



1150060817



IQ

T/UNICAMP Se55a

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
LAQQA – Laboratório de Quimiometria em Química Analítica



UNICAMP

**APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS DE
PRIMEIRA E SEGUNDA ORDEM NA DETERMINAÇÃO
DIRETA DE FÁRMACOS POR ESPECTROSCOPIA
MOLECULAR**

Tese de Doutorado

MARCELO MARTINS DE SENA

Orientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi

Campinas

Maio de 2004

UNIDADE	<u>IQ</u>
Nº CHAMADA	<u>11/UNICAMP</u>
	<u>Se55a</u>
V	EX
TOMBO BCI	<u>608217</u>
PROC.	<u>16-227-04</u>
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	<u>11,00</u>
DATA	<u>18-11-04</u>
Nº CPD	

B.I.A 332458

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

Se55a	<p>Sena, Marcelo Martins de. Aplicação de métodos quimiométricos de primeira e segunda ordem na determinação direta de fármacos por espectroscopia molecular / Marcelo Martins de Sena. -- Campinas, SP: [s.n], 2004.</p> <p align="center">Orientador: Ronei Jesus Poppi.</p> <p align="center">Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p align="center">1. PARAFAC. 2. PLS. 3. Espectrofotometria no UV. 4. Espectrofluorimetria. I. Poppi, Ronei Jesus. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.</p>
-------	---

“A ciência tem raízes na interpretação criativa. Os números sugerem, limitam, refutam, mas, por si sós, não especificam o conteúdo das teorias científicas. Estas são constituídas sobre a base da interpretação desses números, e os que interpretam são com freqüência aprisionados pela sua própria retórica. Estão convencidos de sua própria objetividade e são incapazes de discernir o preconceito que os leva a escolher apenas uma das muitas interpretações que seus números admitem.”

Stephen Jay Gould, em *A Falsa Medida do Homem*

(sobre a história de alguns métodos estatísticos multivariados, como a PCA, que encontraram suas primeiras aplicações a serviço do racismo científico, no começo do século XX)

“Uma tese serve, sobretudo, para ensinar a coordenar idéias, independentemente do tema tratado.”

Umberto Eco, em *Como se Faz uma Tese*

Aos meus pais, Leonídeo e Lídia, pelo amor, pelo
apoio e por sempre terem acreditado em mim.
À minha mãe, Maria Gabriela (*in memoriam*).

À Cristina, pelos dois últimos anos e pelas
muitas viagens que ainda virão.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Ronei J. Poppi, pela amizade, profissionalismo, conhecimento transmitido e paciência ao longo desses anos.
- Aos companheiros do LAQQA pelo ótimo ambiente de trabalho e pelas importantes discussões: Cleidiane, Eduardo, Rosângela, Paulo Fidêncio, Paulo Augusto, Jaqueline, Sílvio, Fernando, Leoberto, Alessandra, Waldomiro, Gilmare, Luciana, Rose e Joana. Em especial a Jez Willian, pelas discussões e sugestões sobre Figuras de Mérito, utilizadas no Capítulo 5, e a Marcello Trevisan, pelas discussões sobre a aplicação de métodos de segunda ordem em espectrofluorimetria, tema do Capítulo 6.
- A Júlio C. B. Fernandes, pelas idéias, discussões e colaboração no trabalho que resultou no Capítulo 3 desta tese.
- A Zahra Chaudhry do LABCROM (Laboratório de Cromatografia Líquida do IQ/UNICAMP), pelas análises cromatográficas (Capítulo 5).
- A Luíz Severo e a Regina do Laboratório de Toxicologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pelo fornecimento dos padrões de tiamina e de piridoxina.
- Ao Hemocentro da Unicamp, pelo fornecimento das amostras de plasma humano.
- Ao projeto PADCT-Graduação/CNPq nº 01-QEQ-01/97-03/01-45, pela aquisição do Espectrofluorímetro Perkin Elmer LS55, usado na aplicação do Capítulo 6 desta tese.
- A Cláudia Martelli, técnica do Laboratório de Espectroscopia, e a Mauro Stancato, técnico do Laboratório de Ensino LQ01, pela ajuda e pelo apoio.

- Aos funcionários da Comissão de Pós-Graduação do IQ: Bel, André, Rodrigo e Celi, pelo profissionalismo e competência.
- Ao Dr. Steeve Gurden, pelo excelente curso sobre análise de dados multidimensionais, ministrado em fevereiro de 2002, no IQ-UNICAMP.
- Ao Dr. Rasmus Bro (Food Technology, Copenhage), pela elaboração e disponibilização das rotinas contidas no “The N-way Toolbox for Matlab”, sem o qual esta tese não teria sido possível.
- À Dra. Rosa T. S. Frighetto da EMBRAPA Meio-Ambiente, Jaguariúna/SP, pela colaboração nas análises dos dados de solos, que, embora não tenham feito parte desta tese, representaram importante aprendizado e troca de conhecimento.
- Aos meus ex-alunos das turmas de formandos de 2001 e 2002 do Curso de Licenciatura em Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras (FAFIG) de Guaxupé/MG, pela oportunidade de aprendizado, fundamental para a minha carreira docente.
- A Édson e Marco Brandão, companheiros de docência e de luta na FAFIG.
- A Fabiana A. L. Ribeiro, pela leitura crítica desta tese e pela grande amizade.
- Aos amigos e amigas que estiveram por perto durante o período deste trabalho: Marcos e Marisa, Ane e Steeve, Daniela e Deniz, Charles e Roberta Graf, Roberta Ziolli e Mário, Renata, Janaína, Patrícia, Adriana, Edna, Andréia Graf, Silvana, Marcelo Herbst, Jez, Aluizio, Rogério e Aline.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento deste projeto.
- Ao Instituto de Química da UNICAMP, por propiciar toda a infra-estrutura necessária à execução desta tese.

CURRICULUM VITAE

1. Dados Pessoais:

Nome: Marcelo Martins de Sena
Nascimento: 28/04/1969, Santos/SP, Brasil
E-mail: marcsen@iqm.unicamp.br

2. Formação Acadêmica

- 2.1. Doutorado em Química (área de concentração em química analítica)
Universidade Estadual de Campinas, 2004.
Título: Aplicação de Métodos Quimiométricos de Primeira e Segunda Ordem na Determinação Direta de Fármacos por Espectroscopia Molecular.
- 2.2. Mestrado em Química Analítica
Universidade Estadual de Campinas, 1996.
Título: Aplicação de Métodos Quimiométricos na Especificação de Cr(VI) em Solução Aquosa.
- 2.3. Graduação: Bacharel em Química Tecnológica
Universidade Estadual de Campinas, 1993.

3. Atuação Profissional

- 3.1. Professor Concursado – Nível Superior
Universidade Estadual de Goiás (UEG), Campus de Anápolis, 2004.
Professor em tempo integral (40 h/semana)
Disciplinas: Química Analítica Quantitativa e Química Analítica Experimental II.
- 3.2. Professor Celetista – Nível Superior
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Guaxupé/MG (FAFIG), 2001.
Professor em tempo parcial (20 h/semana), sendo 11 h/semana dedicadas à docência e 9 h/semana dedicadas a outras atividades, incluindo Elaboração de Projeto Pedagógico, Coordenação de Curso e Orientação de Iniciação Científica.
Disciplinas: Química Analítica I, Química Analítica II e Físico-Química I.
- 3.3. Professor Curso Pré-Vestibular
Cooperativa do Saber, Campinas/SP, 2001 ao 1º semestre de 2003.
Professor de Química, cooperado.
- 3.4. Professor Curso Pré-Vestibular
Cursinho Pré-Vestibular da Moradia dos Estudantes da UNICAMP, Campinas/SP, 2000.
Professor de Química, trabalho voluntário sem vínculo empregatício.

4. Homenagens

- 4.1. Professor homenageado, Formandos de Química da FAFIG/Guaxupé, 2002.
- 4.2. Professor homenageado, Formandos de Química da FAFIG/Guaxupé, 2001.

5. Publicações: Periódicos Científicos

- 5.1. MM Sena, MG Trevisan, RJ Poppi, "Combining standard addition method and second-order advantage for direct determination of salicylate in human plasma by spectrofluorimetry", *Analyst*, artigo submetido.
- 5.2. MM Sena, ZF Chaudhry, CH Collins, RJ Poppi, "Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, artigo submetido.

- 5.3. MM Sena, RJ Poppi, "N-way PLS applied to simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34:27 (2004).
- 5.4. ER Pereira-Filho, MM Sena, MAS Arruda, RJ Poppi, "Exploratory analysis of L'vov platform surfaces for electrothermal atomic absorption spectrometry by using three-way chemometric tools", *Anal. Chim. Acta* 495:177 (2003).
- 5.5. MM Sena, RTS Frighetto, PJ Valarini, H Tokeshi, RJ Poppi, "Discrimination of management effects on soil parameters by using principal component analysis: a multivariate analysis case study", *Soil Till. Res.* 67:171 (2002).
- 5.6. MM Sena, CH Collins, KE Collins, IS Scarminio, "Aplicação de métodos quimiométricos na especiação de cromo(VI) em solução aquosa", *Quím. Nova* 24:331 (2001).
- 5.7. MM Sena, JCB Fernandes, L Rover Jr, RJ Poppi, LT Kubota, "Application of two and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid mixtures using ultraviolet spectrophotometry", *Anal. Chim. Acta* 409:159 (2000).
- 5.8. MM Sena, RJ Poppi, RTS Frighetto, PJ Valarini, "Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos", *Quím. Nova* 23:547 (2000).
- 5.9. MM Sena, IS Scarminio, KE Collins, CH Collins, "Speciation of aqueous chromium(VI) solutions with the aid of Q-mode factor analysis followed by oblique projection", *Talanta* 52:453 (2000).
- 5.10. JA Martins, MM Sena, RJ Poppi, FBT Pessine, "Fluorescence piroxicam study in the presence of cyclodextrins by using the PARAFAC method", *Appl. Spectrosc.* 53:510 (1999).

6. Publicações: Capítulo de Livro

- 6.1. RJ Poppi, MM Sena, "Métodos quimiométricos na análise integrada de dados", em: RTS Frighetto, PJ Valarini (orgs.), "Indicadores biológicos e bioquímicos de qualidade do solo", Manual Técnico, 1ª ed., 2000, p. 19-36.

7. Trabalhos Apresentados em Eventos

- 7.1. 18 trabalhos apresentados e 2 submetidos

8. Experiência Administrativa Acadêmica

- 8.1. Coordenador de Curso de Graduação
Licenciatura em Química, FAFIG/Guaxupé, 2001.

9. Orientação

- 9.1. Iniciação Científica
FAFIG/Guaxupé, 2001.
Aluna: Thaís Maria dos Santos (3º ano)
Título: A Conscientização e a aplicação da química do cotidiano para o ensino médio

10. Participação em Projeto de Pesquisa

- 10.1. EMBRAPA Meio-Ambiente, Jaguariúna/SP, 1998-1999.
Título: Efeito de herbicidas e fungicidas sobre atividades microbiana e enzimática no solo.
Coordenadores: RTS Frighetto e PJ Valarini

RESUMO

Título: APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS DE PRIMEIRA E SEGUNDA ORDEM NA DETERMINAÇÃO DIRETA DE FÁRMACOS POR ESPECTROSCOPIA MOLECULAR

Autor: Marcelo Martins de Sena

Orientador: Prof. Dr.Ronei Jesus Poppi

O objetivo desta tese foi a aplicação conjunta de métodos quimiométricos de primeira e segunda ordens (PLS, PARAFAC e N-PLS) e técnicas de espectroscopia molecular (absorção no UV e espectrofluorimetria) na determinação direta de fármacos, contribuindo assim para a divulgação destas metodologias como alternativas viáveis às tradicionais determinações cromatográficas univariadas. Para isso, foram realizadas quatro aplicações originais. As três primeiras foram as determinações simultâneas de princípios ativos em formulações farmacêuticas, respectivamente: ácido acetilsalicílico e ácido ascórbico; ácido acetilsalicílico, paracetamol e cafeína; diclofenaco, tiamina e piridoxina. Nestas aplicações, foram construídos conjuntos de calibração pequenos (nove amostras), baseados em planejamentos experimentais simples, e foram obtidos espectros de absorção no UV para todas as amostras. As análises foram realizadas em vários valores de pH (entre 1 e 6), gerando então, dados de segunda ordem, que incorporam a informação relativa às dissociações das espécies químicas. Modelos de primeira ordem foram construídos usando os conjuntos de dados obtidos em cada valor de pH e, em seguida, comparados com modelos de segunda ordem, construídos com os dados obtidos de todos os conjuntos de pH para cada aplicação. Na última aplicação, a combinação de um método quimiométrico de segunda ordem, o PARAFAC, de superfícies espectrais de excitação/emissão obtidas pela técnica de espectrofluorimetria e do método da adição padrão foi usada com sucesso na determinação direta de salicilato em plasma humano, na faixa de concentração de 3,0 a 24,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

ABSTRACT

Title: FIRST- AND SECOND-ORDER CHEMOMETRIC METHODS APPLIED FOR DIRECT DETERMINATION OF DRUGS BY MOLECULAR SPECTROSCOPY

Author: Marcelo Martins de Sena

Adviser: Dr. Ronei Jesus Poppi

The goal of this thesis is the combined application of first- and second-order chemometric methods (PLS, PARAFAC and N-PLS) and molecular spectroscopic techniques (UV absorption and spectrofluorimetry) for direct determination of drugs, aiming at contributing for the growing knowledge about the potential of these methodologies as viable alternatives to the traditional univariate chromatographic determinations. Four applications were carried out. The first three ones were the simultaneous determinations of drugs, which have overlapped UV spectra, namely: acetylsalicylic acid and acid ascorbic; acetylsalicylic acid, acetaminophen and caffeine; diclofenac, thiamine and pyridoxine, respectively. For these applications, calibration sets with a small number of points (nine) were considered, based on adequate experimental designs, and UV spectra were acquired for each sample. These analyses were performed in several pH values (from 1 to 6), generating second-order data, which incorporate information related to dissociations of chemical species. For each application, first-order models were built with data sets obtained in each pH, and then, compared with second-order models, which were generated from all the pH data sets. The last application consisted of the combined use of a second-order chemometric method, PARAFAC, excitation-emission matrices and standard addition method for the direct determination of salicylate in human plasma, in the concentration range from 3,0 to 24,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

ÍNDICE

1. Introdução e Objetivos Gerais.....	3
2. Métodos Quimiométricos de Primeira e Segunda Ordens.....	9
2.1. Modelos Bi- e Trilineares.....	12
2.2. Métodos de Calibração de Primeira Ordem.....	13
2.2.1. PLS.....	14
2.3. Métodos de Segunda Ordem.....	15
2.3.1. Modelos de Tucker.....	17
2.3.2. PARAFAC.....	19
2.3.3. N-PLS.....	24
3. Aplicação de Métodos Quimiométricos de Primeira e Segunda Ordens no Estudo de Misturas de Ácido Acetilsalicílico e Ácido Ascórbico por Espectrofotometria no Ultravioleta.....	27
3.1. Introdução.....	29
3.2. Parte Experimental.....	30
3.2.1. Reagentes e soluções.....	30
3.2.2. Instrumentação e tratamento dos dados.....	31
3.2.3. Planejamento experimental e aquisição dos espectros.....	32
3.2.4. Determinação das amostras comerciais.....	33
3.2.5. Estimativa da decomposição de AAS a AS em amostras simuladas.....	34
3.3. Resultados e Discussão.....	36
3.3.1. Estudo exploratório do sistema usando PARAFAC.....	36
3.3.2. Calibração multivariada e determinação de amostras comerciais usando PLS e N-PLS.....	41
3.3.3. Construção de um modelo PLS/pH1 para estimar a decomposição de AAS a AS em amostras simuladas.....	45
3.4. Conclusão.....	47

4. Aplicação de N-PLS na Determinação Espectrofotométrica Simultânea de Ácido Acetilsalicílico, Paracetamol e Cafeína.....	49
4.1. Introdução.....	51
4.2. Parte Experimental.....	52
4.2.1. Reagentes e soluções.....	52
4.2.2. Instrumentação e tratamento dos dados.....	53
4.2.3. Planejamento experimental e aquisição dos espectros.....	53
4.2.4. Determinação das amostras comerciais e teste de recuperação.....	54
4.3. Resultados e Discussão.....	55
4.3.1. Espectros de absorção no UV de AAS, PRC e CAF.....	55
4.3.2. Calibração multivariada usando PLS e N-PLS.....	57
4.3.3. Determinação das amostras comerciais e teste de recuperação.....	59
4.4. Conclusão.....	61
5. Determinação Direta de Diclofenaco em Formulações Farmacêuticas Contendo Vitaminas do Complexo B por Meio de Espectrofotometria no UV e PLS.....	63
5.1. Introdução.....	65
5.2. Figuras de Mérito.....	68
5.3. Parte Experimental.....	71
5.3.1. Reagentes e soluções.....	71
5.3.2. Instrumentação e tratamento dos dados.....	72
5.3.3. Planejamento experimental e aquisição dos espectros.....	72
5.3.4. Determinação das amostras comerciais.....	73
5.3.5. Análise cromatográfica.....	74
5.4. Resultados e Discussão.....	75
5.4.1. Espectros de absorção no UV de DCF, TIA e PIR.....	75
5.4.2. Calibração multivariada usando PLS.....	77
5.4.3. Estimativa de figuras de mérito.....	79
5.4.4. Determinação das amostras comerciais e verificação por CLAE.....	80

5.5. Conclusão.....	84
6. Utilização do PARAFAC e do Método da Adição Padrão como Ferramentas para a Determinação Direta de Salicilato em Plasma Humano por Espectrofluorimetria.....	85
6.1 Introdução.....	87
6.2. Método da Adição Padrão e Vantagem de Segunda Ordem.....	90
6.3. Parte Experimental.....	93
6.3.1. Reagentes e amostras de plasma.....	83
6.3.2. Instrumentação e tratamento dos dados.....	94
6.3.3. Procedimentos.....	94
6.4. Resultados e Discussão.....	95
6.4.1. Estudos preliminares: Resolução dos espectros e tentativa de determinar AS em plasma através de uma curva de calibração.....	95
6.4.2. Determinação de AS em plasma usando o método da adição padrão.....	100
6.5. Conclusão.....	105
7. Conclusões Gerais e Perspectiva Futuras.....	107
Referências Bibliográficas.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico;
AAS	Ácido acetilsalicílico;
ALS	<i>Alternating Least Squares</i> (mínimos quadrados alternados);
AS	Ácido salicílico;
ATLD	<i>Alternating TriLinear Decomposition</i> (decomposição trilinear alternada);
CAF	Cafeína;
CANDECOMP	<i>CANonical DECOMPosition</i> (decomposição canônica);
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC);
CORCONDIA	<i>CORe CONSistency DIAgnostic</i> (teste de consistência trilinear);
DAD	<i>Diode Array Detection</i> (detecção por arranjo de diodos);
DCF	Diclofenaco;
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (calorimetria de varredura diferencial);
DTD	<i>Direct Trilinear Decomposition</i> (decomposição direta trilinear);
EEM	<i>Excitation-Emission Matrix</i> (matriz de excitação-emissão);
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo;
FMN	Flavina mononucleotídeo;
GC/MS	<i>Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry</i> (cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas);
GRAM	<i>Generalized Rank Annihilation Method</i> (método generalizado de aniquilação do posto);
GSAM	<i>Generalized Standard Addition Method</i> (método da adição padrão generalizada);
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (CLAE);
HPTLC	<i>High-Performance Thin-Layer Chromatography</i> (cromatografia de camada delgada de alta eficiência);
LD	Limite de Detecção;
MEKC	<i>Micellar ElectroKinetic Chromatography</i> (cromatografia eletrocínética micelar);
MLR	<i>Multiple Linear Regression</i> (RLM);

NAS	<i>Net Analyte Signal</i> (sinal analítico líquido);
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo;
NBRA	<i>NonBilinear Rank Annihilation</i> (método não bilinear de aniquilação do posto);
N-PLS	<i>N-way Partial Least Squares</i> (PLS multilinear);
PARAFAC	<i>PARAllel FACTor Analysis</i> (análise de fatores paralelos);
PARALIND	<i>PARAllel profiles with LINear Dependence</i> (análise de fatores paralelos com dependência linear);
PCA	<i>Principal Components Analysis</i> (análise de componentes principais);
PCFA	<i>Principal Component Factor Analysis</i> ;
PCR	<i>Principal Components Regression</i> (regressão em componentes principais);
PIR	Piridoxina;
PLS	<i>Partial Least Squares</i> (mínimos quadrados parciais);
PRC	Paracetamol;
RAFA	<i>Rank Annihilation Factor Analysis</i> (análise de fatores por aniquilação do posto);
RLM	Regressão linear múltipla (MLR);
RMSEP	<i>Root Mean Square Error of Prediction</i> (raiz quadrada dos erros médios quadrados de previsão);
SEL	Seletividade;
SEN	Sensibilidade;
SOSAM	<i>Second-Order Standard Addition Method</i> (método da adição padrão de segunda ordem);
SVD	<i>Singular Value Decomposition</i> (decomposição em valores singulares);
TIA	Tiamina;
TLC	<i>Thin-Layer Chromatography</i> (cromatografia de camada delgada);
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i> (Farmacopéia norte-americana);
UV	Ultravioleta.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Amostras simuladas usadas na construção e validação de um modelo PLS para a determinação simultânea de AAS, AA e AS.....	35
TABELA 2. Erros de previsão e coeficientes de regressão entre os valores reais e previstos obtidos para o conjunto de validação, para cada modelo construído.....	43
TABELA 3. Determinação simultânea de AAS e AA em comprimidos usando calibração multivariada.....	44
TABELA 4. Parâmetros para o novo modelo PLS/pH1, que inclui AS, obtidos na previsão do novo conjunto de validação, e determinação das amostras comerciais.....	46
TABELA 5. Previsão do conjunto de amostras simulando a decomposição de AAS a AA, usando o novo modelo PLS/pH1.....	46
TABELA 6. Planejamento experimental $2^3 + 1$ para o conjunto de calibração usado na determinação simultânea de AAS, PRC e CAF.....	54
TABELA 7. Valores de RMSEP entre as concentrações reais e as previstas para oito misturas sintéticas (conjunto de validação), para cada modelo construído.....	58
TABELA 8. Determinação simultânea de AAS, PRC e CAF em oito misturas sintéticas diferentes (conjunto de validação) usando N-PLS2.....	59
TABELA 9. Determinação simultânea de AAS, PRC e CAF em duas amostras comerciais usando N-PLS2 e PLS2/pH5.....	60
TABELA 10. Valores de recuperação obtidos para a adição padrão de 100 μL de solução 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito a cada amostra.....	60
TABELA 11. Planejamento experimental $2^3 + 1$ para o conjunto de calibração usado na determinação simultânea de DCF, TIA e PIR.....	73

