



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**DETERMINAÇÃO DE CLORIDRATO DE PROPRANOLOL EM  
MEDICAMENTOS POR ESPECTROSCOPIA NO  
INFRAVERMELHO COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA  
(PLS)**

---

**Diego Zeni**

**PPGQ**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2005**

**DETERMINAÇÃO DE CLORIDRATO DE PROPRANOLOL EM  
MEDICAMENTOS POR ESPECTROSCOPIA NO  
INFRAVERMELHO COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA  
(PLS)**

---

por

**Diego Zeni**

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

Santa Maria, RS, Brasil

2005

---

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<i>vi</i>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<i>vii</i>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<i>vii</i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>ix</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>x</i>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1. DOSEAMENTO DE FÁRMACOS .....	4
2.1.1. Volumetria de titulometria .....	4
2.1.2. Espectrometria no ultravioleta e visível .....	5
2.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência .....	5
2.2. CLORIDRATO DE PROPRANOLOL .....	6
2.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO .....	6
2.3.1. Fundamentos básicos .....	6
2.3.2. Acessório de reflectância total atenuada (ATR) .....	9
2.4. QUIMIOMETRIA .....	11
2.4.1 Pré-processamento e pré-tratamento de dados .....	12
2.4.1.1. Autoescalamento .....	12
2.4.1.2. MSC ( <i>Multiplicative Scatter Correction</i> ) .....	13
2.4.1.3. Primeira e segunda derivadas .....	13
2.5. MODELO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA .....	14
2.5.1. Parâmetros que indicam a qualidade de um modelo multivariado .	15
2.5.2. Vantagens no uso de calibração multivariada .....	15
2.6. APLICAÇÃO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA E	

ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS .....	17
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
3.1. INSTRUMENTAÇÃO .....	20
3.2. REAGENTES .....	20
3.3. MATERIAIS DIVERSOS .....	21
3.4. AMOSTRAS .....	21
3.5. <i>SOFTWARES</i> UTILIZADOS .....	21
3.6. PARÂMETROS PARA A OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO .....	22
3.6.1 Otimização dos parâmetros .....	22
3.6.1.1 Massa de amostra .....	22
3.6.1.2 Número de varreduras ( <i>scans</i> ) .....	22
3.6.1.3 Obtenção dos espectros infravermelho .....	23
3.7 SELEÇÃO DAS REPLICATAS .....	23
3.8 MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA .....	23
3.8.1 Pré-processamento e pré-tratamentos utilizados .....	24
3.8.2 Seleção dos números de onda .....	24
3.8.2.1 Combinação das regiões .....	25
3.9 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO .....	25
3.10 TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS .....	25

<b>4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b> .....	27
4.1. AMOSTRAS DE CLORIDRATO DE PROPRANOLOL .....	27
4.1.1. Determinação do peso médios dos comprimidos .....	27
4.1.2. Moagem dos comprimidos de cloridrato de propranolol .....	28
4.1.3. Armazenamentos das amostras .....	28
4.2. ESPECTROS DE INFRAVERMELHO .....	29
4.2.1. Otimização da massa de comprimido moído para obtenção dos espectros infravermelho .....	29
4.2.2. Otimização do número de varreduras ( <i>scans</i> ) .....	29
4.2.3 Obtenção das replicatas mais semelhantes .....	29
4.3.MODELAGEM PARA PREDIÇÃO DAS DOSAGENS DE CLORIDRATO DE PROPRANOLOL EM COMPRIMIDOS .....	31
4.3.1. Escolha de pré-processamento e pré-tratamentos utilizados para a construção dos modelos .....	31
4.3.2. Escolha das regiões internas do espectro para utilização no modelo .....	32
4.3.3. Definição dos melhores modelos e predição de amostras externas .....	36
4.4. VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO .....	45
4.5. PARÂMETROS DE MÉRITO .....	47
4.6 COMPARAÇÃO DO TRABALHO PROPOSTO À METODOLOGIA OFICIAL .....	47
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	49
<b>6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS</b> .....	50
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	51

**LISTA DE TABELAS**

---

<b>Tabela 1.</b>	Regiões definidas pelas análise da subtração dos espectros.....	33
<b>Tabela 2.</b>	Modelos selecionados pelo valor de RMSECV e suas respectivas regiões espectrais, pré-processamento e pré-tratamento .....	36
<b>Tabela 3.</b>	Seleção do número melhor número de variáveis latentes para cada modelo proposto .....	37
<b>Tabela 4.</b>	Modelos que apresentaram $R^2$ maior que 0,90 .....	38
<b>Tabela 5.</b>	Modelos que apresentaram $R^2$ maior que 0,90 e RMSEP menores que 0,020 .....	39
<b>Tabela 6.</b>	Tabela com os resultados de predição do modelo $A_1$ , $n=3$ .....	42
<b>Tabela 7.</b>	Tabela com os resultados de predição do modelo $A_2$ , $n=3$ .....	43
<b>Tabela 8.</b>	Tabela com os resultados de predição do modelo $C_1$ , $n=3$ .....	43
<b>Tabela 9.</b>	Tabela com os resultados de predição do modelo $C_2$ , $n=3$ .....	44
<b>Tabela 10.</b>	Tabela com os resultados de predição do modelo $F_1$ , $n=3$ .....	44
<b>Tabela 11.</b>	Médias e desvios padrões para dos modelos obtidos .....	45
<b>Tabela 12.</b>	Concentração, (mg de cloridrato de propranolol por mg de comprimido), peso médio e dosagem dos comprimidos utilizados nos modelos de calibração multivariada .....	46
<b>Tabela 13.</b>	Concentração (mg de cloridrato de propranolol por mg de comprimido), peso médio e dosagem dos comprimidos utilizados como amostras de validação do modelo .....	47
<b>Tabela 14.</b>	Figuras de mérito para os modelos obtidos .....	47

---

**LISTA DE FIGURAS**


---

<b>Figura 1.</b>	Estrutura química e fórmula molecular do cloridrato de propranolol .....	6
<b>Figura 2.</b>	Espectro de infravermelho do cloridrato de propranolol .....	8
<b>Figura 3.</b>	Esquema do acessório ATR .....	10
<b>Figura 4</b> <b>(a e b)</b>	Resultado do HCA das amostras após a seleção das triplicatas .....	30
<b>Figura 5.</b>	Perfil do RMSECV para os testes aplicados .....	32
<b>Figura 6.</b>	Resultado da subtração dos espectros para a escolha das regiões para as modelagens .....	33
<b>Figura 7.</b>	Perfil do RMSECV para os dados com autoescalamento e MSC com modelos construídos para as cinco melhores regiões .....	34
<b>Figura 8.</b>	Perfil do RMSECV para a associação de duas regiões para as 4 melhores combinações .....	35
<b>Figura 9.</b>	Perfil do RMSECV para a associação de três regiões para as 4 melhores associações .....	35
<b>Figura 10.</b>	Perfil do RMSECV, SEC e RMSEP variando-se o número de variáveis latentes para o modelo A .....	37
<b>Figura 11.</b>	Perfil do RMSCEV, SEC e RMSECV para o modelo com a Região 1, autoescalado e MSC .....	38
<b>Figura 12.</b>	Gráfico com o resultado da predição de amostras externas para o modelo $A_1$ .....	40
<b>Figura 13.</b>	Gráfico com o resultado da predição de amostras externas para o modelo $A_2$ .....	40
<b>Figura 14.</b>	Gráfico com o resultado da predição de amostras externas para o modelo $C_1$ .....	41
<b>Figura 15.</b>	Gráfico com o resultado da predição de amostras externas para o modelo $C_2$ .....	41
<b>Figura 16.</b>	Gráfico com o resultado da predição de amostras externas para o modelo $F_1$ .....	42

---

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

---

1d – Primeira derivada

2d – Segunda derivada

As – Autoescalamamento dos dados

ATR – Reflectância total atenuada, do inglês *Attenuated total reflectance*

FB – Farmacopéia Brasileira

FTIR-ATR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada, do inglês, *Fourier transform infrared attenuated total reflectance*

HCA – Análise Hierárquica de Agrupamentos, do inglês *Hierarchical Components Analysis*

HPLC – Cromatografia Líquida de alta eficiência, do inglês *High performance liquid chromatographic*

IV – Infravermelho

MSC – Correção de espalhamento de luz, do inglês, *multiplicative scatter correction*

PCA – Análise por componentes principais, do inglês *Principal Components Analysis*

PLS – Mínimo quadrado parcial, do inglês *Partial least squares*

$R^2$  – Coeficiente de correlação linear

RMSECV – Erro quadrático padrão de validação cruzada, do inglês *root mean standard error of cross validation*

RMSEP – Erro quadrático padrão de predição, do inglês *root mean standard error of prediction*

SEC – Erro padrão de calibração, do inglês *standard error os calibration*

VL's – Variáveis latentes



## RESUMO

### DETERMINAÇÃO DE CLORIDRATO DE PROPRANOLOL EM MEDICAMENTOS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA (PLS)

Neste trabalho foram desenvolvidos modelos de calibração multivariada com o uso da técnica dos mínimos quadrados parciais (PLS) para o doseamento de comprimidos de cloridrato de propranolol utilizando espectroscopia no infravermelho.

As amostras foram moídas e homogeneizadas em moinho criogênico a fim de ter-se todas as amostras nas mesmas condições em relação a granulometria e evitar problemas de heterogeneidade das amostras. Foram utilizadas massas de amostra de  $45,0 \pm 2,0$  mg de comprimidos e a concentração dos padrões ficou entre 0,1 e 0,45 mg de cloridrato de propranolol por mg de comprimido.

Foram utilizadas 18 amostras de calibração e 8 amostras de validação, para as quais foram obtidos espectros em 5 replicatas. Fez-se a escolha de 3 replicatas mais semelhantes pela análise de HCA. Os pré-processamentos e pré-tratamentos utilizados foram: autoescalamamento dos dados, correção de espalhamento de luz (MSC, do inglês, *multiplicative scatter correction*) e primeira e segunda derivadas. Após os testes realizados, foram obtidos 5 modelos com boa capacidade de predição das concentrações de cloridrato de propranolol nos comprimidos. Estes modelos apresentaram os coeficientes de correlação linear maiores que 0,92 e erro quadrático padrão de validação cruzada (RMSECV) menor que 0,020. Realizou-se o teste de ANOVA e verificou-se que não havia diferença significativa entre os modelos com um grau de confiança de 95%.

A metodologia proposta mostrou-se rápida, barata, exata e pode ser facilmente adaptada ao controle de qualidade da indústria farmacêutica. Ademais, a metodologia proposta não gera resíduos químicos perigosos, pois é um técnica não destrutiva e não utiliza solventes para sua realização.

## ABSTRACT

### PROPRANOLOL HYDROCHLORIDE DETERMINATION IN MEDICINES BY INFRARED SPECTROSCOPY WITH MULTIVARIATE CALIBRATION (PLS)

In this work calibration multivariate models were developed with the use of the technique of partial least squares (PLS) for the dosage of tablets of propranolol hydrochloride using infrared spectroscopy.

Samples were ground and homogenized in cryogenic mill in order to have all the samples in the same conditions in relation to the particle size and to avoid problems related to the samples heterogeneity. Sample masses of  $45.0 \pm 2.0$  mg of tablets were used and the concentration of reference tablets were between 0.1 and 0.45 mg of propranolol hydrochloride for mg of tablet. Eighteen calibration samples and 8 validation samples were used, for which were obtained spectra in 5 replicatas. The 3 more similar replicates were chosen by the analysis of HCA. The pre-processing and used pre-treatments were: autoscaling of the data, multiplicative scatter correction and first and second derivatives. Five models were obtained with good capacity of prediction of the concentrations of propranolol hydrochloride in the tablets. These models presented the coefficient of linear correlation higher than 0.92 and the root mean standard error of cross validation (RMSECV) smaller than 0.020. By the ANOVA test was verified that there was not significant difference between the models with a confidence level of 95%.

The proposed procedure was fast, cheap, allowing good accuracy and it can be easily adapted to the quality control of the pharmaceutical industry. In addition, the proposed methodology doesn't generate dangerous chemical residues, because it is a technique non destructive and it doesn't use solvents for your application.

## 1. INTRODUÇÃO

---

A demanda por produtos farmacêuticos tem aumentado constantemente e umas das conseqüências deste aumento é a crescente necessidade de técnicas de controle de qualidade com características adequadas para o fornecimento de resultados de maneira rápida e confiável. Entre os problemas que podem ocorrer durante a produção, podem ser citados: contaminações por metais pesados, contaminações microbiológicas e problemas quanto a dosagem de medicamentos, em especial comprimidos, pois a correta homogeneização de misturas sólido-sólido pode ser difícil no processo de fabricação. O controle de qualidade da produção em uma indústria é um dos principais aspectos para o sucesso da empresa no mercado. Assim, procedimentos que permitam uma rápida, limpa (sem o uso de muitos reagentes e solventes), precisa e exata determinação da composição dos medicamentos se fazem necessários. Os procedimentos que, normalmente, são adotados para o controle da qualidade nas indústrias farmacêuticas são os denominados “métodos oficiais”, descritos em farmacopéias, e servem de referência para os diversos parâmetros de controle de qualidade, tanto para a matéria-prima, como para o produto acabado. Cada substância, descrita em uma farmacopéia, possui metodologias específicas para sua caracterização e determinação, assim como a determinação de prováveis impurezas.

Alguns destes métodos oficiais são bastante demorados, susceptíveis a erros e exigem equipamentos de alto custo. Metodologias que utilizam a espectrometria no ultra-violeta/visível ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para o doseamento de princípios ativos necessitam de muitas etapas de pré-tratamento da amostra. Para a atual necessidade industrial, estas etapas podem comprometer toda uma linha de produção pois a demora na obtenção nos

resultados pode permitir que a produção termine sem a correção dos parâmetros que apresentam problemas, bem como podem aumentar o custo das análises de controle.

Sob este aspecto, a utilização de uma metodologia simples e, principalmente, de menor custo e rápida, pode antecipar a detecção e correção de eventuais problemas que podem acontecer no momento da produção de produtos farmacêuticos.

Como técnica que pode agregar essas características, a espectroscopia no infravermelho oferece a possibilidade de obtenção de espectros com relativa rapidez, além de fornecer informações interessantes, tanto do ponto de vista analítico, qualitativo ou quantitativo. Esta técnica tem sido utilizada cada vez mais para fins quantitativos, aumentando o seu uso que, antigamente, era restrito somente à análises qualitativas. Um fator importante é o custo relativamente acessível de um espectrômetro de infravermelho, além de ser uma técnica não destrutiva.

A técnica de refletância total atenuada (ATR), que é utilizada para obtenção de espectros de infravermelho simplifica, e muito, a obtenção dos espectros, já que basta a simples colocação da amostra sólida sobre o dispositivo, não necessitando de maiores operações. Com o uso deste acessório, não é necessária a confecção de pastilhas de brometo de potássio, como nos sistemas convencionais. Este dispositivo permite, em questão de poucos minutos, a obtenção de espectros com definição satisfatória.

A quimiometria, associada à espectroscopia no infravermelho, é uma ferramenta puramente matemática e que, cada vez mais, torna-se um ramo essencial para a química analítica. A análise quimiométrica considera que espectros de infravermelho, assim como qualquer outro de tipo de análise espectrométrica, fornecem mais informações do que apenas as absorbâncias medidas. Esta ferramenta pode fornecer resultados satisfatórios e interessantes para análises de rotina. Tais informações podem ser utilizadas tanto para a dosagem de certo constituinte, bem como a presença de impurezas. O método que associa a espectroscopia no infravermelho com a quimiometria pode apresentar variações que são equivalentes às obtidas por métodos oficiais, porém em tempo e custo muito reduzidos.

