram selecionadas para a construção dos diferentes modelos, sendo posteriormente,

¹⁰² Norgaard, L. *et al.*, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 413-419.

comparadas com a eficiência do modelo global. O desempenho dos modelos escolhidos foi avaliado através do erro padrão relativo de previsão (RSEP).

O erro sistemático (“*bias*”) foi calculado para as amostras do conjunto de previsão e avaliado sua significância através do teste t. A determinação da significância do erro sistemático foi também aplicada, de maneira independente, para o subconjunto de amostras comerciais, presentes no conjunto de previsão. Este procedimento teve por objetivo avaliar a capacidade do modelo desenvolvido em fazer a previsão destas amostras, já que as mesmas possuem uma matriz mais complexa (excipientes variados) quando comparadas com as amostras sintéticas, o que poderia ocasionar tendência⁷⁷.

A repetibilidade dos métodos propostos foi avaliada através do cálculo da precisão²⁹, para 3 concentrações diferentes de amostras sintéticas (3 replicatas).

4.7.4 Comparação entre os modelos de calibração através de testes de significância

O teste F (95% de confiança) foi aplicado para avaliar a diferença entre os modelos desenvolvidos para cada técnica separadamente (ATR-FTIR e DRIFTS), com o objetivo de selecionar, entre os que apresentavam erros de previsão sem diferença significativa, àquele(s) que apresentava(m) menor RMSEP.

Em uma segunda etapa, o teste F (95% de confiança) foi aplicado para comparar os erros obtidos entre os modelos escolhidos, com o objetivo de avaliar se havia diferença entre as duas metodologias propostas.

Os resultados obtidos para a previsão das amostras foram também avaliados em relação à concordância com a variação permitida pelos códigos oficiais. Neste estudo, foi adotada a variação permitida pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição⁵⁰, a qual estabelece que comprimidos contendo SMZ e TMP não devam apresentar teores abaixo de 93% e acima de 107% do valor nominal. O valor obtido por HPLC foi adotado como valor nominal (em razão de ser esta a informação fornecida para a construção dos modelos por PLS) e a variação para os valores obtidos por DRIFTS e por ATR-FTIR foi calculada a partir deste valor nominal.

Um teste t pareado (95% de confiança) foi aplicado com o objetivo de comparar cada metodologia proposta com o método de referência.

⁷⁷ Iturriaga, H. *et al.*, *Analyst* (2001) 1135-1141.

²⁹ Braga, J. W. B.; Poppl, R. J., *Quim. Nova*, 27 (6) (2004) 1004-1011.

⁵⁰ Farmacopéia Brasileira: parte II, quarto fascículo. 4. ed, 2003.

4.8 Fluxograma das etapas desenvolvidas

Na Figura 12 é possível observar um fluxograma com as principais etapas desenvolvidas durante o trabalho.

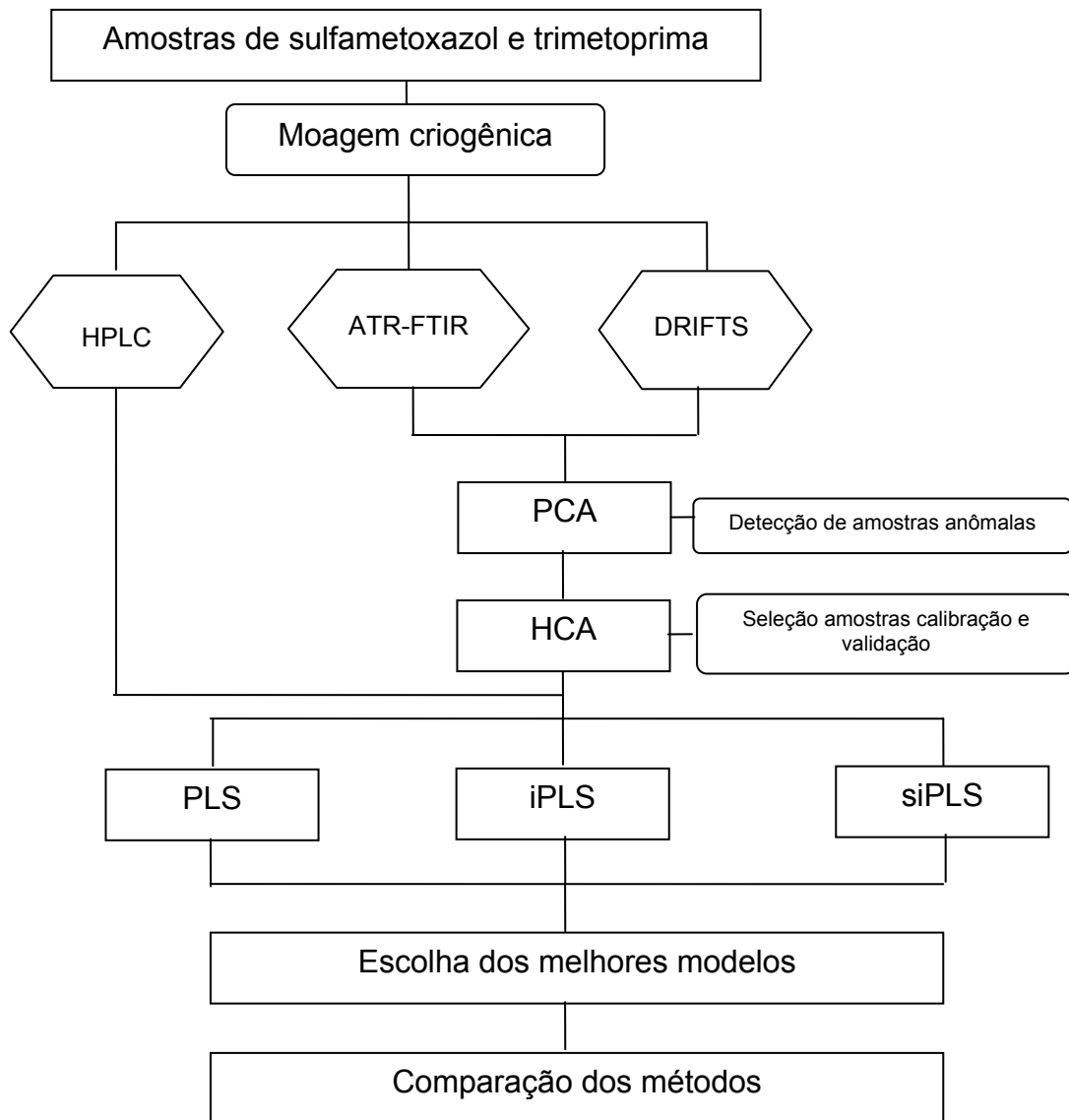


Figura 12. Fluxograma das etapas desenvolvidas na determinação de sulfametoxazol e trimetoprima por ATR-FTIR e DRIFTS.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. Principais características físico-químicas dos fármacos e associações

A Figura 13 mostra as estruturas químicas das duas substâncias utilizadas neste estudo. Estas substâncias apresentam-se disponíveis no mercado nacional em associação, como comprimidos e suspensões, contendo, além das substâncias ativas, excipientes farmacêuticos variados.

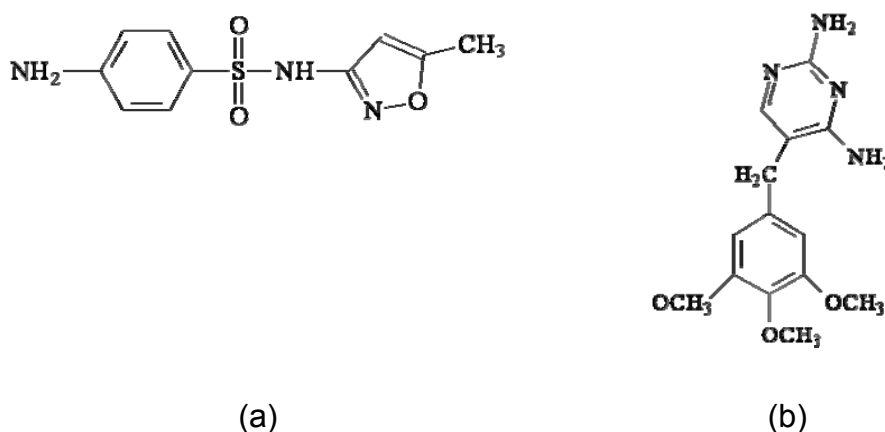


Figura 13. Fórmulas estruturais do (a) sulfametoxazol e da (b) trimetoprima¹⁰⁴.

A determinação simultânea dos fármacos em formas sólidas orais, como comprimidos, pode ser obtida através de cromatografia líquida de alta eficiência, segundo metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira. As diferentes formulações utilizadas neste estudo foram quantificadas por esta técnica, sendo que a mesma apresentou resultados satisfatórios quanto aos itens linearidade, precisão e exatidão. Entretanto, alguns pontos podem ser considerados em relação à quantificação dos fármacos por cromatografia líquida:

a) tempo de análise prolongado: em média, são necessários 30 minutos para a análise de cada formulação (em triplicata), considerando um tempo de corrida de 10 minutos e excluindo-se a etapa de construção da curva de calibração.

b) utilização de solventes orgânicos como componentes da fase móvel: considerando-se o tempo médio de 30 minutos, foi gasto um volume de 6 ml de acetonitrila, para cada análise.

¹⁰⁴ O'Neil, M. J.; Smith, A.; Heckelman, P. E.; Budavari, S.; *The Merck Index*, USA, 2001, 1151-1198.

Desta forma, metodologias analíticas que tenham como característica a rapidez devem ser consideradas em rotinas de análise de medicamentos em indústrias farmacêuticas, principalmente na área de monitoramento de processos, permitindo determinações em tempo real. Em relação ao uso de solventes orgânicos, a busca por metodologias que eliminem o uso de solventes tóxicos torna-se imprescindível, em virtude do impacto ambiental que empresas desta natureza causam, devido ao grande volume diário de resíduo tóxico produzido.

A espectroscopia no infravermelho contempla as características de rapidez e eliminação do uso de solventes orgânicos, conforme citado acima. Além disso, o uso da espectroscopia no modo de reflexão elimina a etapa de preparo, já que permite a aquisição do espectro diretamente da amostra, evitando problemas como perda de material, gasto de reagentes e aumento no tempo de análise.

Os espectros do SMZ e TMP para as duas técnicas estudadas são demonstrados nas Figuras 14 e 15.

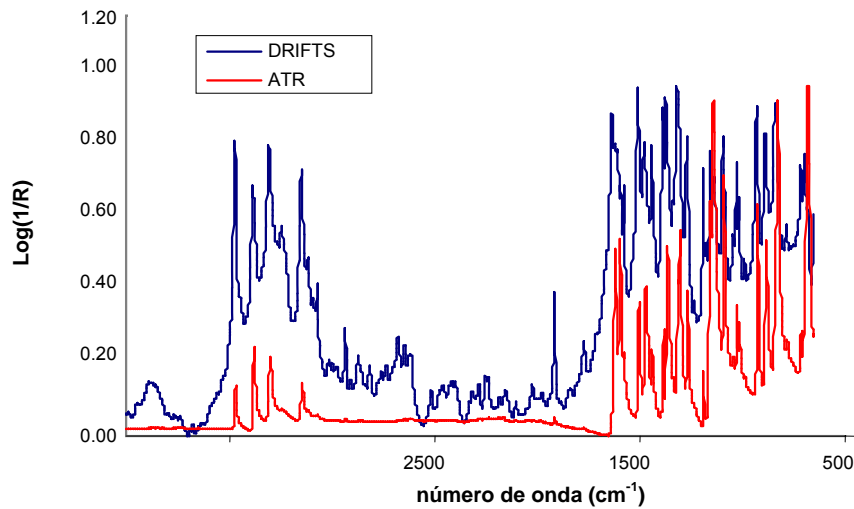


Figura 14. Espectro do sulfametoxazol por reflexão total atenuada e reflexão difusa

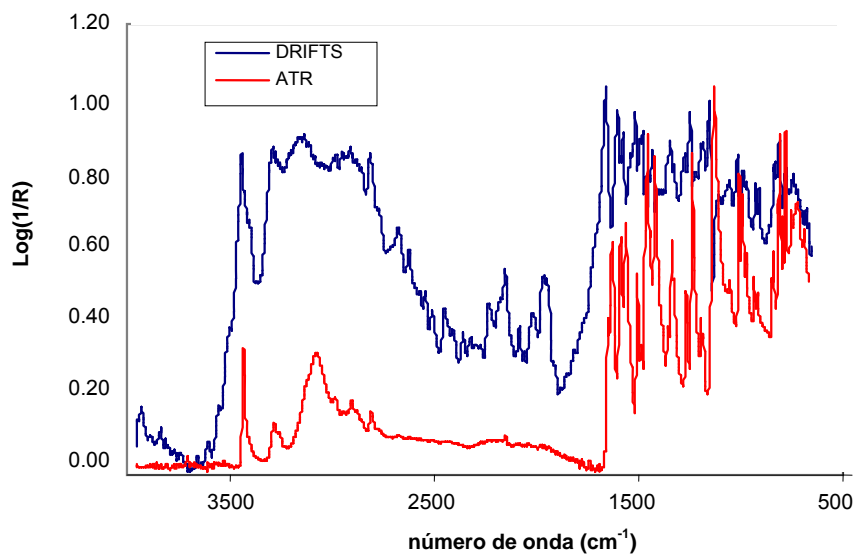


Figura 15. Espectro da trimetoprima por reflexão total atenuada e reflexão difusa

Como pode ser observado, os espectros de SMZ e TMP coletados por ATR-FTIR e DRIFTS apresentam perfis de absorção semelhantes, porém intensidades bastante diferenciadas dependendo da região espectral. Este fato pode beneficiar a utilização destas técnicas associada com métodos de seleção de variáveis, na determinação simultânea dos fármacos, já que pode evidenciar regiões capazes de prever os fármacos, mesmo em casos de sobreposição espectral.

A comparação entre as duas técnicas pode auxiliar no estudo de qual região é a mais relevante na determinação de um ou outro fármaco, ou seja, se os espectros mais intensos obtidos por DRIFTS são mais adequados para a previsão do componente em maior concentração (no caso, o SMZ) ou o inverso.

Na Tabela 7, os diferentes excipientes presentes nas formulações e declarados pelo fabricante são apresentados. A informação contida nestes excipientes pode ser útil para a construção de modelos robustos e que tenham capacidade de previsão satisfatória.

A escolha do excipiente para a manipulação das amostras sintéticas (amido e estearato de magnésio, 99+1) foi baseada na ampla utilização destas substâncias como excipientes farmacêuticos. Em virtude das formulações comerciais terem sido provenientes de diferentes indústrias farmacêuticas, com diferentes composições e, conseqüentemente, diferentes tamanhos de partícula, foi adotado um procedimento de moagem para uniformização. A variação do tamanho da partícula em amostras submetidas a procedimentos de reflexão pode causar alteração no espectro, deslocando a linha de base, comportamento que se torna mais pronunciado em comprimentos de onda de grande absorção pela amostra⁴². A uniformização do tamanho das partículas, através de processos de moagem, pode minimizar os fatores citados acima. Para as condições do programa de moagem selecionado, as partículas apresentaram tamanho $\leq 80 \mu\text{m}$ e não foram observados os efeitos de deslocamento da linha de base e ruído.

⁴² Cordeiro, G. A., Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2006.

Tabela 7. Excipientes das formulações de comprimidos contendo sulfametoxazol e trimetoprima.

Amostra comercial	Excipientes
A	Diocilssulfosuccinato de sódio, estearato de magnésio, povidona, amido carboximetilsódico.
B	metilcelulose, amidoglicolato de sódio, estearato de magnésio.
C	Amido de milho, estearato de magnésio, croscarmelose sódica, laurilsulfato de sódio, manitol.
D	Não informado pelo fabricante
E	Amido, manitol, dióxido de titânio, explosol, celulose microcristalizada, estearato de magnésio.
F	Não informado pelo fabricante.
G	Amido, laurilétersulfato de sódio, croscarmelose sódica, estearato de magnésio.
H	Não informado pelo fabricante.
I	Amido, laurilétersulfato de sódio, croscarmelose sódica, estearato de magnésio.

A seguir, serão apresentados todos os critérios para exclusão de amostras anômalas, definição das amostras para composição do conjunto de calibração e previsão, bem como os parâmetros avaliados para o desenvolvimento dos modelos de calibração na determinação de SMZ e TMP em amostras sintéticas e comerciais contendo os fármacos, utilizando os algoritmos iPLS e siPLS.