TABELA 12. Valores de RMSEP entre as concentrações reais e as previstas para oito misturas sintéticas (conjunto de validação), para cada modelo PLS2.....	77
TABELA 13. Determinação simultânea de DCF, TIA e PIR em oito misturas sintéticas diferentes (conjunto de validação) usando o modelo PLS2/pH5.....	78
TABELA 14. Figuras analíticas de mérito para a determinação de DCF usando o modelo PLS2/pH 5.....	79
TABELA 15. Determinação de DCF em duas formulações farmacêuticas, ambas contendo vitaminas B, pelo método proposto (espectrofotométrico/quimiométrico) e por CLAE.....	83
TABELA 16. Determinação de AS em plasma usando PARAFAC e adição Padrão.....	103

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação do desdobramento (<i>unfolding</i>) de um arranjo de dados tridimensional em uma matriz. Modelo Tucker1.....	18
FIGURA 2. Representação gráfica do modelo Tucker3.....	19
FIGURA 3. Representação gráfica do modelo PARAFAC. Decomposição de um arranjo de dados tridimensional em F tríades de vetores peso.....	20
FIGURA 4. Representação das reações de dissociação do AAS e do AA.....	30
FIGURA 5. Planejamento experimental usado no estudo das misturas de AAS e AA.....	33
FIGURA 6. Espectros de soluções puras ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) de (a) AAS, (b) AA e (c) AS, obtidos para seis diferentes valores de pH.....	37
FIGURA 7. Superfície espectral obtida em função do pH ($[\text{AAS}] = [\text{AA}] = 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e representação do arranjo de dados tratado com o modelo PARAFAC.....	38
FIGURA 8. Espectros deconvoluídos, obtidos através dos pesos do modelo PARAFAC (linhas sólidas), sobrepostos aos espectros obtidos experimentalmente (linhas tracejadas). Todos os espectros foram normalizados entre 0 e 1.....	40
FIGURA 9. Distribuição das espécies em função do pH, obtidas através dos pesos do modelo PARAFAC.....	40
FIGURA 10. Fórmulas estruturais do PRC e da CAF.....	51
FIGURA 11. Espectros de absorção no UV de AAS, PRC e CAF obtidos em pH 2,0. $[\text{AAS}] = [\text{PRC}] = 15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $[\text{CAF}] = 6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	56
FIGURA 12. Representação das reações de dissociação do DCF, da TIA e da PIR.....	67

FIGURA 13. Espectros de absorção no UV de DCF, TIA e PIR obtidos em (a) pH 3,0 e (b) pH 6,0. [DCF] = [TIA] = 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e [PIR] = 75,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	76
FIGURA 14. Espectros de absorção no UV do metil e do propil parabenos, obtidos experimentalmente. [m-parabeno] = [p-parabeno] = 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	81
FIGURA 15. Coeficientes de regressão para a previsão de DCF com o modelo PLS2/pH5.....	83
FIGURA 16. Fórmula estrutural do íon salicilato.....	90
FIGURA 17. Superfícies de excitação-emissão de: (a) uma amostra de plasma puro e (b) uma amostra do mesmo plasma dopada com 9,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AS.....	96
FIGURA 18. Espectros de fluorescência deconvoluídos, obtidos através dos pesos do modelo PARAFAC. (a) excitação e (b) emissão.....	98
FIGURA 19. Espectros de fluorescência de uma solução 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AS em tampão fosfato (pH = 7,4). (a) Espectro de excitação obtido na emissão em 410 nm. (b) Espectro de emissão obtido pela excitação em 300 nm.....	99
FIGURA 20. Representação da montagem dos arranjos de dados tratados nesta aplicação. Superfície de excitação-emissão para a amostra de plasma 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em AS.....	102
FIGURA 21. Reta de adição padrão para a amostra de plasma 9,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em AS.....	103

***APLICAÇÃO DE MÉTODOS
QUIMIOMÉTRICOS DE PRIMEIRA E
SEGUNDA ORDEM NA DETERMINAÇÃO
DIRETA DE FÁRMACOS POR
ESPECTROSCOPIA MOLECULAR***

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS GERAIS

A partir do início dos anos setenta, a presença de microprocessadores e microcomputadores começou a se tornar comum nos laboratórios químicos. Este fato foi um grande impulsionador do desenvolvimento das técnicas instrumentais analíticas, permitindo ao analista obter grandes quantidades de dados até então não disponíveis. Surgiu com isso a necessidade de técnicas de tratamento de dados mais complexas do ponto de vista matemático e estatístico e, a partir de então, a análise multivariada de dados químicos ganhou rapidamente popularidade e deu origem a uma nova disciplina, batizada quimiometria [1,2].

O termo quimiometria (do inglês *chemometrics*) foi proposto no final dos anos setenta para descrever as técnicas e operações associadas com o tratamento matemático e a interpretação de dados químicos. Foi dentro da área de química analítica que a quimiometria provavelmente causou mais impacto [2]. Com o avanço da instrumentação e automação dentro dos laboratórios de análise, uma enorme quantidade de dados, tabelas e gráficos começaram a ser gerados muito rapidamente. A identificação, classificação e interpretação desses dados podem ser fatores limitantes na eficiência e na operação efetiva das análises, principalmente sem a utilização de um tratamento de dados adequado. Além disso, novas metodologias de análise, que de outra forma nem poderiam ser pensadas, puderam ser propostas baseadas na utilização da quimiometria. Como exemplo, pode-se citar a determinação de espécies sem resolução de sinal analítico, ou seja, o sinal analítico não precisa necessariamente ser proveniente apenas da espécie que se deseja determinar.

A área da química analítica para qual a quimiometria mais contribuiu foi, sem dúvida, a espectroscopia molecular. São numerosas as metodologias quantitativas desenvolvidas nas últimas décadas baseadas na combinação de calibração multivariada [3,4] com técnicas de espectroscopia molecular tais como, absorção no ultravioleta (UV) e/ou no visível, no infravermelho (IV) médio ou próximo, Raman e fluorescência molecular.

Uma área importante em que a combinação de quimiometria e espectroscopia molecular vem encontrando aplicação é a determinação direta de

fármacos. Embora as Farmacopéias mais utilizadas, tais como a americana (USP, *United States Pharmacopoeia*) [5], não recomendem metodologias que envolvam quimiometria, uma revisão recente da literatura [6] mostra um número crescente de publicações científicas propondo tais métodos. Entretanto, a maioria das metodologias propostas para determinação de fármacos é baseada em técnicas cromatográficas e determinações univariadas. Estas metodologias são bastante populares, estão bem estabelecidas e são reconhecidas pelos organismos reguladores. Apesar disso, elas podem apresentar desvantagens potenciais em certas situações, tais como custo e tempo de análise relativamente altos. Outra desvantagem é a possibilidade de interferência de um produto de degradação ou de uma impureza que tenha o mesmo tempo de retenção do analito de interesse.

A partir da década passada, o emprego de espectroscopia molecular e calibração multivariada passou a representar uma alternativa rápida, simples e relativamente barata para a determinação direta de fármacos. Em situações onde a determinação de um analito é dificultada ou impedida devido à presença de um ou mais interferentes, ao invés da eliminação dessas espécies (ex: separação cromatográfica, extração, etc.), o uso de calibração multivariada pode permitir a modelagem dos interferentes junto com o analito de interesse. A idéia central consiste em substituir a separação “física” das espécies pela separação “quimiométrica” de seus sinais. As vantagens potenciais da determinação direta são maior rapidez, menor custo e simplificação ao máximo das etapas de tratamento da amostra, diminuindo as possibilidades de erro causadas pela sua manipulação. Nos últimos anos, as duas principais aplicações desta estratégia têm sido encontradas no controle de qualidade de produtos farmacêuticos e em análises clínicas. Tornaram-se possíveis, por exemplo, a determinação simultânea direta de vários princípios ativos em um mesmo produto farmacêutico [7-10] e a determinação de fármacos em amostras complexas, tais como, plasma, soro e urina, sem a necessidade de separação prévia dos constituintes [11-15].

O objetivo desta tese foi a aplicação conjunta de métodos quimiométricos de primeira e segunda ordens (PLS, PARAFAC e N-PLS) e técnicas de espectroscopia molecular (absorção no UV e espectrofluorimetria) na

determinação direta de fármacos, contribuindo assim para a popularização destas metodologias como alternativas viáveis às tradicionais determinações cromatográficas univariadas. Para isso, foram realizadas quatro aplicações originais. As três primeiras foram as determinações simultâneas de princípios ativos em formulações farmacêuticas: ácido acetilsalicílico e ácido ascórbico (Capítulo 3), ácido acetilsalicílico, paracetamol e cafeína (Capítulo 4), diclofenaco, tiamina e piridoxina (Capítulo 5), respectivamente. Nestas aplicações, foram construídos conjuntos de calibração relativamente pequenos, baseados em planejamentos experimentais simples, e foram obtidos espectros de absorção no UV para toda as amostras. As análises foram realizadas em vários valores de pH, gerando dados de segunda ordem, os quais incorporam a informação relativa às dissociações das espécies químicas. Modelos de primeira ordem foram construídos usando os conjuntos de dados obtidos em cada valor de pH e, em seguida, comparados com modelos de segunda ordem construídos com os dados obtidos de todos os conjuntos de pH para cada aplicação. Na última aplicação, foi usada a combinação de um método quimiométrico de segunda ordem, o PARAFAC, da técnica de espectrofluorimetria e do método da adição padrão na determinação direta de salicilato em plasma humano (Capítulo 6). A descrição dos métodos quimiométricos aqui utilizados é apresentada no Capítulo 2. Finalmente, as conclusões gerais desta tese e as perspectivas para futuros trabalhos são comentadas no Capítulo 7.

CAPÍTULO 2

MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS DE PRIMEIRA E **SEGUNDA ORDENS**

Os métodos de calibração usados em química analítica podem ser classificados de acordo com a dimensão dos dados analisados [16]. Métodos de ordem zero são usados para tratar dados univariados, gerados por instrumentos, tais como eletrodos íon-seletivos, pHmetros e colorímetros. Nestes casos, a resposta medida para cada amostra é um valor escalar. Estes métodos não fornecem resultados aceitáveis na presença de interferentes, pois demandam total seletividade para o analito de interesse. Métodos de calibração de primeira ordem podem ser usados para tratar dados multivariados, gerados por instrumentos, tais como espectrômetros e cromatógrafos, cujas respostas fornecem um vetor de dados para cada amostra. Nestes casos, é possível a calibração na presença de interferentes, desde que estes estejam presentes no conjunto de calibração usado para construir o modelo. Instrumentos que fornecem como resposta uma matriz (ou tensor de segunda ordem) de dados para cada amostra geram dados de segunda ordem. Como exemplo, podem ser citadas as chamadas técnicas hífenadas, tais como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS, *Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry*) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD ou HPLC-DAD, *High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection*). Dados de segunda ordem podem ainda ser obtidos por espectrofluorimetria, análise de injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica e análise de imagens. O uso de métodos de calibração de segunda ordem permite a incorporação de uma maior quantidade de informação ao modelo, levando a uma série de possíveis vantagens sobre métodos de ordem inferior. Uma destas vantagens é a possibilidade de obtenção dos espectros (ou outros sinais, dependendo da técnica empregada) puros de cada componente do sistema, aplicando um número mínimo de restrições ao modelo. Uma outra vantagem importante é a possibilidade de calibração, sob certas condições, na presença de interferentes desconhecidos, que não estejam presentes no conjunto de calibração, a chamada “vantagem de segunda ordem” [16,17]. Por fim, deve-se mencionar que métodos de ordem igual ou superior a três são possíveis, embora

não abundantes na literatura química. Espectros de excitação/emissão de fluorescência obtidos em função do tempo para cada amostra são um exemplo recente de dados de terceira ordem presentes na literatura [18]. De modo geral, dados de ordem igual ou superior a dois são denominados dados de ordem superior.

2.1. Modelos Bi- e Trilineares

Para o sucesso de uma aplicação, é fundamental a compatibilidade entre a natureza dos dados e o modelo assumido pelo método quimiométrico. Todos os modelos discutidos aqui são lineares. Os métodos de primeira ordem são baseados em modelos bilineares, pois os vetores de dados coletados para as várias amostras podem ser agrupados em matrizes de dados (arranjos de segunda ordem). Os métodos de segunda ordem se baseiam em modelos trilineares, pois dados de segunda ordem coletados para várias amostras podem ser organizados em um arranjo tridimensional. As matrizes de dados são colocadas “lado a lado”, gerando um “paralelepípedo”, cujas fatias são objetos ou amostras, as colunas, variáveis, e as linhas, outra condição (pH, tempo, temperatura, etc.). Métodos de terceira ordem demandam modelos quadrilineares [18,19] e assim, sucessivamente.

O termo modelo é usado aqui com o mesmo sentido que na estatística clássica. Um modelo é uma aproximação útil para descrever um conjunto de dados reais; por exemplo, a matriz \hat{X} é um modelo estimado dos dados reais contidos na matriz X . A análise de componentes principais (PCA, *Principal Components Analysis*) [3], um dos métodos quimiométricos mais conhecidos, pode ser tomada como exemplo. O modelo PCA é definido por propriedades específicas (especificações do modelo), tais como base estrutural, restrições e função de ajuste. A base estrutural do modelo PCA é bilinear e dada pela seguinte expressão, a qual considera somente os autovalores mais significativos:

$$\hat{X} = T P^t \quad (1)$$

Os parâmetros do modelo, contidos em T (escores) e P (pesos), são estimados sobre certas condições ou restrições. No caso da PCA, as componentes principais devem ser ortogonais e, portanto, a restrição $P^t P = I$ é válida, onde I é uma matriz identidade. Finalmente, a função de ajuste serve como critério objetivo para o algoritmo estimar os parâmetros do modelo. A escolha dessa função normalmente é baseada em suposições acerca dos resíduos do modelo. Todos os métodos descritos a seguir se baseiam em funções de ajuste por mínimos quadrados. No caso da PCA, a função de ajuste é dada por $\|X - TP^t\|_F^2$, onde o subscrito F indica a norma de Frobenius (raiz quadrada da soma absoluta dos quadrados dos elementos de uma matriz).

2.2. Métodos de Calibração de Primeira Ordem

Regressão linear múltipla (RLM ou MLR, *Multiple Linear Regression*), regressão em componentes principais (PCR, *Principal Components Regression*) e mínimos quadrados parciais (PLS, *Partial Least Squares*) são os métodos de calibração de primeira ordem mais comuns.

A RLM é o método mais direto. Nela, a variável a ser prevista, y , é estimada por uma combinação linear das variáveis independentes contidas na matriz X ,

$$y = Xb \quad \text{ou} \quad y = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n \quad (2)$$

onde b é o vetor com os coeficientes de regressão. A solução de mínimos quadrados para encontrar b é: $b = (X^t X)^{-1} X^t y$. A RLM é o melhor método para sistemas bem comportados (respostas lineares, sem interferentes, sem interações entre analitos, com baixo ruído e nenhuma colinearidade). A limitação da RLM está no fato de ela usar toda a informação contida na matriz X , não importando se é relevante ou não, para construir o modelo. Com isso, quantidade significativa de informação irrelevante é incorporada. Outro problema está na etapa de inversão

da matriz (X^tX). Se a matriz X contiver menos linhas que colunas (menos amostras que variáveis), ela não poderá ser invertida e a solução não existirá.

O PCR é um método que fornece uma maneira de superar os problemas descritos no parágrafo anterior, pois a regressão, ao invés de ser feita nas variáveis originais, é feita nos escores obtidos em uma PCA. O PLS difere do PCR por usar a informação das variáveis dependentes na construção do modelo. Dentre os métodos citados, o PLS é o mais usado, tanto nas aplicações em análise de fármacos previamente mencionadas quanto de um modo geral, e por isso será adotado neste trabalho.

2.2.1. PLS

O PLS [3,4] é um método para a construção de modelos de calibração que relaciona duas matrizes, X e Y , as quais contêm as variáveis independentes, x , e as dependentes, y , respectivamente. Essas duas matrizes são decompostas em uma soma de f variáveis latentes, de acordo com o seguinte modelo estrutural:

$$X = T P^t + E = \sum t_f p_f^t + E \quad (3)$$

$$Y = T Q^t + F = \sum t_f q_f^t + F \quad (4)$$

onde T é a matriz de escores; P e Q são as matrizes de pesos (*loadings*) para X e Y , e E e F são as matrizes de resíduos. O produto de T e P^t é uma aproximação das variáveis independentes (ex: espectros) e o produto de T e Q^t é uma aproximação das variáveis dependentes (ex: concentrações). Uma importante característica do PLS é a possibilidade de obter escores que estão simultaneamente relacionados às concentrações (Y) e às medidas (X). A concentração das novas amostras pode ser estimada a partir dos novos escores, T^* , e dos pesos do modelo, Q , de acordo com a equação:

$$Y_N = T^* Q^t \quad (5)$$

O número de variáveis latentes do modelo é escolhido através de um procedimento de validação cruzada [3,4], baseado no menor erro de previsão. Deve-se ainda mencionar a diferença entre PLS1, quando a regressão é feita

individualmente para cada variável dependente (y é um vetor), e PLS2, quando todas as variáveis dependentes são previstas simultaneamente (Y é uma matriz). O número após o PLS indica, portanto, a dimensão do arranjo de dados a ser previsto. Por fim, o tamanho relativamente reduzido desta seção, em comparação com as seções relativas a métodos de segunda ordem descritas a seguir, é justificado pelo fato de o PLS ser um método já razoavelmente estabelecido e difundido na literatura química.

2.3. Métodos de Segunda Ordem

Os métodos multidimensionais (*N-way* ou *multi-mode*) de tratamento de dados foram primeiramente desenvolvidos por psicometristas (pesquisadores da área de psicologia que aplicam estatística multivariada aos seus dados) na década de sessenta, com destaque para o pioneiro Ledyard Tucker, que propôs os assim chamados “métodos de Tucker” [20,21,22]. Esse desenvolvimento coincidiu com a tendência positivista, vigente na época, de valorizar excessivamente o papel da análise quantitativa nas ciências humanas. Desta forma, grandes quantidades de dados eram obtidas na forma de questionários ou testes aplicados a um grande número de indivíduos sob diferentes condições e analisadas por psicometristas, os quais buscavam extrair componentes puros que deveriam representar influências ou padrões de comportamento.

No início dos anos setenta, o pesquisador na área de lingüística Richard Harshman desenvolveu um modelo que viria a encontrar aplicação na literatura química anos mais tarde, a análise de fatores paralelos ou PARAFAC (*PARAllel FACtor analysis*) [23]. Carrol e Chang propuseram na mesma época e de maneira independente um modelo idêntico, ao qual deram o nome de decomposição canônica (*CANDECOMP*, *CANonical DECOMPosition*) [24].

A utilização de métodos multidimensionais em química foi relativamente tardia. O artigo de Ho, Christian e Davidson [25], que propôs o método de análise de fatores por aniquilação do posto (*RAFA*, *Rank Annihilation Factor Analysis*)

para o tratamento de dados obtidos por fluorescência molecular, em 1978, é provavelmente o pioneiro. Durante toda a década de oitenta, a aplicação destes métodos na literatura química permaneceu relativamente restrita. Em 1981, Appellof e Davidson, baseados no artigo de Carrol e Chang [24], apresentaram um modelo similar ao PARAFAC, ao qual não deram nome, para o tratamento de dados cromatográficos com detecção espectrofluorimétrica [26]. Em uma série de três artigos publicados em 1988, Russell e co-autores usaram o mesmo modelo, ao qual denominaram PCFA (*Principal Component Factor Analysis*), para o tratamento de espectros de fluorescência molecular resolvidos no tempo [27-29].

Um destaque especial deve ser dado para o método generalizado de aniquilação do posto, GRAM (*Generalized Rank Annihilation Method*) proposto em 1986 por Sanchez e Kowalski [30]. Este método, de solução algébrica, é baseado em um modelo trilinear e numa decomposição dos dados em autovetores, mas possui a limitação de que uma das dimensões dos dados seja igual a dois (duas amostras). Em 1990, os mesmos autores propuseram uma extensão do método, a decomposição direta trilinear (DTD, *Direct Trilinear Decomposition*) [31], a qual superava a antiga limitação. No entanto, a inexistência de um critério de otimização bem definido (como o ajuste por mínimos quadrados) tem limitado a aplicação deste método a conjuntos de dados livres de ruído [17]. O DTD costuma produzir resultados que não são robustos na presença de ruído instrumental. Em 1989, Wilson e co-autores propuseram uma extensão do GRAM para dados que apresentam posto (*rank*) diferente de um, ou seja, dados em que a contribuição de um analito para o sinal total não corresponde a um sinal de posto um, conforme assumido pelo modelo trilinear do GRAM. Esta alternativa para tratar desvios de trilinearidade foi chamada de método não bilinear de aniquilação do posto (NBRA, *NonBilinear Rank Annihilation*) [32].

Em 1989, Geladi apresentou em um artigo tutorial os métodos para a análise de dados multidimensionais em química e chamou à atenção para a necessidade de sistematização e generalização [33]. Ele corretamente identificava como fatores limitantes para a difusão destes métodos a não disponibilidade de um algoritmo na forma de um programa razoavelmente amigável e a ausência de

generalização para as aplicações encontradas na literatura (nas palavras dele: “aplicações que não vão além do próprio exemplo”). Em 1992, Smilde também chamou à atenção para o potencial de alguns métodos de ordem superior, então ainda pouco usados e conhecidos na literatura química [34]. De 1995 a 1998, ele iria orientar a tese de doutorado de Rasmus Bro [17], a qual veio dar uma contribuição fundamental para difundir a aplicação de alguns novos métodos quimiométricos, o PARAFAC [35] e o N-PLS [36]. Esta tese, que gerou mais de uma dezena de artigos científicos, descreve de modo bastante claro e didático os modelos e os algoritmos para uma série de métodos multidimensionais e apresenta seis exemplos de aplicações em diferentes áreas, discutindo as suas generalizações. A contribuição talvez mais importante desse trabalho foi o fato de o autor disponibilizar gratuitamente os algoritmos usados, na forma de pacotes (*toolboxes*) elaborados em “ambiente” *MATLAB* [37] (<http://www.models.kvl.dk/source/>), facilitando enormemente a difusão do uso desses métodos.

2.3.1. Modelos de Tucker

Embora estes métodos não tenham sido empregados nesta tese, eles serão brevemente descritos aqui para fins didáticos. Durante os anos sessenta, L. Tucker desenvolveu os modelos atualmente conhecidos como Tucker1, Tucker2 e Tucker3 [21,22]. O modelo Tucker1 corresponde ao simples desdobramento (*unfolding*) do arranjo de dados tridimensional \underline{X} (o sublinhado indica uma matriz tridimensional) em uma matriz bidimensional, seguido de uma decomposição bilinear usando PCA. O desdobramento de um arranjo de dados de dimensões $I \times J \times K$ em uma matriz de dimensões $I \times JK$ é representado na Figura 1. Este desdobramento também pode ser feito nas outras duas direções ($J \times KI$ ou $K \times IJ$). O Tucker1, também conhecido como *unfolded-PCA*, ignora a estrutura trilinear dos dados, decompondo-os com um método bilinear. Tal fato leva a modelos que são mais complexos (maior número de graus de liberdade), menos robustos, menos interpretáveis e de menor capacidade de previsão que os modelos estritamente

trilineares [17]. O modelo Tucker2 é um caso particular do Tucker3, em que uma das dimensões é mantida fixa durante a decomposição.