Como método quimiométrico, a calibração multivariada, através do método dos mínimos quadrados parciais (PLS), pode ser empregada para construção de modelos que permitem a predição de determinados constituintes em amostras, independente do estado físico na qual se encontram, com mínimos erros e com rapidez satisfatória. Com a obtenção de modelos de calibração multivariada, análises rápidas, como por exemplo, com a espectroscopia no infravermelho, podem ser facilmente adaptadas a análises de rotinas em laboratórios de controle de qualidade. Assim modelos de calibração multivariada com infravermelho podem representar boas alternativas para o monitoramento da linha de produção.

Desta maneira, neste trabalho é proposta a utilização de um modelo de calibração multivariada que utiliza a espectroscopia no infravermelho com dispositivo ATR para o doseamento de comprimidos de cloridrato de propranolol, medicamento muito utilizado em tratamentos de hipertensão arterial, em diferentes dosagens e proveniente de diferentes fabricantes. O procedimento proposto não utiliza extração do fármaco para posterior análise, procedimento muito usual na quantificação de fármacos. A validação dos resultados foi feita através da aplicação da metodologia oficial descrita na Farmacopéia Brasileira para o doseamento de comprimidos de cloridrato de propranolol.<sup>8</sup>

---

<sup>8</sup> FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª Edição, Parte II, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 2002

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1 DOSEAMENTO DE FÁRMACOS

De acordo com as metodologias oficiais, descritas em farmacopéias, as principais maneiras de se proceder o doseamento de fármacos se restringem a três métodos: titulação por volumetria de neutralização ou de oxi-redução, espectrometria de ultravioleta e visível e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

#### 2.1.1 Volumetria

A volumetria (ou titulometria) é um método que se baseia na adição de um titulante para que este reaja com um analito específico e, uma vez que todo o analito tenha reagido tem-se, no meio reacional, uma brusca mudança em alguma característica, podendo esta ser visual, causada pela adição de algum indicador ou, então, pela mudança no potencial do meio, determinando-se, o ponto de viragem ou ponto de equivalência, respectivamente.<sup>14</sup> Apesar de amplo emprego, esta técnica envolve diversas etapas (pesagem, dissolução, preparação da solução de referência e outras soluções e a determinação, normalmente, por potenciometria) que aumentam o tempo de análise, além do consumo de reagentes e geração de resíduos.

---

<sup>14</sup> Harris, D. C., *Análise Química Quantitativa*, 5ª Ed., LTC Editora, Rio de Janeiro, 2001, p. 126

### 2.1.2 Espectrometria no ultravioleta e visível

Doseamentos espectrofotométricos na região do ultravioleta e visível, em geral, requerem a comparação da absorbância da solução da amostra com a absorbância da solução de referência, ambas preparadas na concentração especificada na monografia de cada fármaco. As soluções de referência são preparadas a partir de substâncias de referência da amostra a ser analisada. A escolha do comprimento de onda de trabalho é feita, normalmente, no máximo de absorbância.

A espectrometria na região do ultravioleta e visível é uma técnica presente em várias monografias. É uma técnica, assim como os métodos de titulação, que necessita de etapas de pesagem, dissolução e diluição e, não raro, envolve o uso de diversos solventes na etapa de preparo da amostra.

### 2.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

Procedimentos cromatográficos baseiam-se nos diferentes tempos que substâncias levam para atravessar uma coluna de separação. Após a coluna, o analito passa por um detector gerando um sinal transiente. O sinal pode ser quantificado em altura ou, mais comumente, em área de pico.

A análise quantitativa por HPLC baseia-se na comparação das áreas geradas por soluções de referência e por áreas geradas pela substância em análise. Dentro de uma determinada faixa de concentração, a resposta do detector (normalmente um detector de ultravioleta) é linear com absorbância, como o esperado pela Lei de Lambert-Beer.<sup>28</sup> Algumas monografias da Farmacopéia Brasileira indicam a utilização da técnica do padrão interno, como maneira de amenizar eventuais variações instrumentais.<sup>8</sup>

A utilização desta técnica para a quantificação de fármacos é ampla, e diversas monografias recomendam a HPLC como técnica oficial para doseamento de princípios ativos, assim como de impurezas.<sup>8</sup>

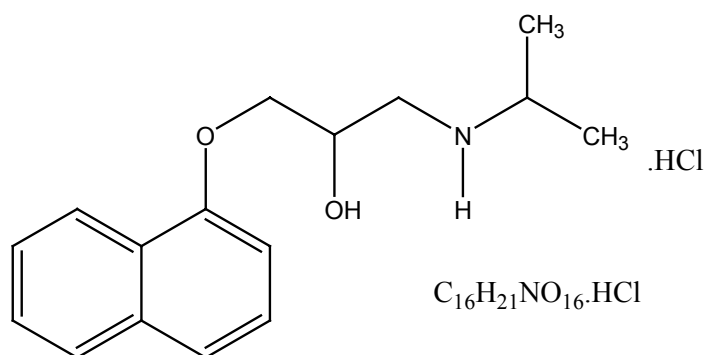
---

<sup>28</sup> Skoog et al., *Princípios de Análise Instrumental*, 5º Ed. Artmed Editora, Porto Alegre, 2002, cap. 16

<sup>8</sup> FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª Edição, Parte II, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 2002

## 2.2 CLORIDRATO DE PROPRANOLOL

O cloridrato de propranolol (1-isopropilamino-3-(naftiloxi)-2-propanol), Figura 1, é um medicamento utilizado para o tratamento da hipertensão arterial e, normalmente, é comercializado em comprimidos de 10, 40 ou 80 mg de cloridrato de propranolol por comprimido. Existe, também, a comercialização de soluções injetáveis e de cápsulas em outras concentrações.



**FIGURA 1.** Estrutura química e fórmula molecular do cloridrato de propranolol

No Brasil, várias indústrias farmacêuticas produzem este medicamento, por exemplo, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Nature's Plus Farmacêuticas Ltda., EMS Sigma-Pharma, Laboratório Teuto Brasileiro S/A, Royton Química Farmacêutica, Laboratório Neoquímica Indústria Farmacêutica Ltda, Cazi Química Farmacêutica Indústria e Comércio Ltda., Brasterápica Indústria Farmacêutica Ltda., Sanus Farmacêutica Ltda. e Blanver Farmoquímica Ltda., dentre outras. O custo de comprimidos de cloridrato de propranolol pode ser considerado baixo, o que o torna um medicamento amplamente receitado por médicos e de fácil acesso da população.

## 2.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

### 2.3.1 Fundamentos básicos

A região espectral do infravermelho compreende a radiação com números de onda no intervalo de, aproximadamente, 12800 a  $10 \text{ cm}^{-1}$ . Este amplo espectro é, normalmente, dividido em 3 partes, que são: infravermelho distante, médio e



próximo. O infravermelho médio, que compreende a região de 650 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , é a região mais usada, tanto para análises quali como quantitativas.<sup>28</sup>

A radiação infravermelho não possui energia suficiente para promover transições eletrônicas como a radiação ultravioleta e visível. A radiação infravermelho esta restrita a espécies moleculares que apresentam pequena diferença de energia entre os diversos estados vibracionais ou rotacionais.<sup>28</sup>

Moléculas que não apresentam variação efetiva no momento dipolar decorrente de vibração ou rotação da mesma, não irão absorver na região do infravermelho. Porém, moléculas que apresentam momentos dipolares, como por exemplo, o cloreto de hidrogênio (o cloro é mais eletronegativo que o hidrogênio), apresentam vibrações. Quando a molécula de cloreto de hidrogênio vibra, uma variação regular do momento dipolar ocorre e interage com o campo elétrico associado à radiação. Se a frequência da radiação coincidir exatamente com a frequência vibracional natural da molécula, ocorre uma transferência de energia efetiva e resulta em uma variação da amplitude da vibração molecular com a correspondente absorção da radiação. Do mesmo modo, a rotação de moléculas assimétricas em torno dos seus centros de massa resulta em uma variação periódica do dipolo que pode interagir com a radiação.<sup>28</sup>

O funcionamento de um espectrômetro de infravermelho é similar ao de outros espectrômetros. Radiação em comprimentos de onda específicos são geradas e essas radiações entram em contato com a amostra que, por sua vez, irá interagir com a radiação incidente, gerando absorções em comprimentos de onda específicos, correspondente ao tipo de composto, ligação e interação existentes na amostra.

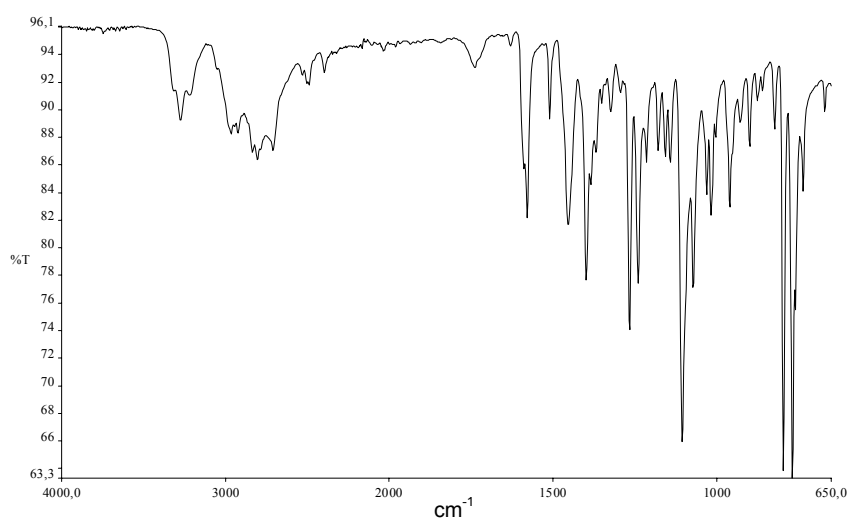
Normalmente, os espectros de infravermelho são registrados em transmitância *versus* número de onda (em  $\text{cm}^{-1}$ ). Atualmente, *softwares* permitem o registro do sinal de maneiras distintas, como, por exemplo, absorbância *versus* comprimento ou número de onda.

A Figura 2 mostra um espectro característico de infravermelho para o cloridrato de propranolol. Podem ser observadas algumas informações da estrutura do cloridrato de propranolol, como por exemplo: o estiramento O—H e

---

<sup>28</sup> Skoog, D. A., *et al.*, *Princípios de Análise Instrumental*, 5º Ed. Artmed Editora, Porto Alegre, 2002, cap. 16

N — H (acima de  $3000\text{ cm}^{-1}$ ), o estiramento C—H dos aromáticos (entre  $3000$  e  $3100\text{ cm}^{-1}$ ), informações sobre as ligações C—H (próximo a  $1500\text{ cm}^{-1}$ ).<sup>27</sup>



**FIGURA 2.** Espectro de infravermelho do cloridrato de propranolol.

Até o início dos anos 1980, a maioria dos espectrômetros de infravermelho era do tipo dispersivo. Porém, este tipo de espectrômetro não é mais comumente utilizado e não será discutido nesta revisão. Os equipamentos sofreram uma drástica mudança, a partir da utilização de espectrômetros de infravermelho com transformada de Fourier. Há diversas vantagens inerentes ao uso de espectrômetros com transformada de Fourier. Dentre elas, a eletrônica atual permite a obtenção de todo o espectro em menos de um segundo. Isso possibilita a realização de várias varreduras diminuindo, assim, a razão sinal-ruído, de acordo com a equação 1, onde  $S_x$  e  $N_x$  são o sinal médio e o ruído, respectivamente, e  $n$  é o número de varreduras.<sup>28</sup> Portanto, com a obtenção de espectros, pode-se realizar várias varreduras a fim de melhorar a razão sinal-ruído.

$$\frac{S}{R} = \sqrt{n} \frac{S_x}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (S_x - S_i)^2}} = \frac{S_x}{N_x} \sqrt{n} \quad (1)$$

<sup>27</sup> Silverstein, R. M., Webster, F. X., *Identificação Espectroscópica de compostos orgânicos*, Ed. LTC, 6ª Ed., Rio de Janeiro, 2000, 67-101

<sup>28</sup> Skoog, D. A., et al., *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª Ed. Artmed Editora, Porto Alegre, 2002, cap. 16

### 2.3.2 Acessório de reflectância total atenuada (ATR)

Em 1961, Fahrenfort<sup>6</sup> descreveu uma nova técnica para obtenção de espectros de infravermelho para compostos orgânicos, a reflectância total atenuada (ATR). Ele propôs, neste mesmo artigo, o uso desta técnica para análises quantitativas, mesmo antes do advento de espectrômetros de infravermelho com Transformada de Fourier.

A espectroscopia com ATR é uma técnica não destrutiva que permite a obtenção de espectros de amostras como sólidos poucos solúveis, filmes, adesivos, pós, pastas entre outros.<sup>28,13</sup>

O funcionamento simples do ATR permite a obtenção de espectros com rapidez, quando comparado ao modo clássico de obtenção de espectros de infravermelho. A montagem básica de um acessório de ATR pode ser vista na Figura 3. O princípio deste tipo de espectroscopia baseia-se no fato de que quando um feixe de radiação, passando de um meio mais denso ( $n_2$  – cristal ATR), transparente ao infravermelho, para um meio menos denso ( $n_1$  – amostra) é refletido. A fração do feixe incidente, que é refletida, aumenta conforme aumenta o ângulo de incidência e, quando excede um determinado ângulo crítico ( $\alpha$ ), a reflexão é completa. No ponto de reflexão, o feixe é atenuado como se penetrasse uma pequena distância dentro da amostra. A profundidade de penetração ( $d_p$ ) é dada pela equação 2.<sup>13</sup>

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \frac{\sqrt{\sin^2 \theta - n_1^2}}{n_2^2}} \quad (2)$$

onde:

$n_2$ : maior índice de refração (cristal ATR);

$n_1$ : menor índice de refração (amostra);

$\theta$ : ângulo de incidência;

$\lambda$ : comprimento de onda da radiação.

<sup>6</sup> Fahrenfort, J., *Spectrochim. Acta* 17 (1961), 698-709

<sup>28</sup> Skoog, D. A., et al., *Princípios de Análise Instrumental*, 5º Ed. Artmed Editora, Porto Alegre, 2002, cap. 16

<sup>13</sup> Harrick, N. J., *Anal. Chem.*, 36, (1964) 188-191

Assim, a profundidade de penetração depende do comprimento de onda, do índice de refração dos dois materiais e do ângulo do feixe em relação a interface. A radiação penetrada é chamada de radiação evanescente e a atenuação da luz ocorre nos comprimentos de onda onde há a absorção. Este fenômeno é chamado de reflectância total atenuada.<sup>28,13,5</sup> Para um ângulo de 45° a penetração é de, normalmente, apenas 4  $\mu\text{m}$ .<sup>15</sup>

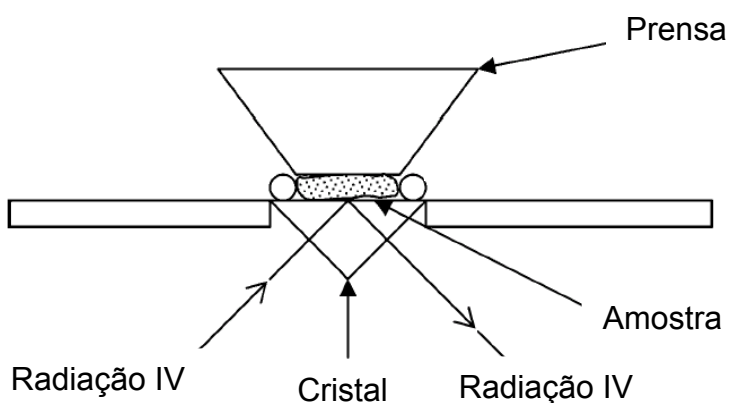


FIGURA 3. Esquema do acessório ATR

O uso deste tipo de acessório facilita e agiliza a obtenção dos espectros, pois a amostra sofre menor pré-tratamento, sendo, para fins quantitativos, somente pesada antes da leitura espectroscópica.

Para o uso com fármacos, o acessório de ATR pode fornecer valiosas informações. É possível determinar a distribuição de diferentes componentes nos comprimidos<sup>5</sup> e, também, se obter informações quantitativas a respeito.