5.2 Detecção de amostras anômalas - Análise por componentes principais

A matriz de dados (variáveis X e Y) foi, inicialmente, tratada no aplicativo Pirouette[®] 3.11 da Infometrix, para a detecção de amostras anômalas e para a definição das amostras dos conjuntos de calibração e previsão. A PCA foi aplicada ao conjunto de dados, a fim de identificar as amostras anômalas de misturas contendo SMZ e TMP, com o objetivo de eliminar qualquer influência negativa nos modelos de calibração. Nesta análise foram utilizadas as regiões espectrais compreendidas entre 650 a 4000 cm⁻¹, sendo os dados autoescalados.

Na Tabela 8, é apresentada a variância dos dados atribuídos a cada componente principal (CP) utilizada, bem como a variância acumulada.

Tabela 8. Variância e variância acumulada em função do número de componentes principais utilizadas.

Número de CPs	Variância (%)	Variância acumulada (%)
1	55,52	55,52
2	25,24	80,76
3	6,56	87,32
4	4,50	91,82
5	2,32	94,14
6	1,42	95,56
7	0,67	96,23
8	0,44	96,67
9	0,31	96,98
10	0,25	97,23

Com base na Tabela 8, é possível verificar que 5 CPs são suficientes para descrever a maior parte da informação presente no conjunto de dados. Assim, baseado nas 5 CPs selecionadas, as amostras anômalas presentes foram detectadas através da análise do gráfico que relaciona os resíduos de Student vs. a distância de Mahalanobis¹¹⁷. Amostras com alto resíduo foram excluídas do conjunto, em função da diferença apresentada em relação às demais, a exemplo das 3 amostras salientadas com um círculo externo, na Figura 16.

¹¹⁷ Pirouette, *Multivariate Data Analysis*, versão 3.11, Infometrix.

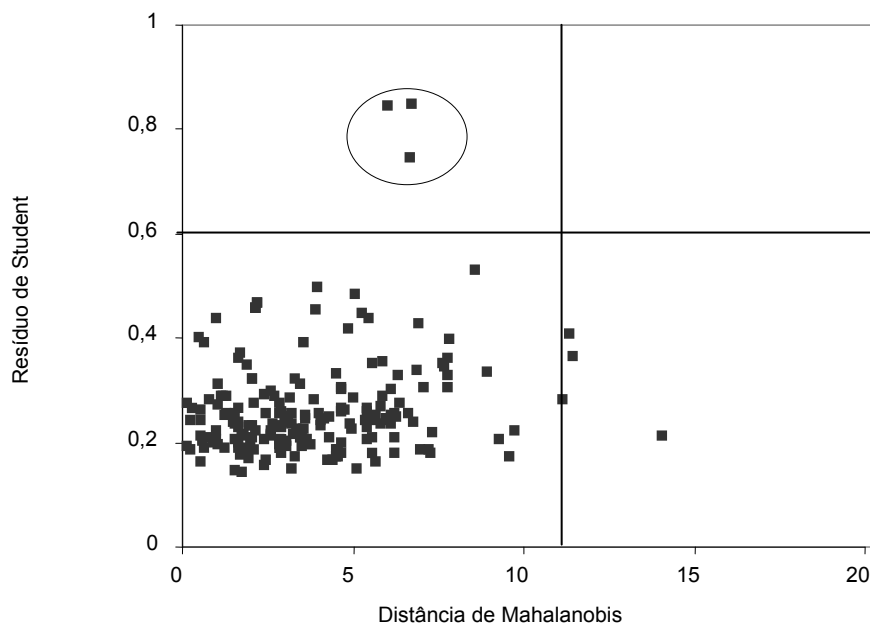


Figura 16. Gráfico de diagnóstico de amostras anômalas.

Após a exclusão das amostras anômalas presentes no conjunto de dados, selecionaram-se as amostras que constituíram os conjuntos de calibração e previsão.

5.3 Seleção das amostras para conjunto de calibração e previsão

Diferentes relatos na literatura demonstram que a não inclusão da informação das variações presentes na matriz do conjunto de calibração gera modelos com baixa capacidade de previsão para amostras comerciais^{8,42,99,124,128}.

Para as amostras em estudo (amostras comerciais), a informação espectral está baseada nas substâncias ativas e nos excipientes que as compõem, diferenciando-se a partir dos diferentes fabricantes.

Testes preliminares, onde as amostras comerciais não estavam inclusas no conjunto de calibração, forneceram modelos com elevados erros de previsão e excessivo número de VL. O número elevado de VL permite construir um modelo com boa capacidade de previsão das amostras de calibração (baixo RMSEC), já que a informação especificamente relacionada ao conjunto de calibração está incluída no

⁸ Barthus, R. C.; Mazo, L. H.; Poppi, R. J., *J. Pharm. Biomed. Anal* 38 (2005) 94-99.

⁴² Cordeiro, G. A., Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2006.

⁹⁹ Navea, S.; Tauler, R.; Juan, A., *Anal. Biochem.* 336 (2005) 231-242.

¹²⁴ Rossignoli, P. S.; Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2006.

¹²⁸ Sena, M. M. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 743-749.

modelo, porém para amostras “desconhecidas” (conjunto de previsão) o erro associado é geralmente elevado³⁸.

Com o objetivo de construir conjuntos de calibração e previsão representativos, alguns procedimentos foram adotados:

1) Construção do conjunto de amostras sintéticas com excipientes considerados “universais”. Este procedimento permitiu obter informação dos excipientes amido e estearato de magnésio, amplamente utilizados em formulações farmacêuticas.

2) Aplicação do algoritmo HCA⁵¹ - A seleção das amostras dos conjuntos de calibração e previsão foi baseada no critério de similaridade entre estas, a partir da aplicação do algoritmo HCA, conforme Figura 17. Segundo Iñon *et al.* (2003)⁷⁶, a HCA associada a espectros no infravermelho aplicada na seleção das amostras do conjunto de calibração permite incluir dentro do modelo a 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.

3) Além da utilização da análise por agrupamentos hierárquicos para a etapa de seleção das amostras, que constituíram os conjuntos de calibração e previsão foi utilizada, também, a informação contida na variável referente à concentração dos fármacos nas amostras.

³⁸ Chen, Q. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 3 (2008) 568-573.

⁵¹ Feng, Y.; Hu, C., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 373-384.

⁷⁶ Iñon, F. A. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 489 (2003) 59-75.

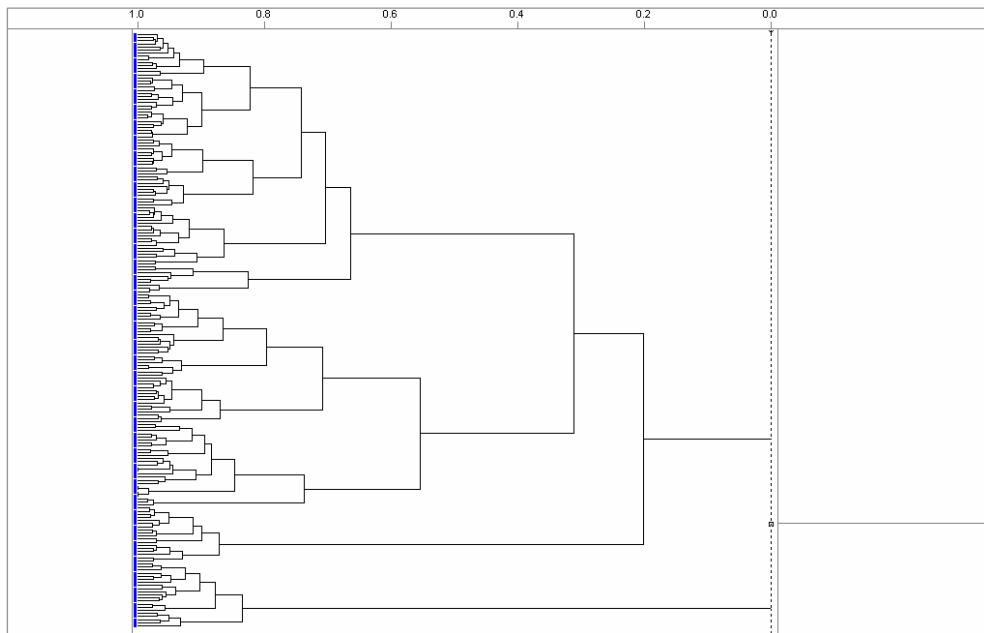


Figura 17. Dendrograma fornecido pela análise por agrupamentos hierárquicos, para a seleção das amostras dos conjuntos de calibração e previsão.

Assim, levando em consideração esses fatores, as amostras de SMZ e TMP foram distribuídas de modo a garantir que a maior variabilidade presentes nos dados esteja contemplada no conjunto de calibração³³. A distribuição da concentração das amostras de calibração e de validação para quantificação de SMZ e TMP, encontra-se representada nas Figuras 18 e 19.

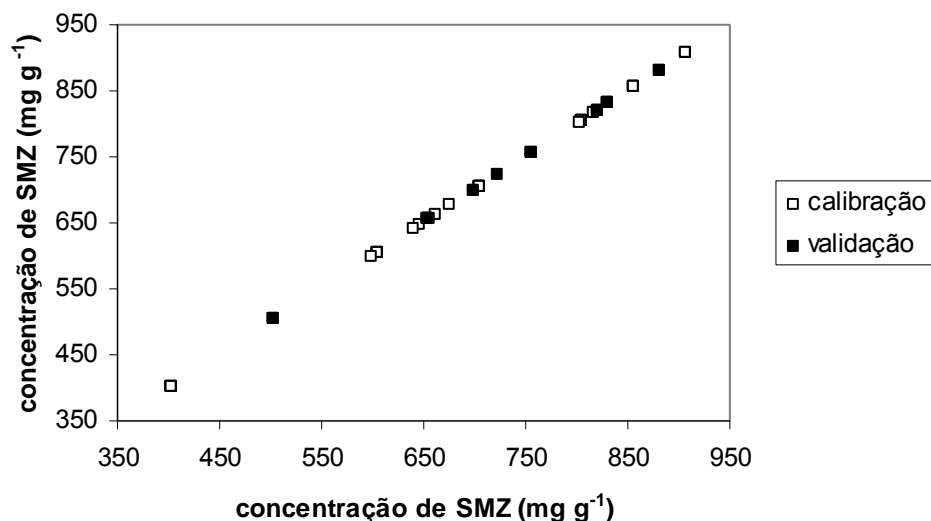


Figura 18. Distribuição das amostras de calibração e validação para quantificação de sulfametoxazol.

³³ Brereton, R. G., *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.

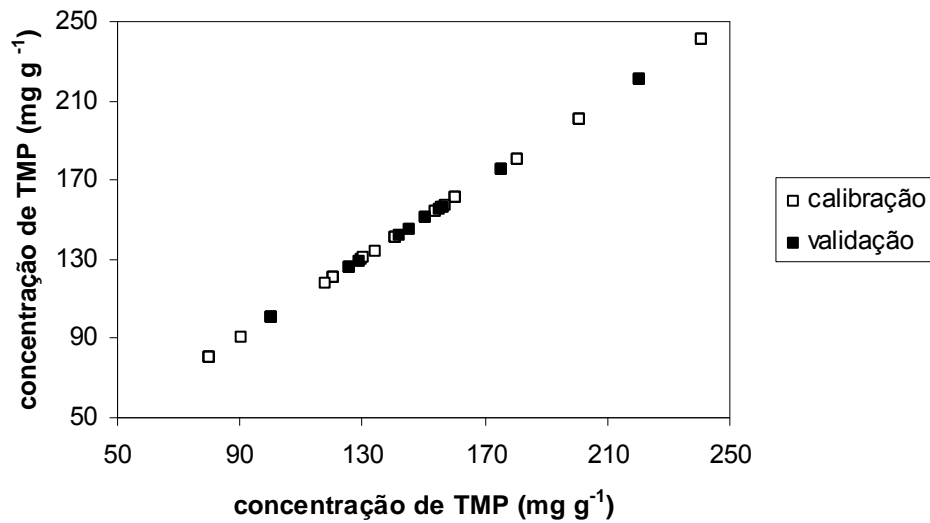


Figura 19. Distribuição das amostras de calibração e validação para quantificação de trimetoprima

Desta forma, o conjunto de calibração foi composto por 41 amostras e o conjunto de previsão por 23 amostras, dentro da faixa de concentração de 400 até 900 mg g⁻¹ para SMZ e 80 até 240 mg g⁻¹ para TMP.

5.4 Determinação do número de variáveis latentes utilizadas nos modelos

Segundo Brereton (2000)³³, erros de validação cruzada, onde uma amostra é deixada de fora e a construção do modelo de calibração é feita com as amostras restantes, são úteis na determinação do número ideal de VL. Geralmente, os valores de RMSECV atingem um mínimo, correspondente ao número ideal de VL e, em seguida, ocorre um aumento do RMSECV para cada VL adicionada ao modelo. Este aumento do RMSECV corresponde à incorporação de informação não significativa (ruído). Desta forma, o valor do RMSECV pode ser útil na determinação do número de VL ideal na construção de um modelo de regressão multivariado.

A escolha do número de VL foi baseada no menor RMSECV, o qual não apresentava diferença na ordem de grandeza do RMSECV atribuído a VL posterior. Este procedimento foi adotado com o objetivo de avaliar a dimensionalidade do modelo, devido ao fato que os valores de RMSECV podem apresentar comportamento monotônico, não atingindo um estado de “mínimo local” ou “platô”.

³³ Brereton, R. G., *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.

Como exemplo do procedimento adotado, as Figuras 20 e 21 mostram o comportamento do conjunto de dados de calibração, onde estão relacionados os valores de RMSECV atribuídos a cada VL.

Na Figura 20 é mostrado o gráfico do RMSECV *versus* o número de variáveis latentes para o modelo PLS desenvolvido com informação do espectro inteiro, na determinação de TMP. Pode-se perceber que o menor valor (“mínimo local”) de RMSECV é obtido para a 4ª e 5ª VL.

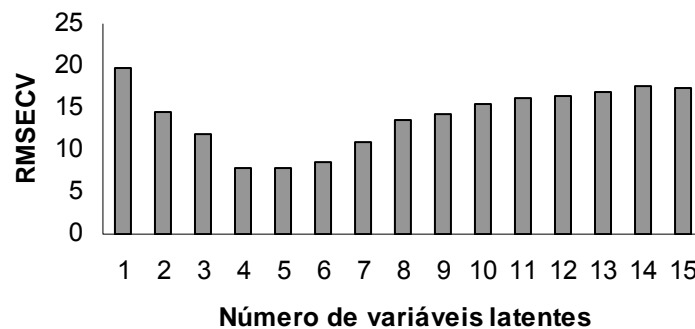


Figura 20. Número de variáveis latentes vs. RMSECV para modelo PLS – Representação do “mínimo local”.

Neste exemplo, a escolha do número de VL através da observação visual do menor valor de RMSECV é, geralmente, aceita como critério para avaliar a dimensionalidade de um modelo. Porém, em muitos casos, não existe uma queda em curva, como pode ser observado na Figura 21 para o modelo construído a partir da aplicação do algoritmo siPLS na determinação de TMP (dados coletados por DRIFTS).

Nesta situação, a decisão sobre a dimensionalidade do modelo a partir da regra do “primeiro mínimo local” ou “estado de platô” é insatisfatória do ponto de vista prático como científico⁴⁸, pois o número de VL adotado pode conter informação do ruído, gerando modelos com baixa capacidade de previsão. Este critério pode ocasionar problemas de superestimação dos modelos, conforme foi verificado nos dados estudados.

⁴⁸ Faber, N. M.; Rajkó, R., *Anal. Chim. Acta* 595 (2007) 98-106.

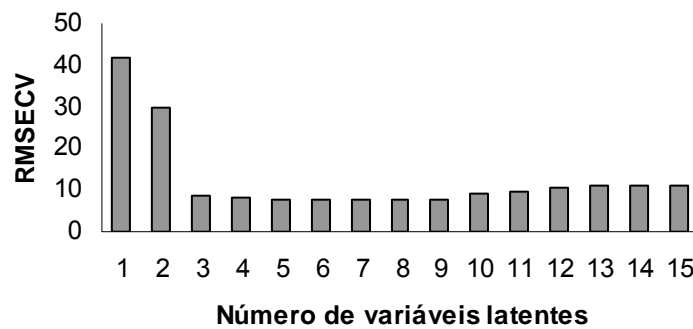


Figura 21. Número de variáveis latentes vs. RMSECV para modelo PLS – Representação do comportamento monotônico.

Para os dados da Figura 21, os algoritmos desenvolvidos por Norgaard *et al.* (2001)¹⁰² selecionam 8 VL para a construção do modelo, o qual apresenta o menor valor de RMSECV, porém na mesma ordem de grandeza que o valor de RMSECV do modelo desenvolvido somente com 3 VL.