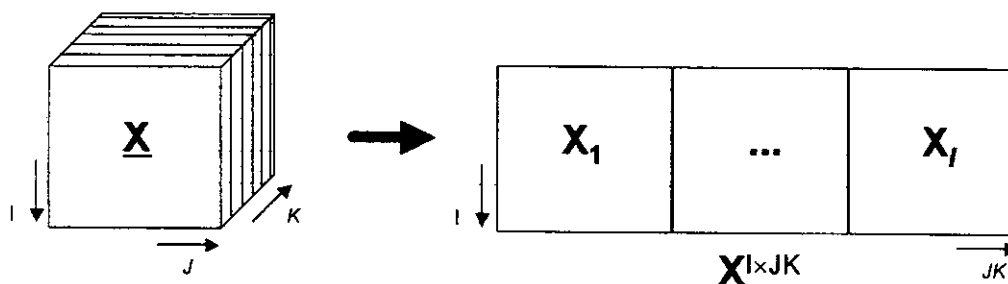


Figura 1. Representação do desdobramento (*unfolding*) de um arranjo de dados tridimensional em uma matriz. Modelo Tucker1.

O mais importante dos modelos de Tucker é o Tucker3, cuja base estrutural é dada pela equação,

$$\underline{X} = \underline{A}\underline{G}(\underline{C} \otimes \underline{B})^t + \underline{E} \quad (6)$$

onde as matrizes \underline{A} ($I \times D$), \underline{B} ($J \times E$) e \underline{C} ($K \times F$) contêm os pesos (*loadings*) do modelo relativos às três dimensões dos dados, respectivamente; a matriz \underline{G} ($D \times EF$) é a matriz central ou conectora (*core matrix*); o tensor \underline{E} ($I \times J \times K$) contém os erros do modelo e o símbolo “ \otimes ” representa o produto de Kronecker ou produto tensorial [38,39]. D , E e F indicam o número de fatores (ou componentes principais) nas três dimensões dos dados, respectivamente. Uma característica particular do modelo Tucker3 é que ele permite que o número de fatores decompostos seja diferente em cada dimensão. Os elementos da matriz \underline{G} , produto do rearranjo do tensor \underline{G} ($D \times E \times F$), definem como os pesos individuais interagem nas diferentes dimensões, ou seja, os seus valores absolutos indicam a importância de cada interação entre fatores para o modelo (um valor próximo de zero indica uma interação insignificante). Por exemplo, o elemento g_{312} conecta os pesos do terceiro fator da primeira dimensão com o primeiro fator da segunda e o segundo da terceira. A restrição dos pesos em \underline{A} , \underline{B} e \underline{C} serem ortogonais é usual.

A representação gráfica da decomposição dos dados efetuada pelo método Tucker3 é apresentada na Figura 2.

Finalmente, é importante mencionar que os modelos de Tucker são coletivamente conhecidos como PCA multidimensional (*multi-way PCA*), mas o uso deste termo não é recomendado por Bro [17], devido à confusão entre os modelos Tucker1 e Tucker3. Ambos os modelos se aplicam a dados tridimensionais, mas o primeiro assume uma estrutura bilinear, enquanto o segundo assume uma estrutura trilinear.

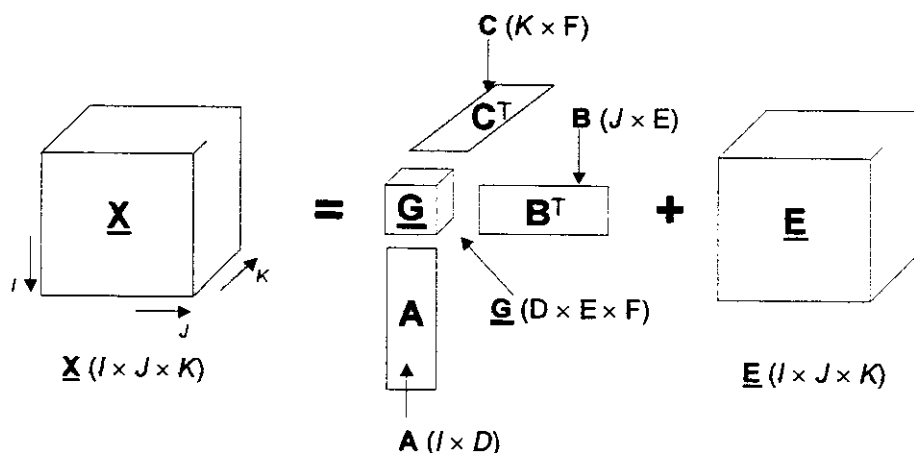


Figura 2. Representação gráfica do modelo Tucker3.

2.3.2. PARAFAC

A análise de fatores paralelos, PARAFAC [17,35], é um outro método para decomposição de dados de ordem superior, cuja base estrutural é dada pelas matrizes de pesos \underline{A} , \underline{B} e \underline{C} , que contêm os elementos a_{if} , b_{jf} e c_{kf} , respectivamente, relativos às três dimensões dos dados. O modelo trilinear é ajustado para minimizar a soma dos quadrados dos resíduos e_{ijk} , de acordo com a seguinte equação:

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (7)$$

onde F é o número de fatores (repare que aqui, ao contrário do Tucker3, este número é igual em todas as dimensões). A Figura 3 mostra a representação gráfica da Equação 7, indicando a decomposição de um arranjo de dados tridimensional em F tríades de vetores pesos. Cada tríade equivale a um fator do modelo PARAFAC.

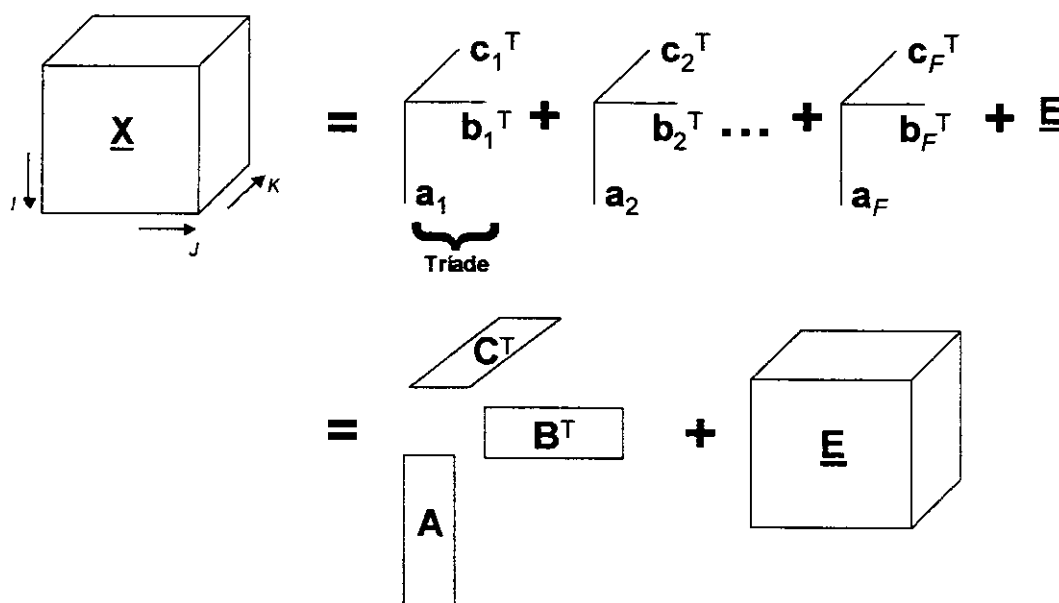


Figura 3. Representação gráfica do modelo PARAFAC. Decomposição de um arranjo de dados tridimensional em F tríades de vetores peso.

Alternativamente, o modelo PARAFAC pode ser representado pela seguinte equação matricial,

$$\underline{X} = \underline{A}(\underline{C}|\otimes|\underline{B})^t + \underline{E} \quad (8)$$

onde as matrizes \underline{A} , \underline{B} e \underline{C} têm dimensões $I \times F$, $J \times F$ e $K \times F$, respectivamente, e o símbolo " $|\otimes|$ " representa o produto de Khatri-Rao [17,38,40].

O PARAFAC pode ser considerado uma generalização da PCA para dados multidimensionais, ou ainda, uma versão restrita do método Tucker3 [17,20] com uma matriz central superidentidade ($g_{def} = 1$ quando $d = e = f$ e $g_{def} = 0$ nas outras posições, ou seja, o primeiro fator de uma dimensão só se relaciona com os primeiros fatores das outras e assim, sucessivamente). Em comparação com a PCA e o Tucker3, ele é menos flexível e usa menos graus de liberdade. Por ser um modelo mais restrito, o PARAFAC é adequado para a modelagem de sistemas nos quais os fatores subjacentes estão associados a leis físico-químicas claramente definidas (em inglês, usa-se o termo *hard modelling* para este tipo de modelagem, em oposição a *soft modelling*, quando a interpretação dos fatores não está restrita a leis físicas tão rígidas, como por exemplo, na determinação de fontes de poluição em análises ambientais). Qualquer conjunto de dados que puder ser modelado adequadamente com o PARAFAC, também poderá ser modelado com o Tucker3 ou com a PCA, mas usando um maior número de graus de liberdade [35]. Esse excesso de graus de liberdade tende a ser usado para modelar ruído ou variância sistemática de uma maneira redundante. Daí, as limitações da aplicação destes dois métodos a problemas de resolução de curvas. Devido ao menor número de graus de liberdade usados, o PARAFAC pode ser considerado um método mais simples e Bro [35] relaciona as vantagens de seu uso às idéias do filósofo do século XIV Guilherme de Ockham e ao “princípio da parcimônia” (*Ockham’s Razor*) [41]: deve-se usar sempre o modelo mais simples possível.

Além disso, ao contrário dos outros métodos citados acima, o PARAFAC fornece solução única, independente de rotações. Matematicamente, isto significa que o modelo estimado não pode sofrer rotação sem perda de ajuste. Esta última propriedade (em inglês, ela é denominada *uniqueness*) é de grande importância para a sua utilização na modelagem de dados espectroscópicos. Graças a ela, será possível recuperar os espectros (ou o que quer que constitua o perfil das variáveis) dos componentes puros do sistema, contanto que os dados sejam realmente trilineares, o número correto de fatores do modelo seja escolhido e a razão sinal/ruído seja apropriada.

A escolha do número de fatores é uma etapa crucial da análise, não existindo para ela um critério absoluto. A escolha pode ser feita baseada na variância explicada pelo modelo, no conhecimento químico do sistema, em métodos de reamostragem e validação cruzada (*split-half*) [42,43] ou no recentemente proposto “teste de consistência trilinear” (CORCONDIA, *COR* *CON* *S* *IST* *E* *N* *C* *Y* *D* *I* *A* *G* *N* *O* *S* *T* *I* *C*) [44]. O CORCONDIA é baseado na interpretação do PARAFAC como um modelo Tucker3 restrito. O Tucker3 é aplicado aos parâmetros do modelo PARAFAC estimado e, se houver consistência trilinear, espera-se que os elementos da superdiagonal do tensor central ($\underline{\mathbf{G}}$) tenham valores próximos de um e os demais elementos valores próximos de zero. A definição matemática é expressa pela seguinte equação,

$$\text{CORCONDIA} = 100 * \left(1 - \frac{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F (g_{def} - h_{def})^2}{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F h_{def}^2} \right) \quad (9)$$

onde g_{def} é o elemento da matriz central calculada com o Tucker3 a partir dos pesos do PARAFAC, h_{def} é o elemento de um tensor binário contendo valores um na superdiagonal e zero nas demais posições e F é o número de fatores do modelo. Um valor de CORCONDIA superior a 90% indica a adequação do modelo PARAFAC, um valor em torno de 50% indica deficiência de trilinearidade e valores próximos de zero ou negativos indicam inconsistência trilinear. O CORCONDIA é uma ferramenta para detectar sobre-ajuste em um modelo PARAFAC, mas não sub-ajuste. O valor de CORCONDIA para um modelo estimado com um número de componentes menor do que o real estará próximo a 100 %, pois a estrutura de tal modelo será trilinear. Portanto, o modelo adequado será aquele com maior número de componentes e que preserve a estrutura trilinear (assumindo que o ruído não é trilinear). Outro aspecto a ser ressaltado no CORCONDIA é o de não assumir suposições *a priori* a respeito dos resíduos, pois é a parte sistemática dos dados, e não a aleatória, que é usada na avaliação do modelo. Bro e Kiers observam ainda, que a validação de um modelo PARAFAC não deve se basear unicamente no CORCONDIA [44].

Outra importante diferença em relação à PCA, é que a solução do PARAFAC não é cumulativa (*not nested*). Isto significa que os parâmetros de um modelo com $F + 1$ fatores não são iguais aos de um modelo com F fatores mais um fator adicional. A razão para isso é que, na solução do PARAFAC, os componentes não necessitam ser ortogonais (não correlacionados) entre si. Uma outra característica importante do PARAFAC é a possibilidade do uso de restrições (*constraints*). O ajuste de um modelo restrito sempre é menor do que o de um modelo não restrito (menor variância explicada). No entanto, a perda de ajuste é compensada pela obtenção de um modelo mais facilmente interpretável e realista. As restrições mais comuns são: não negatividade, ortogonalidade e unimodalidade. A restrição de não negatividade é usualmente adotada na resolução de espectros, já que parâmetros espectrais negativos não possuem significado físico.

O algoritmo usado para a resolução do PARAFAC é o dos mínimos quadrados alternados (ALS, *Alternating Least Squares*), que sucessivamente estima os valores de uma das matrizes de pesos a partir dos valores conhecidos das outras duas [17]. Este algoritmo, o mesmo usado para o Tucker3, pode ser iniciado a partir de valores aleatórios ou usando algum tipo de decomposição dos dados, normalmente DTD ou SVD (*Singular Value Decomposition*). O algoritmo converge iterativamente até atingir um critério de convergência ou um número de iterações previamente definidos. Os passos do algoritmo para um modelo PARAFAC [35] são resumidos a seguir:

- (0) Decida o número de fatores, F ;
- (1) Inicie B e C ;
- (2) Estime A por um ajuste de mínimos quadrados a partir de \underline{X} , B e $C \Rightarrow A = \underline{XZ}^t(ZZ^t)^{-1}$, onde $Z = (C| \otimes |B)^t$;
- (3) Estime B de maneira análoga;
- (4) Estime C de maneira análoga;
- (5) Retorne ao passo (2) até a convergência (pequena mudança no ajuste em relação ao último resultado).

Os principais objetivos das aplicações de PARAFAC em química [17] são a resolução de curvas e a calibração multivariada, embora aplicações em análise exploratória [45,46] e em análise de variância [47,48] também sejam encontradas na literatura. O uso do PARAFAC para calibração segue uma estratégia análoga a do PCR. As amostras de concentrações conhecidas e desconhecidas são decompostas simultaneamente. Os pesos especificamente obtidos para o componente de interesse na amostra desconhecida (também chamados de escores por alguns autores) são relacionados com as concentrações conhecidas do conjunto de calibração através de uma regressão linear.

Um último aspecto a ser comentado diz respeito ao pré-processamento dos dados. O pré-processamento de dados multidimensionais é mais complicado do que o de dados bidimensionais [17,49]. Por exemplo, ao centrar na média os dados em uma das dimensões (ou modos), o escalamento feito em qualquer outra dimensão é afetado. No entanto, não se costuma efetuar nenhum pré-processamento quando se aplica o PARAFAC na resolução de espectros.

2.3.3. N-PLS

O método dos mínimos quadrados multilineares (PLS multilinear ou N-PLS) [4,17] é uma extensão do PLS para dados de ordem superior que foi proposta em 1996 por R. Bro [36]. Os termos N-PLS1 e N-PLS2 possuem significado análogo aos previamente citados PLS1 e PLS2. Como o N-PLS1 não foi usado neste trabalho, a descrição a seguir será feita exclusivamente para o N-PLS2, embora a diferença entre estas duas variantes não seja muito significativa. O algoritmo do N-PLS2 decompõe um arranjo de dados multidimensionais \underline{X} em um conjunto de tríades. Cada tríade é equivalente a uma variável latente no PLS e consiste de um vetor de escores, t , relacionado à dimensão das amostras e dois vetores de pesos (*weights*), w^J e w^K , relacionados às outras duas dimensões dos dados (ex: comprimento de onda e pH). A base estrutural do modelo é dada por

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F t_{if} w_{jf}^J w_{kf}^K + e_{ijk} \quad (10)$$

onde e_{ijk} são os resíduos, t_{if} , w_{jf}^j e w_{kf}^k são os elementos dos f vetores \mathbf{t} , \mathbf{w}^j e \mathbf{w}^k , respectivamente, e F é o número de triades ou fatores. Alternativamente, o modelo N-PLS pode ser representado pela seguinte equação matricial,

$$\underline{\mathbf{X}} = \mathbf{T}(\mathbf{W}^K | \otimes | \mathbf{W}^J)^t + \underline{\mathbf{E}} \quad (11)$$

onde as matrizes \mathbf{T} , \mathbf{W}^j e \mathbf{W}^k têm dimensões $I \times F$, $J \times F$ e $K \times F$, respectivamente, e o símbolo " $| \otimes |$ " representa o produto de Khatri-Rao [17,38,40].

Superficialmente, os vetores \mathbf{t} , \mathbf{w}^j e \mathbf{w}^k estão relacionados aos escores e aos pesos de um modelo PLS bilinear, mas na prática eles são diferentes, pois as variáveis latentes do N-PLS não estão restritas à ortogonalidade. Além disso, a matriz dos pesos das variáveis dependentes, \mathbf{Q} , é determinada após cada nova variável latente ser computada, de acordo com

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T} \mathbf{Q}^t \quad \Rightarrow \quad \mathbf{Q} = (\mathbf{T}^t \mathbf{T})^{-1} \mathbf{T}^t \mathbf{Y} \quad (12)$$

onde \mathbf{T} é a matriz de escores, cujas colunas consistem nos vetores escores individuais, \mathbf{t} , para cada variável latente. A concentração das novas amostras, \mathbf{Y}_N , pode ser estimada a partir dos novos escores, \mathbf{T}^* , de uma maneira similar ao PLS (vide Equação 5). Uma importante diferença em relação ao PLS é o fato de os elementos de \mathbf{Q} no N-PLS necessitarem ser recalculados assim que cada nova variável latente é computada. No caso do PLS bilinear, a primeira coluna de \mathbf{Q} será sempre a mesma, não importando quantas variáveis latentes o modelo tenha. Esta limitação é causada pela já mencionada não ortogonalidade das variáveis latentes, o que leva a uma solução não cumulativa.

Uma descrição mais detalhada do modelo N-PLS é apresentada nas referências 17 e 36. O algoritmo para o N-PLS2 é dado a seguir:

- (0) Centre na média $\underline{\mathbf{X}}$ e \mathbf{Y} ;
 Faça \mathbf{u} igual a uma das colunas de \mathbf{Y} ;
 $f = 1$;
- (1) Calcule a matriz \mathbf{Z} a partir de $\underline{\mathbf{X}}$ e \mathbf{u} ;
- (2) Determine \mathbf{w}^j e \mathbf{w}^k a partir de SVD(\mathbf{Z});
- (3) Calcule \mathbf{t} ;
- (4) $\mathbf{q} = \mathbf{Y}^t \mathbf{t} / | \mathbf{Y}^t \mathbf{t} |$;

- (5) $\mathbf{u} = \mathbf{Y}\mathbf{q}$;
- (6) Se houver convergência, continue; senão, volte ao passo (1);
- (7) $\mathbf{b} = (\mathbf{T}^t\mathbf{T})^{-1}\mathbf{T}^t\mathbf{u}$;
- (8) $\mathbf{X}_i = \mathbf{X}_i - \mathbf{t}_i\mathbf{w}^j(\mathbf{w}^k)^t$ e $\mathbf{Y} = \mathbf{Y} - \mathbf{T}\mathbf{b}\mathbf{q}^t$;
- (9) $f = f + 1$. Continue do passo (1) até descrever apropriadamente \mathbf{Y} .

Por fim, é importante notar que o modelo do N-PLS impõe uma estrutura trilinear aos dados, pois é baseado numa decomposição tridimensional da matriz de calibração. Alguns métodos previamente publicados [50,51] foram originalmente também chamados de N-PLS, mas não podem ser considerados propriamente como métodos de ordem superior, porque são baseados em uma decomposição bidimensional de dados tridimensionais. Na verdade, esses métodos primeiro rearranjam a matriz tridimensional em uma matriz de duas dimensões e, depois, usam um algoritmo similar ao do PLS bilinear. Como eles são baseados em um desdobramento (*unfolding*) da matriz de dados, também são conhecidos como *unfolded-PLS*. Na comparação com o *unfolded-PLS*, o N-PLS apresenta várias vantagens, pois usa menos parâmetros, produz resultados mais facilmente interpretáveis e é mais robusto à influência de ruído nos dados.

CAPÍTULO 3

APLICAÇÃO DE MÉTODOS

QUIMIOMÉTRICOS DE PRIMEIRA E SEGUNDA

ORDENS NO ESTUDO DE MISTURAS DE

ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E ÁCIDO

ASCÓRBICO POR ESPECTROFOTOMETRIA

NO ULTRAVIOLETA

3.1. Introdução

A aspirina, ou ácido acetilsalicílico (AAS), e a vitamina C, ou ácido ascórbico (AA), são amplamente empregados como princípios ativos em produtos farmacêuticos e estão entre os fármacos mais consumidos no mundo [52,53]. As estruturas dessas moléculas são representadas na Figura 4. A partir dos anos 90, AAS e AA passaram a ser comercializados juntamente em formulações que combinam a ação antipirética e analgésica do AAS com o poder do AA de aumentar a resistência do organismo. Vários métodos volumétricos são comumente empregados na determinação dessas substâncias, tais como volumetria de neutralização para o AAS [54] ou volumetria de óxido-redução para o AA [54]. Outros métodos importantes são os espectrofotométricos, existindo uma variedade deles, baseados ou não na formação de um cromóforo, para a determinação do AA [55,56], enquanto o método de Trinder, baseado na formação de um complexo colorido de salicilato com Fe^{3+} , é o mais conhecido para a determinação de AAS [57]. Além desses métodos, CLAE, potenciometria e amperometria também podem ser usadas na determinação de AAS [58-60] e AA [61-63]. Entretanto, poucos métodos foram desenvolvidos até o presente momento para a determinação simultânea de AAS e AA. Uma revisão recente da literatura revela apenas a existência uma determinação feita por CLAE [64] e duas determinações baseadas em espectroscopia derivativa [65,66]. Considerando-se o aumento da produção e do consumo de formulações farmacêuticas que empregam conjuntamente AAS e AA, torna-se interessante o desenvolvimento de novas metodologias para determinação simultânea dessas duas espécies.

Nesta aplicação [67], foram obtidos espectros no UV de misturas de AAS e AA, preparadas de acordo com um planejamento experimental, em vários valores de pH. Os dados foram tratados com métodos quimiométricos de primeira e segunda ordens, visando os seguintes objetivos: (1) realizar um estudo exploratório dos equilíbrios simultâneos de AAS e AA em solução aquosa; (2) estimar a constante de dissociação dessas espécies através da decomposição dos dados tridimensionais (amostras x comprimento de onda x pH), usando um

modelo PARAFAC; e (3) desenvolver uma metodologia multivariada para a determinação direta, rápida e simultânea de AAS e AA em comprimidos. A informação espectral relativa às dissociações das duas espécies (mostradas na Figura 4) será usada na modelagem com os métodos de segunda ordem.