As aplicações da espectroscopia ATR vêm sendo descritas na literatura desde sua primeira publicação.<sup>6</sup>

Armenta *et al.*<sup>1</sup>, desenvolveram um modelo de calibração multivariada utilizando espectroscopia de infravermelho com ATR para acompanhar o processo de fermentação de maçã. Os autores utilizaram apenas uma pequena fração do espectro do infravermelho médio (907 a 1531  $\text{cm}^{-1}$ ) para a construção

<sup>28</sup> Skoog, D. A., *et al.*, *Princípios de Análise Instrumental*, 5º Ed. Artmed Editora, Porto Alegre, 2002, cap. 16

<sup>13</sup> Harrick, N. J., *Anal. Chem.*, 36, (1964) 188-191

<sup>5</sup> Chan, K. L. A., Hammond, S. V., Kazarian, S. G., *Anal. Chem.*, 75 (2003) 2140 – 2146

<sup>15</sup> Hartauer, K. J., Guillory, K., *Pharm. Research*, 6 (1989) 608 – 611

<sup>6</sup> Fahrenfort, J., *Spectrochim. Acta* 17 (1961), 698-709

<sup>1</sup> Armenta, S., *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 545 (2005) 99-106

do modelo e obtiveram resultados satisfatórios para a predição de glicose, frutose, sacarose e etanol (erro máximo relativo de 3,6% para o etanol). A técnica desenvolvida foi considerada muito mais rápida e barata que o método convencional para a determinação de etanol no substrato estudado.

Linker *et al.*<sup>18</sup>, utilizaram FTIR-ATR para a identificação e quantificação direta de nitratos em solos com o uso de métodos quimiométricos e observaram alta correlação entre a concentração de nitratos e os espectros obtidos. Os resultados obtidos apresentaram erros abaixo de 4% para as amostras de solo estudadas.

Peak *et al.*<sup>20</sup> utilizaram FTIR-ATR para verificar a adsorção de ácido bórico em óxido de ferro hidratado em diferentes concentrações, pH e temperaturas. Os autores verificaram as diferentes características do absorção de boro-complexos e evidenciaram que, para cada situação, estes complexos apresentam diferentes comportamentos frente a absorção infravermelho.

Como pode ser visto, a utilização de ATR é vasta e possui várias aplicações. Esta grande variedade de aplicações a torna uma técnica interessante para a pesquisa podendo ser facilmente aplicada a métodos de controle de qualidade das mais distintas indústrias.

## 2.4 QUIMIOMETRIA

A quimiometria pode ser definida como a utilização de métodos matemáticos e estatísticos a dados de origem para a obtenção de informações químicas. Consiste de um conjunto de técnicas de cálculo com o objetivo de promover a obtenção de informação útil de um conjunto complexo de dados, englobando conceitos de planejamento experimental, pré-processamento de dados, estatística e análise multivariada.

Na quimiometria, algumas áreas muito aplicadas atualmente são: 1) calibração multivariada; 2) modelagem estrutura-(re)atividade; 3) reconhecimento de padrões, classificação e análises discriminantes; e 4) monitoramento e modelagem de processos multivariados.<sup>33</sup>

<sup>18</sup> Linker, R., *et al.*, *Chemosphere*, IN PRESS

<sup>20</sup> Peak, D., *et al.*, 67 (2003) 2551-2560

<sup>33</sup> Wold, S., Sjöstrom, M., *Chem. Intell. Lab. Syst.*, 44 (1998) 3-14

Com relação à aplicação em química analítica, a quimiometria permite a obtenção de diversas informações, adicionalmente àquelas que são normalmente obtidas com sistemas convencionais (p. ex, sinais de absorbância, contagens, etc).

As aplicações analíticas da quimiometria são amplas e podem ser aplicadas em associação com diversos equipamentos. Dentre as vantagens oferecidas pela quimiometria está a boa exatidão e precisão nas predições e a rapidez e simplicidade em que os resultados são obtidos.

### **2.4.1 Pré-processamento e pré-tratamento de dados**

Interferências de parâmetros espectrais, como espalhamento de luz, profundidade de penetração da luz, entre outros, são fatores que podem variar de um espectro a outro, mesmo que seja da mesma amostra. Operações matemáticas podem ser utilizadas antes da construção do modelo de calibração multivariada, no intuito de reduzir, eliminar ou padronizar os impactos sobre os espectros.

De acordo com Reich<sup>24</sup>, para a execução de análises qualitativas e quantitativas em infravermelho a aplicação de algum método matemático e/ou estatístico, são necessários para a obtenção de dados importantes e a exclusão de dados desnecessários do espectro.

#### **2.4.1.1 Autoescalamento**

O processo de autoescalamento, como o próprio nome sugere, consiste em padronizar a escala de todas as variáveis para desvio-padrão igual a um.<sup>21</sup> Com isso, assume-se que todas as variações na escala de absorbância, sendo pequenas ou grandes, possuem o mesmo peso para o modelo.

---

<sup>24</sup> Reich, G., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (2005) 1109 – 1143

<sup>21</sup> Pedro, A. M. K., *Dissertação de Mestrado, UNICAMP, 2004*

### 2.4.1.2 Correção de espalhamento de luz

A técnica de correção de espalhamento de luz (MSC, do inglês, *multiplicative scatter correction*) é um processo matemático que visa corrigir o efeito do espalhamento de luz presente nos espectros obtidos por técnicas de reflexão. Nesta técnica, a interferência relativa ao espalhamento de luz é minimizado com base no espalhamento médio de todos os espectros formadores da matriz de dados X.<sup>9</sup>

Medidas espectroscópicas de pó, grãos de diferentes tamanhos, suspensões e outras soluções opacas, freqüentemente, exibem efeitos de espalhamento de luz. Este conceito é especialmente aplicado a espectros de infravermelho mas, também, é relevante para outros tipos de espectrometrias.<sup>30</sup>

### 2.4.1.3 Primeira e segunda derivadas<sup>21</sup>

A inclinação e desvios da linha de base podem ser removidos pela aplicação de derivadas. As linhas de base da curva que apresentam tais características podem ser aproximadas por um modelo linear do tipo.

$$A = a\lambda + b \quad (3)$$

em que a absorbância  $A$  é influenciada por uma inclinação  $a$  e por um termo constante  $b$ , que representa o desvio da linha base. A derivada primeira da expressão acima fornece, então:

$$\frac{dA}{d\lambda} = a \quad (4)$$

e, deste modo, o termo constante  $b$  é removido.

Aplicando-se a derivada segunda sobre a expressão 4 obtém-se, também, a exclusão do termo  $a$ , que representa a inclinação da linha de base:

<sup>9</sup> Ferrão, M. F., Tese de Doutorado, UNICAMP, 2000

<sup>30</sup> Using The Unscrambler, Camo AS, Trondheim, Noruega, 1996

<sup>21</sup> Pedro, A. M. K., Dissertação de Mestrado, UNICAMP, 2004

$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} = 0 \quad (5)$$

A expressão 5 revela que, pela aplicação da segunda derivada, uma completa regularização da linha de base é obtida.

Deve-se observar que os métodos de regularização de linha de base pela aplicação de derivadas, apresentam a desvantagem de diminuir a razão sinal/ruído e, assim, quando espectros apresentam regiões com elevada variação, deve-se realizar um alisamento prévio eficiente.

## 2.5 MODELO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA<sup>11</sup>

A calibração multivariada oferece a possibilidade de análise de dados em espectros com sinais sobrepostos, análise e determinação de simultâneas de constituintes e também a otimização de qualidade para diversos parâmetros.

O método dos mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês, *partial least square*) vem sendo constantemente utilizado no modelamento de dados. Este método pode ser usado na modelagem de sistemas que possuem comportamento linear (PLS-linear) ou não (PLS-polinomial).

O método PLS pode ser dividido, basicamente, em três etapas. A primeira consiste em montar as matrizes de dados X a partir dos dados espectrais (variáveis independentes) e Y a partir das propriedades de interesse (variáveis dependentes). A segunda etapa consiste em eliminar informações que não são relevantes ao sistema, através de combinações lineares das colunas da matriz X feita pela análise das componentes principais (ver seção 2.5.2). A terceira e última etapa consiste em obter-se a relação entre as matrizes X (reduzida pela PCA) e matriz Y que possui a propriedade de interesse.

---

<sup>11</sup> Fidêncio, P. H., Tese de doutorado, UNICAMP, 2001



### 2.5.1 Parâmetros que indicam a qualidade de um modelo multivariado

Alguns parâmetros, calculados com os resultados obtidos pelos modelos, indicam a eficiência do modelo utilizado. Estes parâmetros servem para fazer a escolha e seleção de modelos mais adequados à predição dos parâmetros desejados.

Alguns parâmetros que podem ser adotados como critério de seleções são: o coeficiente de correlação ( $R^2$ ), o número de variáveis latentes, os valores do erro quadrático padrão de validação cruzada (RMSECV), erro quadrático padrão de predição (RMSEP) e o erro padrão de calibração (SEC). Estes parâmetros permitem escolher, com segurança diferentes modelos quanto a capacidade de predição para amostras externas. O RMSECV é calculado segundo a expressão 6, onde  $y_r$  é o valor de referência e  $y_p$  é o valor predito pelo modelo. A mesma expressão matemática serve para calcular o SEC e o RMSEP.

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum (y_r - y_p)^2}{n}} \quad (6)$$

Para o RMSECV, o valor predito é obtido através do modelo construído com todas as amostras menos a amostra predita. Para o RMSEP, os valores de predição são para amostras não contidas no set de calibração. Para o SEC, os valores são preditos após a construção do modelo com todas as amostras, ou seja, o modelo faz a predição para as todas as amostras de calibração de uma única vez.

A análise do valor de  $R^2$  nos mostra a correlação dos pontos da curva de calibração, quanto mais próximo a 1,00 este valor, mais correlacionado estão os valores com a reta obtida.

### 2.5.2 Vantagens no uso de calibração multivariada

Além das vantagens, já descritas na utilização de modelos de calibração multivariada, como o tempo, o custo e a rapidez, a utilização destes modelos pode, após implementação na rotina, tanto industrial como laboratorial, facilitar o acompanhamento de processos.

Estudos podem ser feitos para determinar em qual parte de um processo o maior problema existe. A análise de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Components Analysis*) e a Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA, do inglês, *Hierarchical Components Analysis*) são algoritmos que procuram correlacionar todas as variáveis, a fim de encontrar alguma relação entre elas. Em vista disso, se em alguma linha de produção, se consegue identificar a formação de algum produto indesejável e ele, após o tratamento matemático, encontra-se correlacionado com outro produto no meio da linha de produção, pode-se encontrar uma solução.

Outra vantagem relacionada à utilização de modelos de calibração multivariada no controle de qualidade é, desde que seja um modelo robusto, ele pode ser usado sem a necessidade de calibração contínua, ou seja, a simples certificação de um padrão, pode verificar se o modelo está respondendo bem ao sistema. Essa medida acarreta em um sensível ganho de tempo e diminuição de custos.

Lopes *et al.*<sup>19</sup> realizaram o estudo de acompanhamento do processo de produção por fermentação de um antibiótico por espectroscopia no infravermelho utilizando a análise quimiométrica como ferramenta para localizar problemas em cada etapa do processo de produção. Os autores observaram, dentre outros parâmetros, que é possível com a análise por componentes principais, identificar qual deveria ser o resultado da fermentação. Ademais, os autores concluíram que, após corrigidos os problemas encontrados, houve melhora na qualidade do produto final.

Ražić *et al.*<sup>23</sup> realizaram a determinação de 10 elementos (Cu, Zn, Mn, Fe, K, Ca, Mg, Al e Ba) por espectrometria de absorção e emissão atômica e por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado, em 26 amostras de ervas medicinais. Após os resultados obtidos, os autores realizaram uma análise por componentes principais e conseguiram associar as amostras, com base nos teores de alguns metais, com as possíveis fontes de contaminação.

Em um estudo para analisar o erro de predição dos modelos de calibração multivariada, utilizando-se amostras com concentrações conhecidas de lidocaína,

---

<sup>19</sup> Lopes, J. A., Costa, P. F., Alves, T. P., Menezes, J. C., *Chem. Intell. Lab. Syst.*, 74 (2004) 269 – 275

<sup>23</sup> Ražić, S., Onjia, A., Đogo, S., Slavković, L., Popović, A., *Talanta*, IN PRESS

Wiber *et al.*<sup>31</sup> observaram que a utilização de modelos quimiométricos oferece resultados confiáveis e com rapidez, podendo ser adotado com segurança pelas indústrias farmacêuticas.

Wiberg *et al.*<sup>32</sup> utilizando espectroscopia de fluorescência e calibração multivariada (PLS) determinaram, simultaneamente, albumina e imunoglobina G em amostras sintéticas. Os autores obtiveram RMSEP menor que 2 e RMSEP(%) menor que 8% para um total de 19 amostras.

Ferrão e Davanzo<sup>10</sup> utilizaram modelos de calibração multivariada (PLS) e espectroscopia no infravermelho com reflectância total atenuada para a determinação de cinzas e proteínas em farinhas. Os autores realizaram vários pré-processamentos e os melhores resultados foram encontrados aplicando-se MSC aos dados espectrais.

Sena *et al.*<sup>26</sup>, determinaram diclofenaco na presença de vitaminas B em amostras sintéticas com o uso de espectrometria no ultra/violeta e PLS. Realizou-se a construção de modelos para determinação simultânea de diclofenaco e vitaminas. Os melhores resultados obtidos pelos autores foi em pH 5 com RMSEP de 0,80  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

## 2.6 APLICAÇÃO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA E ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS

O uso da espectroscopia no infravermelho é uma técnica potencialmente rápida, fácil e principalmente, não destrutiva. Por esta razão existe um crescente interesse por parte da indústria farmacêutica por aplicações analíticas da espectroscopia no infravermelho.<sup>12</sup> A espectroscopia no infravermelho encontra várias aplicações qualitativas de determinação de matéria-prima<sup>25</sup> e quantitativas

<sup>31</sup> Wiberg, K., Anderson, M., Hagman, A., Jacobsson, S. P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 859 – 869

<sup>32</sup> Wiberg, K., Sterner-Molin, A., Jacobsson, S. P., *Talanta* 62 (2004) 567 – 574

<sup>10</sup> Ferrão, M. F., Davanzo, C. U., *Anal. Chim. Acta* 540 (2005) 411-415

<sup>26</sup> Sena, M. M., *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 743 – 749

<sup>12</sup> Gottfries, J., *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1495 – 1503

<sup>25</sup> Ryan, J. A., *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9 (1991) 303-310

na análise de compostos com fortes bandas de absorção na região do infravermelho.<sup>29</sup>

Porém, o uso da espectroscopia no infravermelho é mais comumente empregada associada a técnicas de calibração multivariada. Desde a década passada, as técnicas espectroscópicas, combinadas com calibração multivariada, têm sido consideradas promissoras, diretas e relativamente uma alternativa mais barata de determinação de componentes em formulações farmacêuticas, em vista de sua simplicidade e rapidez de análises.<sup>26</sup>

Blanco *et al.*<sup>2</sup> desenvolveram um método para o controle de diferentes etapas na produção de gemfrobozil. Os autores aplicaram PLS para construção dos modelos e predição do conteúdo do princípio ativo na mistura final e observaram um RMSEP menor que 1%.

Krämer e Ebel<sup>16</sup> aplicaram métodos espectroscópicos e quimiométricos para a identificação de excipientes utilizados em produtos farmacêuticos utilizando metodologias de calibração multivariada. Com o uso de MSC e PCA, os autores obtiveram rápida identificação de celulose.

Chalus *et al.*<sup>4</sup> determinaram bromazepan e clonazepan em comprimidos de baixa concentração dos princípios ativos. Os autores testaram vários pré-tratamentos e analisaram os dados de acordo com o RMSEP obtido, encontrando valores aceitáveis e demonstrando a robustez deste procedimento para o controle de qualidade na determinação de princípios ativos em comprimidos, frente à metodologia oficial.