Desta forma, foi adotado como critério para avaliar a dimensionalidade do modelo, o menor número de VL que produz um RMSECV na mesma ordem de grandeza que o sugerido pelos algoritmos de seleção de variáveis aplicados (siPLS e iPLS).

5.5 Testes preliminares e obtenção do modelo global

Inicialmente, a escolha do tratamento e do pré-processamento mais adequado para o desenvolvimento dos modelos foi avaliada através da modelagem de toda a faixa espectral (modelo global), utilizando o algoritmo dos mínimos quadrados parciais (PLS).

O tratamento de correção do espalhamento multiplicativo (MSC)⁶⁴ e os pré-processamentos autoescalado e centrado na média foram aplicados. Para facilitar a visualização dos resultados nas tabelas foi utilizada a sigla MSC, para a correção do espalhamento multiplicativo e as letras A e CM para a identificação dos pré-processamentos, autoescalado e centrado na média, respectivamente. Para a escolha do pré-processamento a ser adotado, foram construídos modelos com cada pré-processamento isoladamente e associado com o tratamento MSC, sendo comparados os valores de RMSECV, R^2_{cal} e RMSEP.

¹⁰² Norgaard, L. *et al.*, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 413-419.

⁶⁴ Geladi, P.; MacDougall, D.; Martens, H., *Appl. Spectrosc.* 39 (1985) 491-500.

Como pode ser observado na Tabela 9, para os dados onde foi aplicado o tratamento MSC, houve diminuição dos valores de RMSEP e RMSECV. A MSC visa corrigir o efeito do espalhamento de luz presente em espectros obtidos por técnicas de reflexão, devido à diferença na distribuição do tamanho das partículas, permitindo uma correção da linha de base⁶⁵. Este tratamento foi escolhido para aplicação nos modelos desenvolvidos posteriormente.

Tabela 9. Pré-processamentos e tratamentos aplicados aos dados por ATR-FTIR para sulfametoxazol.

Modelo	Pré-processamentos e tratamentos	Intervalos	VLS ^a	RMSECV SMZ (mg g ⁻¹)	R ² _{cal}	RMSEP SMZ (mg g ⁻¹)
PLS	nenhum	Todos	7	41,32	0,963	28,80
PLS	CM	Todos	4	41,15	0,963	32,61
PLS	A	Todos	4	46,93	0,952	38,97
PLS	A e MSC	Todos	6	34,75	0,978	22,29
PLS	CM e MSC	Todos	6	32,69	0,977	22,11

a) VLS: variáveis latentes

Na escolha do pré-processamento a ser adotado, foi observado que não houve diferença significativa (erros de previsão comparados através de teste F, com 95% de confiança) entre a aplicação do pré-processamento “centrado na média” e “autoescalado” para os diferentes modelos.

Os modelos posteriores foram criados utilizando o tratamento MSC e o pré-processamento autoescalado para as determinações de SMZ (devido ser esta a combinação adotada para os demais modelos criados por ATR-FTIR e DRIFTS, conforme dados descritos a seguir). Na Tabela 10 é possível observar os resultados obtidos para os diferentes pré-processamentos e tratamentos aplicados aos dados espectrais da TMP.

⁶⁵ Gemperline, P., *Practical guide to chemometrics*, New York, 2006, 140-145.

Tabela 10. Pré-processamentos e tratamentos aplicados aos dados ATR-FTIR para trimetoprima

Modelo	Pré-processamentos e tratamentos	Intervalos	VLs ^a	RMSECV TMP (mg g ⁻¹)	R ² _{cal}	RMSEP TMP (mg g ⁻¹)
PLS	nenhum	Todos	5	15,60	0,933	8,03
PLS	CM	Todos	5	15,47	0,935	8,09
PLS	A	Todos	5	14,90	0,938	7,55
PLS	A e MSC	Todos	4	13,51	0,938	7,86
PLS	CM e MSC	Todos	2	16,04	0,928	9,72

a) VLs: variáveis latentes

Como já observado para os dados referentes ao SMZ, não houve diferença significativa (erros de previsão comparados através de teste F, com 95% de confiança) para os modelos estudados. Desta forma, foi escolhido o tratamento MSC e o pré-processamento autoescalado, para confecção dos modelos posteriores, pois apresentou melhores resultados (menores valores de RMSECV e RMSEP).

O pré-processamento autoescalado e o tratamento MSC foram também adotados para os modelos desenvolvidos por DRIFTS, pois apresentaram melhores resultados, porém sem diferença significativa (erros de previsão comparados através de teste F, com 95% de confiança).

5.6 Determinação de sulfametoxazol por ATR-FTIR

A determinação de SMZ na mistura foi realizada a partir da aplicação do algoritmo PLS. A aplicação de métodos de seleção de variáveis (como iPLS e siPLS) permitiu a seleção de regiões do espectro com informação relevante e menores erros associados.

O algoritmo iPLS tem como princípio dividir o espectro em regiões equidistantes e desenvolver modelos para cada subintervalo. Já o algoritmo siPLS, divide o espectro em intervalos e calcula todas as possíveis combinações de dois, três ou mais intervalos na construção dos modelos. Após, o RMSECV de cada modelo é comparado ao RMSECV do modelo com a informação do espectro inteiro. O algoritmo siPLS foi aplicado com o objetivo de verificar se a combinação de mais que um intervalo poderia resultar em modelos com maior capacidade preditiva.

Neste estudo, foram combinados até 5 intervalos para os espectros divididos em 10 intervalos e até 3 intervalos para os espectros divididos em 25 e 50 intervalos.

Na Figura 22 é mostrado o gráfico fornecido pela rotina iPLS¹⁰², após divisão do espectro em 25 intervalos. A linha tracejada corresponde ao valor do RMSECV para o modelo contendo as informações do espectro inteiro, as barras correspondem ao RMSECV dos intervalos e o número na base da barra corresponde ao número de variáveis latentes utilizadas para construir o modelo.

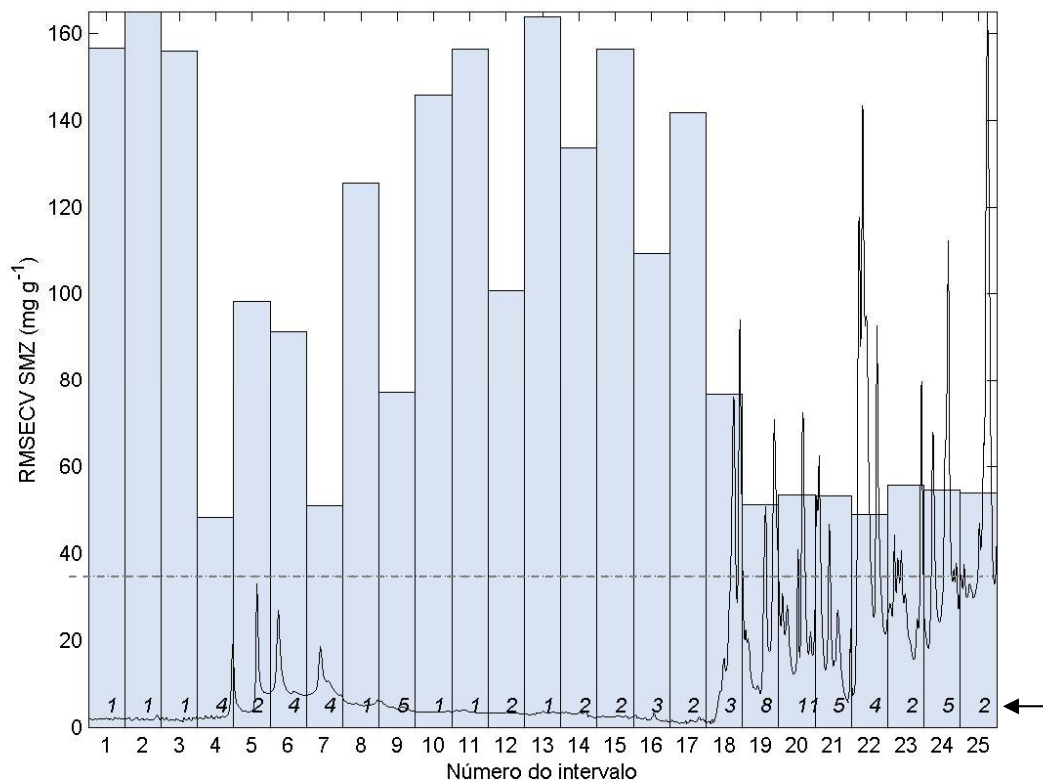


Figura 22. Valores de RMSECV para o modelo global (linha tracejada) e para os intervalos (barras) na determinação de sulfametoxazol por ATR-FTIR. Os números indicados pela seta correspondem às VL para cada intervalo.

Com o objetivo de avaliar o resultado da aplicação dos algoritmos de seleção de variáveis utilizados neste conjunto de dados bem como compará-los, foi construído um modelo utilizando toda a região espectral. O modelo envolvendo as informações do espectro inteiro, denominado “modelo global”, foi obtido com 6 variáveis latentes para SMZ (Tabela 11).

¹⁰² Norgaard, L. *et al.*, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 413-419.

Tabela 11. Parâmetros dos modelos iPLS para sulfametoxazol utilizando ATR-FTIR

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLS ^b	RMSECV	R ² _{cal}	RMSEP
				SMZ (mg g ⁻¹)		SMZ (mg g ⁻¹)
PLS	3351	todos	6	34,75	0,978	22,29
iPLS10	335	10	3	40,15	0,947	35,49
iPLS25	134	22	4	49,05	0,932	37,12
iPLS50	66	49	6	33,20	0,976	31,24

a)TV: número total de variáveis, b) VLS: variáveis latentes

Para a determinação de SMZ por ATR-FTIR utilizando o algoritmo iPLS, foi selecionado o intervalo 10 (para divisão do espectro em 10 intervalos), o qual corresponde à região entre 650 e 985 cm⁻¹. Para a divisão do espectro em 25 intervalos foi selecionada a região entre 1055 e 1189 cm⁻¹ (intervalo 22) e para a divisão em 50 intervalos foi selecionada a região entre 718 e 784 cm⁻¹ (intervalo 49). Os intervalos selecionados compreendem às seguintes regiões do espectro (650 a 1189 cm⁻¹):

- região onde os compostos aromáticos produzem bandas intensas, originadas por deformações angulares fora do plano de C-H e dos anéis, que podem ser correlacionadas com o modo de substituição do anel aromático (intervalo 10)^{7,41}.
- região de deformação angular simétrica fora do plano do grupo N-H (intervalo 22)^{7,41}.
- região de deformação axial simétrica e assimétrica do grupo SO₂ (intervalo 49)^{7,41}.

O erro de previsão do modelo global PLS é significativamente diferente dos erros de previsão dos modelos onde foi aplicado o algoritmo iPLS (teste F, 95% de confiança).

O modelo que apresentou menor RMSEP foi aquele que utilizou a informação do espectro inteiro, mostrando que na aplicação do método de seleção de variáveis por intervalos para este conjunto de dados, não houve diminuição no erro de previsão, até o limite de divisão do espectro em 50 intervalos. Segundo Pataca (2007)¹¹², a informação relevante pode estar distribuída por toda a faixa espectral e

⁷ Barbosa, L. C. A.; Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos, 2007, 25-43.

⁴¹ Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E.; *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, London, 1990, 56-79.

¹¹² Pataca, L. M. *et al.*, *Talanta* 71 (2007) 1926-1931.

a seleção de uma única região poderia reduzir a informação necessária para a construção do modelo, o que pode produzir um aumento do RMSEP.

A Tabela 12 mostra os parâmetros dos modelos siPLS para SMZ. Todos os modelos que utilizaram o espectro dividido em 25 e 50 intervalos mostraram menores valores de RMSEP que o modelo utilizando informação do espectro inteiro.

Tabela 12. Parâmetros dos modelos siPLS para sulfametoxazol utilizando ATR-FTIR

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLS ^b	RMSECV SMZ (mg g ⁻¹)	R ² _{cal}	RMSEP SMZ (mg g ⁻¹)
PLS	3351	todos	6	34,75	0,978	22,29
siPLS10	670	1 e 10	6	30,05	0,981	22,06
siPLS10	1005	1, 2 e 3	7	26,32	0,988	26,42
siPLS10	1340	1, 2, 3 e 4	8	23,34	0,991	23,46
siPLS10	1675	1, 2, 3, 4 e 5	9	24,46	0,992	22,86
siPLS25	270	9 e 23	9	21,52	0,996	13,18
siPLS25	405	6, 9 e 23	8	23,35	0,995	16,25
siPLS50	136	39 e 49	6	19,52	0,993	18,09
siPLS50	204	11, 23 e 49	7	15,75	0,995	19,28

a) TV: número total de variáveis, b) VLS: variáveis latentes

Com base nos valores de RMSEP, os modelos foram comparados utilizando-se o teste F (limite de confiança de 95%). Os 3 modelos que apresentaram menor RMSEP [siPLS25 (2 intervalos), siPLS25 (3 intervalos) e siPLS50 (2 intervalos)] possuem erros de previsão sem diferença significativa, sendo considerados equivalentes. Entre estes 3 modelos, foi selecionado para discussão mais aprofundada aquele que apresentou menor RMSEP. O modelo escolhido foi aquele onde o espectro foi dividido em 25 intervalos e selecionada a combinação do intervalo 9 e 23. Este modelo mostrou boa correlação entre os valores de referência e os valores preditos.

Os intervalos selecionados incluem as regiões entre 2794 a 2928 cm⁻¹ (intervalo 9) e 920 a 1054 cm⁻¹ (intervalo 23), as quais correspondem à vibrações de estiramento CH₃ e S-N, respectivamente^{7,41}. Estes grupamentos fazem parte da

⁷ Barbosa, L. C. A.; Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos, 2007, 25-43.

⁴¹ Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E.; *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, London, 1990, 56-79.

estrutura química do sulfametoxazol. De uma forma geral, a divisão do espectro em 25 intervalos e a combinação dos intervalos 9 e 23 reduziu os valores de RMSECV e RMSEP, possibilitando a seleção de uma região para a determinação do fármaco com baixo erro de predição e reduzido número de variáveis (270 variáveis comparada às 3351 variáveis usadas no modelo utilizando informação do espectro inteiro). A Figura 23 mostra os valores de referência vs. os valores previstos para o modelo selecionado.

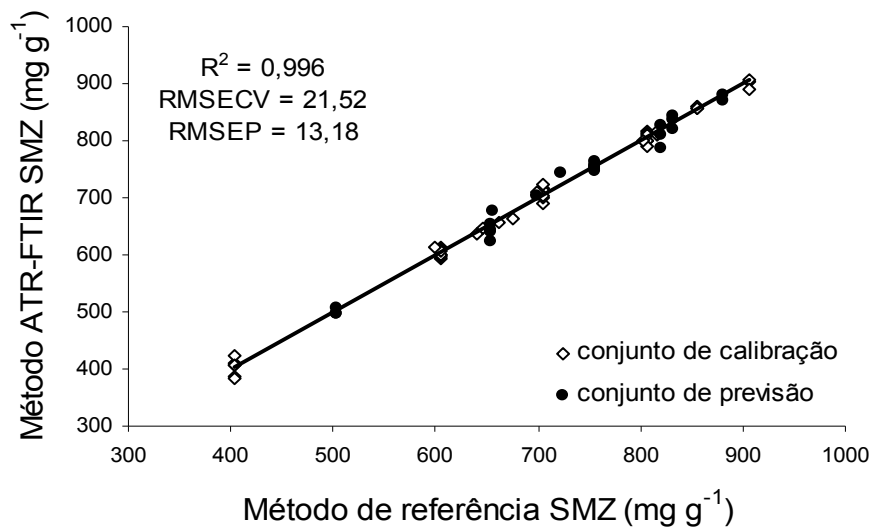


Figura 23. Valores de referência vs. valores previstos do modelo siPLS para sulfametoxazol usando os intervalos 9 e 23 por ATR-FTIR.

A Figura 24 mostra o erro relativo para as 23 amostras do conjunto de previsão.

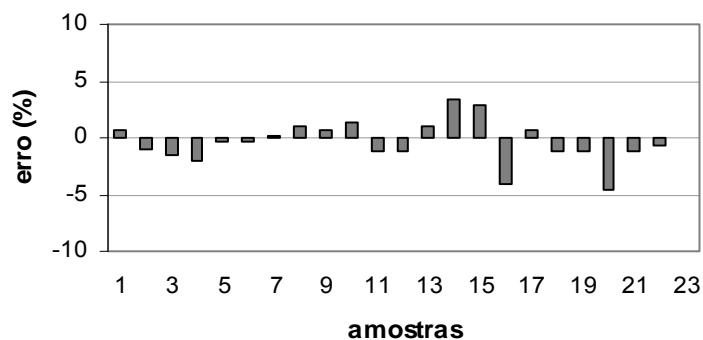


Figura 24. Erro relativo para as 23 amostras do conjunto de previsão na determinação de sulfametoxazol por siPLS.