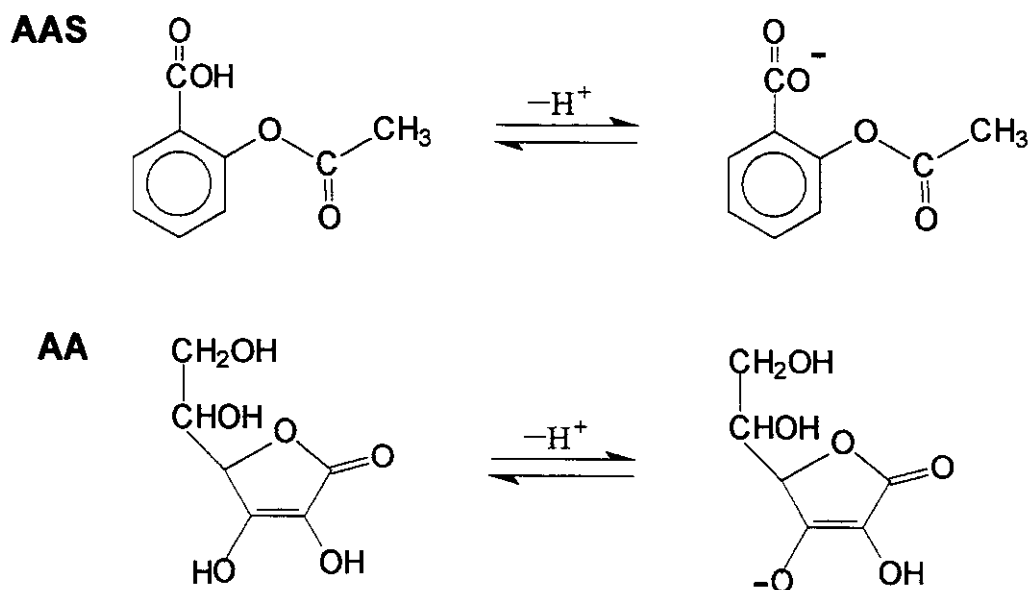


Figura 4. Representação das reações de dissociação do AAS e do AA.

3.2. Parte Experimental

3.2.1. Reagentes e soluções

Os seguintes reagentes foram empregados, todos de grau analítico: AAS, AA, dihidrogenofosfato de potássio, ácido clorídrico, cloreto de potássio, salicilato de sódio, etanol (todos da *Merck*), ácido fosfórico (*Sigma*) e hidróxido de potássio (*Synth*).

Duas soluções estoque de concentração $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas: AA em água e AAS em etanol/água 10:90, v/v (o AAS é pouco solúvel em água). A partir destas, cinco soluções intermediárias, na faixa de concentração de $3,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, foram preparadas para cada ácido, por diluição em água. Seis soluções de concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas na faixa de pH de 1,0 a 5,5: quatro soluções tampão (pH entre 3,0 e 5,5) foram preparadas a partir de KH_2PO_4 e H_3PO_4 ou KOH ; duas outras soluções iônicas de valores de pH 1 e 2 foram preparadas a partir de HCl e HCl/KCl , respectivamente (o KCl foi usado para ajuste de força iônica). A faixa de pH estudada foi escolhida em torno dos valores de pK_{a1} esperados para os dois analitos (3,5 para o AAS e 4,2 para o AA [68]). Embora as soluções tampão preparadas a partir de KH_2PO_4 na faixa de pH entre 4,0 e 5,5 apresentem baixa capacidade tamponante (valores de pH distantes dos valores de pK_1 do KH_2PO_4 , 2,15), as suas concentrações ($10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) são entre 1000 e 10000 vezes maiores do que as concentrações das soluções problemas a serem medidas (10^{-4} a $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, vide seção 3.2.3), garantindo assim, a resistência à mudança de pH nas condições de análise. Todas as soluções foram preparadas usando água deionizada (Milli-Q).

3.2.2. Instrumentação e tratamento dos dados

Um espectrofotômetro UV/visível dispersivo *Pharmacia Biotech*, modelo *Ultrospec 2000*, foi usado e os dados foram registrados com o auxílio dos programas *Swift-Time Drive* e *Wavescan*, versões 1.0. As medidas de pH foram registradas em um pHmetro *Corning*, modelo 350. Os dados foram tratados no programa *MATLAB™*, versão 5.2 (*The MathWorks*, Natick, EUA), usando os pacotes *The N-way Toolbox for MATLAB*, versão 1.00 beta [37], para as análises com o PARAFAC e o N-PLS, e *PLS Toolbox*, versão 2.0 (*Eigenvector Technologies*, Manson, EUA), para as análises com o PLS.

3.2.3. Planejamento experimental e aquisição dos espectros

Os dados foram gerados a partir de um planejamento experimental feito com dois fatores (AAS e AA) e cinco níveis (concentrações na faixa de $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). Esse planejamento, representado na Figura 5, consistiu de dois sub-planejamentos, um 3^2 e um $3^2 - 1$ (dois fatores e três níveis menos o ponto central). O conjunto dos dados foi utilizado na análise com o PARAFAC (deconvolução espectral e estimativa das constantes de dissociação). Para a calibração multivariada, os dados foram divididos em dois conjuntos, um de calibração (planejamento 3^2) e um de validação (planejamento $3^2 - 1$ e faixa de concentração contida na faixa do conjunto de calibração). Para cada valor de pH estudado, dezessete soluções de trabalho foram preparadas de acordo com o planejamento. Essas soluções foram preparadas diretamente na cubeta de quartzo (1,00 cm de caminho ótico), sob agitação, pela adição de 100 µL de soluções intermediárias de cada ácido e 2,80 mL de solução tampão ou iônica para cada respectivo valor de pH. O volume total de solução (3,00 mL) foi escolhido de acordo com a capacidade da cubeta. Apesar da solução estoque de AAS ter sido preparada em etanol/água 10:90 (v/v), ela foi diluída entre 100 e 1000 vezes para a obtenção das soluções de trabalho. Portanto, o conteúdo final de etanol nas soluções medidas foi, no máximo, 0,1 % e foi adotada a aproximação de que os valores de pH eram os mesmos que em água pura. Soluções preparadas da mesma maneira que as soluções de trabalho, mas não contendo nenhum dos analitos, foram usadas como branco para cada conjunto de pH. Os espectros foram coletados na faixa de 210 a 300 nm (passo 1 nm). Também foram obtidos espectros de soluções puras de AAS, AA e ácido salicílico (AS) em cada valor de pH.

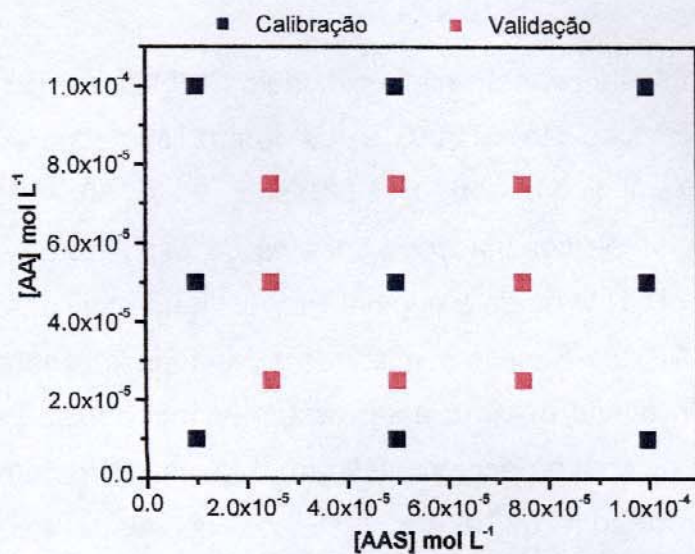


Figura 5. Planejamento experimental usado no estudo das misturas de AAS e AA.

3.2.4. Determinação das amostras comerciais

As amostras de duas formulações farmacêuticas comerciais disponíveis no mercado nacional foram compradas em uma farmácia local. Essas amostras apresentam a seguinte composição por comprimido, especificada pelos fabricantes:

- Amostra 1: 0,40 g de AAS, 0,24 g de AA, bicarbonato de sódio, amido e essência de limão.
- Amostra 2: 0,40 g de AAS, 0,24 g de AA, bicarbonato de sódio, amido, corante vermelho e essência de laranja.

Os comprimidos efervescentes foram dissolvidos em 500 mL de água. Em seguida, uma nova diluição 1:2 foi efetuada e, finalmente, 100 μ L de cada amostra foram misturados na cubeta com 2,80 mL da respectiva solução tampão ou iônica mais 100 μ L de água deionizada. Os espectros das amostras comerciais foram obtidos da mesma maneira que os espectros das soluções de trabalho.

3.2.5. Estimativa da decomposição de AAS a AS em amostras simuladas

Com o objetivo de verificar se o melhor modelo PLS bilinear construído era capaz de prever a decomposição de AAS a AS, foram simulados espectros de misturas de AAS e AA (ambos $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), sob 10, 20, 30, 40, 50 e 100 % de decomposição, através de combinações lineares de espectros puros obtidos experimentalmente em pH 1. O modelo original PLS/pH 1 não foi capaz de prever a decomposição de AAS a AS nestas misturas simuladas e, então, um novo modelo foi construído incluindo o AS (a partir de um espectro experimental). Um novo conjunto de misturas com a decomposição do AAS variando entre 5 e 35 % foi simulado, de acordo com a Tabela 1. Esses espectros foram usados juntamente com os 17 espectros originais das soluções reais, totalizando 23 espectros (9 originais) para a construção e 21 espectros (8 originais) para a validação do novo modelo. Este novo modelo foi usado para prever amostras que simulavam a decomposição do AAS a AS (entre 10 e 100 %) e também as amostras comerciais.

Tabela 1. Amostras simuladas usadas na construção e validação de um modelo PLS para a determinação simultânea de AAS, AA e AS¹

Número da amostra	Concentração		
	10 ⁵ [AA] / mol L ⁻¹	10 ⁵ [AAS] / mol L ⁻¹	10 ⁵ [AS] / mol L ⁻¹
#1 ²	1,00	0,95	0,05
#2	5,00	0,95	0,05
#3	10,00	0,95	0,05
#4	1,00	4,75	0,25
#5	5,00	4,75	0,25
#6	10,00	4,75	0,25
#7	1,00	9,50	0,50
#8	5,00	9,50	0,50
#9	10,00	9,50	0,50
#10	1,00	0,85	0,15
#11	5,00	0,85	0,15
#12	10,00	0,85	0,15
#13	1,00	4,25	0,75
#14	5,00	4,25	0,75
#15	10,00	4,25	0,75
#16	1,00	8,50	1,50
#17	5,00	8,50	1,50
#18	10,00	8,50	1,50
#19	1,00	0,65	0,35
#20	5,00	0,65	0,35
#21	10,00	0,65	0,35
#22	1,00	3,25	1,75
#23	5,00	3,25	1,75
#24	10,00	3,25	1,75
#25	1,00	6,50	3,50
#26	5,00	6,50	3,50
#27	10,00	6,50	3,50

¹ Níveis de decomposição do AAS: 5, 15 e 35 %.

² Números ímpares: amostras de calibração; números pares: amostras de validação.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Estudo exploratório do sistema usando PARAFAC

A Figura 6 mostra os espectros de soluções puras de AAS, AA e AS ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) obtidos nos diferentes valores de pH. Como pode ser observado, em soluções de pH próximo ou menor que dois, o AA apresenta uma banda com máximo de absorção em 243 nm; em soluções de pH maior, esse máximo se desloca para 265 nm. Por outro lado, o AAS apresenta uma banda com λ_{max} em 229 nm, em $\text{pH} < 2$, e mais próximo a 220 nm em pH maior que quatro (neste caso, a banda mostra uma forma em que o máximo não é claramente definido).

Os dados foram agrupados em um arranjo tridimensional (17 amostras x 91 comprimentos de onda x 6 valores de pH) e não sofreram nenhum tipo de pré-tratamento. A Figura 7 mostra uma das superfícies espectrais obtidas em função do pH (amostra de $[\text{AAS}] = [\text{AA}] = 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e representa a montagem do arranjo de dados. Um modelo PARAFAC foi construído sob restrição de não negatividade nas três dimensões dos dados, pois não se esperam valores negativos de concentração ou absorbância. Além disso, foram usados iniciação por valores aleatórios ortogonais e critério de convergência igual a 1×10^{-6} . A etapa mais crítica da modelagem com o PARAFAC está na escolha do número de fatores. Neste caso, a escolha foi baseada inicialmente no prévio conhecimento químico do sistema, pois se esperava a presença de quatro componentes, correspondentes aos dois ácidos e às suas respectivas espécies dissociadas. Um modelo com quatro fatores produziu resultados que foram coerentemente interpretados, explicou 99,7% da variância original dos dados e apresentou um CORCONDIA de 95,6%, o que garante a sua consistência trilinear. Modelos com cinco e seis fatores produziram soluções degeneradas e, portanto, se mostraram inadequados. Soluções degeneradas [35] são soluções difíceis de se ajustarem a um modelo PARAFAC. Em muitos casos, a convergência do algoritmo costuma ser extremamente lenta. Um típico sinal de solução degenerada é a presença de vetores pesos altamente correlacionados em uma mesma dimensão dos dados.

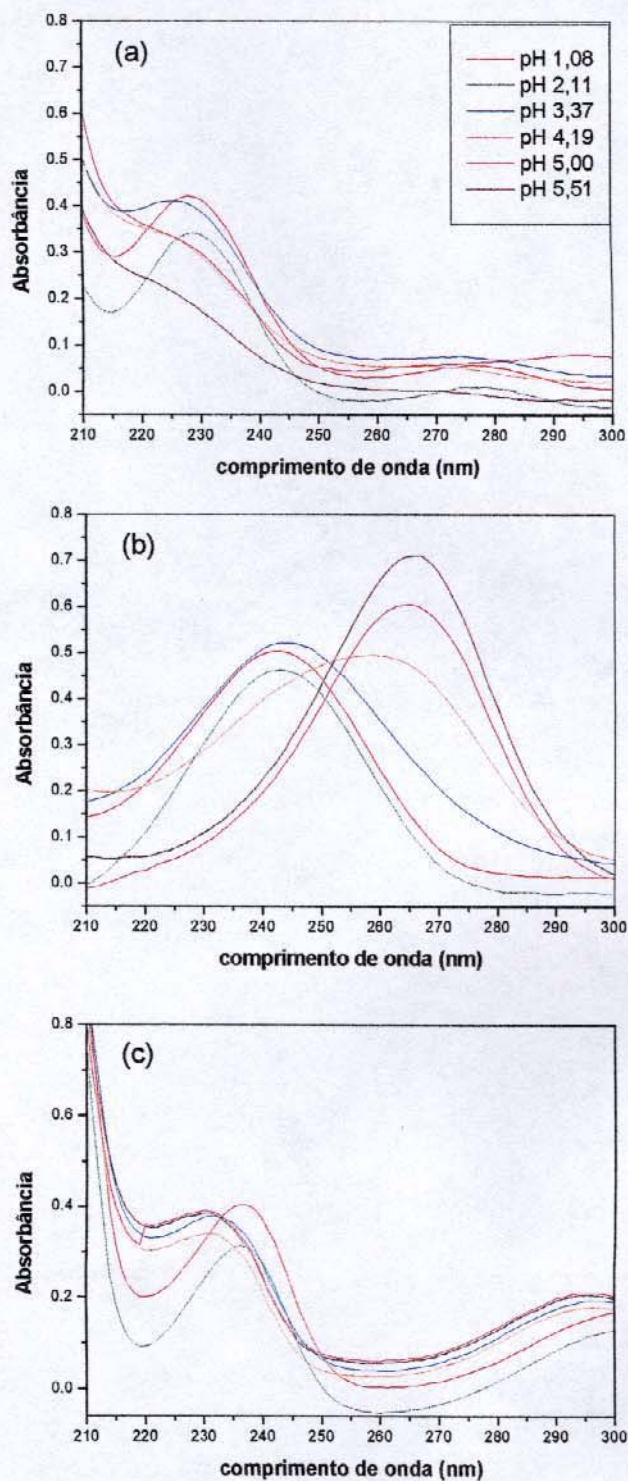


Figura 6. Espectros de soluções puras ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) de (a) AAS, (b) AA e (c) AS, obtidos para seis diferentes valores de pH.

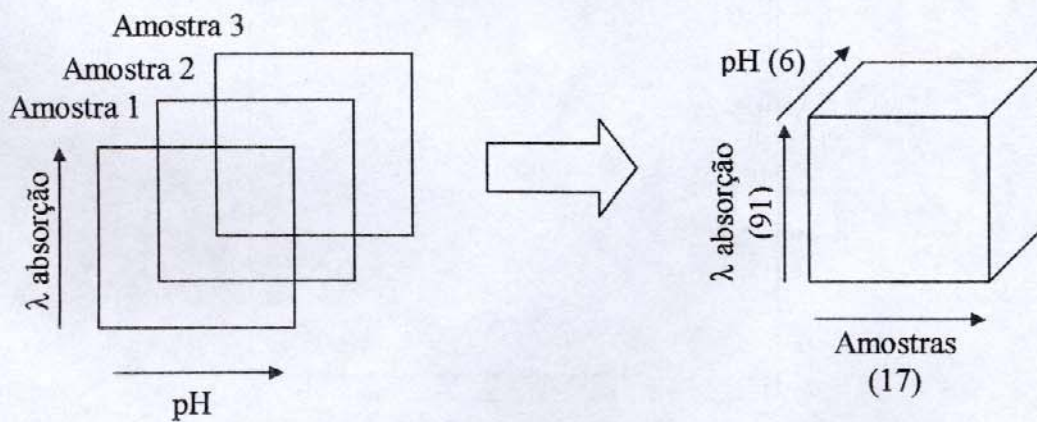
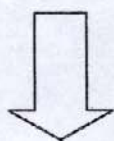
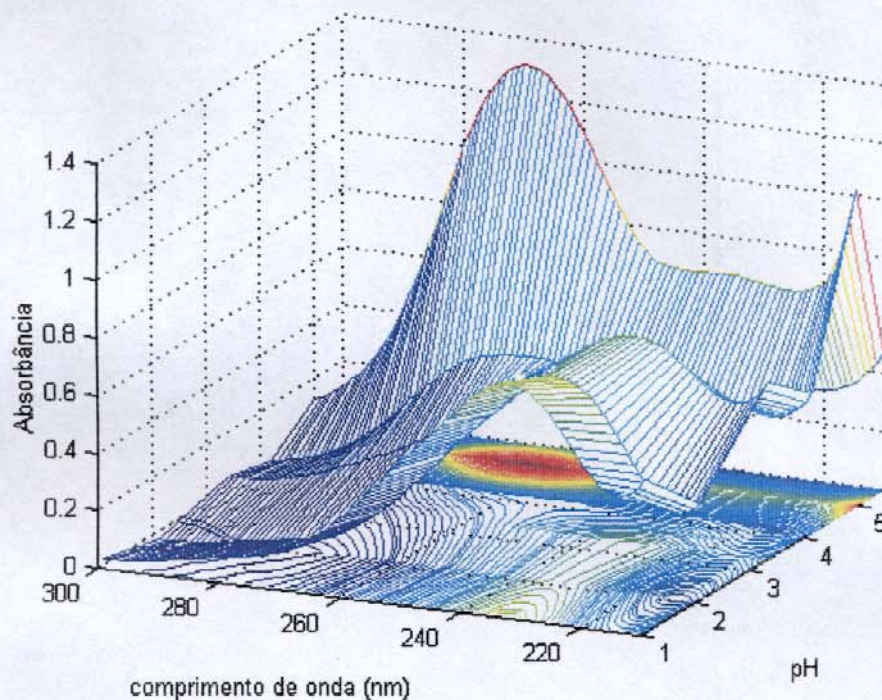


Figura 7. Superfície espectral obtida em função do pH ($[AAS] = [AA] = 5,0 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$) e representação do arranjo de dados tratado com o modelo PARAFAC.

As Figuras 8 e 9 apresentam os resultados do modelo PARAFAC com quatro fatores. Os pesos obtidos para a segunda dimensão dos dados (espectros) são bastante semelhantes aos espectros obtidos para o AAS e o AA puros (pH=1) e para as suas respectivas espécies deprotonadas (pH=5,5), os íons acetilsalicilato e ascorbato. Esses pesos são mostrados na Figura 8, em sobreposição aos espectros das espécies puras obtidos experimentalmente. Nesta figura, tanto os pesos quanto os espectros foram normalizados para valores entre 0 e 1. A Figura 9 mostra os pesos obtidos para a terceira dimensão dos dados, os quais representam a distribuição das espécies em função do pH. Foram ajustadas funções sigmóides a essas distribuições. As constantes de dissociação para ambos os ácidos podem ser estimadas através dessa figura, conforme indicado pela projeção do cruzamento das respectivas curvas no eixo das abscissas. Os valores de pK_a estimados foram 3,41 para o AAS e 4,10 para o AA. Esses valores estão bem próximos dos encontrados na literatura, 3,49 para o AAS e 4,17 para o AA, a 25 °C [68], valores estes determinados por titulação potenciométrica [69]. Estes resultados indicam que o modelo adotado foi bastante adequado aos dados.

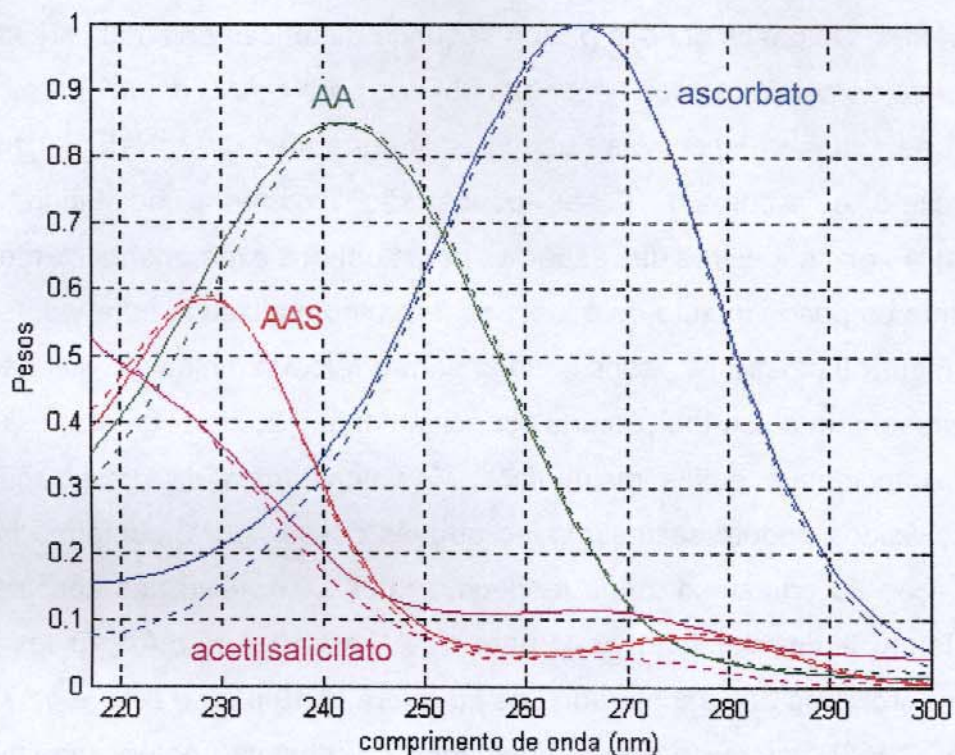


Figura 8. Espectros deconvoluídos, obtidos através dos pesos do modelo PARAFAC (linhas sólidas), sobrepostos aos espectros obtidos experimentalmente (linhas tracejadas). Todos os espectros foram normalizados entre 0 e 1.