Bunaciu *et al.*<sup>3</sup> determinaram, com o uso de espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada, bucilamina em formulações farmacêuticas em pastilhas de KBr.

Li e Worosila<sup>17</sup> realizaram a quantificação de acetaminofeno, crosprovidona e excipiente (estereato de magnésio) em misturas em pó. Bons coeficientes de correlação e baixos erros (SEC e RMSEP) foram observados pelos autores.

Pöllänen *et al.*<sup>22</sup> acompanharam o processo de cristalização de sulfatiazol para a determinação de polimorfismo do precipitado por ATR-FTIR. O processo

<sup>29</sup> Toraño, J.S., Hattum, S. H. C., *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 532-535

<sup>26</sup> Sena, M. M., *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 743 – 749

<sup>2</sup> Blanco, M., *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 237-246

<sup>16</sup> Krämer, K., Ebel, S., *Anal. Chim. Acta* 420 (2000) 155 - 161

<sup>4</sup> Chalus, P., *et al.*, *Talanta*, 66 (2005) 1294 – 1302

<sup>3</sup> Bunaciu, A. A., *et al.*, *Il Farmaco*, IN PRESS

<sup>17</sup> Li, W., Worosila, G. D., *International J. of Pharmaceutics*, 295 (2005) 213 – 219

---

foi acompanhado por difração de raios-X. Os autores concluíram que a técnica proposta demonstrou-se rápida e precisa alternativa para o acompanhamento *on-line* do processo.

Poucos trabalhos que utilizam a metodologia de aplicação direta em sólidos (por exemplo, comprimidos) em espectroscopia no infravermelho e a determinação quantitativa de algum componente são encontrados na literatura. Dado esta escassez e a perspectiva de um resultado rápido e preciso, estimulou-se o desenvolvimento deste trabalho.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **3.1. INSTRUMENTAÇÃO**

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrômetro com transformada de Fourier Perkin Elmer (mod. Spectrum One, Beaconsfield, Reino Unido) e com dispositivo ATR com cristal de seleneto de zinco. O gás de purga utilizado foi nitrogênio (99,999%, White Martins, Brasil).

Para a determinação da concentração das amostras, adotadas para o modelo de calibração, e para posterior validação utilizou-se um espectrômetro absorção no ultra-violeta e visível Shimadzu (mod. Multispec-1501, Kyoto, Japão), de acordo com a monografia número 143.1 da Farmacopéia Brasileira<sup>8</sup> para comprimidos de cloridrato de propranolol.

Um moinho criogênico Spex Certiprep (mod. 6750 Freezer Mill, Metuchen, EUA), com argônio líquido, foi utilizado para moagem e homogeneização das amostras.

Todas as pesagens foram feitas em uma balança eletro mecânica com resolução de 0,0001 g e tara máxima de 245 g Metler Toledo (mod. AG245, Greifensee, Suíça).

### **3.2. REAGENTES**

A água utilizada foi previamente destilada e deionizada em uma coluna trocadora de íons e purificada em um sistema Milli Q (Millipore, Bedford, USA).

---

<sup>8</sup> FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª Edição, Parte II, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 2002

Para o doseamento segundo a FB<sup>8</sup> utilizou-se metanol de alta pureza (EMD Chemicals Inc., catálogo MX0488-1, Canadá). O cloridrato de propranolol de referência utilizado foi fornecido pela FB (lote 1005), no teor de 100,0%.

### 3.3. MATERIAIS DIVERSOS

Toda vidraria utilizada neste trabalho foi lavada por imersão em HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) por um período de 24 horas e, posteriormente, enxaguada com água e etanol e seca em estufa a 50 °C por 1 hora.

### 3.4. AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste trabalho foram obtidas através de doação da FB e pela compra em farmácias de Santa Maria.

Primeiramente, foi determinado o peso médio dos comprimidos, utilizando-se a metodologia proposta pela FB, que prevê a pesagem de 20 comprimidos.<sup>7</sup>

As amostras foram moídas e homogeneizadas em moinho criogênico em dois ciclos, sendo o pré-congelamento de 40 segundos e a moagem por 2 minutos para cada ciclo.

As dosagens existentes no mercado para o cloridrato de propranolol são de 10, 40 e 80 mg, sendo que, as concentrações de cloridrato de propranolol nas amostras variaram de, aproximadamente, 0,10 a 0,46 mg de cloridrato de propranolol por mg de comprimido, valor este encontrado após a determinação do peso médio e moagem dos comprimidos.

### 3.5. SOFTWARES UTILIZADOS

Utilizou-se para obtenção dos espectros de IV o *software* Spectrum, versão 5.0.1, Copyright<sup>©</sup>, Perkin Elmer Instruments.

<sup>8</sup> FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª Edição, Parte II, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 2002

<sup>7</sup> FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª Edição, Parte I, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 1988

Para a conversão dos dados espectrais para uma linguagem compatível com o The Unscrambler, utilizou-se o *software* Microsoft® Office Excel 2003.

Para os cálculos dos modelos de calibração multivariada, bem como para qualquer operação que utilizasse os dados espectrais, utilizou-se o *software* Pirouette Versão 2.7 (Infometrix Inc., Woodinville, EUA).

### **3.6. PARÂMETROS PARA A OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO**

#### **3.6.1 Otimização dos parâmetros**

Os parâmetros otimizados foram: massa de amostra e número de varreduras.

##### **3.6.1.1 Massa de amostra**

Para a otimização da massa do comprimido para posterior obtenção do espectro, transferiu-se uma quantidade de amostra que fosse suficiente para preencher o espaço no dispositivo de ATR. A massa escolhida foi de 40 mg. Então, foram pesadas massas de amostra (5 replicatas) compreendidas entre 30 e 50 mg para as quais foram obtidos os respectivos espectros de infravermelho. Os espectros foram analisados visualmente no que diz respeito a intensidade de bandas e razão sinal/ruído.

##### **3.6.1.2 Número de varreduras (*scans*)**

Uma vez otimizada a massa de amostra, determinou-se o número de varreduras necessário para uma maior razão sinal ruído. Pesou-se a amostra (total de 5 replicatas) e obteve-se os espectros dessas cinco replicatas, variando-se o número de varreduras de 4 a 64 *scans*. Os espectros foram analisados visualmente com relação a razão sinal/ruído.



### 3.6.1.3 Obtenção dos espectros infravermelho

Pesou-se, exatamente, cerca  $45,0 \pm 2,0$  mg de amostra previamente moída e transferiu-se para o acessório de ATR. Fez-se uma prévia compactação da amostra com uma espátula e posterior compactação com o braço do dispositivo ATR, até que uma força de 100 Gauge fosse aplicada. Em seguida, foram feitos 32 *scans* e a obtenção do espectro IV, desde 650 até  $4000\text{ cm}^{-1}$ . Registrou-se o espectro em absorbância *versus* número de onda. Após a aquisição dos cinco espectros de uma determinada amostra, sempre foi registrado um espectro do *background* para correção da linha base. Os espectros foram salvos em formato ASC para a transferência dos dados ao *software* Excel e posterior confecção da matriz dos dados no *software* de calibração multivariada.

## 3.7. SELEÇÃO DAS REPLICATAS

Para cada amostra foram obtidos 5 espectros e, destes, foram escolhidos 3 espectros mais semelhantes. Para tanto, utilizou-se o algoritmo HCA, disponível no *software* Piroutte, para a escolha dos espectros.

## 3.8. MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Para o desenvolvimento dos modelos de calibração construíram-se duas matrizes:

- uma matriz *x* com 3351 colunas, correspondendo a absorbância para cada número de onda, e 54 linhas, representando cada amostra padrão
- uma segunda matriz *y* com uma coluna, com as concentrações de cloridrato de propranolol obtidas através de espectrometria de ultravioleta e visível e 54 linhas correspondendo aos padrões.

### 3.8.1 Pré-processamento e pré-tratamentos utilizados

Aplicaram-se algumas operações aos dados espectrais para a construção de um modelo capaz de atingir as necessidades propostas para este trabalho. As opções de pré-processamento foram: autoescalamento dos dados e nenhum pré-processamento. Com relação aos pré-tratamentos utilizados, foram escolhidos os seguintes: MSC (do inglês, *Multiplicative Scatter Correction*) para diminuir efeitos do espalhamento de luz durante a obtenção dos espectros e derivadas (primeira e segunda), para a melhora da resolução espectral. Foram testadas as seguintes combinações de pré-processamento e pré-tratamento: 1) dados autoescalados, 2) dados autoescalados com MSC, 3) dados com primeira derivada, 4) dados com segunda derivada, 5) dados brutos, 6) dados com MSC, 7) dados autoescalados com primeira derivada e, 8) dados autoescalados com segunda derivada.

A escolha do melhor pré-processamento e pré-tratamento foi feita em função dos valores de RMSECV e o número de variáveis latentes.

### 3.8.2 Seleção dos números de onda

Com o objetivo de se utilizar no modelo somente as regiões que fossem correlacionadas com o teor de cloridrato de propranolol, foram selecionadas duas regiões no espectro que apresentaram bandas com absorbância significativa: de 2633 até 3572  $\text{cm}^{-1}$  e de 830 até 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Além disso, foi empregado o método de subtração de espectros, que consiste em subtrair os espectros de amostras com concentrações extremas do fármaco analisado e, a partir do perfil resultante, subdividir os espectros em sub-regiões que serão posteriormente empregadas na modelagem.

As regiões mais correlacionadas foram selecionadas de acordo com os valores de RMSECV e número de variáveis latentes.

### 3.8.2.1 Combinação das regiões

Para verificar o sinergismo entre as regiões espectrais, foram realizadas combinações entre as sub-regiões selecionadas anteriormente.

## 3.9. VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO

O procedimento proposto para o *Doseamento de comprimidos de cloridrato de propranolol* encontra-se descrito na FB.<sup>8</sup>

Este método consiste na preparação de uma solução de referência de 0,004% de cloridrato de propranolol. Para os comprimidos comerciais, pesou-se exatamente o correspondente a cerca de 20 mg de cloridrato de propranolol nos comprimidos analisados. Colocou-se o sólido em um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se 10 mL de água e agitou-se, mecanicamente, por 10 minutos. Adicionaram-se 50 mL de metanol e agitou-se mecanicamente por 10 minutos. Após, aferiu-se a 100 mL com metanol. Filtrou-se e diluíram-se 10 mL do filtrado em um balão volumétrico de 100 mL com metanol. Determinou-se a absorvância em 290,0 nm da solução de referência e da solução obtida a partir dos comprimidos. Através das absorvâncias obtidas no comprimento de onda especificado determinou-se a quantidade de cloridrato de propranolol nos comprimidos.

O mesmo procedimento foi utilizado para dosear os comprimidos utilizados como referência para a confecção do modelo de calibração multivariada.

## 3.10. TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

As soluções utilizadas para a validação do procedimento proposto por espectrometria de ultravioleta e visível, que continham metanol como constituinte majoritário, foram bidestiladas para o reuso do metanol (rendimento de aproximadamente, 75%) e o restando foi encaminhado para incineração por uma empresa autorizada.

---

<sup>8</sup> FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª Edição, Parte II, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 2002

---

O cloridrato de propranolol utilizado na obtenção dos espectros de infravermelho foram, após o uso, acondicionados em lugar apropriado e, posteriormente, enviados para estocagem em uma empresa autorizada pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental do Estado do Rio Grande do Sul (UTRESA – Usina de tratamento de resíduos S.A., Central de resíduos industriais – Terminal com reciclagem e aterro de resíduos industriais perigosos, CNPJ: 93441483/0001-40, Estância Velha – RS).

## 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

---

### 4.1. AMOSTRAS DE CLORIDRATO DE PROPRANOLOL

Foram adquiridas 26 amostras de medicamentos à base de cloridrato de propranolol (genérico e similar) na forma de comprimidos e nas dosagens de 10, 40 e 80 mg/comprimido. Ao todo, 10 indústrias foram, através de seus comprimidos, incluídas no estudo: União Química Farmacêutica Nacional S/A, Nature's Plus Farmacêuticas Ltda., EMS Sigma-Pharma, Laboratório Teuto Brasileiro S/A, Royton Química Farmacêutica, Laboratório Neoquímica Indústria Farmacêutica Ltda., Cazi Química Farmacêutica Indústria e Comércio Ltda., Brasterápica Indústria Farmacêutica Ltda., Sanus Farmacêutica Ltda e Blanver Farmoquímica Ltda.

#### 4.1.1 Determinação do peso médios dos comprimidos

Para a determinação da concentração de cloridrato de propranolol por comprimido, foi necessária, num primeiro momento, a obtenção do peso médio de cada lote dos comprimidos. Seguiu-se o procedimentos descrito pela Farmacopéia Brasileira <sup>7</sup>, que consiste na pesagem de 20 comprimidos da amostra em estudo. Após a determinação do peso médio, verificou-se que todas as amostras estavam dentro dos parâmetros limites permitidos pela FB que é de  $\pm 10\%$  para comprimidos com massa menor que 80 mg,  $\pm 7,5\%$  para comprimidos com massa entre 80 e 250 mg e de  $\pm 5\%$  para comprimidos com massa superior a 250 mg.<sup>7</sup> Os pesos médios são necessários para, após obtenção da dosagem

---

<sup>7</sup> FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª Edição, Parte I, Atheneu Editora, São Paulo Ltda, 1988

real do comprimido pelo método oficial, obter-se os valores em mg de cloridrato de propranolol por mg de comprimido que foi o valor utilizado nos modelos de calibração aqui propostos.

#### 4.1.2 Moagem dos comprimidos de cloridrato de propranolol

Os 20 comprimidos pesados, para a obtenção do peso médio de cada amostra, foram moídos em um moinho criogênico até obtenção de um tamanho de partícula menor ou igual a 80  $\mu\text{m}$ . A diminuição do tamanho de partícula é, geralmente, acompanhado pelo aumento da homogeneidade da amostra, que é um aspecto importante na reprodutibilidade dos espectros de infravermelho com reflectância. Quando as amostras foram moídas em gral de ágata, ou seja, com tamanhos de partículas maiores, não se obtinha boa reprodutibilidade dos espectros.

É importante frisar que uma moagem efetiva, como a que foi realizada, só pode ser feita em um moinho criogênico, pois assegura-se que não haja degradação da estrutura do princípio ativo, uma vez que se trabalha em temperaturas próximas a 190 °C negativos.

#### 4.1.3 Armazenamentos das amostras

As amostras, após moagem, foram acondicionadas em frascos de polipropileno de 15 ml em dessecador. Desta forma, diminui-se a possibilidade de interação com a umidade do ar o que, com certeza, seria prejudicial aos resultados, pois fortes bandas de estiramentos O–H podem ser observadas na região acima de 3000  $\text{cm}^{-1}$  e poderiam sobrepor ou intensificar as absorções normais do cloridrato de propranolol.<sup>27</sup>

---

<sup>27</sup> Silverstein, R. M., Webster, F. X., *Identificação Espectroscópica de compostos orgânicos*, Ed. LTC. 6ª Ed., Rio de Janeiro, 2000, 67-101

## 4.2 ESPECTROS DE INFRAVERMELHO

### 4.2.1 Otimização da massa de comprimido moído para obtenção dos espectros infravermelho

Após a realização dos testes (conforme descrito na seção 3.6.1.1), verificou-se que o uso de 45 mg promoveu a obtenção de espectros com uma maior intensidade de bandas espectrais e maior razão sinal/ruído. Portanto, esta massa de amostra foi utilizada na obtenção de todos os espectros de infravermelho deste trabalho, admitindo-se um desvio de 2 mg para mais ou para menos.