O modelo selecionado apresentou baixo erro médio relativo de previsão (RSEP = 1,79%), sugerindo que a metodologia utilizada apresenta boa exatidão.

O erro sistemático incluso no modelo foi insignificante ($\text{bias} = 2,75$ e $t_{\text{sist}} < t_{\text{crit}}$), mostrando que os erros de previsão não apresentam tendência.

Para o subconjunto de amostras comerciais (13 a 18), não foi observada tendência ($\text{bias} = -1,94$ e $t_{\text{sist}} < t_{\text{crit}}$), o que demonstra que o erro sistemático incluído no modelo por estas amostras não é considerado significativo. A capacidade do modelo desenvolvido em prever o conteúdo das amostras comerciais, mesmo na presença de excipientes variados, conforme Figura 25, somado às regiões espectrais escolhidas, indica uma possível seleção da informação contida na estrutura química do fármaco, e não somente informação dos excipientes.

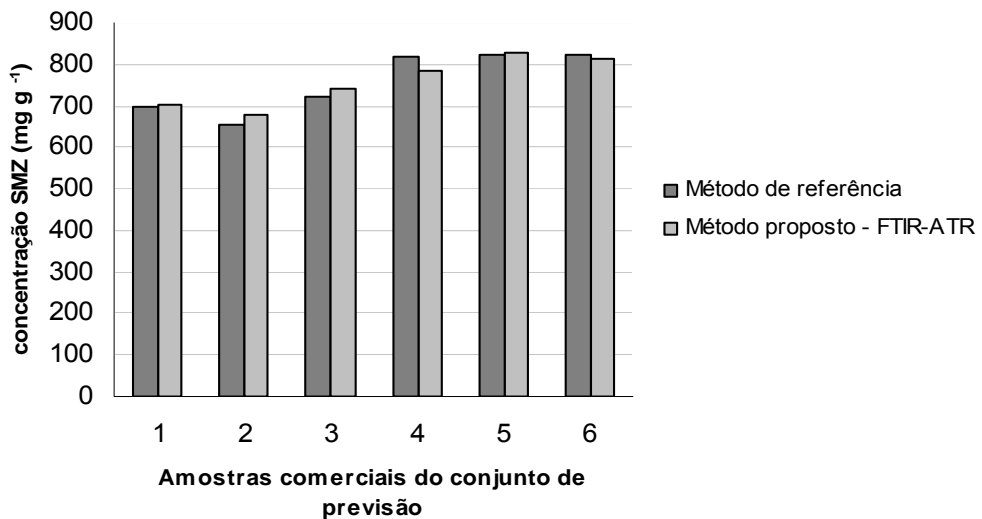


Figura 25. Histograma da diferença entre o valor da concentração pelo método de referência e o valor previsto obtido pelo modelo siPLS para 6 amostras comerciais na determinação de sulfametoxazol.

5.7 Determinação de trimetoprima por ATR-FTIR

A determinação de TMP na mistura foi realizada a partir da aplicação do algoritmo PLS. A aplicação de métodos de seleção de variáveis (como iPLS e siPLS) permitiu a seleção de regiões do espectro com informação relevante e menores erros associados.

Neste estudo, foram aplicados os algoritmos iPLS e siPLS como métodos de seleção de variáveis. Para os modelos criados a partir da aplicação do algoritmo siPLS, foram combinados até 5 intervalos para os espectros divididos em 10 intervalos e até 3 intervalos para os espectros divididos em 25 e 50 intervalos.

Na Figura 26 é mostrado o gráfico fornecido pela rotina iPLS¹⁰², após divisão do espectro em 25 intervalos.

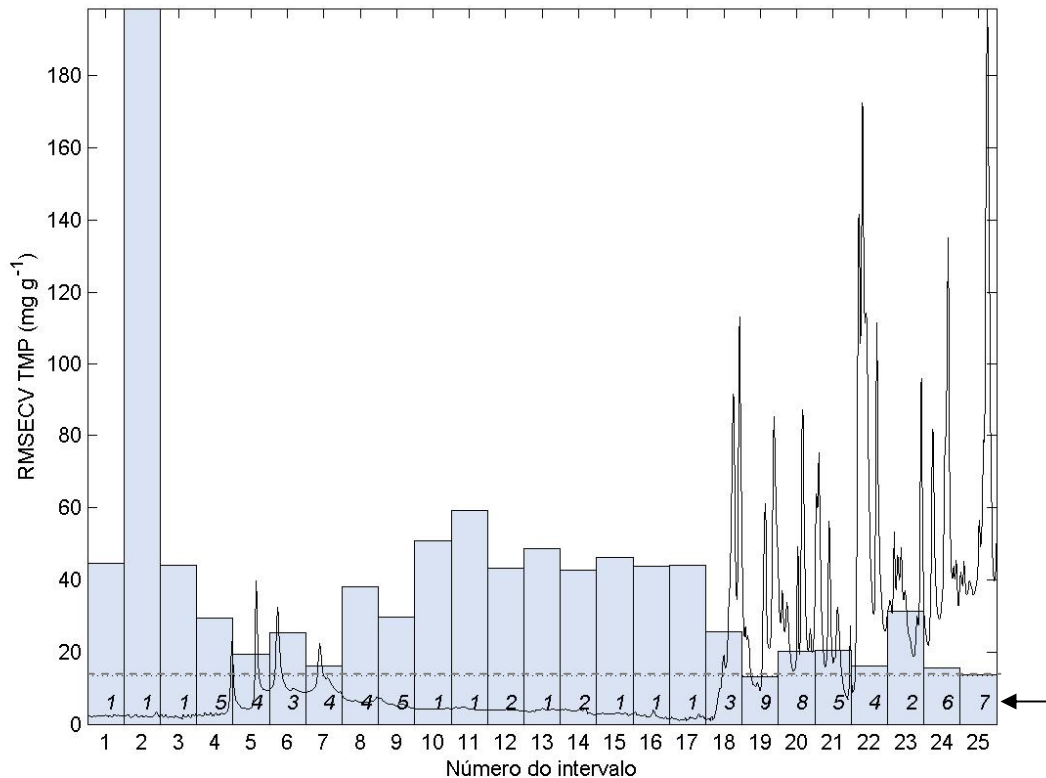


Figura 26. Valores de RMSECV para o modelo global (linha tracejada) e para os intervalos (barras) na determinação de trimetoprima por ATR-FTIR. Os números indicados pela seta correspondem às VL para cada intervalo.

Da mesma forma que o procedimento adotado para a determinação de SMZ, inicialmente foi construído um modelo utilizando as informações do espectro inteiro. Este procedimento teve por objetivo avaliar o resultado da aplicação dos algoritmos de seleção de variáveis bem como compará-los. O critério para determinar o número de VL foi baseado no menor número a partir do qual não foi verificada diferença entre os erros (RMSECV).

O melhor modelo envolvendo o espectro inteiro (modelo global), foi obtido com 4 variáveis latentes (Tabela 13).

¹⁰² Norgaard, L. *et al.*, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 413-419.

Tabela 13. Parâmetros dos modelos iPLS para trimetoprima utilizando ATR-FTIR

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLs ^b	RMSECV	R ² _{cal}	RMSEP
				TMP (mg g ⁻¹)		TMP (mg g ⁻¹)
PLS	3351	Todos	4	13,51	0,938	7,86
iPLS10	335	3	3	14,60	0,912	10,82
iPLS25	134	19	9	13,08	0,953	15,84
iPLS50	66	49	5	17,40	0,936	10,82

a) TV: número total de variáveis, b) VLs: variáveis latentes

Para a determinação de TMP por ATR-FTIR utilizando o algoritmo iPLS, foi selecionado o intervalo 3 (para divisão do espectro em 10 intervalos), o qual corresponde à região entre 2995 e 3329 cm⁻¹. Para a divisão do espectro em 25 intervalos foi selecionada a região entre 1461 e 1595 cm⁻¹ (intervalo 19) e para a divisão em 50 intervalos foi selecionada a região entre 718 e 784 cm⁻¹ (intervalo 49). Os intervalos selecionados compreendem às seguintes regiões do espectro:

- região de deformação angular simétrica fora do plano do grupo N-H (intervalo 49)^{7,41}.
- vibrações de deformação axial C=C e C=N do anel (bandas do esqueleto) (intervalo 19)^{7,41}.
- região de deformação axial C-H de compostos aromáticos (intervalo 3)^{7,41}.

Todos os intervalos selecionados correspondem a regiões do espectro onde a TMP apresenta absorção no IR.

O modelo desenvolvido utilizando o intervalo 19 para o espectro dividido em 25 intervalos produziu o menor RMSECV (quando comparado aos outros 24 intervalos), porém este modelo não apresentou valor de RMSEP equivalente ao modelo utilizando informação do espectro inteiro. Este fato pode ser atribuído à informação limitada gerada pela seleção de uma região específica, o que resultou em erros de previsão superiores aos produzidos por modelos com maior número de variáveis. A Tabela 14 mostra os parâmetros dos modelos siPLS para TMP.

⁷ Barbosa, L. C. A.; Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos, 2007, 25-43.

⁴¹ Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E.; *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, London, 1990, 56-79.

Tabela 14. Parâmetros dos modelos siPLS para trimetoprima utilizando ATR-FTIR

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLS ^b	RMSECV TMP (mg g ⁻¹)	R ² _{cal}	RMSEP TMP (mg g ⁻¹)
PLS	3351	todos	4	13,51	0,938	7,86
siPLS10	670	2 e 10	7	12,51	0,961	6,80
siPLS10	1005	3,7 e 9	4	12,68	0,938	8,2
siPLS10	1340	1, 2, 3 e 10	4	12,40	0,943	9,07
siPLS10	1675	1, 2, 3, 9 e 10	4	12,24	0,943	7,83
siPLS25	270	14 e 25	11	10,01	0,994	9,47
siPLS25	405	7, 19 e 23	9	9,25	0,985	8,28
siPLS50	136	34 e 49	4	8,75	0,975	7,08
siPLS50	204	14, 39 e 49	6	8,17	0,983	6,03

a) TV: número total de variáveis, b) VLS: variáveis latentes

Com base nos valores de RMSEP, os modelos foram comparados utilizando-se o teste F (limite de confiança de 95%). De maneira geral, os modelos onde foi aplicado o algoritmo siPLS apresentaram erros de previsão sem diferença significativa, destacando-se o modelo siPLS50 (3 intervalos). Em relação a este modelo, outros 7 modelos (incluindo aquele onde foi utilizada informação do espectro inteiro) apresentaram erros de previsão sem diferença significativa, sendo considerados equivalentes.

Os valores de RMSECV superiores aos valores de RMSEP para a maioria dos modelos construídos a partir da divisão do espectro em 10 intervalos, podem ser atribuídos ao fato de que na construção do erro médio por validação cruzada, uma amostra é retirada de cada vez, sendo o modelo construído com as amostras restantes. Desta forma, a retirada desta amostra poderia ocasionar perda da informação da matriz, o que acarretaria em valores de RMSECV superiores aos valores de RMSEP.

Segundo Faber & Rajkó (2007)⁴⁸, o uso de validação cruzada em dados planejados pode afetar negativamente o modelo, já que cada ponto tem um grande impacto sobre o modelo e a incerteza de predição é relativamente pequena para estes pontos. Desta forma, o modelo construído para previsão dos pontos

⁴⁸ Faber, N. M.; Rajkó, R., *Anal. Chim. Acta* 595 (2007) 98-106.

remanescentes em dados planejados, pode ser muito diferente do modelo global, já que este pode gerar um grande resíduo de predição para as amostras deixadas de fora. Embora o autor não faça referência à informação da matriz, e sim a dados planejados, o mesmo raciocínio pode ser aplicado para o entendimento da diferença observada entre os valores de RMSECV e RMSEP, nos dados estudados. Quando da seleção do conjunto de calibração, as amostras comerciais que deveriam compor este conjunto foram selecionadas de tal forma (através do HCA) que garantissem que toda a variação dos excipientes estivesse contemplada pelas amostras de calibração. Isto é ratificado pelos resultados de RMSEP, pois, ao prever as amostras comerciais externas, não se verificou grande erro se comparada com as amostras sintéticas. Por outro lado, no procedimento de validação cruzada, ao se prever cada amostra, deve-se retirá-la da calibração e, conseqüentemente, a informação adicional desta amostra não é modelada e o erro de previsão da mesma tende a ser maior, resultando em maiores valores de RMSECV.

O modelo siPLS50 (com 3 intervalos) foi selecionado para discussão mais aprofundada, pois apresentou menor RMSEP e RMSECV. Neste modelo o espectro foi dividido em 50 intervalos e combinado os intervalos 14, 39 e 49. Os resultados demonstraram boa correlação entre os valores de referência e os valores previstos, indicado por um coeficiente de correlação de 0,983, conforme Figura 27.

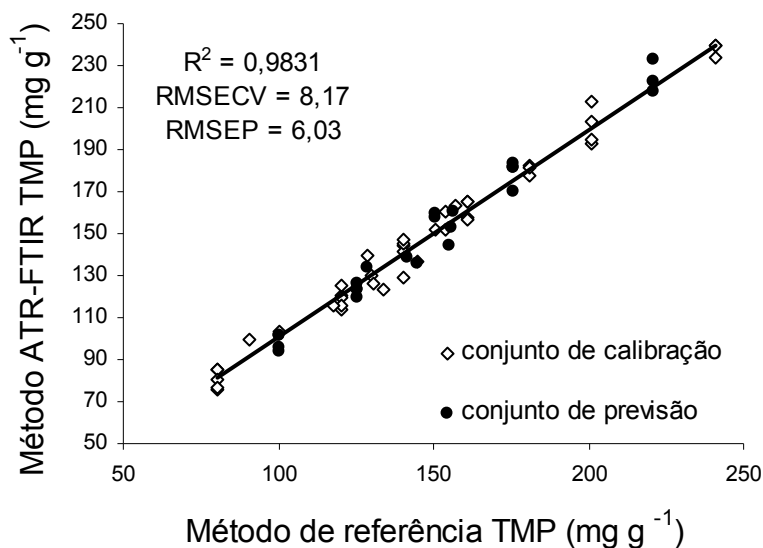


Figura 27. Valores de referência vs. valores previstos do modelo siPLS para trimetoprima usando os intervalos 14, 39 e 49 por ATR-FTIR.

Os intervalos selecionados incluem as regiões de 3064 a 3130 cm^{-1} (intervalo 14) e 1389 a 1455 cm^{-1} (intervalo 39), os quais correspondem a vibrações de estiramento =C-H, =C-C e =C-N do anel pirimidina^{7,41} presente na estrutura da TMP e, ainda, a região entre 718 e 784 cm^{-1} (intervalo 49), a qual corresponde a vibrações de deformação N-H fora do plano^{7,41}. De uma maneira geral, o algoritmo siPLS selecionou regiões semelhantes às selecionadas pelo iPLS para a determinação da TMP na mistura.

O erro sistemático incluso no modelo foi insignificante ($\text{bias} = -0,13$ e $t_{\text{sist}} < t_{\text{crit}}$) e para o subconjunto de amostras comerciais (13 a 18), não foi observada tendência ($\text{bias} = 3,01$ e $t_{\text{sist}} < t_{\text{crit}}$). Na Figura 28 é possível observar o erro relativo (%) para as 23 amostras que compõem o conjunto de previsão.

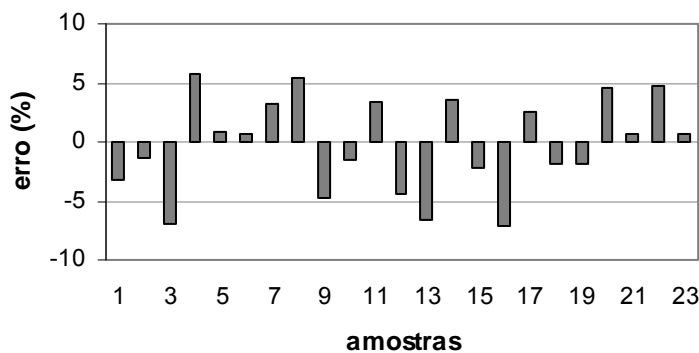


Figura 28. Erro relativo para as 23 amostras do conjunto de previsão na determinação de trimetoprima por siPLS

A capacidade do modelo desenvolvido em prever o conteúdo das amostras comerciais mesmo na presença de excipientes variados é demonstrada na Figura 29.