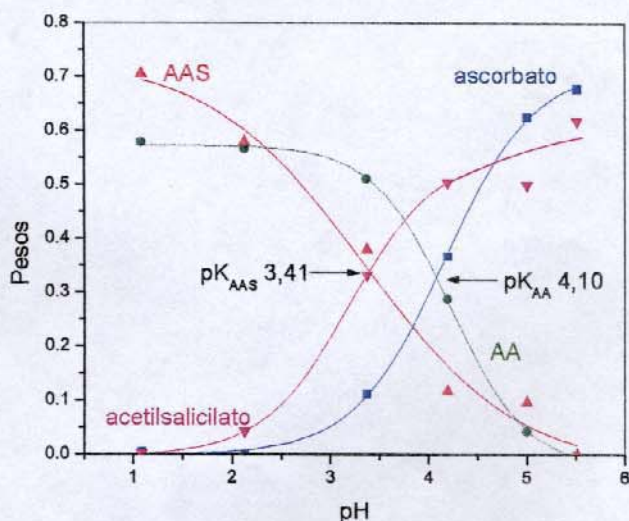


Figura 9. Distribuição das espécies em função do pH, obtidas através dos pesos do modelo PARAFAC.

3.3.2. Calibração multivariada e determinação de amostras comerciais usando PLS e N-PLS

Conforme já mencionado (seção 2.3.2), o modelo PARAFAC pode ser usado para a calibração multivariada de dados multidimensionais, seguindo uma estratégia análoga à do PCR, sendo que os pesos da dimensão das amostras podem ser usados como variáveis independentes em uma regressão linear. Entretanto, o uso do N-PLS para este fim pode ser mais vantajoso em certas situações. Como a solução do PARAFAC não é cumulativa, torna-se necessário construir diferentes modelos para cada número de fatores e testá-los individualmente. Levando em conta que o algoritmo para a resolução do PARAFAC é bem mais lento que o do N-PLS, a vantagem em termos de tempo e simplicidade de processamento dos dados pode ser significativa, dependendo do tamanho do conjunto de dados, da velocidade do processador e da memória computacional disponível (em alguns casos, um modelo PARAFAC pode levar mais de uma hora para convergir). Além disso, o N-PLS pode fornecer um modelo de previsão mais estável e robusto devido à incorporação da informação das variáveis dependentes na decomposição das variáveis independentes. Desta maneira, optou-se pela calibração multivariada usando um modelo trilinear N-PLS, o qual foi comparado com modelos bilineares PLS construídos individualmente para cada conjunto de pH. Os modelos foram construídos com apenas nove soluções e usados para prever outras oito soluções, de acordo com um planejamento experimental (Figura 5). A raiz quadrada dos erros médios quadrados de previsão (RMSEP, *Root Mean Square Error of Prediction*) do conjunto de validação e o coeficiente de correlação (r) entre os valores reais e os previstos foram os parâmetros usados para a comparação entre os diversos modelos. O RMSEP é calculado pela Equação 13, onde y_r é o valor padrão (esperado) da variável dependente (neste caso, concentração), \hat{y}_p é o valor previsto pelo modelo e n é o número de amostras previstas.

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum (y_r - \hat{y}_p)^2}{n}} \quad (13)$$

Modelos PLS1 e PLS2 forneceram resultados similares e, portanto, os resultados do PLS2 foram escolhidos por serem obtidos de maneira mais direta. A região espectral entre 210 e 225 nm foi eliminada dos modelos, pois foi verificada empiricamente uma melhora nas previsões. Uma possível explicação para este resultado pode estar associada à interação do branco (fosfato) com o analito, o que poderia gerar instabilidade no sinal analítico nesta região. Charles e co-autores também observaram que a eliminação dessa mesma região espectral melhorou a previsão de aspirina em uma determinação simultânea de três fármacos usando calibração multivariada [70]. Eles atribuíram essa observação à forte sobreposição espectral do sinal das espécies nessa região e a um desvio da Lei de Beer. Entretanto, essa região espectral foi essencial para a modelagem dos dados com o PARAFAC (seção 3.3.1), visto que a sua eliminação impossibilitou a decomposição dos dados. Portanto, o modelo N-PLS foi construído a partir de um arranjo de dados formado por 9 amostras, 76 comprimentos de onda e 6 valores de pH. Os modelos PLS foram construídos a partir de matrizes 9 x 76.

A Tabela 2 mostra os valores dos parâmetros RMSEP e r obtidos para todos os modelos construídos. O número ótimo de variáveis latentes foi dois para todos os modelos PLS e quatro para o N-PLS. Os melhores modelos PLS2 foram obtidos em valores de pH menores que dois. Curiosamente, este resultado não deveria ser esperado, pois os espectros do AAS e do AA apresentam melhores resolução e sensibilidade ($\epsilon_{265} > \epsilon_{243}$ para o AA) em valores de pH maiores que 3 (Figura 6). Entre as hipóteses para o comportamento observado, pode-se citar uma possível instabilidade do íon ascorbato. Fernandes e co-autores mostraram que o AA pode sofrer até 21 % decomposição a ácido dehidroascórbico (não absorve entre 210 e 300 nm) na presença de oxigênio em pH 5,0-5,6, em um período de 30 a 60 minutos [71]. Além disso, o AAS apresenta em pH > 3 uma banda espectral, na qual não há um máximo claramente definido e onde pequenas flutuações na absorvância podem levar a erros significativos nas concentrações previstas. Por fim, o N-PLS foi considerado o melhor modelo, pois forneceu resultados significativamente superiores aos melhores modelos PLS. Um teste F com 8 e 8 graus de liberdade ($F_{8,8}$), no nível de 95 % de confiança, indicou que os

valores de RMESP para a previsão do AAS e do AA com o modelo N-PLS são significativamente menores que os valores de RMSEP para as previsões do AAS com o modelo PLS/pH1 e do AA com o modelo PLS/pH2, respectivamente.

Tabela 2. Erros de previsão e coeficientes de regressão entre os valores reais e previstos obtidos para o conjunto de validação, para cada modelo construído

RMSEP e r	PLS2/pH						N- PLS2
	1,08	2,11	3,37	4,19	5,00	5,51	
10^6 [AAS] _{RMSEP} mol L ⁻¹	8,21	4,55	10,3	10,7	19,2	26,5	3,77
ASA _r	0,991	0,998	0,987	0,996	0,965	0,953	0,998
10^6 [AA] _{RMSEP} mol L ⁻¹	5,17	7,13	10,8	10,0	25,6	7,42	2,42
AA _r	0,998	0,997	0,991	0,995	0,923	0,997	0,999

Os dois melhores modelos de calibração, N-PLS e PLS/pH 1, foram usados para a determinação simultânea de AAS e AA em formulações farmacêuticas comerciais de dois diferentes fabricantes. Os resultados são mostrados na Tabela 3 e estão em boa concordância com os valores especificados pelos fabricantes, sendo que as maiores diferenças observadas foram de 4 % para a previsão do AAS com o PLS/pH1 e 2% para a previsão do AA com o N-PLS. Os modelos PLS em valores de pH maiores que 3 forneceram previsões para essas amostras com diferenças em relação aos valores especificados pelos fabricantes em torno de, ou superiores a 10 % (em alguns casos, essa diferença esteve em torno de 5 %). O modelo PLS/pH2 produziu previsões semelhantes às do modelo PLS/pH1. Embora

o N-PLS tenha apresentado melhores previsões para amostras sintéticas, os resultados para amostras comerciais foram semelhantes aos do PLS/pH1. Considerando uma análise de rotina, a utilização do modelo PLS/pH 1 poderia ser considerada mais adequada devido à maior simplicidade, pois para a construção de um modelo N-PLS as amostras precisam ser medidas em vários valores de pH.

Tabela 3. Determinação simultânea de AAS e AA em comprimidos usando calibração multivariada

Amostras ¹	Valores Previstos (g por comprimido)			
	N-PLS2		PLS2 / pH1	
	AAS	AA	AAS	AA
#1	0,392	0,245	0,416	0,254
#2	0,397	0,252	0,396	0,248

¹ Conteúdo de ambas as amostras: 0,40 g de AAS e 0,24 g de AA.

3.3.3. Construção de um modelo PLS/pH1 para estimar a decomposição de AAS a AS em amostras simuladas

Muitos métodos para a determinação de AAS são indiretos. Neles, o AAS é primeiro convertido a AS e depois determinado [57,60]. Um problema com esses métodos é que eles não consideram a hipótese de uma possível decomposição do AAS a AS (hidrólise), que pode ocorrer em ambientes úmidos. Se essa decomposição ocorrer em um certo nível, os produtos comerciais podem conter uma quantidade de AAS menor do que a especificada. Portanto, é interessante o desenvolvimento de métodos de determinação que levem em conta uma possível decomposição do AAS a AS. O modelo PLS/pH1 previamente desenvolvido foi testado em amostras de AAS e AA, as quais simulavam um grau de decomposição de AAS a AS entre 10 e 100 %, e não forneceu bons resultados. Ele previu 2,5% de decomposição para uma amostra sob 10% e 30% de decomposição para uma amostra sob 100%. Além disso, os erros para a previsão de AA aumentavam como aumento da decomposição de AAS (20% de erro sob decomposição total). Claramente, este modelo não fez uma boa distinção entre AAS e AS, o que pode ser explicado pela semelhança de seus espectros de absorção no UV (Figura 6). Foi então proposto um novo modelo, baseado no princípio de incorporar o interferente ao modelo ao invés de separá-lo. Vinte e sete novas misturas foram simuladas a partir dos espectros puros de AAS, AA e AS obtidos em pH 1 (Tabela 1). O novo modelo foi construído com 14 novas amostras simuladas mais as 9 reais do conjunto original de calibração, as quais não continham AS. O conjunto de validação foi preparado com 13 amostras simuladas mais as 8 reais originais. Os valores de RMSEP e r determinados para o novo modelo, assim como as previsões das amostras reais, são mostrados na Tabela 4. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos com o modelo original. O modelo foi capaz ainda de prever a decomposição de AAS a AA, conforme demonstrado pelos resultados da Tabela 5.

Tabela 4. Parâmetros para o novo modelo PLS/pH1, que inclui AS, obtidos na previsão do novo conjunto de validação, e determinação das amostras comerciais

	AAS	AA	AS
10^6 [RMSEP] / mol L ⁻¹	6,23	4,89	3,49
r	0,999	0,999	0,997
Determinação das amostras (g/comprimido)			
#1	0,426	0,258	n.d. ¹
#2	0,401	0,251	n.d. ¹

¹ não detectável (valores negativos próximos de zero).

Tabela 5. Previsão do conjunto de amostras simulando a decomposição de AAS a AS, usando o novo modelo PLS/pH1

Grau de decomposição	10^5 Concentração / mol L ⁻¹					
	Real			Obtida		
	AA	AAS	AS	AA	AAS	AS
10%	5,00	4,50	0,50	5,00	4,53	0,46
20%	5,00	4,00	1,00	5,00	4,03	0,97
30%	5,00	3,50	1,50	4,99	3,52	1,49
40%	5,00	3,00	2,00	4,99	3,01	2,01
50%	5,00	2,50	2,50	4,98	2,51	2,51
100%	5,00	0,00	5,00	4,96	0,00	5,09

3.4. Conclusão

A deconvolução espectral usando métodos de primeira ordem (bilineares) tais como PCA não costuma ser possível, a menos que severas restrições sejam aplicadas ao modelo. Isto tem levado ao desenvolvimento de métodos que funcionam bem sob determinadas condições específicas, mas que não são facilmente generalizáveis [72-74]. O PARAFAC tem a propriedade de produzir solução única, independente de rotação, e devido a isto tem se mostrado uma excelente ferramenta para a resolução de curvas em um número mais abrangente de aplicações. Na presente aplicação, ele forneceu ótimos resultados para a deconvolução dos espectros de AAS, AA e suas respectivas espécies ionizadas, os íons acetilsalicilato e ascorbato. Além disso, o uso de PARAFAC e espectrofotometria no UV proporcionou uma nova maneira de estimar valores de pK , a qual pode ser aplicada a ácidos ou bases muito fracas. Por outro lado, pouquíssimos métodos foram previamente propostos na literatura para a determinação simultânea de AAS e AA. O presente trabalho apresentou um novo método que forneceu bons resultados. Embora o N-PLS tenha fornecido melhores resultados para amostras sintéticas, o modelo PLS/pH1 poderia ser indicado como mais adequado para uma análise de rotina, devido à maior simplicidade dos procedimentos necessários. Uma possível alternativa para simplificar esta determinação usando o N-PLS seria a automação através de um sistema de injeção em fluxo com gradiente de pH e detecção no UV por arranjo de diodos. Finalmente, um novo modelo PLS, robusto o bastante para distinguir o teor de AS proveniente da hidrólise de AAS, foi proposto e testado em amostras simuladas e reais.

CAPÍTULO 4

APLICAÇÃO DE N-PLS NA DETERMINAÇÃO
ESPECTROFOTOMÉTRICA SIMULTÂNEA DE
ÁCIDO ACETILSALICÍLICO, PARACETAMOL E
CAFEÍNA

4.1. Introdução

O AAS, o paracetamol (PRC) e a cafeína (CAF) são comercializados de maneira combinada na mesma formulação farmacêutica em vários países. Essas formulações possuem efeitos analgésico e antipirético. O efeito analgésico do AAS [52] e do PRC pode ser reforçado pelo poder estimulante da CAF [75]. O PRC, também conhecido como acetaminofeno, possui a vantagem adicional sobre o AAS de não irritar a mucosa gastro-intestinal [76]. As fórmulas estruturais do PRC e da CAF são mostradas na Figura 10 (a fórmula do AAS foi mostrada na Figura 4, seção 3.1).

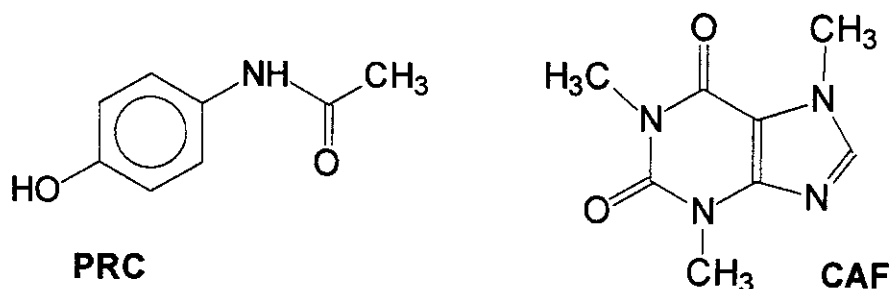


Figura 10. Fórmulas estruturais do PRC e da CAF.

Os métodos mais comuns para a determinação dessas substâncias em comprimidos ou cápsulas são baseados em técnicas cromatográficas, tais como CLAE [5,77,78], cromatografia de camada delgada de alta eficiência (HPTLC, *High-Performance Thin-Layer Chromatography*) [79] e cromatografia eletrocínética micelar (MEKC, *Micellar ElectroKinetic Chromatography*) [80]. Nos últimos anos, o uso de métodos quimiométricos e técnicas espectroscópicas passou a representar uma nova alternativa para a análise dessas substâncias. A calibração multivariada com PLS foi empregada na determinação simultânea de AAS, PRC e CAF em combinação com um sistema de injeção em fluxo interrompido com detecção por infravermelho com transformada de Fourier [81] e também em um sistema de fluxo

com retenção em fase sólida (resina C18 quimicamente ligada) e detecção por UV [82]. No entanto, os métodos mais simples usados para essa determinação foram baseados na medida de soluções aquosas em um espectrofotômetro de arranjo de diodos e no tratamento dos dados com PLS [8,83].

Nesta aplicação [84], foi feita a modelagem quimiométrica de um sistema de três fármacos. Em relação à aplicação apresentada no Capítulo 3, passou-se do estudo de um sistema binário para o estudo de um sistema ternário. O objetivo é determinar simultaneamente AAS, PRC e CAF em comprimidos, a partir de espectrofotometria no UV e um reduzido número de soluções, preparadas de acordo com um planejamento experimental. O experimento foi repetido em vários valores de pH. Modelos PLS obtidos em cada pH foram comparados com um modelo N-PLS construído com todos os dados.

4.2. Parte Experimental

4.2.1. Reagentes e soluções

Os seguintes reagentes foram empregados, todos de grau analítico: AAS, dihidrogenofosfato de potássio, ácido clorídrico, cloreto de potássio, etanol (todos da *Merck*), ácido fosfórico (*Sigma*), CAF (*Ecibra*), hidróxido de potássio e PRC (ambos da *Synth*).

A unidade de concentração escolhida para ser usada nesta aplicação foi $\mu\text{g mL}^{-1}$, seguindo a tendência da maior parte da literatura científica sobre determinações analíticas de fármacos. Na aplicação anterior (Capítulo 3), ao contrário, foi usada a unidade mol L^{-1} . Três soluções estoque de concentração $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas: PRC e CAF em água e AAS em etanol/água 20:80, v/v (o AAS é pouco solúvel em água). A partir destas, cinco soluções intermediárias foram preparadas por diluição em água, nas faixas de concentração de 300 a $450 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o AAS e o PRC e na faixa de 60 a $180 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a CAF. Três soluções tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de valores de pH 3,0, 4,0 e 5,0, respectivamente, foram preparadas a partir de H_3PO_4 e KH_2PO_4 e tiveram o seu

valor ajustado com H_3PO_4 ou KOH . Uma solução iônica $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 2,0 foi preparada a partir de HCl e KCl (o KCl foi usado para ajuste de força iônica). A faixa de pH estudada foi escolhida de acordo com as aplicações de calibração multivariada de primeira ordem encontradas na literatura para a determinação desses fármacos (pH entre 1,0 e 5,5) [8,82,83]. As considerações a respeito da capacidade tamponante das soluções na faixa de pH entre 4,0 e 5,5, feitas no capítulo anterior (seção 3.2.1), são válidas também para esta aplicação. Todas as soluções foram preparadas usando água deionizada (Milli-Q).

4.2.2. Instrumentação e tratamento dos dados

Um espectrofotômetro UV/visível de arranjo de diodos *Agilent HP8453* foi usado para a aquisição dos dados, juntamente com o *Agilent UV-Visible ChemStation Software*. As medidas de pH foram registradas em um pHmetro *Corning*, modelo 350. Os dados foram tratados no programa *MATLAB™*, versão 6.1 (*The MathWorks*, Natick, EUA), usando os pacotes *The N-way Toolbox for MATLAB*, versão 2.00 [37], para as análises com o N-PLS, e *PLS Toolbox*, versão 2.0 (*Eigenvector Technologies*, Manson, EUA), para as análises com o PLS. Um banho ultra-sônico (*Unique*) foi utilizado na dissolução das amostras.

4.2.3. Planejamento experimental e aquisição dos espectros

As soluções do conjunto de calibração foram preparadas de acordo com um planejamento experimental $2^3 + 1$ (3 fatores e 2 níveis mais um ponto central, Tabela 6), nas faixas de 10 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para AAS e PRC e de 2 a 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CAF. As misturas sintéticas usadas como conjunto de validação foram preparadas de acordo com um planejamento 2^3 similar ao anterior (sem o ponto central). Para este conjunto de validação, os níveis superiores foram 13,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para AAS e PRC e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CAF e os níveis inferiores foram 11,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para AAS e PRC e 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CAF. Dezesete soluções de trabalho (conjuntos de calibração e validação) foram preparadas diretamente na cubeta (1,00 cm de caminho ótico), pela adição de 100 μL de cada solução intermediária e 2,70 mL de solução tampão ou iônica, em cada respectivo valor de pH. O volume total de

solução (3,00 mL) foi escolhido de acordo com a capacidade da cubeta. Apesar da solução estoque de AAS ter sido preparada em etanol/água 20:80 (v/v), ela foi diluída entre 200 e 300 vezes para a obtenção das soluções de trabalho. Portanto, o conteúdo final de etanol nas soluções medidas foi menor ou igual a 0,1 % e a aproximação de que os valores de pH eram os mesmos que em água pura foi adotada. Soluções preparadas da mesma maneira que as soluções de trabalho, mas não contendo nenhum dos analitos, foram usadas como branco para cada conjunto de pH. Os espectros foram coletados na faixa de 210 a 300 nm (passo 1 nm). Espectros de soluções puras de AAS, PRC e CAF também foram obtidos em cada pH.

Tabela 6. Planejamento experimental $2^3 + 1$ para o conjunto de calibração usado na determinação simultânea de AAS, PRC e CAF¹

Solução /	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Analito									
AAS	+	+	+	-	-	-	+	-	~
PRC	+	+	-	+	-	+	-	-	~
CAF	+	-	+	+	+	-	-	-	~

¹Nível (+): AAS 15.0 µg mL⁻¹, PRC 15.0 µg mL⁻¹, CAF 6.0 µg mL⁻¹.

Nível (-): AAS 10.0 µg mL⁻¹, PRC 10.0 µg mL⁻¹, CAF 2.0 µg mL⁻¹.

Nível (~): AAS 12.5 µg mL⁻¹, PRC 12.5 µg mL⁻¹, CAF 4.0 µg mL⁻¹.

4.2.4. Determinação das amostras comerciais e teste de recuperação

Amostras de duas formulações farmacêuticas comerciais foram analisadas, a primeira disponível no mercado nacional e a segunda no mercado norte-americano. Essas amostras apresentam a seguinte composição por comprimido, especificada pelos fabricantes:

- Amostra 1: 200mg de AAS, 150 mg de PRC e 50 mg de CAF.
- Amostra 2: ingredientes ativos: 250mg de AAS, 250 mg de PRC e 65 mg de CAF; ingredientes inativos: ácido benzóico, cera de carnaúba, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, celulose microcristalina, óleo mineral, polisorbato 20, polividona, propileno glicol, emulsão de simeticona, monolaurato de sorbitol e ácido esteárico; pode também conter: corante azul FD&C nº 1 e dióxido de titânio.