### 4.2.2 Otimização do número de varreduras (*scans*)

Observou-se que os espectros obtidos com até 16 *scans* apresentaram baixa razão sinal/ruído. Já os espectros obtidos com 32 e 64 *scans*, apresentaram maior razão sinal/ruído, sendo o número de 32 *scans* adotado como padrão para a obtenção dos espectros de infravermelho. Poder-se-ia empregar 64 *scans*, porém o tempo de aquisição do espectro com o incremento no número de *scans* aumenta em duas vezes, diminuindo a frequência analítica do procedimento.

### 4.2.3 Obtenção das replicatas mais semelhantes

Como pode ser observado na Figura 4 (a e b), a seleção do HCA foi satisfatória, pois permitiu escolher os espectros para todas as amostras, com a formação de um sub-grupo entre as 3 replicatas escolhidas antes de agrupar-se com outra amostra formando, assim, outro grupo. Estes grupos são formados de acordo com semelhanças entre os espectros.

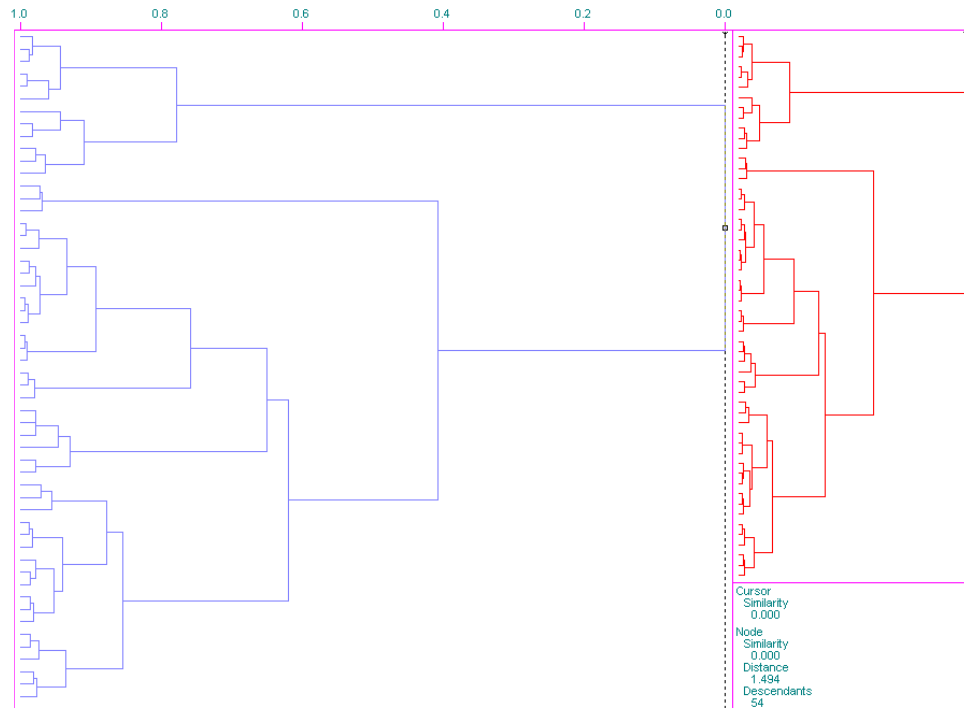


Figura 4.a. Resultado do HCA das amostras após a seleção das triplicatas.

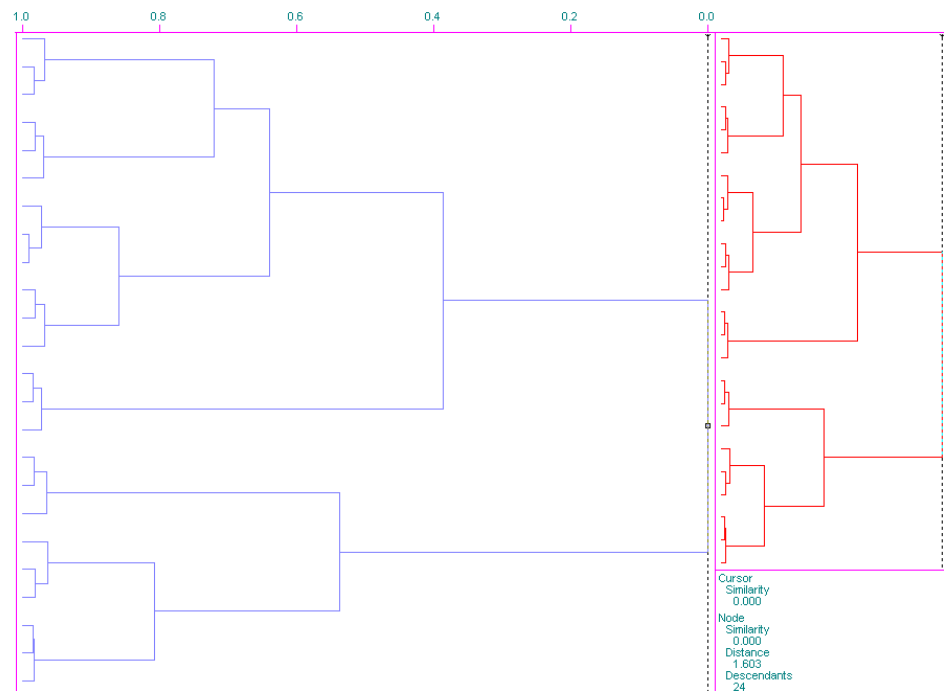


Figura 4.b. Resultado do HCA das amostras após a seleção das triplicatas.

Com a análise dos resultados obtidos pelo HCA, pôde-se escolher, de maneira a distribuir ao máximo os tipos de amostras e grupos, a fim de se ter o



maior número de excipientes diferentes possíveis, as amostras para a confecção dos modelos de calibração. Elegeram-se 18 amostras para o *set* de calibração e 8 para o *set* de validação (amostras externas). Para a escolha das amostras de calibração foi estabelecido, além dos critérios já citados, que as amostras com maior e menor concentração ficassem contidas no *set* de calibração, para evitar que alguma amostra predita pelo modelo estivesse fora da curva de calibração. As replicatas, reprovadas pela análise HCA, foram excluídas das matrizes.

### **4.3 MODELAGEM PARA PREDIÇÃO DAS DOSAGENS DE CLORIDRATO DE PROPRANOLOL EM COMPRIMIDOS**

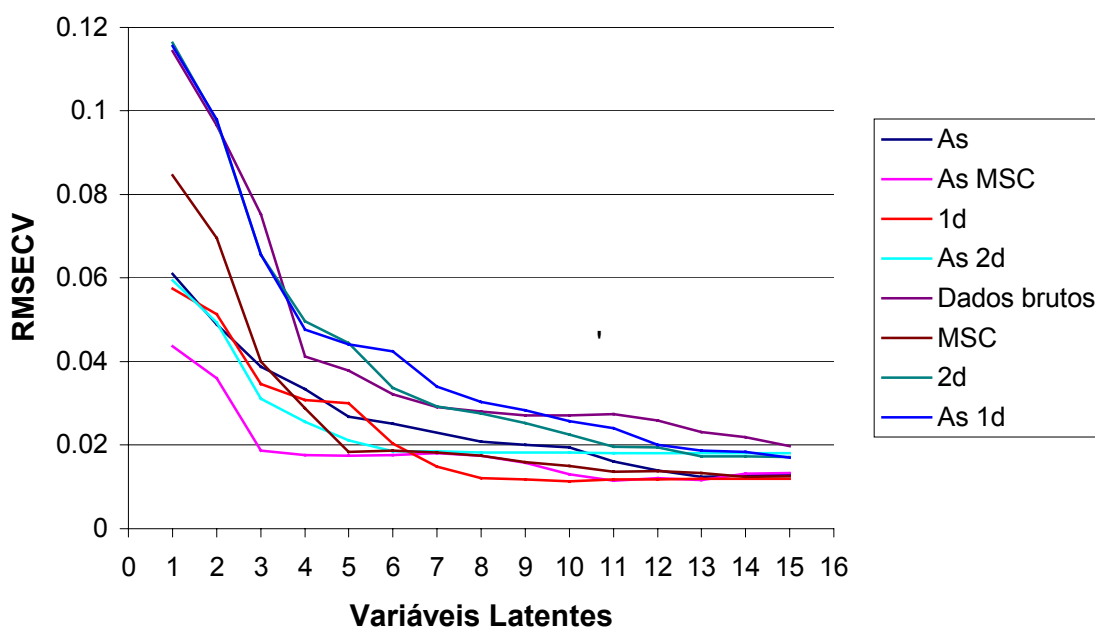
Com os espectros escolhidos pela análise HCA e, depois de feita a escolha das amostras que seriam as presentes no modelo de calibração, partiu-se para as tentativas de construção dos modelos para atender ao problema proposto para este trabalho.

#### **4.3.1 Escolha de pré-processamento e pré-tratamentos utilizados para a construção dos modelos**

Conforme já visto na parte da revisão bibliográfica deste trabalho (seção 2.4.1), o pré-processamento e o pré-tratamento dos dados podem ser excelentes ferramentas para obtenção de resultados satisfatórios na construção de modelos de calibração multivariada para dados espectroscópicos pois, através de tratamentos matemáticos, pode-se eliminar, ou suavizar, efeitos e interferências indesejáveis.

Para os dados deste trabalho, o pré-processamento de autoescalamento e alguns pré-tratamentos foram testados, com a finalidade de obter-se um modelo robusto. Foram testados modelos com: 1) dados autoescalados (As), 2) dados autoescalados com MSC, 3) dados com primeira derivada (1d), 4) dados com segunda derivada (2d), 5) dados brutos, 6) dados com MSC, 7) dados autoescalados com primeira derivada (As 1d) e, 8) dados autoescalados com segunda derivada (As 2d). Estes testes foram realizados com a seleção dos

números de onda onde há absorbância do comprimido de cloridrato de propranolol (de 830 até 1700  $\text{cm}^{-1}$  e de 2633 até 3572  $\text{cm}^{-1}$ ), conforme Figura 2. O resultado pode ser visto na Figura 5, onde analisa-se o RMSECV, ou seja, o erro para a predição das amostras por validação cruzada.



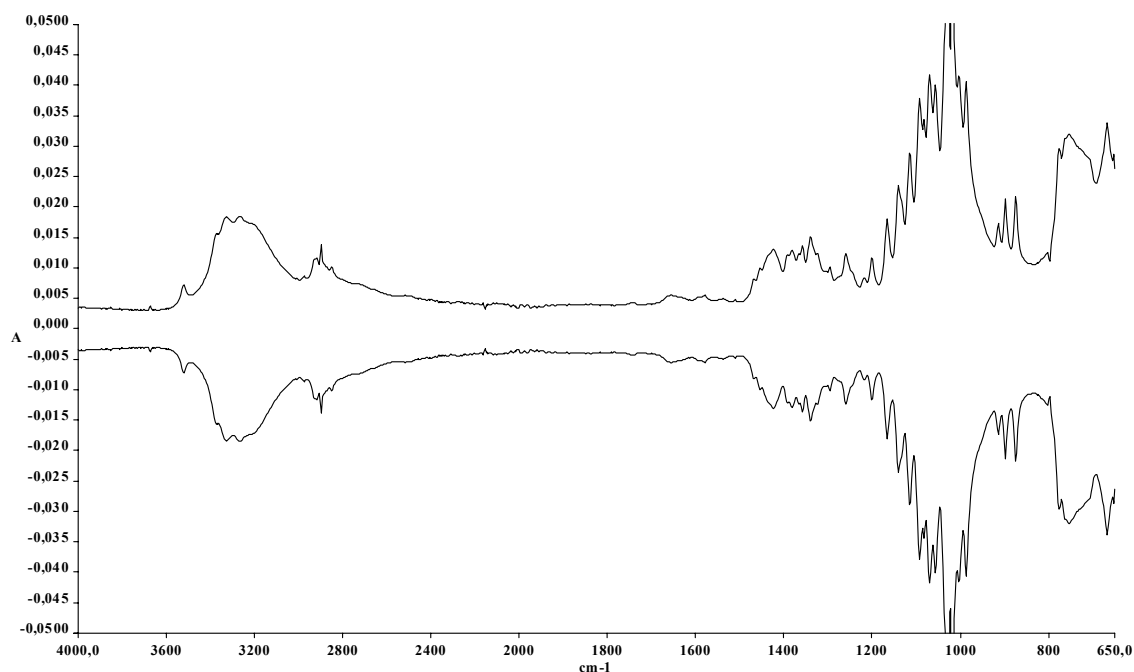
**Figura 5.** Perfil do RMSECV para os testes aplicados

Pode-se observar que os dois modelos que, apresentaram melhores resultados, foram os com MSC autoescalado e o modelo com primeira derivada sem pré-processamento. O modelo com autoescalamento e MSC apresentou baixo valor de RMSECV (em torno de 0,017) quando se utilizou entre 3 e 8 variáveis latentes. O valor de RMSECV diminuiu ainda mais, com um número de variáveis latentes maior ou igual a 10. A partir de 10 variáveis latentes os valores de RSMECV, utilizando-se a primeira derivada ou autoescalamento com MSC, assemelham-se, porém, considerou-se um número muito elevado de variáveis latentes e, portanto, todos os estudos seguintes foram realizados sempre com os dados autoescalados e MSC.

#### 4.3.2 Escolha das regiões internas do espectro para utilização no modelo

Na Figura 6 pode-se observar o perfil do sinal resultante da subtração dos espectros da amostra de cloridrato de propranolol, contendo concentração mínima

e máximo do princípio ativo. Na Tabela 1 encontram-se as regiões escolhidas para os testes de modelagens, estas regiões foram escolhidas nos números de onda onde há diferença entre os espectros.

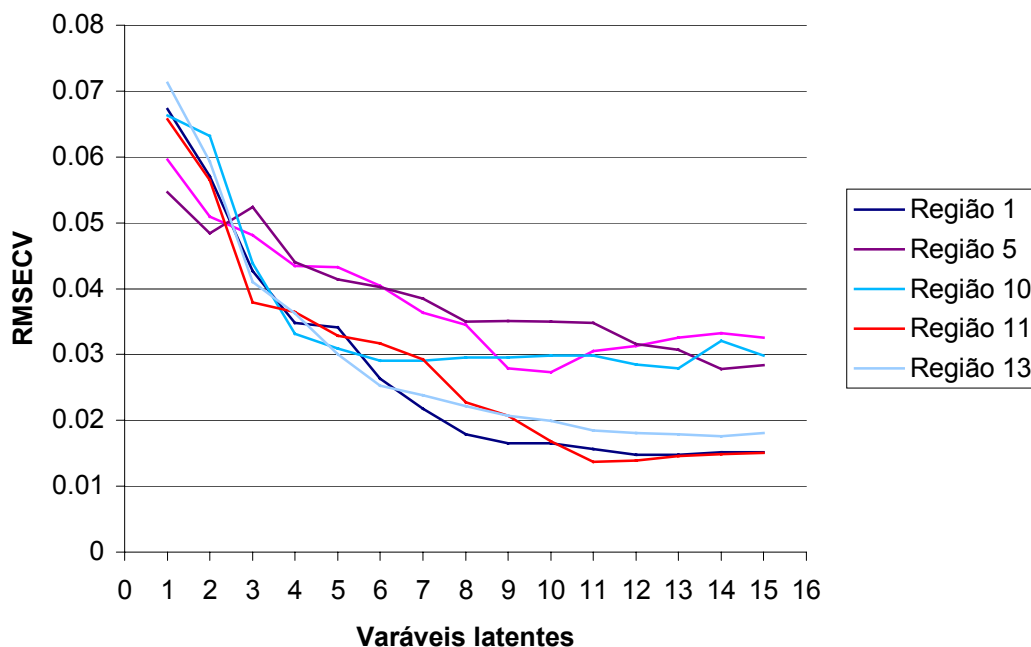


**Figura 6.** Resultado da subtração dos espectros para a escolha das regiões para as modelagens

**Tabela 1.** Regiões definidas pelas análise da subtração dos espectros

Região	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )
Região 1	2984 – 3489
Região 2	2827 – 2983
Região 3	1535 – 1605
Região 4	1492 – 1534
Região 5	1446 – 1491
Região 6	1395 – 1445
Região 7	1275 – 1394
Região 8	1245 – 1274
Região 9	1226 – 1244
Região 10	1184 – 1225
Região 11	1157 – 1183
Região 12	1113 – 1156
Região 13	960 – 1112