⁷ Barbosa, L. C. A.; Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos, 2007, 25-43.

⁴¹ Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E.; *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, London, 1990, 56-79.

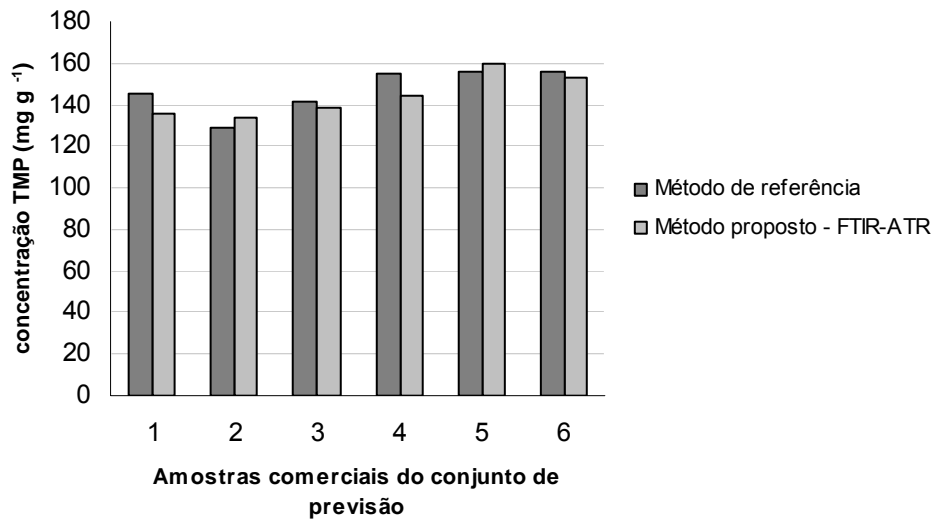


Figura 29. Histograma da diferença entre o valor médio da concentração pelo método de referência e o valor médio previsto obtido pelo modelo siPLS para 6 amostras comerciais na determinação de trimetoprima.

Como descrito no caso anterior, a informação contida no modelo escolhido indica principalmente a seleção da faixa espectral referente à estrutura química dos fármacos, e não somente da matriz de excipientes.

5.8 Determinação de sulfametoxazol por DRIFTS

A determinação de SMZ por DRIFTS na amostra foi realizada através do emprego do algoritmo PLS. Com o objetivo de selecionar regiões espectrais com menores erros associados e informação relevantes foram empregados os algoritmos iPLS e siPLS. Para os modelos iPLS, o espectro foi dividido em 10, 25 ou 50 intervalos. Para os modelos siPLS, foram combinados até 5 intervalos para os espectros divididos em 10 intervalos e até 3 intervalos para os espectros divididos em 25 e 50 intervalos. Para comparação com os modelos criados a partir dos intervalos ou da combinação destes, foi construído um modelo utilizando informação do espectro inteiro. Na Figura 30 é mostrado o gráfico fornecido pela rotina iPLS¹⁰², após divisão do espectro em 10 intervalos.

¹⁰² Norgaard, L. *et al.*, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 413-419.

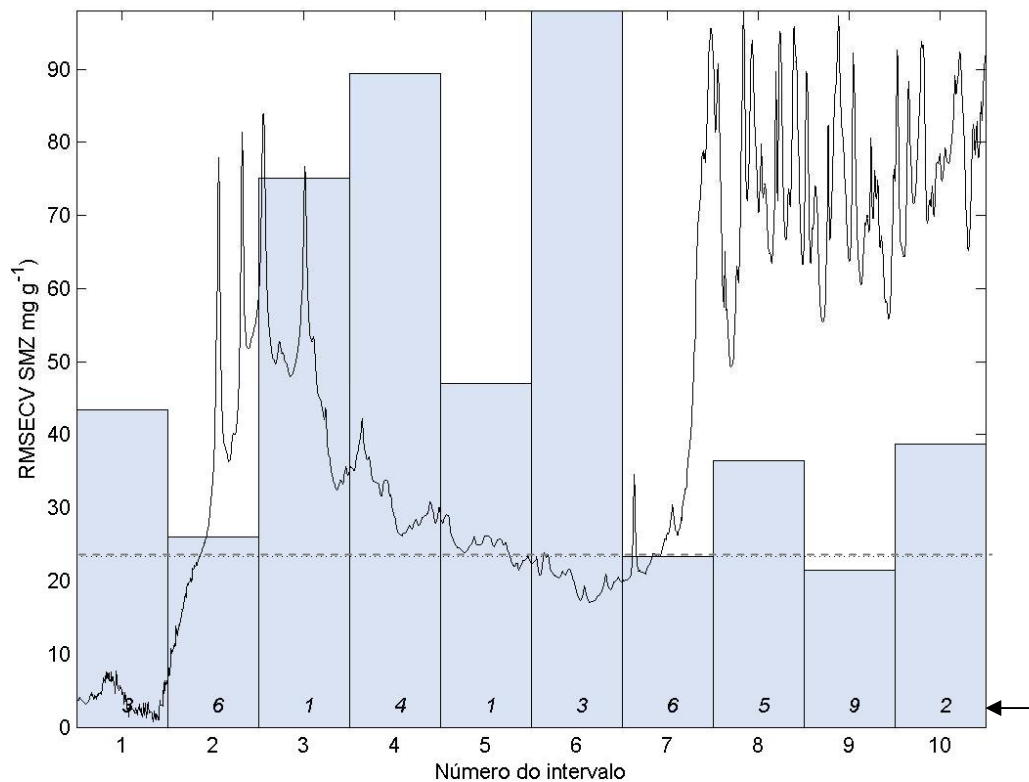


Figura 30. Valores de RMSECV para o modelo global (linha tracejada) e para os intervalos (barras) na determinação de sulfametoxazol por DRIFTS. Os números indicados pela seta correspondem às VL para cada intervalo.

O critério para determinar o número de VL foi o mesmo adotado para os dados coletados por ATR-FTIR. O modelo construído com informação do espectro inteiro foi obtido com 8 VL para SMZ (Tabela 15).

Tabela 15. Parâmetros dos modelos iPLS para sulfametoxazol utilizando DRIFTS

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLs ^b	RMSECV SMZ (mg g ⁻¹)	R ² _{cal}	RMSEP SMZ (mg g ⁻¹)
PLS	1764	todos	8	23,29	0,999	16,99
iPLS10	175	9	9	21,74	0,979	20,91
iPLS25	70	17	2	27,46	0,954	31,85
iPLS50	34	34	2	29,86	0,634	34,21

a) TV: número total de variáveis, b) VLs: variáveis latentes

Para a determinação de SMZ por DRIFTS utilizando o algoritmo iPLS, o modelo construído com o intervalo 9 (para o espectro dividido em 10 intervalos –

iPLS10) apresentou menor RMSECV, sendo o RMSEP equivalente ao modelo global. O intervalo 9 inclui a região entre 941 e 1280 cm^{-1} . Este intervalo compreende regiões onde os compostos aromáticos produzem bandas intensas (originadas por deformações angulares fora do plano de C-H e dos anéis), região de deformação angular simétrica fora do plano do grupo N-H e região de deformação axial simétrica e assimétrica do grupo SO_2 ^{7,41}. Os demais intervalos correspondem às regiões entre 1660 e 1790 cm^{-1} (intervalo 17) e 1630 e 1690 cm^{-1} (intervalo 34), relacionadas às vibrações de estiramento da ligação C=N e deformação angular da ligação NH_2 ^{7,41}.

Para o algoritmo aplicado, cabe ressaltar que a diminuição do número de VL dos modelos iPLS25 e iPLS50 em comparação ao modelo global não causou um aumento brusco no RMSECV, demonstrando a vantagem da aplicação de métodos de seleção com o objetivo de reduzir o número de variáveis totais e construir modelos utilizando número adequado de VL. Entretanto, problemas associados com superestimação podem estar presentes, o que acarreta em erros de previsão maiores que os encontrados para modelos globais. Este fato pode ser explicado pela falta de robustez de alguns modelos gerados a partir do algoritmo iPLS que, muito embora produzam erros de validação cruzada na mesma ordem que o modelo envolvendo informação do espectro inteiro, podem não possuir informação suficiente para construir modelos com baixos erros de previsão. Segundo Chen *et al.* (2008)³⁸, o algoritmo iPLS tem como objetivo selecionar uma única região com informação espectral de interesse, eliminando regiões ruidosas. Porém, se a informação de interesse estiver distribuída em mais que um intervalo ou no espectro inteiro, serão produzidos modelos com baixa capacidade de previsão. Esta limitação pode ser suprida através da aplicação de métodos de seleção que combinam intervalos, como biPLS e siPLS. O algoritmo siPLS foi então aplicado para verificar se a combinação de intervalos produziria modelos com menor RMSEP que o modelo global.

A Tabela 16 mostra os parâmetros dos modelos siPLS para SMZ.

⁷ Barbosa, L. C. A.; Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos, 2007, 25-43.

⁴¹ Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E.; *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, London, 1990, 56-79.

³⁸ Chen, Q. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 3 (2008) 568-573.

Tabela 16. Parâmetros dos modelos siPLS para sulfametoxazol utilizando DRIFTS

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLS ^b	RMSECV SMZ (mg g ⁻¹)	R ² _{cal}	RMSEP SMZ (mg g ⁻¹)
PLS	1764	todos	8	23,29	0,998	16,99
siPLS10	350	6 e 8	7	14,97	0,997	13,25
siPLS10	525	6, 7 e 10	4	15,28	0,994	13,03
siPLS10	700	3, 6, 7 e 9	10	13,79	0,999	23,43
siPLS10	875	1,5,6,8 e 9	7	15,06	0,997	13,57
siPLS25	140	15 e 20	7	13,16	0,995	27,86
siPLS25	210	15,20 e 22	6	13,75	0,996	22,88
siPLS50	70	30 e 39	5	16,32	0,971	25,43
siPLS50	105	30,34 e 47	6	12,60	0,990	17,86

a) TV: número total de variáveis, b) VLS: variáveis latentes

Também com base nos valores de RMSEP, os modelos foram comparados utilizando-se o teste F (limite de confiança de 95%). Os 5 modelos que apresentaram menor RMSEP [PLS, siPLS10 (2 intervalos), siPLS10 (3 intervalos), siPLS10 (5 intervalos) e siPLS50 (3 intervalos)] possuem erros de previsão sem diferença significativa, sendo considerados equivalentes. Entre estes modelos, foi selecionado para discussão mais aprofundada aquele que apresentou menor RMSEP. Desta forma, o melhor resultado foi obtido quando o espectro foi dividido em 10 intervalos e selecionado a combinação dos intervalos 6, 7 e 10.

Os intervalos selecionados incluem as regiões entre 1960 e 2300 cm⁻¹ (intervalo 6), 1620 e 1960 cm⁻¹ (intervalo 7) e 600 e 939 cm⁻¹ (intervalo 10). A região entre 600 e 939 cm⁻¹ corresponde a deformações angulares do H fora do plano e a região entre 1620 e 2300 cm⁻¹ inclui bandas harmônicas e de combinação das deformações angulares devido à presença do anel aromático na estrutura^{7,41}.

O modelo selecionado mostrou boa correlação entre o valor de referência e o valor previsto, conforme Figura 31.

⁷ Barbosa, L. C. A.; Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos, 2007, 25-43.

⁴¹ Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E.; *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, London, 1990, 56-79.

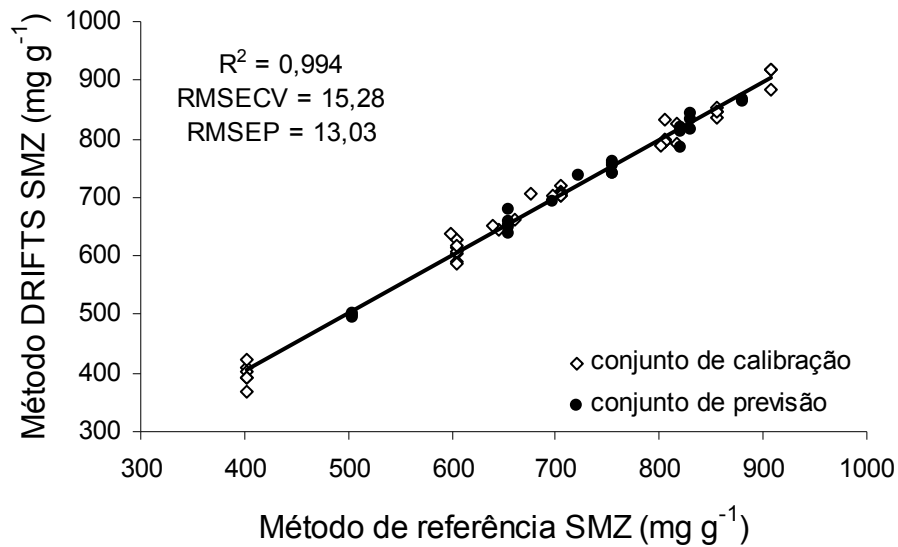


Figura 31. Valores de referência vs. valores previstos do modelo siPLS para sulfametoxazol usando os intervalos 6, 7 e 10 por DRIFTS.

Desta forma, foi possível encontrar uma região para determinação de SMZ com baixos erros de predição e reduzido número de variáveis (525 variáveis comparadas com 1764 variáveis do espectro inteiro). Além disso, foi possível explicar a variância dos dados com apenas 4 VL, ao contrário do modelo global, que necessitou de 8 VL. A Figura 32 mostra o erro relativo (%) para as 23 amostras do conjunto de previsão.

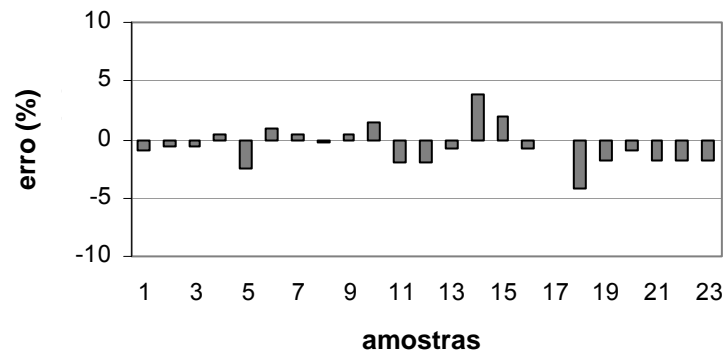


Figura 32. Erro relativo para as 23 amostras do conjunto de previsão na determinação de sulfametoxazol por siPLS.

O modelo selecionado apresentou baixo erro médio relativo de previsão (RSEP = 1,77%), sugerindo que a metodologia utilizada apresenta exatidão.

Os erros de previsão apresentaram comportamento aleatório como mostrado pelo erro sistemático insignificante do modelo ($bias = 1,77$ e $t_{sist} < t_{crit}$).

Para o subconjunto de amostras comerciais (13 a 18), não foi observada tendência ($\text{bias} = 1,29$ e $t_{\text{sist}} < t_{\text{crít}}$), o que demonstra que o erro sistemático incluído no modelo por estas amostras pode ser considerado insignificante.

A capacidade do modelo desenvolvido em prever o conteúdo das amostras mesmo na presença de excipientes variados, conforme Figura 33, somado às regiões espectrais escolhidas, indica uma possível seleção da informação contida na estrutura química dos fármacos, e não somente informação da matriz de excipientes.

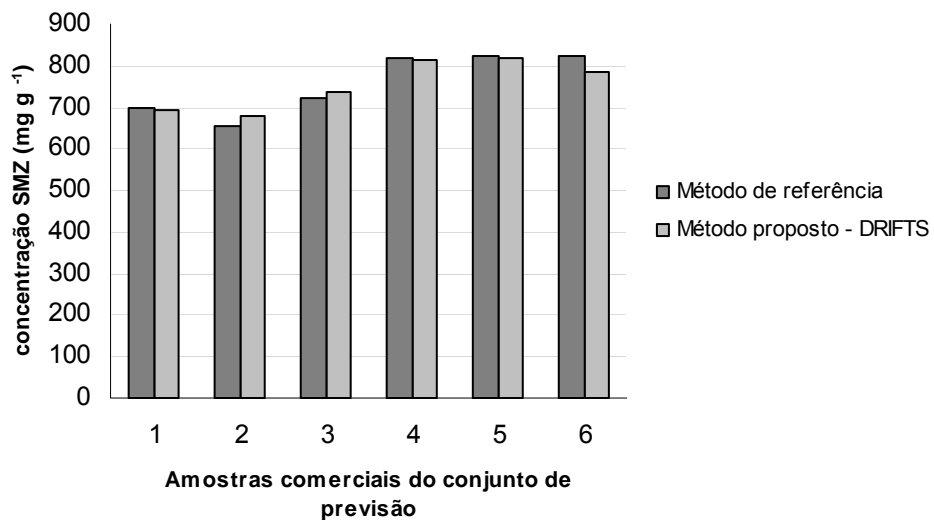


Figura 33. Histograma da diferença entre o valor médio da concentração pelo método de referência e o valor médio previsto obtido pelo modelo siPLS para 6 amostras comerciais na determinação de sulfametoxazol.