Seis comprimidos de cada formulação foram pesados individualmente para se obter valores médios representativos. Os comprimidos foram finamente triturados em um almofariz e depois misturados. Massas correspondentes ao valor médio de um comprimido de cada formulação foram pesadas e dissolvidas em 500mL de etanol/água (20:80, v/v), com o auxílio de um banho ultra-sônico (15 minutos). Alíquotas de 100 μL de cada solução de amostra foram misturadas diretamente na cubeta com 200 μL de água e 2,70 mL de solução tampão ou iônica, em cada respectivo valor de pH. Os espectros destas soluções foram obtidos da mesma maneira descrita na seção anterior. Um teste de recuperação foi também realizado, consistindo na adição de alíquotas de 100 μL de solução padrão 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito a cada solução de amostra. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Espectros de absorção no UV de AAS, PRC e CAF

A Figura 11 mostra os espectros de absorção no UV para soluções aquosas de AAS, CAF e PRC em pH 2 ($[\text{AAS}] = [\text{PRC}] = 15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $[\text{CAF}] = 6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Como pode ser observado, existe uma forte sobreposição entre eles, impedindo o uso de calibração univariada em uma determinação direta simultânea. Os dados foram coletados entre pH 2 e 5. Os espectros de PRC e CAF praticamente não variaram com o pH, o que já era esperado, pois essas

espécies não sofrem ionização nessas condições (o pK_{a1} estimado para o PRC é aproximadamente 9,5 [85], enquanto a CAF não sofre ionização em pH maior que 1). Em contraste, os espectros de AAS mostraram um comportamento já descrito na aplicação anterior (Figura 6, seção 3.3.1): λ_{max} em 229 nm a pH 2 e deslocamento para valores de λ menores em valores de pH maiores. A mudança espectral é causada pela ionização do AAS, cujo pK_a é aproximadamente 3,5 (seção 3.3.1). Apesar desta mudança, os espectros das três espécies continuam sobrepostos em pH 5, embora em menor grau.

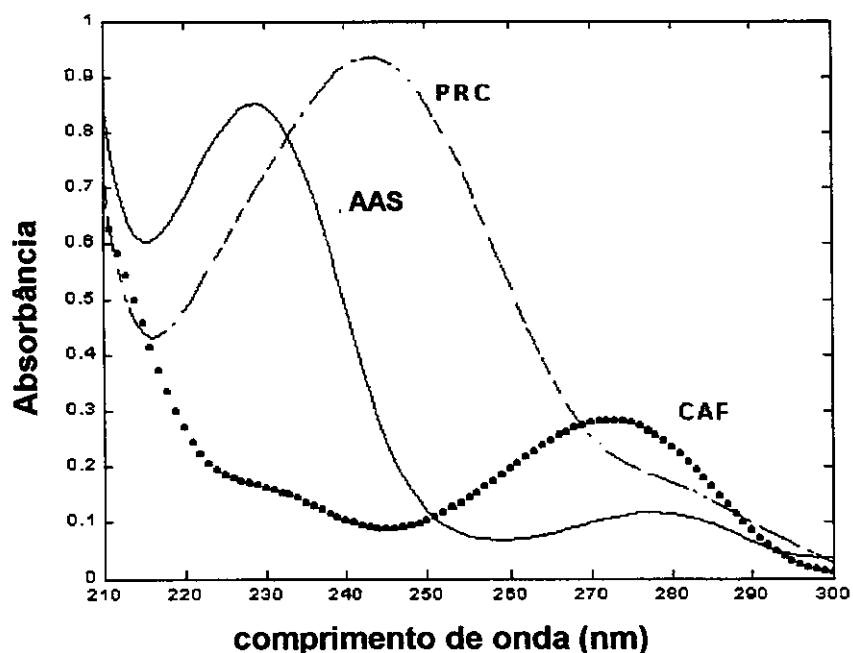


Figura 11. Espectros de absorção no UV de AAS, PRC e CAF obtidos em pH 2,0.
[AAS] = [PRC] = 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e [CAF] = 6,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.3.2. Calibração multivariada usando PLS e N-PLS

Para o sucesso de uma calibração multivariada é necessário um planejamento experimental adequado. Nesta aplicação, um conjunto de calibração foi construído com apenas nove soluções, de acordo com a Tabela 6. Outras oito soluções foram usadas como conjunto de validação, de acordo com um segundo planejamento (seção 4.2.3), cuja faixa de concentração está contida no primeiro planejamento. Poderia-se argumentar que este planejamento de calibração de dois níveis (mais um ponto central) é inadequado, pois normalmente quatro ou cinco níveis de concentração seriam necessários para cada analito [4]. Entretanto, essa escolha depende fortemente da natureza do sistema a ser calibrado. Este planejamento reduzido certamente seria insuficiente para matrizes mais complexas, tais como amostras de solo analisadas no infravermelho. Mas, ele pode ser considerado adequado para matrizes mais simples, tais como as usadas nesta aplicação (soluções aquosas sintéticas), o que pode ser demonstrado pelos bons resultados obtidos aqui e em outras aplicações encontradas na literatura [8,81,83].

Um modelo PLS foi elaborado para cada conjunto de pH (matrizes 9 x 91) e um arranjo de dados tridimensional (9 soluções x 91 comprimentos de onda x 4 valores de pH) foi construído combinando todos os conjuntos e usado para elaborar o modelo N-PLS. A seguir, são discutidos os resultados para a previsão das amostras sintéticas do conjunto de validação. Modelos PLS1 e PLS2 produziram resultados bastante semelhantes e, por isso, somente os resultados para o PLS2 são apresentados. A Tabela 7 mostra os valores de RMSEP obtidos para cada um dos modelos elaborados, todos usando três variáveis latentes. O modelo PLS obtido em pH 5 foi considerado o melhor entre os modelos bilineares, com o menor valor de RMSEP para o AAS, mas apenas o segundo menor para a CAF e o terceiro para o PRC. Também foi observado que, com o aumento do pH, abaixou o RMSEP do AAS, o que pode ser atribuído à diminuição do grau de sobreposição entre os espectros do PRC e do AAS (Figuras 6 e 11). Este resultado aparentemente está em oposição ao da aplicação anterior (seção 3.3.2),

onde a melhor previsão para o AAS foi obtida em pH 2. No entanto, é preciso considerar que os sistemas analisados nas duas aplicações são diferentes.

Por outro lado, o modelo N-PLS foi considerado o melhor modelo para a determinação simultânea dos três fármacos, o que pode ser atribuído à incorporação de maior quantidade de informação (todos os conjuntos de pH). As previsões do N-PLS para o AAS e para a CAF foram as melhores (RMSEP 18% menor para o AAS e 35% menor para a CAF, em relação ao modelo PLS/pH5). Entretanto, o N-PLS apresentou previsões para o PRC inferiores às do modelo PLS/pH2 (RMSEP 14% maior), o qual por sua vez apresentou erros muito altos na previsão de AAS e CAF.

Tabela 7. Valores de RMSEP entre as concentrações reais e as previstas para oito misturas sintéticas (conjunto de validação), para cada modelo construído

Analito	PLS/pH2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	PLS/pH3 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	PLS/pH4 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	PLS/pH5 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	N-PLS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
AAS	0,728	0,337	0,306	0,184	0,152
PRC	0,480	0,573	0,816	0,619	0,548
CAF	0,433	0,377	0,276	0,329	0,213

Os resultados das previsões individuais das amostras sintéticas do conjunto de validação usando o modelo N-PLS2 são apresentados na Tabela 8. Os resultados mais exatos foram obtidos nas previsões do AAS, cujos erros foram de 2,6 %, no máximo. As previsões para o PRC no nível mais alto ($13,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentaram erros entre 5 e 6 %. Os erros mais altos, de até 10 %, foram observados para a previsão da CAF no nível mais baixo ($3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), o que pode indicar um possível limite inferior do método.

Tabela 8. Determinação simultânea de AAS, PRC e CAF em oito misturas sintéticas diferentes (conjunto de validação) usando N-PLS2

Quantidade adicionada ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			Quantidade prevista ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			Erro (%)		
AAS	PRC	CAF	AAS	PRC	CAF	AAS	PRC	CAF
13,5	13,5	5,0	13,7	14,3	5,0	1,5	5,9	0,0
13,5	13,5	3,0	13,5	14,3	2,7	0,0	5,9	-10,0
13,5	11,5	5,0	13,3	11,4	5,1	-1,5	-0,9	2,0
11,5	13,5	5,0	11,8	14,2	5,0	2,6	5,2	0,0
11,5	11,5	5,0	11,4	11,3	5,0	-0,9	-1,7	0,0
11,5	13,5	3,0	11,4	14,3	2,8	-0,9	5,9	-6,7
13,5	11,5	3,0	13,6	11,5	2,7	0,7	0,0	-10,0
11,5	11,5	3,0	11,4	11,4	2,7	-0,9	-0,9	-10,0

4.3.3. Determinação das amostras comerciais e teste de recuperação

Duas diferentes formulações farmacêuticas disponíveis comercialmente foram analisadas usando os dois melhores modelos, N-PLS e PLS/pH5. Os resultados são mostrados na Tabela 9 e foram semelhantes para ambos os modelos. Todas as previsões estão próximas aos valores especificados pelos fabricantes. A maior diferença entre os valores especificados e os previstos foi de 8 % para a determinação de CAF na amostra 1, usando o modelo N-PLS. Os desvios padrão obtidos para as determinações em triplicata com o modelo PLS/pH5 foram maiores, o dobro na maioria dos casos, do que os obtidos com o N-PLS, indicando uma maior precisão deste último modelo. As previsões das amostras comerciais usando os demais modelos PLS bilineares (pH 2, 3 e 4) forneceram resultados (não mostrados) que foram considerados insatisfatórios

(diferença maior que 10 % entre os valores previstos e os especificados pelo fabricante) para pelo menos um dos três analitos.

Um teste de recuperação foi também realizado, consistindo na adição de uma quantidade conhecida de cada um dos analitos a cada uma das amostras. A Tabela 10 mostra a percentagem de recuperação para cada adição. Como pode ser visto, essa recuperação variou entre 95 e 105 % para a CAF e entre 98 e 101 % para o PRC e o AAS, corroborando a eficiência do método proposto.

Tabela 9. Determinação simultânea de AAS, PRC e CAF em duas amostras comerciais usando N-PLS2 e PLS2/pH5

Amostra	Especificação (mg/comprimido)			Quantidade prevista com N-PLS (mg/comprimido) ¹			Quantidade prevista com PLS/pH5 (mg/comprimido) ¹		
	AAS	PRC	CAF	AAS	PRC	CAF	AAS	PRC	CAF
#1	200	150	50	200±1	152±1	54±1	205±2	151±1	52±2
#2	250	250	65	243±1	257±2	68±1	242±2	255±3	69±2

¹ Valores médios e desvios padrão de três determinações.

Tabela 10. Valores de recuperação obtidos para a adição padrão de 100 µL de solução 30 µg mL⁻¹ de cada analito a cada amostra

Amostra	N-PLS2			PLS2/pH5		
	Recuperação (%) ¹					
	AAS	PRC	CAF	AAS	PRC	CAF
#1	101±1	99±1	105±2	101±1	98±1	95±2
#2	99±1	100±1	98±2	101±1	99±1	95±2

¹ Valores médios e desvios padrão de três determinações.

4.4. Conclusão

A combinação de calibração multivariada e espectrofotometria no UV se mostrou uma alternativa viável e de relativo baixo custo para a determinação simultânea de AAS, PRC e CAF, sendo capaz de prever com exatidão e precisão adequadas amostras de formulações comerciais. A determinação usando o modelo N-PLS forneceu resultados mais exatos para um conjunto de amostras sintéticas e mais precisos para as amostras reais, em relação aos modelos PLS. Apesar dos melhores resultados, o modelo N-PLS apresentou a desvantagem de necessitar de um procedimento mais trabalhoso e demorado, pois as soluções precisaram ser medidas a vários valores de pH. O uso de um sistema de análise por injeção em fluxo com gradiente de pH e detecção no UV por arranjo de diodos seria uma alternativa mais simples e rápida para a determinação simultânea destes fármacos usando o N-PLS. Além da maior praticidade, a automação pode levar à diminuição dos erros provenientes do preparo das amostras, já que menos soluções serão preparadas (neste caso, quatro vezes menos, pois as medidas foram feitas em quatro valores de pH).

CAPÍTULO 5

DETERMINAÇÃO DIRETA DE DICLOFENACO

EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

CONTENDO VITAMINAS DO COMPLEXO B

POR MEIO DE ESPECTROFOTOMETRIA NO

UV E PLS

5.1. Introdução

O diclofenaco (DCF), ácido 2-(2',6'-dicloroanilino)-fenilacético (Figura 12), é uma droga antiinflamatória não esteroideal, empregada em formulações farmacêuticas como sal de sódio ou potássio [86]. Além do potencial antiinflamatório, ela possui propriedades analgésicas e antipiréticas, mas pode apresentar efeitos colaterais, tais como lesões gastro-intestinais, dores de cabeça, tonturas, erupções na pele, edemas e problemas renais e hepáticos. As vitaminas do complexo B podem potencializar os efeitos antinociceptivo e analgésico do DCF e várias publicações relataram a contribuição delas para a diminuição da dosagem diária de DCF e o encurtamento do tratamento [87-89]. Embora alguns trabalhos questionem o efeito das vitaminas B administradas conjuntamente com DCF [90,91], esses compostos passaram a ser comercializados concomitantemente nos últimos anos, em diversos países. Essas formulações costumam conter quantidades similares de DCF, tiamina (vitamina B₁) e piridoxina (vitamina B₆) e uma quantidade cerca de 50 a 100 vezes menor de cianocobalamina (vitamina B₁₂). A tiamina (TIA) é empregada em produtos farmacêuticos como nitrato ou cloridrato [92], enquanto a piridoxina (PIR) é apenas um dos três compostos similares que são conhecidos como vitamina B₆ (os outros dois são o piridoxal e a piridoxamina). No entanto, apenas a piridoxina é usada em formulações farmacêuticas [93]. Para se ter uma idéia do quão recente é a produção de formulações que contenham conjuntamente DCF e vitaminas B, a comercialização do único medicamento com tal composição disponível no mercado brasileiro foi iniciada apenas no ano de 2002 [94].

Muitos métodos foram propostos na literatura para determinação de DCF em formulações farmacêuticas, na maioria baseados em técnicas cromatográficas ou espectrofotométricas e espectrofluorimétricas. Além disso, métodos para determinar DCF baseados em ressonância magnética nuclear [95], calorimetria de varredura diferencial (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) [96], potenciometria [97] e eletroforese capilar [98,99] também são encontrados na literatura. CLAE [5,99-101], cromatografia de camada delgada (TLC, *Thin-Layer Chromatography*)

[102], cromatografia micelar [98,103] e cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas [104] são exemplos de técnicas cromatográficas usadas na determinação de DCF, sendo que algumas destas são capazes de determiná-lo na presença de interferentes, tais como impurezas [101,102], preservativos [101] e outros princípios ativos [100,104]. Por outro lado, as técnicas espectrofotométricas podem apresentar algumas vantagens práticas e econômicas sobre as cromatográficas. Porém, a determinação direta de DCF costuma ser impedida pela presença de substâncias que absorvem ou fluorescem na mesma região do espectro. Uma alternativa proposta por alguns autores é a determinação indireta de DCF por formação de complexos coloridos [105,106] que, contudo, apresenta a desvantagem de envolver uma etapa de extração com solvente. Vários autores determinaram DCF diretamente por absorção no UV [107,108] ou por fluorescência [97,109-111], mas estes métodos não funcionam na presença de TIA e PIR, pois os espectros de absorção destas espécies são fortemente sobrepostos ao do DCF e o espectro de emissão da PIR também sobrepõe o do DCF [109,112]. O único método encontrado na literatura, que é capaz de determinar DCF na presença de TIA e PIR, é baseado em medidas de absorção no UV em fase sólida, mas envolve uma etapa de extração [113]. Os mesmos autores deste último trabalho descreveram ainda um sensor de UV em fluxo, baseado na retenção em fase sólida, para a determinação de DCF na presença de alguns interferentes, tais como álcool benzílico e paracetamol [114].

O objetivo desta aplicação [115] foi propor um método simples, rápido e direto, que envolvesse o mínimo possível de manipulação da amostra, visando à determinação de DCF na presença de vitaminas do complexo B. Para isso foi usada a estratégia, mencionada na introdução desta tese (Capítulo 1), de incorporar os possíveis interferentes ao modelo. Soluções de misturas ternárias de DCF, TIA e PIR foram preparadas de acordo com um planejamento experimental e medidas por espectrofotometria no UV em vários valores de pH. Modelos PLS foram propostos para a determinação de DCF em comprimidos e cápsulas. A estimativa de figuras de mérito é um importante requisito para a futura aceitação deste tipo de método espectrofotométrico-quimiométrico pelas agências

reguladoras, e portanto, algumas delas foram estimadas para o melhor modelo PLS. Os resultados das análises de amostras comerciais foram ainda verificados por uma técnica analítica independente, a CLAE.

Os experimentos foram conduzidos em uma faixa de pH entre 3 e 6. Esta faixa foi escolhida por abranger as dissociações das três espécies envolvidas. As representações dessas dissociações são mostradas na Figura 12. Na molécula de DCF ocorre a ionização do grupo carboxílico. Já na molécula de TIA, ocorre a desprotonação do grupo 4'-amino [116], enquanto na molécula de PIR a desprotonação do átomo de nitrogênio dá origem a um novo equilíbrio entre duas espécies, a forma neutra e forma dipolar iônica ou íon "hermafrodita" (*zwitterion*), com predomínio desta última (cerca de 98 % em pH 6,86) [117,118].

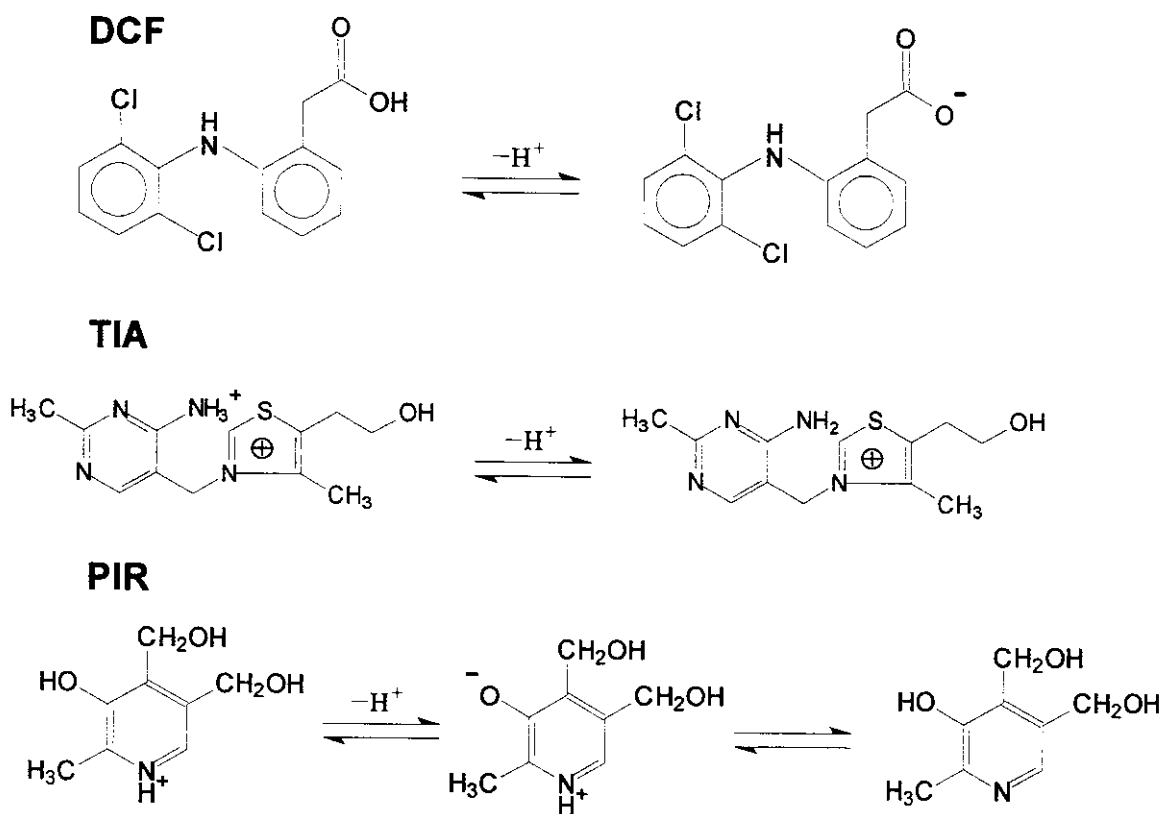


Figura 12. Representação das reações de dissociação do DCF, da TIA e da PIR.

5.2. Figuras de Mérito

Os métodos analíticos baseados em calibração multivariada são relativamente recentes e a sua aceitação pelas agências e organismos reguladores das diversas áreas ainda é restrita. Na área farmacêutica, é possível afirmar que ainda existe um longo caminho a ser percorrido até a certificação desses métodos e um requisito essencial para isto é a validação dos mesmos [119]. Essa validação consiste em atestar a eficiência do método para a função a que ele se destina e pode ser acessada pela determinação de parâmetros que são conhecidos como figuras de mérito. Tais figuras, como sensibilidade, seletividade e precisão, podem ser estimadas e usadas na comparação entre métodos analíticos [120].

Na estimativa de figuras de mérito em calibração multivariada, a parte do sinal que se relaciona unicamente ao analito de interesse é mais importante que o sinal total. Esse sinal único é denominado sinal analítico líquido ou NAS (*Net Analyte Signal*). O NAS é definido como a parte do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos interferentes presentes na amostra [121], de acordo com a seguinte equação,

$$\mathbf{NAS} = (\mathbf{I} - \mathbf{R}_n \mathbf{R}_n^+) \mathbf{r}_n \quad (14)$$

na qual \mathbf{I} é uma matriz identidade, \mathbf{R}_n é a matriz dos espectros puros de todos os constituintes da amostra, exceto o n -ésimo analito, \mathbf{r}_n é o espectro do n -ésimo analito e o símbolo $^+$ indica a pseudo-inversa de uma matriz. O vetor **NAS** contém os valores para cada amostra e pode ser relacionado com o vetor dos coeficientes de regressão, \mathbf{b} , em modelos de calibração inversa, tais como o PLS, através da seguinte equação [16],

$$\|\mathbf{NAS}\| = 1 / \|\mathbf{b}\| \quad (15)$$

onde o símbolo “ $\|\ \|$ ” indica a norma euclideana de um vetor.

Outras figuras de mérito podem ser calculadas como função do NAS (ou do vetor dos coeficientes de regressão) [16,120]. A sensibilidade (SEN) é a fração da variação do sinal associada ao acréscimo de uma unidade de concentração da

propriedade de interesse. Ela é estimada como o NAS na concentração unitária, de acordo com a Equação 16. A seletividade (SEL) é uma medida, variando entre 0 e 1, do grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e os interferentes presentes na amostra e indica quanto do sinal é perdido por essa sobreposição. A SEL é estimada como a razão entre a SEN e o sinal total (x), de acordo com a equação 17.

$$SEN = |NAS| \quad (16)$$

$$SEL = |NAS| / |x| \quad (17)$$

A sensibilidade analítica (γ) é uma figura de mérito que normalmente não é abordada em normas ou protocolos de validação. Entretanto, ela apresenta, de forma clara, a sensibilidade do método em função da unidade de concentração que é utilizada. Em analogia com a calibração univariada [122], a γ é definida como a razão entre a SEN e o ruído instrumental (ε), de acordo com a Equação 18. O vetor ε contém o desvio padrão do sinal analítico em cada comprimento de onda e pode ser estimado a partir de um certo número de medidas do branco.

$$\gamma = SEN / |\varepsilon| \quad (18)$$

O inverso da γ (γ^{-1}) é uma estimativa da diferença de concentração mínima que é discernível pelo método analítico na ausência de erro experimental, independente da técnica específica que foi empregada.