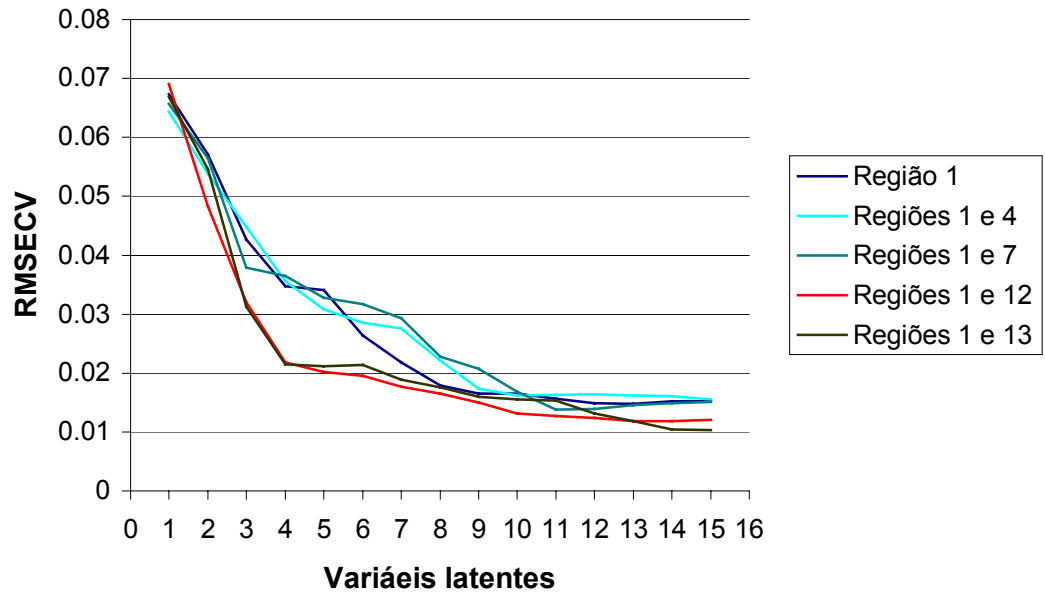
A Figura 7 apresenta o perfil do RMSECV para as cinco melhores regiões mostradas na Tabela 1 para os dados com autoescalamiento e MSC.



**Figura 7.** Perfil do RMSECV para os dados com autoescalamiento e MSC com modelos construídos para as cinco melhores regiões

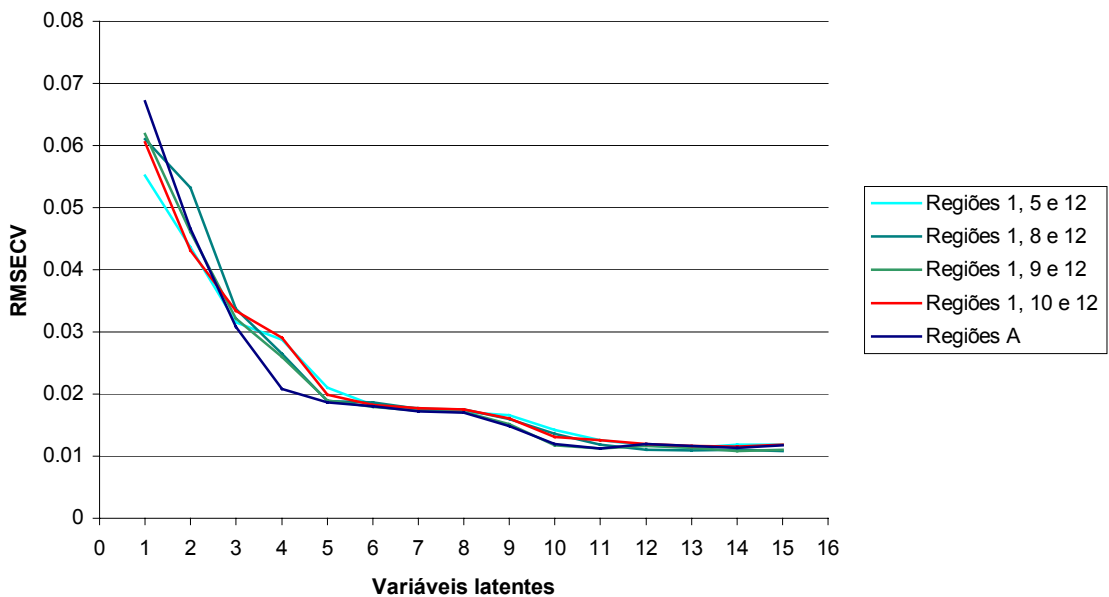
Como pode ser observado, o melhor modelo para os dados autoescalados e com MSC é o que contém os dados da Região 1. Com isso, a Região 1 (com menor valor de RMSECV) foi mantida fixa e adicionou-se a ela cada região em separado, para verificar se ocorria uma melhora significativa no modelo, sempre em relação ao RMSECV.

A Figura 8 mostra os valores de RMSECV para os modelos obtidos combinando-se as Região 1 com as demais. Verifica-se que a combinação da Região 1 com a Região 12, bem como, a combinação da Região 1 com a Região 13, apresentam os menores valores de RMSECV. Porém, a associação 1 e 12 utiliza um número menor de variáveis latentes.



**Figura 8.** Perfil do RMSECV para a associação de duas regiões para as 4 melhores combinações.

Com base neste resultado, partiu-se para uma terceira combinação, agora mantendo-se a Região 1 e a Região 12 fixas, adicionando-se um terceira região.



**Figura 9.** Perfil do RMSECV para a associação de três regiões para as 4 melhores associações.

De acordo com o observado na Figura 9, conclui-se que não há mais uma significativa diminuição do valor do RMSECV com a combinação de 3 regiões em comparação ao valor de RMSECV da Figura 8. Desta maneira, resolveu-se não prosseguir com as associações de regiões, pois presumiu-se que a partir deste

ponto, poderia-se estar agregando ao modelo maior quantidade de dados prejudiciais do que benéficos a ele. Mesmo assim, para os estudos seguintes, o melhor resultado observado na Figura 9 foi levado em consideração, que é a associação das Regiões 1, 8 e 12.

A Tabela 2 mostra os modelos que foram selecionados pelos critérios adotados até o momento, bem como, arbitra um nome para cada modelo.

**Tabela 2.** Modelos selecionados pelo valor de RMSECV e suas respectivas regiões espectrais, pré-processamento e pré-tratamento

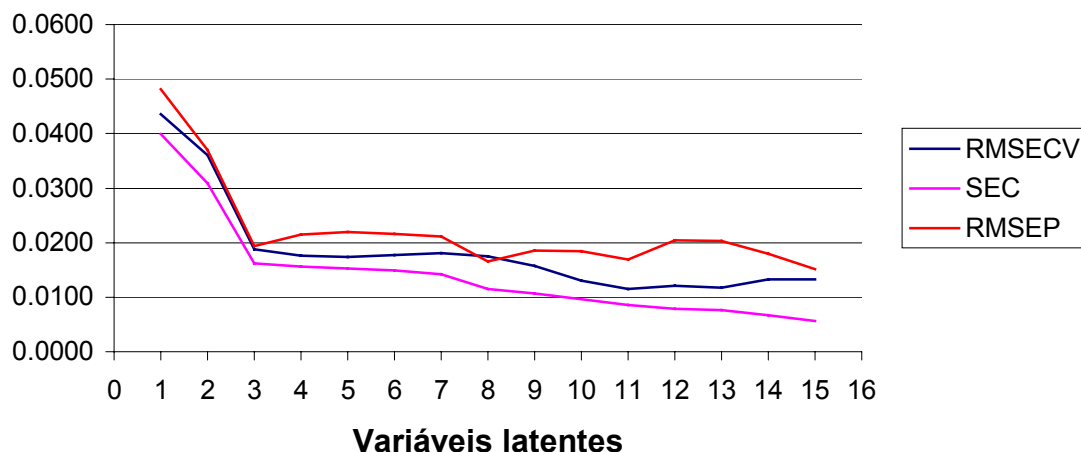
Nome do Modelo	Regiões do espectro	Operação
A	Altos e baixos números de onda	Autoescalamamento e MSC
B	Altos números de onda	Autoescalamamento e MSC
C	Baixos números de onda	Autoescalamamento e MSC
D	Região 1	Autoescalamamento e MSC
E	Regiões 1 e 12	Autoescalamamento e MSC
F	Regiões 1, 8 e 12	Autoescalamamento e MSC

#### 4.3.3 Definição dos melhores modelos e predição de amostras externas

Para a escolha do número de variáveis latentes, necessárias ao modelo para que se tenha boa robustez e capacidade de predição com segurança do valor de concentração para amostras externas, plotou-se os gráficos combinando os valores de RMSECV, o SEC e o RMSEP dos modelos selecionados até o momento, mostrados na Tabela 2. A escolha deve ser feita para regiões onde os valores de RMSECV, SEC e RMSEP estejam próximos e, preferencialmente, com os valores menores possíveis.

Nesta situação, não há risco de se estar supervalorizando os modelos e calibração (overfitting) ou assim adicionando-se ruído aos modelos.

Para os modelos construídos com os números de onda baixos e altos, o gráfico resultante está mostrado na Figura 10. Observa-se que, com 3 e 8 variáveis latentes, o modelo apresenta valores próximos para RMSECV, RMSEP e SEC.



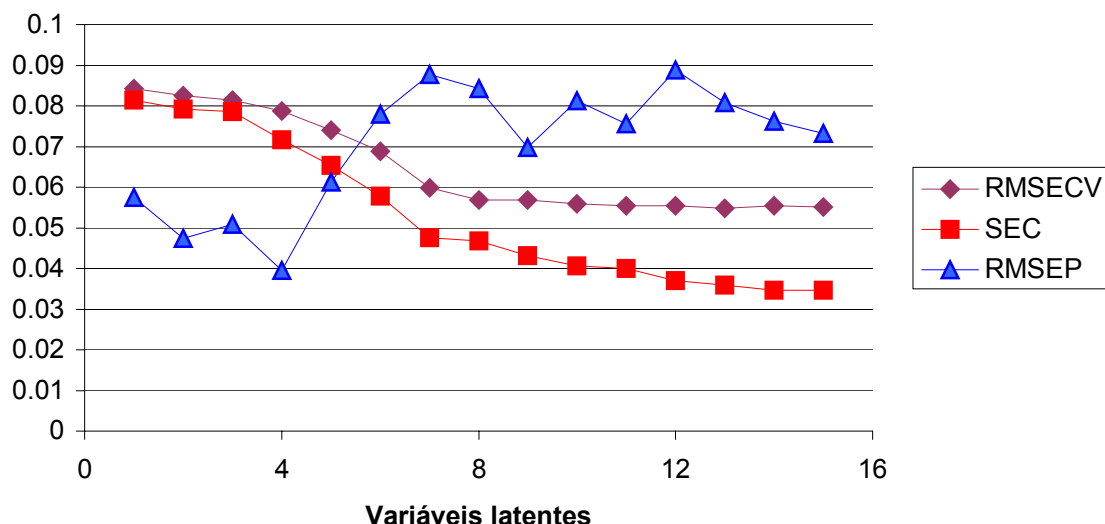
**Figura 10.** Perfil do RMSECV, SEC e RMSEP variando-se o número de variáveis latentes para o modelo A.

Depois de todas as combinações propostas acima, verificaram-se quais seriam as variáveis latentes, necessárias para o melhor desempenho de cada modelo. A Tabela 3 mostra os resultados destes gráficos construídos, mostrando o tipo de pré-processamento, pré-tratamento e a região do espectro utilizado para a construção do modelo.

**Tabela 3.** Seleção do número melhor número de variáveis latentes para cada modelo proposto

Regiões do espectro	Operação	Variáveis latentes
Altos e baixos números de onda	Autoescalamento e MSC	3, 8
Altos números de onda	Autoescalamento e MSC	8, 9
Baixos números de onda	Autoescalamento e MSC	7, 10
Região 1	Autoescalamento e MSC	nenhum
Regiões 1 e 12	Autoescalamento e MSC	4, 5, 8
Regiões 1, 8 e 12	Autoescalamento e MSC	5, 10

Os modelos foram, então, construídos com o número de variáveis latentes para todas as possibilidades acima para a predição das amostras externas, a fim de verificar a habilidade do modelo em determinar a concentração de amostras não presentes no modelo. Para o modelo com uma região apenas (Região 1), não foi encontrada nenhuma variável latente com o perfil esperado, além de se ter valores muito elevados de RMSECV, RMSEP e SEC, conforme Figura 11.



**Figura 11.** Perfil do RMSCEV, SEC e RMSECV para o modelo com a Região 1, autoescalado e MSC.

Como primeiro critério de seleção dos modelos, adotou-se o valor de  $R^2$ , excluindo-se de uma análise mais minuciosa os modelos com  $R^2$  menor que 0,90. A Tabela 4 apresenta os modelos que foram obtidos com  $R^2$  maiores do que 0,90. Este valor de 0,90 foi estipulado para limitar a linearidade do modelo, pois quanto mais linear, melhor e mais confiável será o modelo.

**Tabela 4.** Modelos que apresentaram  $R^2$  maior que 0,90

Modelo	Valor de $R^2$
Altos números de onda, As MSC, 8 VL's	0,9217
Altos números de onda, As MSC, 9 VL's	0,9228
Baixos números de onda, As MSC, 7 VL's	0,9526
Baixos números de onda, As MSC, 10 VL's	0,9780
Regiões 1 e 12, As MSC, 4 VL's	0,9315
Duas regiões msc 5cp	0,9417
Duas regiões msc 8cp	0,9614
Altos e baixos números de onda, As MSC, 3 VL's	0,9495
Altos e baixos números de onda, As MSC, 8 VL's	0,9563
Regiões 1, 8 e 12, As MSC, 10 VL's	0,9801
Regiões 1, 8 e 12, As MSC, 5 VL's	0,9484

Após a seleção dos modelos que apresentaram melhores valores para os coeficientes de correlação, escolheu-se o segundo critério de seleção dos melhores modelos. Como o propósito deste trabalho é obter-se um modelo capaz



de prever amostras de comprimidos de cloridrato de propranolol, independente de seu excipiente, a seleção dos modelos vistos na Tabela 4 foi feita tomando-se por base o valor de RMSEP. Este parâmetro indica o erro padrão de predição para amostras externas ao modelo. Assim, assumiu-se, como limite de seleção o valor de 0,020, ou seja, selecionou-se todos os modelos com valores inferiores a 0,020. O valor de 0,020 foi estipulado arbitrariamente, pois entendeu-se que, a partir deste valor, o erro seria muito elevado para as amostras externas ao modelo. Para os valores mais baixos de concentração da curva, este erro máximo, admitido de 0,020 para o RMSEP, pode representar até 20% de erro. Portanto, deve-se ter uma atenção especial para as amostras com baixa concentração. A Tabela 5 mostra os modelos selecionados por este critério, bem como, os nomes adotados para cada modelo.

**Tabela 5.** Modelos que apresentaram  $R^2$  maior que 0,90 e RMSEP menores que 0,020

Modelo	Valor de RMSEP
Altos e baixos números de onda, As MSC, 3 VL's (modelo A <sub>1</sub> )	0,0199
Altos e baixos números de onda, As MSC, 8 VL's (modelo A <sub>2</sub> )	0,0147
Baixos números de onda, As MSC, 7 VL's (modelo C <sub>1</sub> )	0,0174
Baixos números de onda, As MSC, 10 VL's (modelo C <sub>2</sub> )	0,0167
Regiões 1, 8 e 12, As MSC, 10 VL's (modelo F <sub>1</sub> )	0,0184

Como pôde-se observar com as tabelas acima, somente os modelos A, C e F (utilizando-se algumas das variáveis latentes selecionadas na Tabela 3) mostraram bom desempenho nos parâmetros analisados (RMSEP e  $R^2$ ), sendo estes utilizados para expressar os resultados para a predição de amostras externas.