5.9 Determinação de trimetoprima por DRIFTS

Para a determinação de trimetoprima por DRIFTS foram aplicados os algoritmos PLS, iPLS e siPLS. Para os modelos criados a partir da aplicação do algoritmo siPLS, foram combinados até 5 intervalos para os espectros divididos em 10 intervalos e até 3 intervalos para os espectros divididos em 25 e 50 intervalos.

Na Figura 34 é mostrado o gráfico fornecido pela rotina iPLS¹⁰², após divisão do espectro em 25 intervalos.

¹⁰² Norgaard, L. *et al.*, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 413-419.

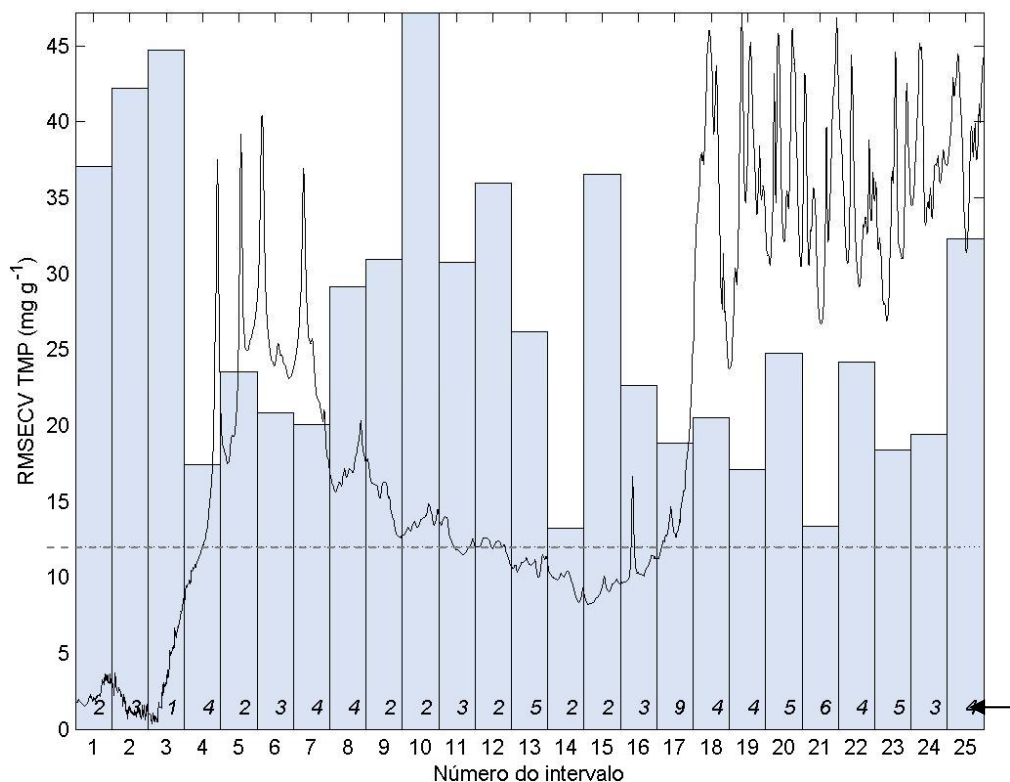


Figura 34. Valores de RMSECV para o modelo global (linha tracejada) e para os intervalos (barras) na determinação de trimetoprima por DRIFTS. Os números indicados pela seta correspondem às VL para cada intervalo.

O modelo envolvendo informação do espectro inteiro, foi obtido com 4 VL para a determinação de TMP por DRIFTS (Tabela 17).

Os modelos desenvolvidos a partir da divisão do espectro em 10 e 25 intervalos selecionaram uma região semelhante (intervalo 9 correspondente a região entre 941 e 1280 cm^{-1} e intervalo 21, correspondente à região entre 1110 e 1250 cm^{-1}), demonstrando que esta região é importante para a criação de um bom modelo para a quantificação do fármaco, pois os valores de RMSECV apresentam-se na mesma ordem de grandeza e os RMSEP equivalentes entre si.

A região selecionada (941 a 1250 cm^{-1}) corresponde a deformações axiais simétricas de C-O-C de grupamentos alquil aril éter^{7,41}, que absorvem na faixa de 1020 e 1120 cm^{-1} .

⁷ Barbosa, L. C. A.; Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos, 2007, 25-43.

⁴¹ Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E.; *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, London, 1990, 56-79.

Tabela 17. Parâmetros dos modelos iPLS para trimetoprima utilizando DRIFTS

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLs ^b	RMSECV	R ² _{cal}	RMSEP
				TMP (mg g ⁻¹)		TMP (mg g ⁻¹)
PLS	1764	todos	4	12,22	0,951	10,61
iPLS10	175	9	5	13,19	0,948	6,87
iPLS25	70	21	6	12,92	0,954	8,66
iPLS50	35	28	4	11,26	0,910	10,13

a) TV: número total de variáveis, b) VLs: variáveis latentes

O intervalo 28, selecionado após divisão do espectro em 50 intervalos corresponde à região entre 2060 e 2130 cm⁻¹, a qual inclui bandas harmônicas e de combinação do anel pirimidina, semelhantes às observadas em compostos benzênicos^{7,41}. De uma forma geral, os modelos apresentaram boa capacidade de previsão, com valores de RMSEP inferiores ao modelo criado a partir do espectro inteiro.

Da mesma forma que a aplicação anterior, o algoritmo siPLS foi utilizado com o objetivo de encontrar regiões espectrais com menores erros associados e melhor capacidade preditiva. A Tabela 18 mostra os parâmetros estatísticos dos modelos siPLS para determinação de TMP por DRIFTS.

Tabela 18. Parâmetro dos modelos siPLS para trimetoprima utilizando DRIFTS

Modelo	TV ^a	Intervalos	VLs ^b	RMSECV	R ² _{cal}	RMSEP
				TMP (mg g ⁻¹)		TMP (mg g ⁻¹)
PLS	1764	todos	4	12,22	0,951	10,61
siPLS10	350	6 e 10	6	9,495	0,982	7,04
siPLS10	525	6, 7 e 8	7	10,54	0,983	4,37
siPLS10	700	6,7, 8 e 10	7	9,89	0,988	6,40
siPLS10	875	1,4,6,7 e 8	9	8,92	0,989	9,14
siPLS25	140	15 e 17	6	7,53	0,983	4,88
siPLS25	210	15,17 e 18	7	8,41	0,986	5,38
siPLS50	70	21 e 31	7	8,71	0,974	7,76
siPLS50	105	20,30 e 31	4	7,75	0,982	8,88

a) TV: número total de variáveis, b) VLs: variáveis latentes

A aplicação do algoritmo siPLS produziu modelos com menores erros de calibração e previsão que o modelo global. Entre os modelos com menores RMSEP

⁷ Barbosa, L. C. A.; Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos, 2007, 25-43.

⁴¹ Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E.; *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, London, 1990, 56-79.

equivalentes, pode-se destacar 2 modelos: siPLS10 (3 intervalos) e siPLS25 (2 intervalos). No modelo siPLS10, com seleção dos intervalos 6,7 e 8 encontra-se o menor valor de RMSEP, demonstrando ser este um modelo adequado para a predição do fármaco. A região selecionada inclui os números de onda entre 1280 a 2300 cm^{-1} , correspondente a estiramentos C=C e C=N^{7,41}.

O segundo modelo destacado foi o siPLS25 com seleção dos intervalos 15 e 17 (com regiões entre 2100 e 2230 cm^{-1} e 1830 e 1960 cm^{-1} , respectivamente). Estas regiões correspondem a bandas harmônicas e de combinação do anel pirimidina, semelhantes às observadas em compostos benzênicos^{7,41}.

O modelo siPLS25 (2 intervalos) apresentou erros de previsão equivalentes ao modelo siPLS10 (3 intervalos) e menor número de VL, sendo escolhido para uma discussão mais aprofundada, pois apresentou menor RMSECV e menor número de variáveis totais (TV = 140), quando comparado ao modelo siPLS10 (3 intervalos e TV = 525). O modelo selecionado mostrou boa correlação entre o valor de referência e o valor predito, conforme Figura 35.

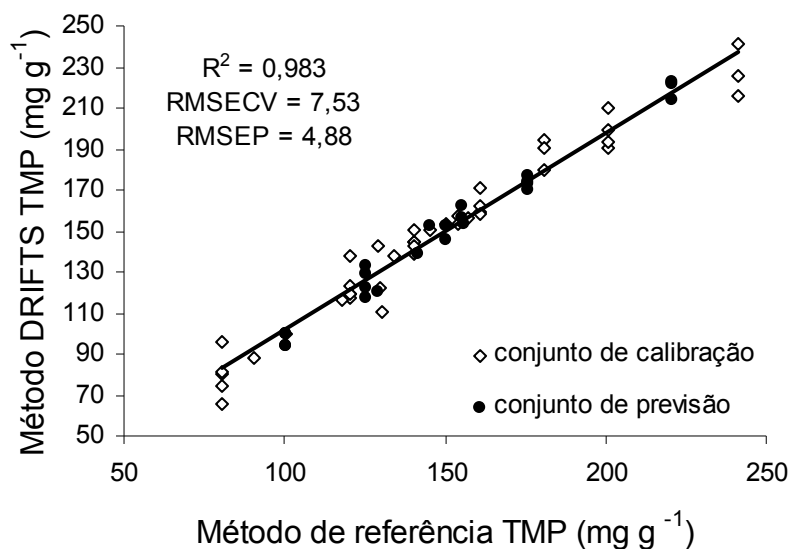


Figura 35. Valores de referência vs. valores previstos do modelo siPLS para trimetoprima usando os intervalos 15 e 17 por DRIFTS.

A Figura 36 mostra o erro relativo (%) para as 23 amostras do conjunto de previsão, em relação ao método de referência. O modelo selecionado apresentou

⁷ Barbosa, L. C. A.; Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos, 2007, 25-43.

⁴¹ Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E.; *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, London, 1990, 56-79.

baixo erro médio relativo de previsão (RSEP = 3,16%), sugerindo que a metodologia utilizada apresenta exatidão.

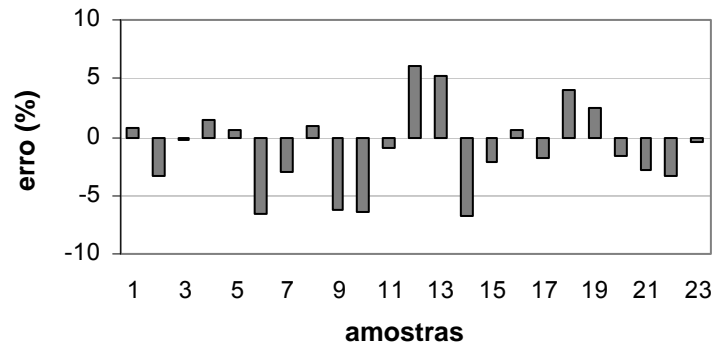


Figura 36. Erro relativo para as 23 amostras do conjunto de previsão na determinação de trimetoprima por siPLS.

Os erros de previsão apresentaram comportamento aleatório como mostrado pelo erro sistemático insignificante do modelo ($bias = 1,26$ e $t_{sist} < t_{crit}$).

Para o subconjunto de amostras comerciais (13 a 18), não foi observada tendência ($bias = -0,09$ e $t_{sist} < t_{crit}$), o que demonstra que o erro sistemático incluído no modelo por estas amostras pode ser considerado insignificante.

Como já mencionado no item anterior, a seleção das variáveis, com informação correspondente a regiões de absorção dos fármacos, indica a capacidade do modelo desenvolvido em prever o conteúdo das amostras mesmo na presença de excipientes variados, conforme demonstrado na Figura 37, para as amostras comerciais do conjunto de previsão.

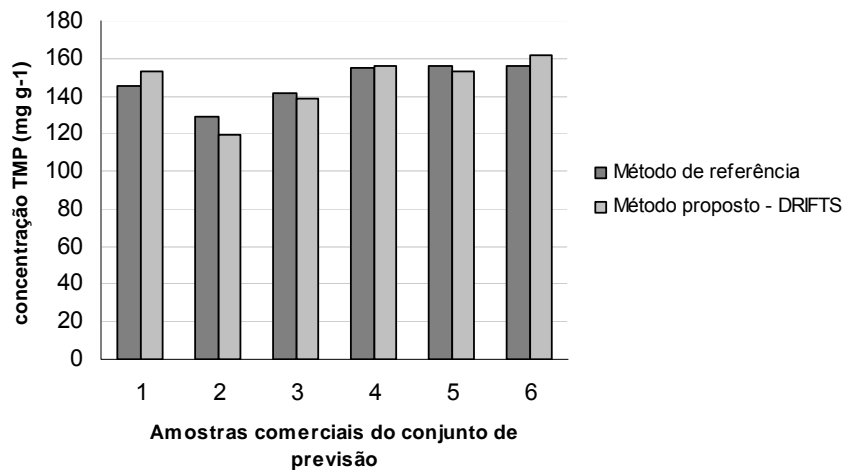


Figura 37. Histograma da diferença entre o valor médio da concentração pelo método de referência e o valor médio previsto obtido pelo modelo siPLS para 6 amostras comerciais na determinação de trimetoprima.

5.10 Comparação das técnicas de reflexão atenuada e difusa na determinação dos fármacos

Com o objetivo de avaliar as técnicas desenvolvidas utilizando reflexão no IR médio em relação a sua capacidade de aplicação como metodologia analítica e as possíveis diferenças entre os acessórios, um teste F foi aplicado para comparação dos erros de previsão obtidos. Uma segunda comparação foi feita entre a variação encontrada para cada amostra do conjunto de previsão e a variação permitida pelos códigos oficiais, conforme descrito a seguir.

5.10.1. Comparação dos erros de previsão entre os modelos selecionados através do Teste-F

O teste F foi aplicado para comparação do erro de previsão entre os modelos escolhidos, com o objetivo de determinar se existia diferença significativa entre estes. Desta forma, é possível determinar se os erros obtidos pelas diferentes técnicas estudadas (ATR-FTIR e DRIFTS) são equivalentes. O valor de F crítico extraído foi 2,07 para o nível de confiança de 95% e 22 graus de liberdade. Para a determinação de SMZ, o valor de F encontrado ($F=1,0231$) demonstra que não há diferença significativa entre os erros de previsão dos dois modelos propostos (ATR-FTIR e DRIFTS). Na determinação de TMP, o valor encontrado ($F=1,5268$), também

demonstra não haver diferença significativa entre os erros de previsão dos dois modelos propostos.

Desta forma, é possível afirmar que os erros de previsão obtidos para as duas técnicas, para ambos os fármacos, são equivalentes.

5.10.2 Resultados obtidos na determinação de sulfametoxazol

Na Tabela 19 é possível observar os valores encontrados para as amostras de previsão, na determinação por FTIR–ATR, DRIFTS e a metodologia oficial por HPLC.

Tabela 19. Resultados médios da previsão de sulfametoxazol

Amostras	SMZ		
	HPLC ^{1,2}	DRIFTS ^{1,3}	ATR-FTIR ^{1,3}
1 ^S	503,59	499,04	507,20
2 ^S	503,59	500,52	498,19
3 ^S	654,67	650,69	644,16
4 ^S	654,67	657,72	641,54
5 ^S	654,67	638,90	652,47
6 ^S	755,38	762,19	752,44
7 ^S	755,38	758,25	757,02
8 ^S	755,38	753,49	762,81
9 ^S	830,92	834,03	836,43
10 ^S	830,92	842,28	841,74
11 ^S	830,92	815,18	821,58
12 ^S	881,28	864,70	871,36
13 ^C	698,12	692,53	704,88
14 ^C	655,30	680,68	677,53
15 ^C	722,95	737,63	743,29
16 ^C	819,79	813,22	785,98
17 ^C	820,66	819,38	826,37
18 ^C	820,88	786,49	811,28
19 ^S	503,59	494,30	497,70
20 ^S	654,67	648,13	624,57
21 ^S	755,38	741,58	746,55
22 ^S	755,38	741,60	750,12
23 ^S	881,28	865,27	880,74

¹ Valores expressos em mg g⁻¹

² Método de referência por HPLC⁵⁰

³ Método proposto

Para a determinação de SMZ na mistura, foi obtida uma variação de 95,4 a 103,4% por ATR-FTIR e 95,8 a 103,9% por DRIFTS, comparado aos resultados obtidos pelo método de referência. Segundo a Farmacopéia Brasileira⁵⁰, para comprimidos contendo a associação entre SMZ e TMP é permitida uma variação entre 93 e 107% do valor nominal na determinação do teor para ambos os fármacos. Uma variação mais ampla (entre 85 e 115%) é permitida para ensaios de uniformidade de conteúdo.