O limite de detecção (LD) de um procedimento analítico é a menor quantidade da espécie de interesse que pode ser detectada sob as condições experimentais estabelecidas (com precisão e exatidão adequadas). Neste trabalho, o LD foi calculado de acordo com a seguinte equação.

$$LD = 3 |\varepsilon|_2 / |NAS|_2 \quad (19)$$

O uso da Equação 19 representa uma estimativa bruta do LD, a qual assume que o ruído nos dados é homoscedástico, conforme indicado por Faber e co-autores [123]. Um conjunto de dados homoscedástico deve apresentar variância espectral constante dentro de um certo limite, variância dos erros de previsão

aproximadamente constante ao longo da faixa de trabalho e erros de previsão não correlacionados. A estimativa indicada na Equação 19 é uma garantia contra erros do tipo I, também conhecidos como falso positivo, os quais ocorrem quando algum sinal é detectado e na realidade o analito não está presente. Entretanto, se for desejada uma estimativa mais rigorosa do LD, o experimento deverá ser ajustado de acordo com um planejamento especial que garanta também contra erros do tipo II, também conhecidos como falso negativo (nenhum sinal é detectado quando na realidade o analito está presente), implicando num aumento do trabalho experimental [124]. Levando em conta que o principal interesse desta aplicação é a determinação de um analito, DCF, em uma faixa específica de concentração em torno dos valores especificados pelos fabricantes dos medicamentos, foi adotada a estimativa de LD menos estrita.

A precisão expressa o grau de concordância entre os resultados de uma série de medidas feitas para uma mesma amostra homogênea, em condições determinadas. Nesta aplicação, a precisão média foi estimada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{precisão média} = \sqrt{\frac{\sum_i^n \sum_j^m (\hat{y}_{ij} - \hat{y}_i)^2}{n(m-1)}} \quad (20)$$

na qual \hat{y}_{ij} é o valor estimado para cada replicata, \hat{y}_i é a média estimada para cada amostra, n é o número de amostras replicadas e m é o número de replicatas por amostra.

5.3. Parte Experimental

5.3.1. Reagentes e soluções

Os seguintes reagentes foram empregados, todos de grau analítico: metanol (Tedia), dihidrogenofosfato de potássio e hidrocloreto de piridoxina (ambos da *Merck*), ácido fosfórico e hidrocloreto de tiamina (ambos da *Sigma*), monohidrogenofosfato de potássio e hidróxido de potássio (ambos da *Synth*). O diclofenaco sódico foi comprado em uma farmácia de manipulação (*Ao Pharmaceutico*, Campinas), procedente da China e importado pela *Galena* (Campinas).

A unidade escolhida para ser usada nesta aplicação foi $\mu\text{mol L}^{-1}$, ao contrário da aplicação anterior, na qual foi usada $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Capítulo 4). O motivo para a escolha foi o fato de a TIA estar presente em duas formas diferentes nas formulações comerciais a serem determinadas, a saber, mononitrato e hidrocloreto.

Três soluções estoque foram preparadas em balões de 100 mL: PIR 6000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água, TIA 4000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água e DCF 4000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em metanol/água 50:50, v/v (o DCF é muito pouco solúvel em água). Cinco soluções intermediárias de cada analito foram preparadas a partir das soluções estoque, nas faixas de 200 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para DCF e TIA e de 300 a 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para PIR. As soluções intermediárias de DCF também foram preparadas em metanol/água 50:50. Todas as soluções intermediárias foram guardadas na geladeira (4 °C) em frascos protegidos da luz, pois TIA e PIR são fotodegradáveis. Observou-se que essas soluções foram estáveis por pelo menos três meses. Cinco soluções tampão 0,1 mol L^{-1} foram preparadas na faixa de pH de 3 a 6, a partir de H_3PO_4 , KH_2PO_4 e/ou K_2HPO_4 , e tiveram o seu valor ajustado com H_3PO_4 ou KOH. As considerações a respeito da capacidade tamponante das soluções na faixa de pH entre 4,0 e 5,0, feitas no capítulo 3 (seção 3.2.1), são válidas também para esta aplicação. Todas as soluções foram preparadas usando água deionizada (Milli-Q).

5.3.2. Instrumentação e tratamento dos dados

Um espectrofotômetro UV/visível de arranjo de diodos *Agilent HP8453* foi usado para a aquisição dos dados, juntamente com o *Agilent UV-Visible ChemStation Software*. As medidas de pH foram registradas em um pHmetro *Coming*, modelo 350. Os dados foram tratados no programa *MATLAB™*, versão 6.1 (*The MathWorks*, Natick, EUA), usando os pacotes *The N-way Toolbox for MATLAB*, versão 2.00 [37], para as análises com o N-PLS, e *PLS Toolbox*, versão 2.0 (*Eigenvector Technologies*, Manson, EUA), para as análises com o PLS. Um banho ultra-sônico (*Unique*) foi utilizado na dissolução das amostras.

5.3.3. Planejamento experimental e aquisição dos espectros

As soluções do conjunto de calibração foram preparadas de acordo com um planejamento experimental $2^3 + 1$ (3 fatores e 2 níveis mais um ponto central, Tabela 11), similar ao da aplicação anterior (seção 4.2.3), nas faixas de 10 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para DCF e TIA e de 15 a 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para PIR. Três pontos do planejamento, os dois extremos (+++ e ---) e o central (~~~), foram determinados em triplicata, visando a estimativa da precisão média do método. As misturas sintéticas usadas como conjunto de validação foram preparadas de acordo com um planejamento 2^3 . Para este conjunto de validação, os níveis superiores foram 40,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para DCF e TIA e 60,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para PIR e os níveis inferiores foram 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para DCF e TIA e 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para PIR. Vinte e três soluções de trabalho (calibração, validação e triplicatas) foram preparadas em balões de 10 mL, pela adição de 500 μL de cada solução intermediária, 5,00 mL do respectivo tampão e água até completar o volume. O procedimento foi repetido para todos os conjuntos de pH. Apesar das soluções intermediárias de DCF terem sido preparadas em metanol/água 50:50 (v/v), elas foram diluídas 20 vezes para a obtenção das soluções de trabalho. Portanto, o conteúdo final de metanol nas soluções medidas foi de cerca de 2,5 % e a aproximação de que os valores de pH eram os mesmos que em água pura foi adotada. Soluções preparadas da mesma maneira que as soluções de trabalho, mas não contendo nenhum dos analitos, foram usadas como branco para cada

conjunto de pH. Espectros dos brancos em cada pH foram medidos quinze vezes em seqüência, visando estimar o ruído instrumental para o cálculo de figuras de mérito. As amostras foram medidas em cubetas de quartzo de 1,00 cm de caminho ótico. Os espectros foram coletados na faixa de 220 a 360 nm (passo 1 nm). Espectros de soluções puras de DCF, PIR e TIA também foram obtidos em cada pH.

Tabela 11. Planejamento experimental $2^3 + 1$ para o conjunto de calibração usado na determinação simultânea de DCF, TIA e PIR¹

Solução /	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Analito									
DCF	+	+	+	-	-	-	+	-	~
TIA	+	+	-	+	-	+	-	-	~
PIR	+	-	+	+	+	-	-	-	~

¹Nível (+): DCF 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, TIA 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, PIR 75,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Nível (-): DCF 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, TIA 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, PIR 15,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Nível (~): DCF 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, TIA 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, PIR 45,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

5.3.4. Determinação das amostras comerciais

Duas amostras comerciais diferentes foram analisadas, uma na forma de cápsulas e a outra na forma de comprimidos. A amostra 1 (cápsulas) foi encomendada em uma farmácia de manipulação local e possui composição similar a uma formulação comercializada na Espanha [114]. A amostra 2 (comprimidos) é a única formulação atualmente comercializada no mercado brasileiro que contém DCF e vitaminas B de forma combinada. Estas amostras apresentam a seguinte composição:

- Amostra 1: 50 mg de DCF sódico, 50 mg de hidrocloreto de TIA, 50 mg de hidrocloreto de PIR, 1 mg de cianocobalamina e excipiente q. s. p. (lactose).
- Amostra 2: 50 mg de DCF sódico, 50 mg de mononitrato de TIA, 50 mg de hidrocloreto de PIR, 1 mg de cianocobalamina, talco, estearato de magnésio, lactose, celulose, carboximetilcelulose sódica, dióxido de silício coloidal, Eudragit RL 30D, macrogol, dióxido de titânio, dimeticona, trietilcitrate, metilparabeno, propilparabeno, polividona, corante vermelho FD&C nº6.

Dez comprimidos e o pó de dez cápsulas foram pesados individualmente para se obter massas médias representativas. Os comprimidos foram finamente triturados em um almofariz e misturados. O pó das cápsulas também foi misturado. Massas correspondentes ao valor médio de uma cápsula ou de um comprimido foram dissolvidas em 250 mL de metanol/água (50:50, v/v). Alíquotas de 500 µL de cada solução de amostra foram adicionadas em balões de 10 mL, juntamente com 5,00 mL do respectivo tampão e água até completar o volume. Os espectros destas soluções foram obtidos da mesma maneira descrita na seção anterior. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

5.3.5. Análise cromatográfica

As análises por CLAE foram feitas usando um aparelho *Shimadzu*, o qual consiste de uma bomba *LC 10 AD* e um detector no UV *SPD 10AV* com uma válvula injetora (*Rheodyne*) de 5 µL. O programa *Chrom Perfect for Windows*, versão 3.52 (*Justice Innovations Inc.*) foi usado para aquisição dos dados. A coluna analítica (150 x 3,9 mm) utilizada foi desenvolvida no Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida, *LABCROM*, do Instituto de Química da UNICAMP. A fase estacionária consistiu de sílica *Rainin* (5 µm) coberta por uma camada de poli(metil-octadecilsiloxano) termicamente imobilizada [125]. A fase móvel usada foi metanol/água 70:30, v/v, ajustada a pH 3,8 com ácido fosfórico. A vazão foi de 1,0 mL min⁻¹ e a detecção foi feita em 275 nm. Todas as injeções foram repetidas três vezes e as determinações foram feitas em triplicata.

5.4. Resultados e Discussão

5.4.1. Espectros de absorção no UV de DCF, TIA e PIR

Os valores de pK_a encontrados na literatura para estes fármacos são 4,84 para o DCF [110], 4,35 para a TIA [116] e 5,00 para a PIR [93]. Considerando esses valores de pK_a , decidiu-se conduzir os experimentos na faixa de pH de 3 a 6. A Figura 13a mostra os espectros de absorção no UV de soluções aquosas de DCF, TIA e PIR obtidos em pH 3,0 ($[DCF] = [TIA] = 50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $[PIR] = 75,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), onde estão presentes apenas as formas ácidas dessas espécies. A Figura 13b mostra os espectros de soluções das mesmas espécies nas mesmas concentrações em pH 6,0, representando as suas formas básicas. Os espectros de ambas as formas, ácida e básica, do DCF são muito semelhantes, mostrando apenas um pequeno deslocamento de λ_{max} de 274 para 277 nm. Esta similaridade espectral pode ser atribuída ao fato de a ionização na molécula de DCF ocorrer em um sítio relativamente distante da parte cromófora, ou seja, dos anéis aromáticos (Figura 12). Observando-se ainda a Figura 13, nota-se que existe uma forte sobreposição espectral entre os analitos, tanto em meio ácido como em meio básico. Embora a PIR possa ser determinada univariadamente em pH 6, em 325 nm, o espectro de DCF permanece fortemente sobreposto pelos espectros das duas outras espécies em qualquer valor de pH, o que impede o uso de calibração univariada em uma determinação direta simultânea.

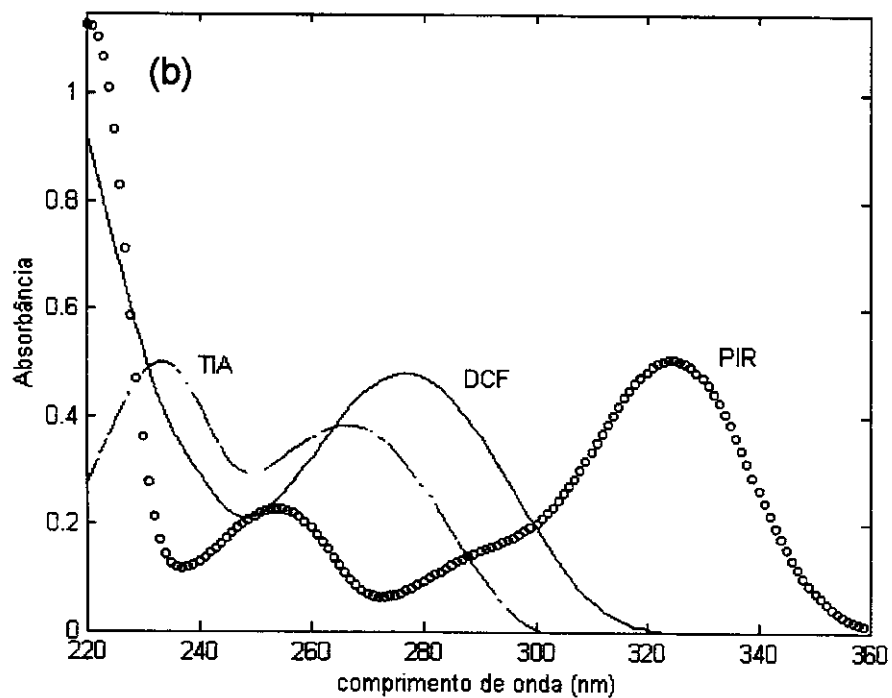
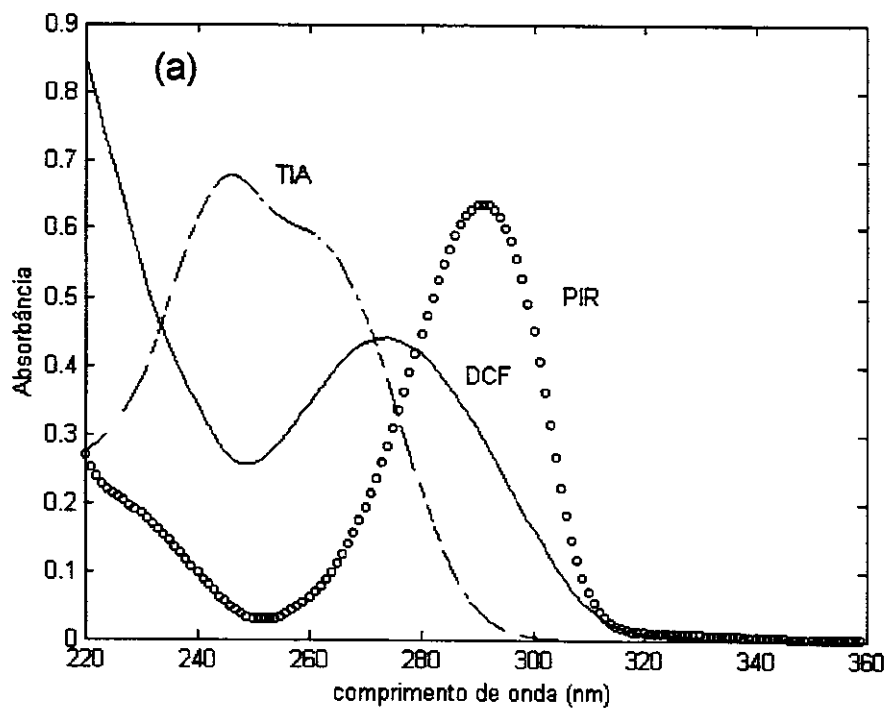


Figura 13. Espectros de absorção no UV de DCF, TIA e PIR obtidos em (a) pH 3,0 e (b) pH 6,0. $[DCF] = [TIA] = 50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $[PIR] = 75,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

5.4.2. Calibração multivariada usando PLS

Uma das vantagens do método de determinação aqui proposto é o uso de um número reduzido de amostras de calibração, seguindo um planejamento experimental simples. As considerações feitas no capítulo anterior (seção 4.3.2) a respeito da adequação do uso deste tipo de planejamento também são válidas para esta aplicação. Foram construídos modelos bilineares PLS em cinco diferentes valores de pH e o número de variáveis latentes escolhido por validação cruzada foi igual a três em todos os casos. A Tabela 12 mostra os valores de RMSEP para a previsão do conjunto de validação por cada modelo PLS2. O melhor modelo para a previsão do DCF foi obtido em pH 5, embora tenham sido obtidos melhores resultados para a previsão de PIR e TIA em pH 4. Como o maior interesse está na determinação do DCF, o modelo PLS2/pH5 foi escolhido como o melhor para a previsão das amostras sintéticas. Os resultados obtidos com PLS1 foram praticamente iguais aos do PLS2, apresentando diferença insignificante (na terceira casa decimal). Foi também construído um modelo N-PLS englobando os cinco conjuntos de pH. Entretanto, os resultados para a previsão das três espécies foram levemente inferiores aos dos melhores modelos PLS e, por isso, não são apresentados aqui.

Tabela 12. Valores de RMSEP entre as concentrações reais e as previstas para oito misturas sintéticas (conjunto de validação), para cada modelo PLS2

Analito	pH 3.0 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	pH 4.0 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	pH 4.5 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	pH 5.0 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	pH 6.0 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
DCF	3,44	3,05	1,56	0,80	3,08
TIA	0,69	0,24	0,37	0,38	0,98
PIR	1,42	0,35	0,53	0,70	1,37

As previsões individuais para as oito misturas sintéticas do conjunto de validação são mostradas na Tabela 13, com o objetivo de demonstrar a exatidão do modelo PLS2/pH5. Todas as previsões apresentaram erros inferiores a 5 %, sendo que a grande maioria apresentou erros iguais ou inferiores a 2 %.

Tabela 13. Determinação simultânea de DCF, TIA e PIR em oito misturas sintéticas diferentes (conjunto de validação) usando o modelo PLS2/pH5

Quantidade adicionada ($\mu\text{mol l}^{-1}$)			Quantidade prevista ($\mu\text{mol l}^{-1}$)			Erro (%)		
DCF	TIA	PIR	DCF	TIA	PIR	DCF	TIA	PIR
40,0	40,0	60,0	40,0	39,6	59,8	0,0	- 1,0	- 0,3
40,0	40,0	30,0	41,9	40,3	30,6	4,8	0,8	2,0
40,0	20,0	60,0	40,7	20,2	61,1	1,8	1,0	1,8
20,0	40,0	60,0	20,1	39,5	59,9	0,5	- 1,3	- 0,2
20,0	20,0	60,0	20,6	20,3	61,2	3,0	1,5	2,0
20,0	40,0	30,0	20,6	40,7	30,7	3,0	1,8	2,3
40,0	20,0	30,0	40,0	20,1	30,4	0,0	0,5	1,3
20,0	20,0	30,0	20,4	20,2	30,5	2,0	1,0	1,7

5.4.3. Estimativa de figuras de mérito

A Tabela 14 mostra as figuras de mérito estimadas para a determinação do DCF com o modelo que foi selecionado como o melhor, PLS2/pH5. A precisão média foi estimada a partir das previsões de triplicatas de três pontos da curva de calibração (os dois extremos mais o ponto central). Portanto, $n = m = 3$ na Equação 20 (seção 5.2). Os valores de LD e γ estimados são equivalentes a $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $25 \text{ mL } \mu\text{g}^{-1}$, respectivamente. A estimativa de γ indica que o método proposto é capaz de distinguir uma diferença de concentração de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, na ausência de erro experimental. As estimativas de sensibilidade analítica e de precisão média obtidas atestaram a boa qualidade do modelo.

Tabela 14. Figuras analíticas de mérito para a determinação de DCF usando o modelo PLS2/pH 5.

Figuras de mérito	Estimativa
SEL	0,15
SEN	0,03
γ ($\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$)	8,0
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,4
precisão média ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,4

5.4.4. Determinação das amostras comerciais e verificação por CLAE

Primeiramente, o modelo PLS2/pH5 foi aplicado na determinação simultânea de DCF, TIA e PIR em duas formulações farmacêuticas diferentes. Estas formulações contêm as mesmas quantidades de substâncias ativas, mas excipientes com diferentes composições. O excipiente da amostra 1 (cápsulas) contém apenas uma substância, a lactose, enquanto o excipiente da amostra 2 (comprimidos) possui uma composição bem mais complexa, contendo quinze substâncias.

As previsões de TIA e PIR para a amostra 1 foram $53,1 \pm 0,3$ mg e $51,9 \pm 1,5$ mg (estimativas da média e do desvio padrão de três determinações), respectivamente. Estes resultados estão em acordo com os valores especificados pelo fabricante (50 mg para ambas), levando-se em conta o limite de tolerância de $\pm 10\%$ estabelecido pela Farmacopéia americana [5] para este tipo de fármaco.

Por outro lado, só foi possível obter bons resultados na amostra 2 para a determinação de DCF (diferença menor que 5%), pois as previsões de TIA e PIR apresentaram uma diferença superior a 10% em relação às quantidades especificadas. Estes resultados podem ser explicados pela complexidade do excipiente da amostra 2, que contém espécies que absorvem na mesma região dos analitos, tais como os preservantes metil e propilparabeno. Ambos os parabenos mostram uma banda larga, muito intensa e centrada próxima a 260 nm (espectros obtidos experimentalmente, Figura 14). Como essas espécies não estavam presentes no conjunto de calibração e, portanto não foram modeladas, as suas interferências devem ter causado os erros de previsão. Outro possível interferente seria a cianocobalamina (vitamina B₁₂), ausente do conjunto de calibração, mas presente nas formulações em uma quantidade 50 vezes menor do que os outros fármacos. No entanto, a não observação de sua banda de absorção característica em 360 nm [126] permite considerar esta possível interferência insignificante.

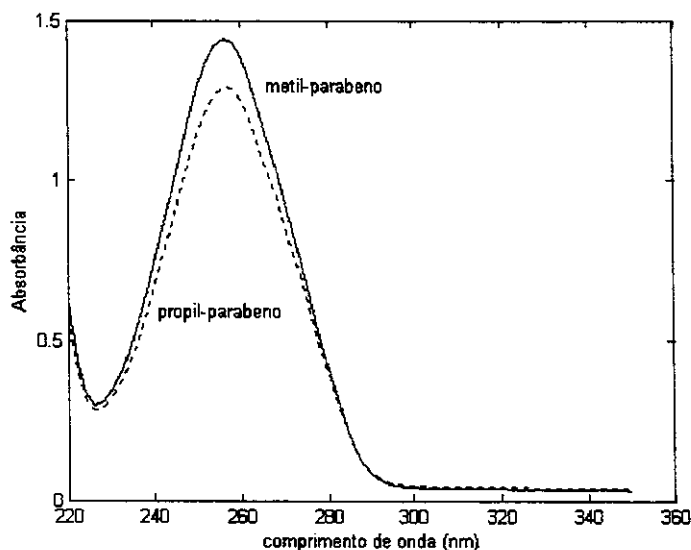


Figura 14. Espectros de absorção no UV do metil e do propil parabenos, obtidos experimentalmente. [m-parabeno] = [p-parabeno] = 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Uma alternativa para a determinação simultânea dos três analitos na amostra 2 seria a realização de um estudo sistemático visando identificar todas as espécies presentes no seu excipiente que possam interferir na determinação das vitaminas B. Em seguida, os interferentes identificados seriam incorporados em um modelo PLS em quantidades próximas às presentes na formulação, de acordo com um novo planejamento experimental.