Uma maneira satisfatória de conferir o resultado de uma previsão para amostras externas em um modelo de calibração multivariada é plotar em um gráfico os valores obtidos pelo método de referência *versus* o valor predito pelo modelo. As Figuras 12, 13, 14, 15 e 16 mostram os correspondentes gráficos para os modelos escolhidos pelo menor valor de RMSECV.

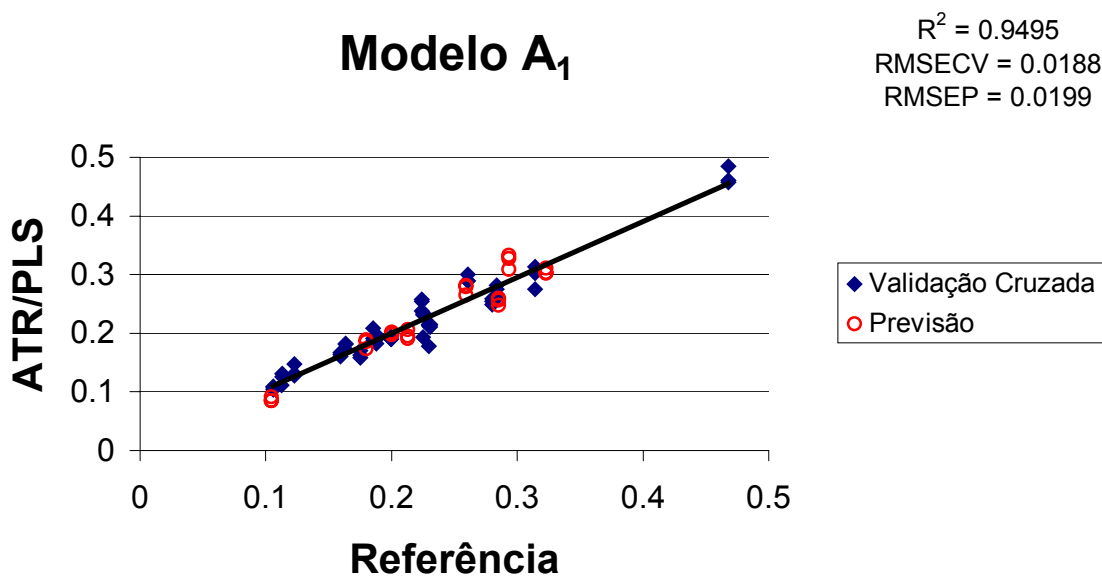


Figura 12. Gráfico com o resultado da predição de amostras externas para o modelo A<sub>1</sub>.

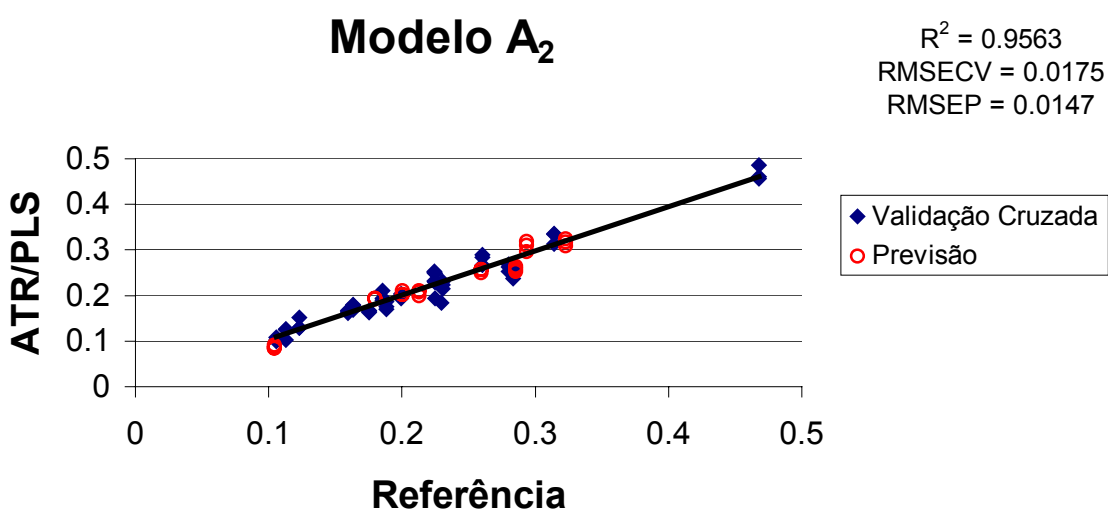


Figura 13. Gráfico com o resultado da predição de amostras externas para o modelo A<sub>2</sub>.

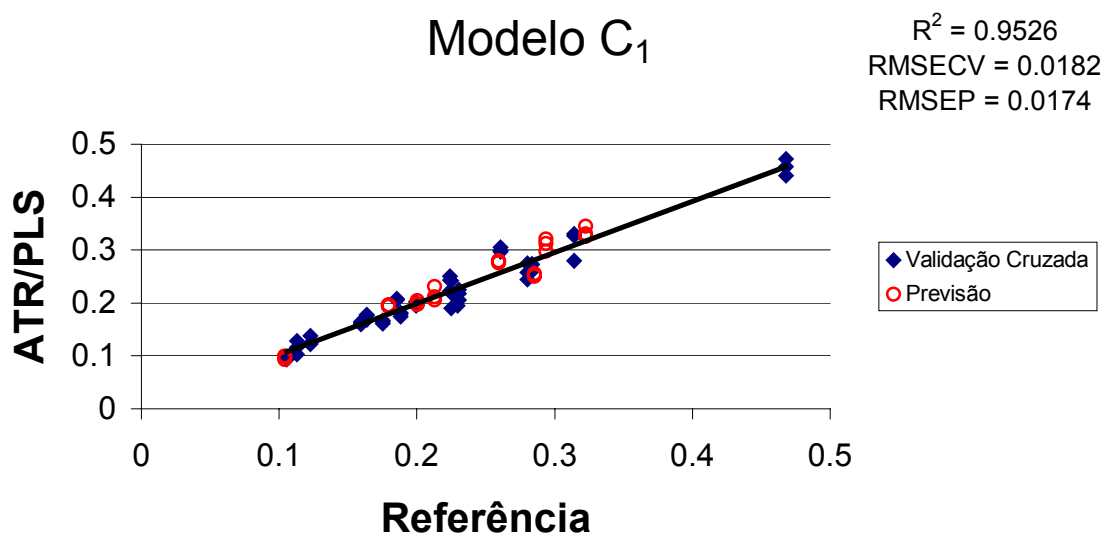


Figura 14. Gráfico com o resultado da predição de amostras externas para o modelo C<sub>1</sub>.

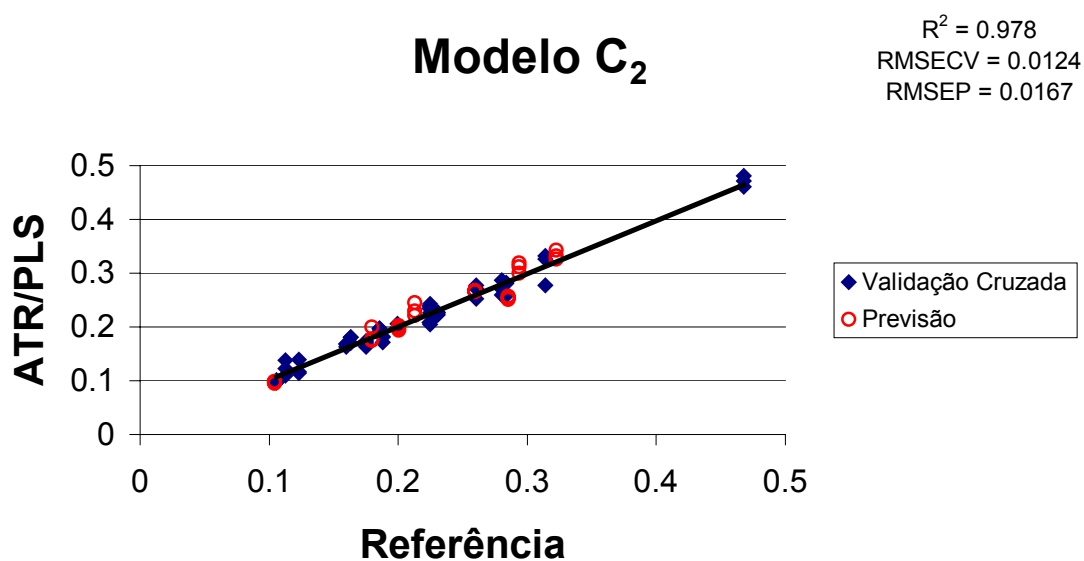
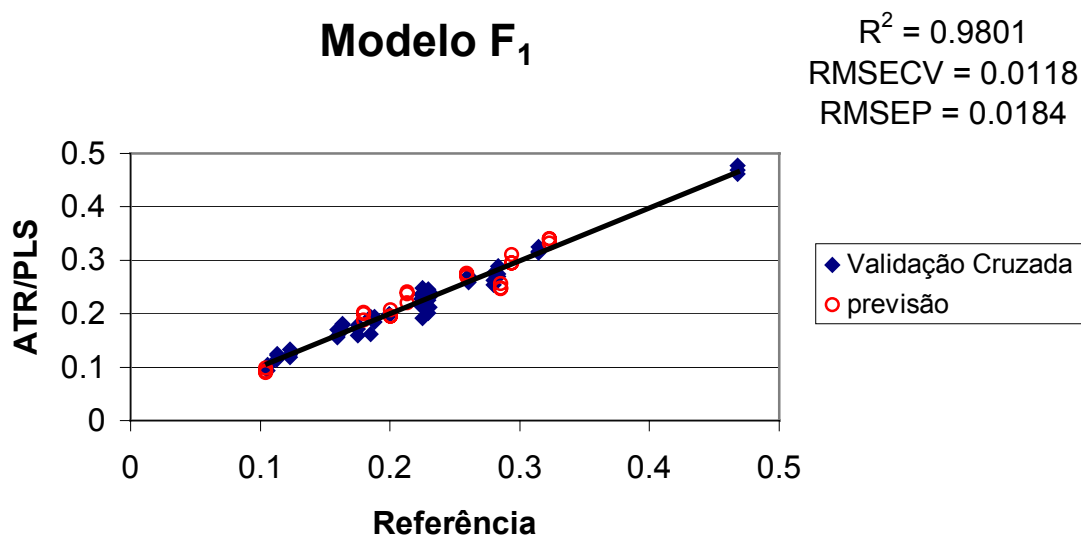


Figura 15. Gráfico com o resultado da predição de amostras externas para o modelo C<sub>2</sub>.



**Figura 16.** Gráfico com o resultado da predição de amostras externas para o modelo F<sub>1</sub>.

Pode-se observar que as curvas obtidas com os valores da metodologia oficial *versus* valores preditos para as amostras de calibração mostram boa correlação. Observa-se, também, que os valores preditos para as amostras do set de validação seguem a tendência de aproximar-se da linha de tendência dos pontos de validação cruzada. Sabendo-se agora, que para os modelos testados tais características (tendência de aproximação da linha de regressão linear) foram encontradas, construiu-se as Tabelas 6, 7, 8, 9 e 10, onde apresentam-se os resultados das predições dos modelos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e F<sub>1</sub>, respectivamente.

**Tabela 6.** Tabela com os resultados de predição do modelo A<sub>1</sub>, n=3

Amostras	Concentração prevista	Concentração (metodologia oficial)	Dosagem prevista	Dosagem (metodologia oficial)	Razão prevista/oficial
1	0,2754 ± 0,0087	0,2592 ± 0,0018	43,60	41,03	1,06
2	0,2761 ± 0,0062	0,2851 ± 0,0015	78,27	80,82	0,97
3	0,1992 ± 0,0023	0,2002 ± 0,0027	39,07	39,27	0,99
4	0,3058 ± 0,0049	0,3226 ± 0,0143	79,14	83,50	0,95
5	0,1831 ± 0,0080	0,1795 ± 0,0116	39,68	38,91	1,02
6	0,0876 ± 0,0040	0,1042 ± 0,0103	8,38	9,97	0,84
7	0,3232 ± 0,0124	0,2935 ± 0,0059	88,75	80,60	1,10
8	0,1974 ± 0,0078	0,2130 ± 0,0033	35,89	38,73	0,93

**Tabela 7.** Tabela com os resultados de predição do modelo A<sub>2</sub>, n=3

Amostras	Concentração prevista	Concentração (metodologia oficial)	Dosagem prevista	Dosagem (metodologia oficial)	Razão prevista/oficial
1	0,2545 ± 0,0042	0,2592 ± 0,0018	40,28	41,03	0,98
2	0,2687 ± 0,0045	0,2851 ± 0,0015	76,17	80,82	0,94
3	0,2054 ± 0,0049	0,2002 ± 0,0027	40,28	39,27	1,03
4	0,3169 ± 0,0075	0,3226 ± 0,0143	82,03	83,50	0,98
5	0,1931 ± 0,0012	0,1795 ± 0,0116	41,87	38,91	1,08
6	0,0872 ± 0,0041	0,1042 ± 0,0103	8,34	9,97	0,84
7	0,3085 ± 0,0113	0,2935 ± 0,0059	84,73	80,60	1,05
8	0,2059 ± 0,0052	0,2130 ± 0,0033	37,43	38,73	0,97

**Tabela 8.** Tabela com os resultados de predição do modelo C<sub>1</sub>, n=3

Amostras	Concentração prevista	Concentração (metodologia oficial)	Dosagem prevista	Dosagem (metodologia oficial)	Razão prevista/oficial
1	0,2783 ± 0,0019	0,2592 ± 0,0018	44,05	41,03	1,07
2	0,2603 ± 0,0026	0,2851 ± 0,0015	73,79	80,82	0,91
3	0,2000 ± 0,0039	0,2002 ± 0,0027	39,22	39,27	1,00
4	0,3338 ± 0,0100	0,3226 ± 0,0143	86,40	83,50	1,03
5	0,1953 ± 0,0011	0,1795 ± 0,0116	42,34	38,91	1,09
6	0,0971 ± 0,0030	0,1042 ± 0,0103	9,29	9,97	0,93
7	0,3105 ± 0,0114	0,2935 ± 0,0059	85,26	80,60	1,06
8	0,2166 ± 0,0134	0,2130 ± 0,0033	39,39	38,73	1,02

**Tabela 9.** Tabela com os resultados de predição do modelo  $C_2$ ,  $n=3$ 

Amostras	Concentração prevista	Concentração (metodologia oficial)	Dosagem prevista	Dosagem (metodologia oficial)	Razão prevista/oficial
1	0,2668 ± 0,0010	0,2592 ± 0,0018	42,24	41,03	1,03
2	0,2596 ± 0,0032	0,2851 ± 0,0015	73,59	80,82	0,91
3	0,1982 ± 0,0038	0,2002 ± 0,0027	38,87	39,27	0,99
4	0,3341 ± 0,0086	0,3226 ± 0,0143	86,47	83,50	1,04
5	0,1838 ± 0,0137	0,1795 ± 0,0116	39,85	38,91	1,02
6	0,0973 ± 0,0014	0,1042 ± 0,0103	9,31	9,97	0,93
7	0,3104 ± 0,0098	0,2935 ± 0,0059	85,23	80,60	1,06
8	0,2322 ± 0,0119	0,2130 ± 0,0033	42,21	38,73	1,09

**Tabela 10.** Tabela com os resultados de predição do modelo  $F_1$ ,  $n=3$ 

Amostras	Concentração prevista	Concentração (metodologia oficial)	Dosagem prevista	Dosagem (metodologia oficial)	Razão prevista/oficial
1	0,2735 ± 0,0035	0,2592 ± 0,0018	43,30	41,03	1,06
2	0,2589 ± 0,0047	0,2851 ± 0,0015	73,39	80,82	0,91
3	0,1997 ± 0,0067	0,2002 ± 0,0027	39,18	39,27	1,00
4	0,3374 ± 0,0047	0,3226 ± 0,0143	87,32	83,50	1,05
5	0,1973 ± 0,0081	0,1795 ± 0,0116	42,77	38,91	1,10
6	0,0952 ± 0,0047	0,1042 ± 0,0103	9,12	9,97	0,91
7	0,2999 ± 0,0088	0,2935 ± 0,0059	82,37	80,60	1,02
8	0,2329 ± 0,0111	0,2130 ± 0,0033	42,35	38,73	1,09

De acordo com o observado nas Tabelas 6, 7, 8, 9 e 10, todos os modelos apresentaram bom desempenho global frente a amostras externas ao modelo. Estes dados podem indicar uma boa robustez do modelo de calibração construído para prever concentrações de cloridrato de propranolol de diferentes concentrações e formulações (excipientes distintos). A amostra 6, em especial, não apresentou bom desempenho para os modelos  $A_1$  e  $A_2$ , mesmo que para o modelo com 8 variáveis (modelo  $A_2$ ) latentes o valor de RMSEP tenha sido o menor observado para todos os modelos. Isso pode ser explicado pelo fato desta amostra ser de baixa concentração, e para esta concentração, os modelos  $A_1$  e

A<sub>2</sub>, não responderem satisfatoriamente, pois os modelos A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> contêm informações a respeito da matriz (excipiente) da amostra 6.