Não foi encontrada diferença significativa entre os valores obtidos para as duas metodologias propostas e a metodologia oficial (após aplicação do teste T pareado, com 95% de confiança). Desta forma, as técnicas desenvolvidas apresentaram variação dentro da permitida e de acordo com o recomendado pelos códigos oficiais, sendo úteis para aplicação no controle de qualidade dos medicamentos.

5.10.3 Resultados obtidos na determinação de trimetoprima

Na Tabela 20 é possível observar os valores encontrados para as amostras de validação, na determinação por FTIR-ATR, DRIFTS e a metodologia oficial, HPLC.

Para a determinação de TMP na mistura, foi obtida uma variação de 93,0 a 105,8% por ATR-FTIR e 93,3 a 106,1% por DRIFTS. Como descrito para a determinação de SMZ, os resultados obtidos para a quantificação de TMP apresentaram-se dentro da variação permitida e de acordo com o recomendado pelos códigos oficiais.

Não foi encontrada diferença significativa entre os valores obtidos para as duas metodologias propostas e a metodologia oficial (após aplicação do teste T pareado, com 95% de confiança). Porém uma observação importante refere-se ao menor valor de erro encontrado para as determinações por DRIFTS na determinação de TMP, quando comparadas aos valores por ATR-FTIR, sugerindo-se que estes valores podem estar relacionados com uma maior informação obtida a partir da reflexão difusa, para o fármaco em menor concentração (e com sobreposição de sinal), ocasionado um menor erro na determinação.

⁵⁰ Farmacopéia Brasileira: parte II, quarto fascículo. 4. ed, 2003.

Tabela 20. Resultados médios da previsão de trimetoprima

Amostras	TMP		
	HPLC ^{1,2}	DRIFTS ^{1,3}	ATR-FTIR ^{1,3}
1 ^S	175,73	177,11	169,99
2 ^S	220,91	213,54	217,80
3 ^S	100,41	100,10	93,37
4 ^S	150,62	152,84	159,36
5 ^S	220,91	222,05	222,82
6 ^S	100,41	93,86	101,08
7 ^S	175,72	170,44	181,46
8 ^S	220,91	222,95	233,02
9 ^S	100,41	94,15	95,66
10 ^S	125,52	117,49	123,70
11 ^S	175,72	174,13	181,70
12 ^S	125,52	133,12	119,89
13 ^C	145,10	152,749	135,51
14 ^C	129,00	120,37	133,64
15 ^C	141,83	138,88	138,71
16 ^C	155,44	156,40	144,41
17 ^C	156,23	153,36	160,23
18 ^C	155,60	161,97	152,63
19 ^S	125,52	128,64	123,16
20 ^S	175,72	172,91	183,65
21 ^S	125,52	122,00	126,30
22 ^S	150,62	145,49	157,76
23 ^S	100,41	99,99	101,02

¹ Valores expressos em mg g⁻¹
² Método de referência por HPLC⁵⁰
³ Método proposto

5.10.4 Considerações finais

Como principais vantagens da utilização de ATR-FTIR e DRIFTS na quantificação de SMZ e TMP, podem-se citar a rapidez na análise (inferior a 3 minutos, baseada no tempo necessário para aquisição do espectro), a facilidade no preparo da amostra (caracterizado neste trabalho por uma etapa prévia de moagem) e a eliminação do uso de solventes orgânicos. Entretanto, alguns parâmetros referentes à validação da metodologia desenvolvida devem apresentar desempenho igual ou superior à metodologia tradicional. Estes parâmetros podem ser observados na tabela 21, sendo considerados satisfatórios quando comparados à metodologia oficial.

Tabela 21. Principais parâmetros para a determinação sulfametoxazol e trimetoprima por ATR-FTIR e DRIFTS

		SMZ		TMP	
		ATR-FTIR	DRIFTS	ATR-FTIR	DRIFTS
Exatidão	RMSEP*	13,18	13,03	6,03	4,88
	RSEP (%)	1,79	1,77	3,90	3,16
Precisão*	Repetibilidade	4,06	5,10	2,88	2,99
Linearidade	Inclinação**	0,99	0,98	1,06	1,01

* Valores expressos em mg g^{-1}

**Baseado na equação da reta obtida entre valores previstos vs. valores medidos

Em relação ao parâmetro seletividade, os métodos propostos foram considerados satisfatórios, com respostas equivalentes ao método de referência, mesmo na presença de concentrações variadas de excipientes e do fármaco associado.

A aplicação do método de seleção de variáveis aos dados permitiu a construção de modelos mais robustos em relação à dimensionalidade (expressa como número de VLs) e erros de previsão (RMSEP), quando comparados aos modelos produzidos com informação do espectro inteiro, demonstrando ser este método uma ferramenta útil na construção de metodologias aplicáveis a rotinas de controle de qualidade.

De um modo geral, os métodos propostos apresentaram resultados adequados, sendo considerados apropriados para implantação em rotinas de controle de qualidade.

6. CONCLUSÃO

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e reflexão total atenuada (ATR-FTIR) ou reflexão difusa (DRIFTS) combinadas às técnicas quimiométricas, mostraram-se métodos apropriados para a determinação de SMZ e TMP em amostras sólidas (comprimidos). Esses métodos têm como vantagens: baixo tempo para a realização da análise; a não destruição da amostra e a facilidade no manuseio dos instrumentos. Além destes fatores, apresentam um baixo custo operacional em análises de rotina num ambiente industrial.

Na determinação de SMZ por ATR-FTIR, o modelo utilizando todas as variáveis independentes (modelo global com 3351 comprimentos de onda do espectro de infravermelho) forneceu um valor de RMSEP de 22,29 mg g⁻¹, coeficiente de determinação de 0,978, utilizando 6 variáveis latentes (VLs). Porém, empregando-se o método de seleção de variáveis siPLS foi possível obter um modelo melhor, que apresentou um valor de RMSEP de 13,18 mg g⁻¹ (41% menor que o do modelo global), coeficiente de determinação de 0,996, 9 variáveis latentes, utilizando somente 270 variáveis independentes (92% menos variáveis que o modelo global).

Na determinação de TMP por ATR-FTIR, o modelo utilizando todas as variáveis independentes forneceu um valor de RMSEP de 7,86 mg g⁻¹, coeficiente de determinação de 0,938, utilizando 4 variáveis latentes (VLs). Para o modelo siPLS selecionado, foi obtido um valor de RMSEP de 6,03 mg g⁻¹ (23% menor que o do modelo global), coeficiente de determinação de 0,983, 6 variáveis latentes, utilizando somente 204 variáveis independentes (94% menos variáveis que o modelo global).

Para as determinações envolvendo DRIFTS, o mesmo desempenho dos modelos siPLS foi observado. Na determinação de SMZ, o modelo utilizando todas as variáveis independentes (modelo global com 1764 comprimentos de onda do espectro de infravermelho) forneceu um valor de RMSEP de 16,99 mg g⁻¹, coeficiente de determinação de 0,998, utilizando 8 variáveis latentes (VLs). Para o modelo siPLS selecionado, foi obtido um RMSEP de 13,03 mg g⁻¹ (23% menor que o do modelo global), coeficiente de determinação de 0,994, 4 variáveis latentes, utilizando somente 525 variáveis independentes (70% menos variáveis que o modelo global).

Na determinação de TMP por DRIFTS, o modelo utilizando todas as variáveis independentes forneceu um valor de RMSEP de 10,61 mg g⁻¹, coeficiente de determinação de 0,951, utilizando 4 variáveis latentes (VLs). O método de seleção de variáveis siPLS produziu um modelo com melhor desempenho, com valor de RMSEP de 4,88 mg g⁻¹ (54% menor que o do modelo global), coeficiente de determinação de 0,983, 6 variáveis latentes, utilizando somente 140 variáveis independentes (92% menos variáveis que o modelo global).

Desta forma, para os dois métodos propostos o siPLS mostrou-se uma ferramenta eficiente na redução do número de variáveis independentes, aumentando a exatidão dos resultados.

De uma maneira geral, os dois métodos propostos (ATR-FTIR e DRIFTS) apresentaram características de rapidez na execução, custo e operacionalidade melhores que os métodos atualmente utilizados para a determinação dos fármacos. Portanto, a utilização de diferentes acessórios de reflexão associados à espectroscopia no IR médio mostraram-se adequados, sendo úteis para aplicação no controle de qualidade, em ensaios para determinação do teor e uniformidade de conteúdo no produto acabado, bem como para ensaios de controle de processo, durante a fabricação do mesmo.

Os métodos de análise por espectroscopia no infravermelho podem ser considerados como um recurso potencial a ser explorado no campo das análises farmacêuticas, já que possuem as características de rapidez e não produção de resíduos tóxicos, tão necessárias no contexto mundial atual. Desta forma, levando em consideração as exigências no controle de qualidade de medicamentos, este é, ainda, um campo com inúmeras possibilidades de estudo, o que irá contribuir futuramente para a inclusão da espectroscopia por infravermelho entre os métodos de análise quantitativos recomendados pelos órgãos reguladores do setor farmacêutico.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação dos fármacos por espectroscopia no infravermelho próximo, objetivando a comparação com resultados obtidos por espectroscopia no infravermelho médio.
- b) Aplicação de diferentes métodos de seleção de variáveis (como Algoritmos Genéticos) e suas associações. Realizar estudo comparativo entre as variáveis selecionadas pelos diferentes algoritmos.
- c) Desenvolvimento de um guia de harmonização, com os principais parâmetros referentes à validação de metodologias analíticas por espectroscopia no infravermelho médio associada a métodos de análise multivariada.

8. REFERÊNCIAS

1. Abrahamsson, C.; Johansson, J.; Sparen, A.; Lindgren, F.; Comparison of different variable selection methods conducted on NIR transmission measurements on intact tablets, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 69 (2003) 3-12.
2. Agatonovic-Kustrin, S.; Rades, T.; Wu, V.; Saville, D.; Tucker, I. G.; Determination of polymorphic forms of ranitidine-HCl by DRIFTS and XRPD, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 741-750.
3. Akay, C.; Ozkan, S. A.; Simultaneous LC determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002)1207-1213.
4. Annual Book of ASTM Standards, *Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis*, E1655, vol.03.06, ASTM International West Conshohocken, Pennsylvania, USA, 2000.
5. ANVISA. Bulário Eletrônico Nacional. Disponível em: <http://www.bulario.bvs.br>. Acesso em: 25 nov. 2007.
6. Armenta, S.; Guarrigues, S.; Guardia, M.; Rondeau, P.; Attenuated total reflection-fourier transform infrared analysis of the fermentation process of pineapple, *Anal. Chim. Acta* 545 (2005) 99-106.
7. Barbosa, L. C. A.; *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*, Viçosa: Ed. UFV (2007).
8. Barthus, R. C.; Mazo, L. H.; Poppi, R. J.; Simultaneous determination of vitamins C, B6 and PP in pharmaceuticals using differential pulse voltammetry with a glassy carbon electrode and multivariate calibration tools, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 94-99.
9. Berntsson, O.; Danielsson, L. G.; Johansson, M. O.; Folestad, S.; Quantitative determination of content in binary powder mixtures using diffuse reflectance near infrared spectrometry and multivariate analysis, *Anal. Chim. Acta* 419 (2000) 45-54.
10. Bertache, V.; Pini, E.; Stradi, R.; Stratta, F.; Quantitative determination of amorphous cyclosporine in crystalline cyclosporine samples by Fourier Transform infrared spectroscopy, *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 159-166.
11. 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.

12. Blanco, M.; Castillo, M.; Peynado, A.; Beneyto, R.; Determination of low analyte concentrations by near-infrared spectroscopy: effect of spectral pretreatments and estimation of multivariate detection limits, *Anal. Chim. Acta* 581 (2007) 318-323.
13. Blanco, M.; Coello, J.; Eustaquio, A.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Development and validation of methods for the determination of miokamycin in various pharmaceutical preparations by use of near infrared reflectance spectroscopy, *Analyst* 124 (1999) 1089-1092.
14. Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Pagès, J.; Calibration in non-linear near infrared reflectance spectroscopy: a comparison of several methods, *Anal. Chim. Acta* 384 (1999) 207-214.
15. Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Pérez-Maseda, C.; Determination of polymorphic purity by near infrared spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 407 (2000) 247-254.
16. 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.
17. Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Serrano, D.; Near infrared analytical control of pharmaceuticals. A single calibration model from mixed phase to coated tablets, *Analyst* 123 (1998) 2307-2312.
18. Blanco, M.; Eustaquio, A.; González, J. M.; Serrano, D.; Identification and quantitation assays for intact tablets of two related pharmaceutical preparations by reflectance near-infrared spectroscopy: validation of the procedure, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22 (2000) 139-148.
19. Blanco, M.; Gozález Bañó, R.; Bertran, E.; Monitoring powder blending in pharmaceutical processes by use of near infrared spectroscopy, *Talanta* 56 (2002) 203-212.
20. Blanco, M.; Romero, M. A.; Alcalá, M.; Strategies for constructing the calibration set for a near infrared spectroscopic quantitation method, *Talanta* 64 (2004) 597-602.
21. Blanco, M.; Romero, M. A.; Near infrared transreflectance spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 467-472.
22. Blanco, M.; Valdes, D.; Boyd, M. S.; Fernandez-Mari, F.; Llorente, I.; Characterization and analysis of polymorphs by near-infrared spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 502 (2004) 221-227.
23. Bodson, C.; Dewé, W.; Hubert, Ph.; Delatre, L.; Comparison of FT-NIR transmission and UV-vis spectrophotometry to follow the mixing kinetics and to assay low-dose tablets containing riboflavin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 783-790.

24. Bogomolov, A.; Hachey, M.; Application of SIMPLISMA purity function for variable selection in multivariate regression analysis: A case study of protein secondary structure determination from infrared spectra, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 88 (2007) 132-142.
25. 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.
26. Borin, A.; Poppi, R. J.; Application of mid infrared spectroscopy and iPLS for the quantification of contaminants in lubricating oil, *Vib. Spectrosc.* 37 (2005) 27-32.
27. Boyer, C.; Bregere, 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.
28. Braga, J. W. B.; *Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada, aplicada na determinação de carbamazepina por espectrometria no infravermelho próximo e médio*, Campinas:UNICAMP. Programa de Pós-Graduação em Química, 2004. Dissertação (Mestrado).
29. 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, *Quim. Nova*, 27 (6) (2004) 1004-1011.
30. BRASIL. RDC 210, de 04 de agosto de 2003. Dispõe sobre o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2003.
31. Bratchell, N.; Cluster analysis, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 6 (1987) 105-125.
32. Brereton, R. G.; *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and chemical Plant, Chemical Analysis Series*, Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. (2003).
33. Brereton, R. G.; Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry, *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.
34. Carapuça, H. M.; Cabral, D. J.; Rocha, L. S.; Adsorptive stripping voltammetry of trimethoprim: mechanistic studies and application to the fast determination in pharmaceutical suspensions, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 364-369.
35. Carlsson, D. J.; Wiles D. M.; Surface studies by attenuated total reflection spectroscopy. I. Corona treatment of polypropylene, *Can. J. Chem.* 48 (1970) 2397-2406.
36. 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.