Os valores obtidos nos diversos modelos (razão das metodologias prevista/oficial) foram analisados pela ANOVA, e não apresentaram diferença significativa com um grau de confiança de 95%. A Tabela 11 mostra as médias e os desvios padrões obtidos da razão das metodologias prevista/oficial para os modelos.

Tabela 11. Médias e desvios padrões para dos modelos obtidos

Modelo	Média	Desvio Padrão
A <sub>1</sub>	0,983	0,081
A <sub>2</sub>	0,984	0,074
C <sub>1</sub>	1,014	0,074
C <sub>2</sub>	1,009	0,065
F <sub>1</sub>	1,018	0,062

Pode-se observar, na Tabela 11, que todas as médias aproximam-se de 1. Porém, dados aos valores observados nas Tabelas 6 e 7, pode-se descartar os modelos A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, visto que o modelo não apresentou boa predição para a amostra de baixa concentração (amostra 6). Os demais modelos podem ser considerados equivalentes.

Cabe ressaltar, também, que o limite de tolerância prescrito pela FB<sup>7</sup> é de 10% para mais ou para menos da concentração indicada no rótulo do medicamento e, assim, com a exceção da amostra 6 para os modelos A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, todos os outros comprimidos de cloridrato de propranolol estariam aprovados de acordo com a concentração fornecida pelo modelo de calibração multivariado construído com os espectros de infravermelho.

#### 4.4 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO

Após todas as otimizações feitas, o procedimento foi validado através da metodologia oficial descritos no item *Materiais e Métodos* (3.8). Os valores de concentração encontrados para as amostras que foram utilizadas na construção do modelo de calibração multivariada estão contidas na Tabela 12, e os valores

<sup>7</sup> FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª Edição, Parte I, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 1988

de concentração de cloridrato de propranolol nos comprimidos para as amostras contidas no set de amostras externas estão na Tabela 13. Nas respectivas tabelas também encontra-se o peso médio dos comprimidos, dado necessário para encontrar-se a concentração em mg de cloridrato de propranolol por mg de comprimido.

**Tabela 12.** Concentração, (mg de cloridrato de propranolol por mg de comprimido), peso médio e dosagem dos comprimidos utilizados nos modelos de calibração multivariada

Amostra	Concentração	Peso médio (mg)	Dosagem (mg de cloridrato de propranolol)
1	0,1128 ± 0,0008	201,31	22,71
2	0,1596 ± 0,0017	202,18	32,27
3	0,1753 ± 0,029	201,62	35,35
4	0,1881 ± 0,0022	200,34	37,68
5	0,1994 ± 0,0010	201,08	40,11
6	0,2305 ± 0,0016	202,87	46,76
7	0,2605 ± 0,0028	157,46	41,02
8	0,1057 ± 0,0037	94,70	10,01
9	0,2801 ± 0,0271	279,11	78,17
10	0,1853 ± 0,0016	218,68	40,51
11	0,2241 ± 0,0038	178,36	39,97
12	0,2249 ± 0,0123	366,02	82,33
13	0,3142 ± 0,0122	255,63	80,32
14	0,1228 ± 0,0011	82,98	10,19
15	0,2835 ± 0,0060	141,65	40,15
16	0,4679 ± 0,0024	167,42	78,33
17	0,1986 ± 0,0009	199,03	39,52
18	0,2295 ± 0,0018	171,11	39,26



**Tabela 13.** Concentração (mg de cloridrato de propranolol por mg de comprimido), peso médio e dosagem dos comprimidos utilizados como amostras de validação do modelo

Amostra	Concentração	Peso médio (mg)	Dosagem
			(mg de cloridrato de propranolol)
1	0,2592 ± 0,0018	158,30	41,03
2	0,2851 ± 0,0015	283,47	80,82
3	0,2002 ± 0,0027	196,15	39,27
4	0,3226 ± 0,0143	358,82	83,50
5	0,1795 ± 0,0116	216,77	38,91
6	0,1042 ± 0,0103	95,68	9,97
7	0,2935 ± 0,0059	274,61	80,60
8	0,2130 ± 0,0033	181,82	38,73

#### 4.5 PARÂMETROS DE MÉRITO

Os parâmetros obtidos para os modelos escolhidos estão dispostos na Tabela 14.

**Tabela 14.** Figuras de mérito para os modelos obtidos

Parâmetros	Modelos				
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	F <sub>1</sub>
R <sup>2</sup>	0,9495	0,9563	0,9526	0,9780	0,9801
RMSECV	0,0194	0,01775	0,0182	0,0124	0,0118
RMSEP	0,0199	0,0147	0,0174	0,0167	0,0184

#### 4.6 COMPARAÇÃO DO TRABALHO PROPOSTO À METODOLOGIA OFICIAL

A metodologia proposta neste trabalho deve ser comparada à metodologia oficial descrita na FB para comprimidos de cloridrato de propranolol. O primeiro aspecto que chama a atenção ao custo, visto que a metodologia prevê a utilização de aproximadamente 150 mL de metanol de grau espectroscópico para

cada amostra. O custo atual de metanol nestas características é de aproximadamente R\$ 200,00 o litro. Portanto, a análise para cada amostra custa cerca de R\$ 30,00, e para uma análise feita em triplicada, o custo sobe para R\$ 90,00 (somente levando-se em conta o custo do metanol), muito elevado para obter-se somente um resultado. A metodologia proposta neste trabalho prevê apenas a pesagem do comprimido moído.

Um segundo aspecto importante na comparação entre as duas metodologias propostas é em relação ao tempo necessário de análise. Pela metodologia proposta, requer-se em média, uma hora de análise por amostra, realizando-se o experimento em triplicata. Já pela metodologia proposta, em aproximadamente 7 minutos se obtém o resultado da análise, mesmo após a obtenção de 5 espectros e seleção por HCA das 3 mais semelhantes e predizendo no modelo. Portanto, ganha-se uma frequência analítica de mais de 6 vezes. Esta alta rapidez, atualmente, é de grande importância, dados os aspectos exposto na introdução deste trabalho. É possível, que no futuro, sejam utilizados sondas de infravermelho, o que agilizaria ainda mais a obtenção dos resultados. Porém, acredita-se que a metodologia proposta é uma excelente ferramenta para o acompanhamento da produção. Entretanto, deve-se, com uma frequência programada, verificar o desempenho do modelo com relação à metodologia oficial.

Outro ponto que merece comparação é em relação à geração de resíduos da técnica proposta, que é desprezível, pois a técnica ATR/FT-IR é uma técnica não destrutiva. Em contrapartida, com a metodologia oficial há uma grande geração de resíduos.

## 5. CONCLUSÃO

---

Os modelos desenvolvidos neste trabalho, para o doseamento de comprimidos de cloridrato de propranolol, foram aptos para o controle de qualidade destes. Aspectos importantes como massa de amostra, tamanhos de partículas e números de *scans* foram averiguados e observou-se que são cruciais para a reprodutibilidade dos espectros.

Para a grande maioria das amostras, as predições nos modelos estudados apresentaram concordância maiores que 90% em comparação ao método oficial, o que mostra a possível aplicação do procedimento proposto para o controle de qualidade de comprimidos de cloridrato de propranolol.

Observou-se, também, a necessidade do autoescalamento (como pré-processamento) e da aplicação de MSC (como pré-tratamento dos dados) pois, nestas condições, os modelos apresentaram melhores coeficientes de correlação e menores erros (RMSECV e RMSEP).

Os dados obtidos para as predições, imaginando-se a aplicação para o controle de qualidade em uma indústria farmacêutica, seriam aprovados, assim como os valores obtidos pelo método oficial.

A metodologia proposta é, substancialmente, menos onerosa que a metodologia oficial, além de necessitar de menor tempo de operação, bem como, mais fácil manuseio das amostras.

Outro aspecto importante deste trabalho é a geração mínima de resíduos visto que, para todo o processo, não foi necessário o uso de solventes para solubilização/diluição das amostras a serem analisadas.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

---

A partir deste trabalho, as seguintes sugestões podem ser elencadas para futuros testes empregando-se metodologias semelhantes:

- Construção de modelos com a granulometria do pó produzido pela indústria, pois se assemelharia às condições de obtenção dos comprimidos industrialmente.
- Realizarem-se trocas no *set* de amostras do modelo de calibração por algumas do *set* de validação, procurando-se resultados ainda mais precisos, visando a prevenir eventuais diferenças causadas pela composição (excipientes) dos padrões e amostras de validação.
- Avaliar os dados com o pré-tratamento com primeira derivada que, para este, foram excluídos, pois é possível que com o agrupamento de regiões com este pré-tratamento, possa-se obter resultados satisfatórios.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Armenta, S., Garrigues, S., de la Guardia, M., Rondeau, P., Attenuated Total Reflection-Fourier transform infrared analysis of the fermentation process of pineapple, *Anal. Chim. Acta* 545 (2005) 99-106
2. Blanco, M., Coello, J., Eustaquio, A., Iturriaga, H., MasPOCH, S., Analytical control of pharmaceutical production steps by near infrared reflectance spectroscopy, *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 237-246
3. Bunaciu, A. A., Aboul-Enein, H. Y., Fleschin, Ş., Quantitative analysis of buccillamine and its pharmaceutical formulation using FT-IR spectroscopy, *Il Farmaco*, IN PRESS
4. Chalus, P., Roggo, Y., Walter, S., Ulmschneider, M., Near-infrared determination of active substance content in intact low-dosage tablets, *Talanta*, 66 (2005) 1294 – 1302
5. Chan, K. L. A., Hammond, S. V., Kazarian, S. G., Applications of attenuated total reflection infrared spectroscopic imaging to pharmaceutical formulations, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 2140 – 2146
6. Fahrenfort, J., Attenuated total reflectance, a new principle for production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds, *Spectrochim. Acta* 17 (1961), 698-709
7. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª Edição, Parte I, Atheneu Editora, São Paulo Ltda, 1988

8. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4<sup>a</sup> Edição, Parte II, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 2002
9. Ferrão, M. F., Aplicação de técnicas espectroscópicas de reflexão no infravermelho no controle de qualidade de farinha de trigo, Tese de Doutorado, UNICAMP, 2000
10. 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
11. Fidêncio, P. H., Análise de solos por espectroscopia no infravermelho próximo e aplicação de métodos quimiométricos, Tese de doutorado, UNICAMP, 2001
12. 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 metoprolol tablets: a comparison between transmission and diffuse reflectance near-infrared spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1495 – 1503
13. Harrick, N. J., Multiple reflection cells for internal reflection spectrometry, *Anal. Chem.*, 36, (1964) 188-191
14. Harris, D. C., *Análise Química Quantitativa*, 5<sup>a</sup> Ed., LTC Editora, Rio de Janeiro, 2001, p. 126
15. Hartauer, K. J., Guillory, K., Quantitative Fourier transform-infrared/attenuated total reflectance (FT-IR/ATR) analysis of trimethoprim and sulfamethoxazole in a pharmaceutical formulation using partial least squares, *Pharm. Research*, 6 (1989) 608 – 611
16. Krämer, K., Ebel, S., Application of NIR reflectance spectroscopy for the identification of pharmaceutical excipients, *Anal. Chim. Acta* 420 (2000) 155 – 161
17. Li, W., Worosila, G. D., Quantitation of active pharmaceutical ingredients and excipients in powder blends using designed multivariate calibration

- models by near-infrared spectroscopy, *International J. of Pharmaceutics*, 295 (2005) 213 – 219
18. Linker, R., Shmulevich, I., Kenny, A., Shaviv, A., Soil identification and chemometrics for direct determination of nitrate in soils using FTIR-ATR mid-infrared spectroscopy, *Chemosphere*, IN PRESS
19. Lopes, J. A., Costa, P. F., Alves, T. P., Menezes, J. C., Chemometrics in bioprocess engineering: process analytical technology (PAT) applications, *Chem. Intell. Lab. Syst.*, 74 (2004) 269 – 275
20. Peak, D., Luther, G. W., Sparks, D. L., ATR-FTIR spectroscopic studies of boric acid adsorption on hydrous ferric oxide, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67 (2003) 2551-2560
21. Pedro, A. M. K., Determinação simultânea e não destrutiva de sólidos totais e solúveis, licopeno e beta-caroteno em produtos de tomate por espectroscopia no infravermelho próximo utilizando calibração multivariada, *Dissertação de Mestrado, UNICAMP*, 2004
22. Pöllänen, K., Häkkinen, A., Reinikainen, S., Rantanen, J., Karjalainen, M., Louhi-Kultanen, M., Nyström, L., Infrared spectroscopy together with multivariate data analysis as a process analytical tool for in-line monitoring of crystallization process and solid-state analysis of crystalline product, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 275 – 284
23. Ražić, S., Onjia, A., Đogo, S., Slavković, L., Popović, A., Determination of metal content in some herbal drugs – Empirical and chemometric approach, *Talanta*, IN PRESS
24. Reich, G., Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceuticals applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (2005) 1109 – 1143
25. Ryan, J. A., Compton, S. V., Brooks, M.A., Compton, D.A. C., Rapid verification of identity and content of drug formulations using mid-infrared spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9 (1991) 303-310

- 
26. Sena, M. M., Chaudhry, Z. F., Carol H. 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
27. Silverstein, R. M., Webster, F. X., Identificação Espectroscópica de compostos orgânicos, Ed. LTC. 6ª Ed., Rio de Janeiro, 2000, 67-101
28. Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., *Princípios de Análise Instrumental*, 5º Ed. Artmed Editora, Porto Alegre, 2002, cap. 16
29. Toraño, J.S., Hattum, S. H. C., Quantitative analysis of active compounds in pharmaceuticals preparations by use of attenuated total-reflection Fourier transform mid-infrared spectrophotometry and the internal standard method, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 532-535
30. Using The Unscrambler, Camo AS, Trondheim , Noruega, 1996
31. Wiberg, K., Anderson, M., Hagman, A., Jacobsson, S. P., Use of control sample for estimation of prediction error in multivariate determination of lidocaine with non-column chromatographic diode array UV spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 859 – 869
32. Wiberg, K., Sterner-Molin, A., Jacobsson, S. P., Simultaneous determination of albumin and immunoglobulin G with fluorescence spectroscopy and multivariate calibration, *Talanta* 62 (2004) 567 – 574
33. Wold, S., Sjöström, M., Chemometric, present and future success, *Chem. Intell. Lab. Syst.*, 44 (1998) 3-14