37. Chalus, P.; Walter, S.; Ulmschneider, M.; Combined wavelet transform-artificial neural network use in tablet active content determination by near-infrared spectroscopy, *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 219-224.
38. Chen, Q.; Zhao, J.; Liu, M.; Cai, J.; Liu, J.; Determination of total polyphenols content in green tea using FT-NIR spectroscopy and different PLS algorithms, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 3 (2008) 568-573.
39. Chen, Q.; Zhao, J.; Zhang, H.; Wang, X.; Feasibility study on qualitative and quantitative analysis in tea by near infrared spectroscopy with multivariate calibration, *Anal. Chim. Acta* 572 (2006) 77-84.
40. 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 Dev. Ind. Pharm.* 27 (2001) 623-631.
41. Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E.; *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, Academic Press, London (1990).
42. 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).
43. Correia, P. R. M.; Ferreira, M. M. C.; Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos, *Quim. Nova* 30 (2007) 481-487.
44. De Beer, T. R. M.; Vergote, G. J.; Baeyens, W. R. G.; Remon, J. P.; Vervaet, C.; Verpoort, F.; Development and validation of a direct, non-destructive quantitative method for medroxyprogesterone acetate in a pharmaceutical suspension using FT-Raman spectroscopy, *Eur. J. Pharm. Sci.* 23 (2004) 355-362.
45. Eastment, H. T.; Krzanowski, W. J.; Cross validity choice of the number of components from a principal component analysis, *Technometrics* 24 (1982) 73-77.
46. Einax, J. W.; Zwanziger, H. W.; Geiß, S.; *Chemometrics in environmental analysis*, Wiley-VCH., Weinheim (1997).
47. 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.
48. Faber, N. M.; Rajkó, R.; How to avoid over-fitting in multivariate calibration – the conventional validation approach and an alternative, *Anal. Chim. Acta* 595 (2007) 98-106.

49. Fahrenfort, J.; Attenuated total reflection: a new principle for the production of useful infrared reflection spectra of organic compounds, *Spectrochim. Acta* 17 (1961) 698-709.
50. Farmacopéia Brasileira: parte II, quarto fascículo. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.
51. Feng, Y.; Hu, C.; Construction of universal quantitative models for determination of roxithromycin and erythromycin ethylsuccinate in tablets from different manufacturers using near infrared reflectance spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 373-384.
52. 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).
53. Ferrão, M. F.; Davanzo, C. U.; Horizontal attenuated total reflection applied to simultaneous determination of ash and protein contents in commercial wheat flour, *Anal. Chim. Acta* 540 (2005) 411-415.
54. Ferrão, M. F.; Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos, *Tecno-lóg* 5 (2001) 63-85.
55. Ferreira M. M. C., Antunes A. M., Melgo M. S., Volpe P. L. O., Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial, *Quim. Nova* (22) (1999) 724-731.
56. Ferreira, M. M. C.; Multivariate QSAR, *J. Braz. Chem. Soc.* 13 (2002) 742-753.
57. Fontain, W.; Dumstorf, K.; Lowell, A. E.; Lodder, R. A.; Mumper, R. J.; Near-infrared spectroscopy for the determination of testosterone in thin-film composites, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 181-189.
58. Foot, M.; Mulholland, M.; Classification of chondroitin sulfate C, glucosamine hydrochloride and glucosamine-6-sulfate using chemometric techniques, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 397-407.
59. Gabrielsson, J.; Lindberg, N.; Lundstedt, T.; Multivariate methods in pharmaceutical applications, *J. Chemom.* 16 (2002) 141-160.
60. Gabrielsson, J.; Trygg, J.; Recent developments in multivariate calibration, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006) 243-255.
61. Garcia-Alvarez-Coque, M. C.; Simo-Alfonso, E. F.; Ramis-Ramos, G.; Esteve-Romero, J. S.; High-performance micellar liquid chromatography determination of sulphonamides in pharmaceuticals after azodye precolumn derivatization, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 237-245.
62. Geladi, P.; Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics, *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 767-782.

63. Geladi, P.; Kowalski B. R.; Partial least-squares: a tutorial, *Anal. Chim. Acta* 185 (1986) 1-17.
64. Geladi, P.; MacDougall, D.; Martens, H.; Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat, *Appl. Spectrosc.* 39 (1985) 491-500.
65. Gemperline, P.; *Practical guide to chemometrics*, 2nd ed.; CRC Press Taylor & Francis, New York (2006) 105-160.
66. Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C.; A comparison of orthogonal signal correction and net analyte preprocessing methods: theoretical and experimental study, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 56 (2001) 73-81.
67. 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 undesigned kerosene samples, *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 253-265.
68. Gottfries, J.; Depui, H.; Fransson, M.; Jongeneelen, M.; Josefson, M.; Langkilde, F. W.; Witte, D. T.; Vibrational spectrometry for the assessment of active substance in metropolol tablets: a comparison between transmission and diffuse reflectance near-infrared spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1495-1503.
69. Granero, G.; Garnero, C.; Longhi, M.; Second derivative spectrophotometric determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in the presence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 51-59.
70. Harrick, N. J.; Semiconductor surface properties deduced from free carrier absorption and reflection of infrared radiation, *J. Phys. Chem. US*, (64) (1960) 60-71.
71. Harris, C. D.; *Análise Química Quantitativa*, 5ª ed.; LTC Editora, Rio de Janeiro (1999).
72. Hartauer, K. J.; Guillory, J. K.; Quantitative Fourier transform-infrared/attenuated total reflectance (FT-IR/ATR) analysis of trimethoprim and sulphamethoxazole in a pharmaceutical formulation using partial squares, *Pharmaceut. Res.* 6 (1989) 608-611.
73. Hicks, M. B.; Zhou, G. X.; Lieberman, D. R.; Antonucci, V.; Ge, Z.; Shi, Y.; Cameron, M.; Lynch, J. E.; In situ moisture determination of a cytotoxic compound during process optimization, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 495-501.
74. Hind, A. R.; At the solid/liquid interface: FTIR/ATR – the tool of choice, *Adv. Colloid Interfac.* 93 (2001) 91-114.
75. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Q2 (R1), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, USA, 2005. Disponível em: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>. Acesso em 01 dez. 2007.

76. 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.
77. Iturriaga, H.; Coello, J.; Maspocho, S.; Porcel, M.; Multi-component kinetic-spectrophotometric analysis. Selection of wavelength and time ranges, *Analyst* (2001) 1135-1141.
78. Kachrimanis, K.; Braun, D. E.; Griesser, U. J.; Quantitative analysis of paracetamol polymorphs in powder mixtures by FT-Raman spectroscopy and PLS regression, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 407-412.
79. Katzung, B. G.; Voeux, P. L.; *Farmacologia básica & clínica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2003).
80. Kauffman, J. F.; Dellibovi, M.; Cunningham, C. R.; Raman spectroscopy of coated pharmaceutical tablets and physical models for multivariate calibration to tablet coating thickness, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 39-48.
81. Kipouros, K.; Kachrimanis, K.; Nikolakakis, I.; Malamataris, S.; Quantitative analysis of less soluble form IV in commercial carbamazepine (form III) by diffuse reflectance fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and lazy learning algorithm, *Anal. Chim. Acta* 550 (2005) 191-198.
82. Kipouros, K.; Kachrimanis, K.; Nikolakakis, I.; Tserki, V.; Malamataris, S.; Simultaneous quantification of carbamazepine crystal forms in ternary mixtures (I, III, and IV) by diffuse reflectance FTIR spectroscopy (DRIFTS) and multivariate calibration, *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 2419-2431.
83. Kirsch, J. D.; Drennen, J. K.; Nondestructive tablet hardness testing by near-infrared spectroscopy: a new and robust spectral best-fit algorithm, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 351-362.
84. Lavine, B. K.; *Clustering and Classification of Analytical Data in the Encyclopedia of Analytical Chemistry: Instrumentation and Applications*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester (2000).
85. Lee, T.; Lin, S.; Microspectroscopic FT-IR mapping system as a tool to assess blend homogeneity of drug-excipient mixtures, *Eur. J. Pharm. Sci.* 23 (2004) 117-122.
86. Li, W.; Johnson, M. C.; Bruce, R.; Ulrich, S.; Rasmussen, H.; Worosila, G. D.; Mass-balanced blend uniformity analysis of pharmaceutical powders by at-line near-infrared spectroscopy with a fiber-optic probe, *Int. J. Pharm* (2006) 182-185.
87. Li, W.; Worosila, G. D.; Quantitation of active pharmaceutical ingredients and excipients in powder blends using designed multivariate calibration models by near-infrared spectroscopy, *Int. J. Pharm.* 295 (2005) 213-219.
88. Lin, Z.; Zhou, L.; Mahajan, A.; Song, S.; Wang, T.; Ge, Z.; Ellison, D.; Real-time endpoint monitoring and determination for a pharmaceutical salt formation

- process with in-line FT-IR spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 99-104.
89. Lopes, J. A.; Costa, P. F.; Alves, T. P.; Menezes, J. C.; Chemometrics in bioprocess engineering: process analytical technology (PAT) applications, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 74 (2004) 269-275
90. Lundstedt-Enkel, K.; Gabrielsson, J.; Olsman, H.; Seifert, E.; Petersen, J.; Lek, P. M.; Boman, A.; Lundstedt, T.; Different multivariate approaches to material discovery, process development, PAT and environmental process monitoring, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 84 (2006) 201-207.
91. Mazurek, S.; Szostak, R.; Quantitative determination of diclofenac sodium and aminophylline in injection solutions by FT-Raman spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 1235-1242.
92. McGoverin, C. M.; Ho, L. C. H.; Zeitler, J. A.; Strachan, C. J.; Gordon, K. C.; Rades, T.; Quantification of binary polymorphic mixtures of ranitidine hydrochloride using NIR spectroscopy, *Vib. Spectrosc.* 41 (2006) 225-231.
93. Meza, C. P.; Santos, M. A.; Romañach, R. J.; Quantitation of drug content in a low dosage formulation by transmission near infrared spectroscopy, *AAPS PharmSciTech* 7 (2006) Article 29.
94. Mirabella, F. M.; Internal reflection spectroscopy, *Appl. Spectrosc. Rev.* 21 (1985) 45-178.
95. 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.
96. Moros, J.; Garrigues, S.; Guardia, M.; Comparison of two partial least squares infrared spectrometric methods for the quality control of pediculosis lotions, *Anal. Chim. Acta* 582 (2007) 174-180.
97. 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 proteome-altering gene by spectroscopy and chemometrics, *Anal. Chim. Acta* 446 (2001) 169-184.
98. Nagaraja, P.; Sunitha, K. R.; Vasantha, R. A.; Yathirajan, H. S.; Iminodibenzyl as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53 (2002) 187-192.
99. Navea, S.; Tauler, R.; Juan, A., Application of the local regression method interval partial least-squares to the elucidation of protein secondary structure, *Anal. Biochem.* 336 (2005) 231-242.
100. *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: 10 dez. 2007.

101. Norgaard, L.; Hahn, M. T.; Knudsen, L. B.; Farhat, I. A.; Engelsen, S. B.; Multivariate near-infrared and Raman spectroscopic quantifications of the crystallinity of lactose in whey permeate powder, *Int. Dairy J.* 15 (2005) 1261-1270.

102. 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.

103. 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 and Applied Chemistry (IUPAC Technical Report)* 78 (2006) 633-661.

104. O'Neil, M. J.; Smith, A.; Heckelman, P. E.; Budavari, S.; *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological*, Merck & Co, USA, Whitehouse Station (2001).

105. Paris, I.; Janoly-Dumenil, A.; Paci, A.; Mercier, L.; Bourget, P.; Brion, F.; Chaminade, P.; Rieutord, A.; Near infrared spectroscopy and process analytical technology to master the process of busulfan paediatric capsules in a university hospital, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1171-1178.

106. Parisotto, G.; *Determinação do número de acidez total em resíduo atmosférico empregando a espectrometria no infravermelho e calibração multivariada*, Santa Maria: UFSM. Programa de Pós-Graduação em Química, 2007. Dissertação (Mestrado)

107. 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.

108. Parisotto, G.; Souza, J. S.; Ferrão, M. F.; Furtado, J. C.; Molz, R. F.; Análise exploratória aplicada no estudo de medicamentos contendo piroxicam, *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 41 (2005) 499-505.

109. 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.

110. Pasquini, C.; Near infrared spectroscopy: fundamentals practical aspects and analytical applications, *J. Braz. Chem. Soc.* 14 (2003) 198-219.

111. PAT - A framework for innovative pharmaceutical manufacturing and quality assurance guidance for industry, Food and Drug Administration, USA, 2004. Disponível em: <http://www.fda.gov.br/cder/guidance/6419fnl.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2007.

112. Pataca, L. M.; Neto, W. B.; Marcucci, M. C.; Poppi, R. J.; Determination of apparent reducing sugars, moisture and acidity in honey by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectrometry, *Talanta* 71 (2007) 1926-1931.
113. Patel, A. D.; Luner, P. E.; Kemper, M. S.; Quantitative analysis of polymorphs in binary and multi-component powder mixtures by near-infrared reflectance spectroscopy, *Int. J. Pharm.* 206 (2000) 63-74.
114. Pereira, A. F. C.; Pontes, M. J. C.; Neto, F. F. G.; 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.* (2008), doi: 10.1016/j.foodres.2007.12.013.
115. PIKE Technologies. Disponível em: <http://www.piketch.com>. Acesso em: 23 nov. 2007.
116. Pinto, T. J. A.; Kaneko, T. M.; Ohara, M. T.; *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*, São Paulo: Atheneu, 2000.
117. Pirouette, *Multivariate Data Analysis*, versão 3.11, Infometrix, Inc. Washington, EUA.
118. 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.
119. Pöllänen, K.; Häkkinen, A.; Reinikainen, S.; Louhi-Kultanen, M.; Nyström, L.; ATR-FTIR in monitoring of crystallization processes: comparison of indirect and direct OSC methods, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 76 (2005) 25-35.
120. Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; *Farmacologia*. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2001).
121. Reich, G.; Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 57 (2005) 1109-1143.
122. Roggo, Y.; Chalus, P.; Maurer, L.; Lema-Martinez, C.; Edmond, A.; Jent, N.; A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies, *Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 683-700.
123. 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* (2008) in press, doi:10.1016/j.talanta.2007.12.008.
124. Rossignoli, P. S.; *Determinação simultânea de glicosamina e condroitina em forma farmacêutica por espectroscopia no infravermelho por refletância difusa e calibração multivariada*, Curitiba: UFPR. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2006. Dissertação (Mestrado).

125. Sabin, J. G.; Ferrão, M. F.; Furtado, M. F.; Determination of amoxicillin content in powdered pharmaceutical formulations using DRIFTS and PLS, *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 40 (2004) 387-396.
126. Salari, A.; Young, R. E.; Application of attenuated total reflectance FTIR spectroscopy to the analysis of pharmaceutical polymorphs, *Int. J. Pharm.* 163 (1998) 157-166.
127. Sekulic, S. S.; Wakeman, J.; Doherty, P.; Hailey, P. A.; Automated system for the on-line monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy Part II: qualitative approaches to blend evaluation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 1285-1309.
128. 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.
129. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemlle, D. J.; *Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos*, Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, 7^a ed., (2006).
130. Skoog, D.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Principles of instrumental analysis*, Orlando: Harcourt Brace & Company (1998).
131. 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.
132. Spinacé, M. A. S.; Lucato, M. U.; Ferrão, M. F.; Davanzo, C. U.; De Paoli, M. A.; Determination of intrinsic viscosity of poly(ethylene terephthalate) using infrared spectroscopy and multivariate calibration method, *Talanta*, 69 (2006) 643-649.
133. Trevisan, M. G.; Poppi, R. J.; Química analítica de processos, *Quim. Nova*, 29 (2006) 1065-1071.
134. Voort, F. R.; Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis, *Food Res. Int.* 25 (1992) 397-403.
135. Wartewig, S.; Neubert, R. H. H.; Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 57 (2005) 1144-1170.
136. Watson, D. G.; *Pharmaceutical Analysis*, Harcourt Publishers Limited, London, UK (1999).
137. Weerd, J.; Kazarian, S. G.; Combined approach of FTIR imaging and conventional dissolution tests applied to drug release, *J. Control. Release* 98 (2004) 295-305.

-
138. Winning, H.; Viereck, N.; Norgaard, L.; Larsen, J.; Engelsen, S. B., Quantification of the degree of blockiness in pectins using ^1H NMR spectroscopy and chemometrics, *Food Hydrocoll.* 21 (2007) 256-266.
139. Wold, S.; Cheney, J.; Kettaneh, N.; McCready, C.; The chemometric analysis of point and dynamic data in pharmaceutical and biotech production (PAT) – some objectives and approaches, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 84 (2006) 159-163.
140. Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P.; Principal component analysis, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2 (1987) 37-52.
141. Wold, S.; Sjöström, M.; Eriksson, L.; PLS-regression: a basic tool of chemometrics, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 58 (2001) 109-130.
142. Wold, S.; Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models, *Technometrics* 20 (1978) 397-405.
143. Xiaobo, Z.; Jiewen, Z.; Yanxiao, L.; Selection of the efficient wavelength regions in FT-NIR spectroscopy for determination of SSC of “Fuji” apple based on BiPLS and FiPLS models, *Vib. Spectrosc.* 44 (2007) 220-227.