Contudo, apesar dos problemas observados na determinação das vitaminas B, resultados exatos e precisos foram obtidos experimentalmente para a determinação de DCF e verificados por uma técnica analítica independente, a CLAE. Quando se constrói um modelo de calibração de primeira ordem tal como o PLS, toda espécie espectralmente ativa que possa estar presente na amostra a ser determinada deve ser incluída no modelo. Métodos de calibração de primeira ordem podem detectar a presença de um interferente não modelado, mas nesses casos o sucesso da determinação raramente é possível. Uma hipótese para explicar o sucesso da determinação de DCF na amostra 2 poderia estar

relacionada com a combinação da distribuição dos coeficientes de regressão para o DCF no modelo PLS2/pH5 (Figura 15) com o perfil espectral dos parabenos, os quais são os principais interferentes. Como pode ser observado na Figura 15, os coeficientes de regressão para o DCF apresentam um comportamento aproximadamente linear na região entre 245 e 280 nm, invertendo os seus sinais (de negativo para positivo) em 262 nm, próximo ao centro das bandas simétricas de ambos os parabenos (Figura 14). É possível que a multiplicação de um lado das bandas simétricas dos interferentes pelos coeficientes de regressão negativos foi cancelada pela multiplicação da outra parte das bandas pelos coeficientes simetricamente positivos.

A Tabela 15 mostra os resultados das determinações de DCF nas duas amostras comerciais com o modelo PLS2/pH5, juntamente com os resultados da análise cromatográfica usada na verificação do método. Deve-se notar que foi usado o termo “verificação”, ao invés de “validação”, pois foi empregada uma coluna cromatográfica experimental [125] e, portanto, a metodologia adotada não é certificada. Assim como as determinações espectrofotométricas, as determinações por CLAE também foram feitas em triplicata, mas usando amostras preparadas de forma independente. Um teste t com quatro graus de liberdade foi realizado para mostrar que os resultados das duas metodologias não diferiram significativamente num nível de 95% de confiança ($t=0,273$ para a amostra 1 e $t=0,559$ para a amostra 2, ambos bem abaixo do valor limite de 2,776).

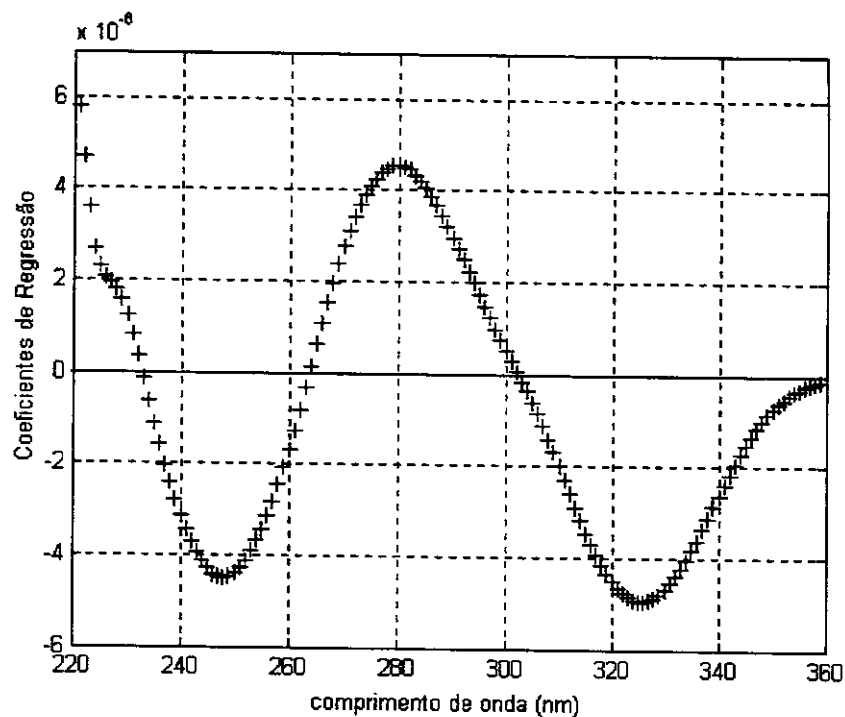


Figura 15. Coeficientes de regressão para a previsão de DCF com o modelo PLS2/pH5.

Tabela 15. Determinação de DCF em duas formulações farmacêuticas, ambas contendo vitaminas B, pelo método proposto (espectrofotométrico/quimiométrico) e por CLAE

Amostra	Especificado (mg)	Método proposto (mg) ¹	CLAE (mg) ¹
#1	50	47,8 ± 0,7	47,2 ± 3,5
#2	50	52,2 ± 1,9	51,0 ± 1,0

¹ Valores médios e desvios padrão de três determinações.

5.5. Conclusão

O método espectrofotométrico proposto foi capaz de determinar DCF na presença de interferentes fortemente sobrepostos, tais como vitaminas B e outras substâncias presentes no excipiente. Foram obtidos resultados precisos e exatos, baseados na estimativa de figuras de mérito e na verificação por outra técnica analítica, a CLAE. Desta forma, o método proposto pode ser sugerido como uma possível alternativa para o controle de qualidade deste fármaco neste tipo de formulação.

Este método é ainda capaz de determinar simultaneamente DCF, TIA e PIR em formulações que contenham excipientes simples, tais como a amostra 1. Em uma formulação específica mais complexa, cujo excipiente contém outras espécies espectrofotometricamente ativas, a amostra 2, o método ainda assim foi capaz de determinar DCF com exatidão e precisão. Este pode ser considerado um caso raro, em que foi possível determinar um analito na presença de interferentes não modelados usando um método de calibração de primeira ordem, tal como o PLS.

CAPÍTULO 6

UTILIZAÇÃO DO PARAFAC E DO MÉTODO
DA ADIÇÃO PADRÃO COMO FERRAMENTAS
PARA A DETERMINAÇÃO DIRETA DE
SALICILATO EM PLASMA HUMANO POR
ESPECTROFLUORIMETRIA

6.1. Introdução

A espectrofluorimetria [127] é uma técnica analítica consagrada, que permite a realização de determinações com grandes sensibilidade e seletividade, embora a sua aplicação seja limitada a espécies que apresentem o fenômeno da fluorescência molecular (ou que possam ser convertidas a moléculas fluorescentes). A sensibilidade e o limite de detecção de uma determinação fluorimétrica podem ser melhorados pelo aumento da intensidade da fonte, até o limite dado pela intensidade máxima em que ocorre a fotodecomposição da amostra. Esta é uma importante diferença em relação às técnicas de espectroscopia de absorção molecular, nas quais o aumento da intensidade da fonte não causa mudança na intensidade da absorção. A espectrofluorimetria se diferencia também pela relação direta entre concentração do fluoróforo e intensidade do sinal medido, ao contrário da espectroscopia de absorção, na qual a concentração é função do logaritmo da transmitância.

A espectrofluorimetria tem sido muito usada como ferramenta quantitativa em diversas áreas, tais como química, medicina, meio ambiente e ciência de alimentos. Entretanto, a análise de misturas multicomponentes que apresentam espécies com sinais sobrepostos é bastante limitada quando as medidas são feitas em um único comprimento de onda de emissão ou de excitação. A aplicação de espectrofluorimetria em análises clínicas é dificultada pela complexidade de matrizes, tais como sangue e urina, que apresentam uma grande variedade natural de compostos fluorescentes, os quais freqüentemente possuem espectros que se sobrepõem ao sinal da espécie de interesse. Esta situação exige o uso de tediosos processos de separação para que a determinação dessa espécie seja possível.

Quando a fluorescência de uma amostra é medida em diversos comprimentos de onda de emissão para diversos comprimentos de onda de excitação, obtém-se uma superfície ou matriz de excitação-emissão (EEM, *Excitation-Emission Matrix*). Quando um conjunto de amostras é medido nessas mesmas condições, obtém-se um arranjo de dados multidimensional (um tensor

de terceira ordem), o qual deve apresentar comportamento trilinear, a despeito da presença de ruído, espalhamentos (Rayleigh e Raman) e outros fenômenos, tais como difração de segunda ordem. Este comportamento torna os métodos quimiométricos de segunda ordem, tais como PARAFAC e N-PLS, bastante adequados para o tratamento de dados espectrofluorimétricos, pois o modelo matemático assumido por eles é condizente com o modelo físico que gera os dados. Recordando a base estrutural do modelo PARAFAC, na Equação 7 (seção

2.2.3),
$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk}$$
, x_{ijk} representará a intensidade de fluorescência

medida para a i -ésima amostra nos comprimentos de onda de excitação j e de emissão k ; a_{if} será a concentração do f -ésimo fluoróforo na amostra i ; b_{jf} será o coeficiente de absorção molar do f -ésimo fluoróforo no comprimento de onda de excitação j ; c_{kf} será o coeficiente de emissão relativa do f -ésimo fluoróforo no comprimento de onda de emissão k ; e e_{ijk} deverá representar os resíduos, contendo a variação não capturada pelo modelo. Pelo fato de gerar facilmente dados de estrutura trilinear, a espectrofluorimetria é, provavelmente, o objeto do maior número de aplicações do PARAFAC encontradas na literatura, tanto em calibração quanto na resolução de espectros. Dentre essas aplicações, podem ser citadas: a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e pesticidas [128-131], a estimativa do conteúdo de dioxinas em óleo de peixe [132], o estudo de parâmetros de qualidade e do processo de produção de açúcar [133,134], a resolução dos espectros das diferentes formas do fármaco anti-inflamatório piroxicam [135] e dos produtos de degradação da clorofila [136]. Um artigo de revisão recente discute uma série de aspectos práticos sobre este tipo de análise, dentre eles, a escolha do número correto de fatores, o uso de valores ausentes (*missing values*) na correção da trilinearidade das regiões espectrais onde ocorre espalhamento e a detecção de amostras anômalas (*outliers*) [137].

Nos últimos anos, a combinação de PARAFAC e espectrofluorimetria abriu a possibilidade de determinações diretas de fármacos em amostras biológicas complexas, sem a necessidade de uma etapa de extração de proteínas, comum nas análises tradicionais. As proteínas presentes no sangue costumam interagir

com os fármacos, exercendo um forte efeito supressor (*quenching*) sobre o sinal de fluorescência. A partir do ano 2002, surgiram os primeiros artigos na literatura, relatando o uso da combinação PARAFAC/espectrofluorimetria na determinação de fármacos, tais como, ácido salicílico e naproxen [12,13], piroxicam [14], antibióticos fluoroquinolonas [15], doxorrubicina [43] e carbamazepina [138], em matrizes tais como, plasma, soro ou urina. Em particular, a determinação direta de um fármaco sem a necessidade de uma etapa de diluição da matriz foi possível em apenas uma dessas aplicações [43].

O ácido salicílico (AS) [139] é o produto da hidrólise e o principal metabólito do AAS. No sangue humano ($\text{pH} \cong 7,4$), ele se apresenta em sua forma desprotonada, o íon salicilato (Figura 16). Além disso, o AS também é usado em pomadas por seu efeito analgésico e anti-séptico. O interesse na determinação de AS em plasma humano está ligado a casos de ingestão de grande quantidade de aspirina, normalmente por crianças, e a intoxicações pelo uso de pomadas [140]. A meia vida biológica do AS, entre 3 e 19 horas, é bastante superior à meia vida do AAS, entre 15 e 20 minutos. Voluntários saudáveis, que ingeriram uma dose de 500 mg de AAS apresentaram uma concentração máxima de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ nas primeiras 3 a 4 horas [141]. A determinação de AS em amostras biológicas tem sido feita por volumetria (método de Trinder) [57], por CLAE [59,142,143], por eletroforese capilar [144] e usando um biossensor amperométrico [145]. A maioria desses métodos exige etapas de extração e precipitação de proteínas. Outras determinações foram baseadas em espectros de fluorescência obtidos em um comprimento de onda de excitação fixo e métodos quimiométricos de primeira ordem (PLS) [11,146]. Porém, estas determinações também exigiram etapas de extração com solvente.

O objetivo desta aplicação [147] foi determinar diretamente salicilato em plasma humano, usando um método que simplifique ao máximo a manipulação das amostras. Essa determinação em plasma puro, na presença de interferentes e de um forte efeito de matriz, foi possibilitada pela utilização de uma nova estratégia, a qual incluiu, além do PARAFAC, o uso do método da adição padrão. Mais do que esta determinação específica, o objetivo principal desta aplicação foi

demonstrar o potencial do uso desta combinação de quimiometria e dados trilineares de fluorescência molecular em análises de matrizes de interesse clínico.

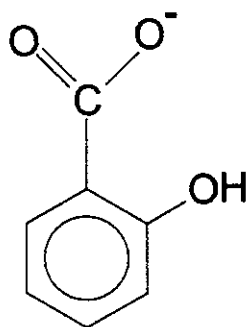


Figura 16. Fórmula estrutural do íon salicilato.

6.2. Método da Adição Padrão e Vantagem de Segunda Ordem

O método da adição padrão é bastante conhecido entre os químicos analíticos e sua descrição pode ser encontrada na maioria dos livros didáticos de análise quantitativa e instrumental [148,149]. Ele é aplicado a dados univariados (ordem zero) como um meio de superar o efeito de matriz que afeta a maneira pelo qual o instrumento responde ao analito. Este método requer duas condições para o sucesso da calibração:

- (1) O instrumento deve responder linearmente ao aumento da concentração do analito.
- (2) Quando a concentração do analito for zero, a resposta instrumental também deve ser igual a zero.

A estimativa da concentração do analito na amostra é obtida através de um gráfico da resposta instrumental (ordenada) em função da quantidade de padrão

adicionada (abscissa), usando o valor da intersecção da reta ajustada aos dados com o eixo das abscissas.

Em 1979, Saxberg e Kowalski propuseram uma extensão do método da adição padrão para dados multivariados (primeira ordem), batizada de método da adição padrão generalizada (GSAM, *Generalized Standard Addition Method*) [150]. O GSAM requer que tanto o analito quanto os interferentes sejam adicionados à amostra seqüencialmente. Isto relaxa a restrição de que o método analítico seja inteiramente seletivo para o analito de interesse. Entretanto, resultados adequados não serão obtidos, se houver alguma fonte de sinal instrumental não calibrada. Portanto, na ausência de todas as espécies incluídas no modelo de calibração, a resposta instrumental deverá ser zero em todos os canais.

Em 1995, Booksh e co-autores propuseram outra extensão do método da adição padrão, desta vez, para dados multidimensionais (segunda ordem), a qual foi chamada de método da adição padrão de segunda ordem (SOSAM, *Second-Order Standard Addition Method*) [151]. Eles trataram dados de segunda ordem cinético-espectroscópicos com o objetivo de determinar tricloroetileno e usaram o DTD (decomposição trilinear direta) [31] como método de decomposição. O SOSAM pode ser resumido em três etapas:

- (1) O DTD é aplicado na decomposição de um arranjo de dados de terceira ordem, formado pelo agrupamento dos dados de segunda ordem da amostra e de cada adição sucessiva. O número de fatores usado na decomposição deverá corresponder ao número de analitos mais o de interferentes.
- (2) A matriz de pesos (*loadings*) da dimensão correspondente à composição da amostra deverá conter em suas colunas a informação relativa às concentrações do analito e dos interferentes. A identificação de qual coluna corresponde ao analito de interesse pode ser feita pela comparação dos pesos da dimensão dos espectros (ou de outro tipo de sinal) com o espectro do analito puro.

- (3) Os valores da coluna identificada, correspondentes as concentrações do analito na amostra e após as adições sucessivas, serão usados em uma regressão, da mesma maneira que em uma adição padrão univariada.

Um dos principais aspectos a serem ressaltados no SOSAM é a utilização da “vantagem de segunda ordem”, definida como a habilidade de realizar uma determinação na presença de interferentes desconhecidos ou não incluídos no modelo de calibração [16,17,152]. Para que a vantagem de segunda ordem ocorra, duas condições devem ser satisfeitas:

- (1) Os dados devem ser, no mínimo, trilineares ou aproximadamente trilineares.
- (2) O método usado deve ser de segunda ordem e decompor as amostras a serem previstas simultaneamente com as amostras de calibração.

O uso de um método de segunda ordem é condição necessária, mas não suficiente, para que haja vantagem de segunda ordem. O N-PLS, por exemplo, é um método de segunda ordem, mas não propicia vantagem de segunda ordem, pois realiza primeiro a decomposição do conjunto de calibração para depois projetar as amostras a serem previstas. Dentre os métodos que permitem o uso da vantagem de segunda ordem, estão o PARAFAC, o DTD e o GRAM [30], os quais satisfazem a segunda condição mencionada acima.

Todavia, o número de artigos encontrados na literatura, que fazem uso do SOSAM, é escasso. Herrero e co-autores usaram-no em dados espectro-eletroanalíticos (espectros de UV/visível obtidos em diferentes potenciais de um voltamograma cíclico) [153]. Wu e co-autores [154] usaram uma variação do SOSAM, na qual a decomposição dos dados é feita por um novo algoritmo, chamado decomposição trilinear alternada (ATLD, *Alternating TriLinear Decomposition*) e desenvolvido pelos próprios autores [155]. Eles determinaram organo-clorados aromáticos por uma técnica hifenada, CLAE-DAD. Mais recentemente, Comas e co-autores combinaram o método da adição padrão com o GRAM na determinação de sulfonatos aromáticos em água [156] e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em sedimentos marinhos [157], ambos por CLAE-DAD. Como o GRAM possui a limitação de que uma das dimensões dos

dados seja igual a dois (seção 2.3), estas duas últimas aplicações foram limitadas a apenas uma adição em cada amostra.

Na presente aplicação, o método empregado na decomposição dos dados foi o PARAFAC, ao invés do DTD, originalmente proposto no SOSAM. Na comparação entre os dois métodos, o PARAFAC apresenta a vantagem de ser mais robusto à presença de ruído nos dados, o que muitas vezes impede a aplicação do DTD a dados reais (seção 2.3). Além de combinar o PARAFAC e o método da adição padrão, outra originalidade desta aplicação foi o emprego desta estratégia na análise de matrizes de excitação-emissão, obtidas por espectrofluorimetria.

6.3. Parte Experimental

6.3.1. Reagentes e amostras de plasma humano

Foi preparada uma solução de salicilato de sódio (Merck) $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ em água deionizada (Milli-Q) e, a partir desta, duas soluções diluídas nas concentrações de 120 e $75 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Amostras de plasma de dez voluntários saudáveis foram obtidas junto ao Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro) da Unicamp e estocadas à temperatura de $-8 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras foram obtidas na forma de plasma fresco congelado, contidas em bolsas plásticas. É importante ressaltar os cuidados com a manipulação dessas amostras, a fim de evitar qualquer risco de contaminação. Elas foram retiradas das bolsas com o auxílio de seringas de plástico descartáveis e toda a manipulação foi conduzida com o uso de luvas cirúrgicas. Todo o material contaminado com plasma (seringas, luvas, bolsas de plástico, etc.) foi descartado em uma caixa coletora apropriada (coletor de materiais perfurocortantes, Descarpack). Todas as amostras e soluções que continham plasma foram descartadas em frascos plásticos, que, por sua vez, foram embalados em sacos de polietileno especiais para “resíduos sólidos de serviços de saúde” (Descarpack). Todo o material de descarte foi encaminhado para incineração junto

ao Hemocentro. Toda vidraria, depois de utilizada, foi deixada de molho em água sanitária por pelo menos 6 horas.

6.3.2. Instrumentação e tratamento dos dados

Os espectros foram obtidos em um espectrofluorímetro *Perkin Elmer LS 55*, com o auxílio do programa *FL Winlab*, e usando uma cubeta de quartzo apropriada, de 10,00 mm de caminho ótico. Os dados foram importados utilizando uma rotina desenvolvida individualmente e tratados no programa *MATLAB™*, versão 6.1 (*The MathWorks*, Natick, EUA), usando o pacote *The N-way Toolbox for MATLAB*, versão 2.00 [37].

6.3.3. Procedimentos

Todas as amostras foram obtidas pela contaminação artificial do plasma com salicilato. Inicialmente, foi realizada uma análise, visando à determinação de salicilato através de uma curva de calibração. Trinta amostras foram preparadas em balões de 10 mL, na faixa de 1,5 a 30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, pela adição de quantidades específicas de solução de salicilato 300 ou 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os balões foram completados com plasma de indivíduos diferentes. Como não foi possível obter bons resultados com a curva de calibração, optou-se por outra estratégia, baseada no método da adição padrão.

Para esta nova análise, dez amostras foram preparadas da mesma forma que na análise preliminar, na faixa de 1,5 a 24,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O plasma de um indivíduo diferente foi usado para cada nível de concentração. Para cada medida, 2,5 mL de amostra foram adicionados à cubeta. Em seguida, foram feitas e medidas quatro adições sucessivas de 50 μL de uma solução 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de salicilato. Após cada adição, as amostras eram homogeneizadas com o auxílio de uma micro barra magnética. Todas estas análises foram feitas em triplicata.

Todas as superfícies espectrais foram obtidas na faixa de excitação de 280 a 340 nm (passo 5 nm) e na faixa de emissão de 360 a 580 nm (passo 0,5 nm). As larguras das fendas de emissão e de excitação foram ambas mantidas em 4,0 nm e a velocidade de varredura foi de 1200 nm min^{-1} .

6.4. Resultados e Discussão

6.4.1. Estudos preliminares: Resolução dos espectros e tentativa de determinar AS em plasma através de uma curva de calibração

Superfícies de excitação-emissão, obtidas para uma amostra de plasma puro e para esta mesma amostra contaminada artificialmente com $9,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AS, são mostradas na Figura 17. A diferença mais notável entre essas duas superfícies espectrais é o aparecimento de uma banda de forte intensidade com máximo de excitação/emissão em aproximadamente 320/400 nm, devido à fluorescência do AS.

A idéia inicial desta aplicação era determinar AS através de uma curva de calibração preparada com amostras de plasmas de indivíduos diferentes, seguindo a estratégia original adotada por Trevisan e Poppi na determinação de doxorrubicina em plasma humano [43]. Esta estratégia simplificou bastante a manipulação da amostra, eliminando a necessidade de diluição do plasma. Em um estudo preliminar, foram preparadas trinta soluções de AS em plasma (dezoito para calibração e doze para validação), na faixa de $1,5$ a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, e obtidas as suas superfícies de fluorescência. Um modelo PARAFAC foi construído, sob restrição de não negatividade nas dimensões espectrais, a partir de um arranjo de dados tridimensional formado por 442 comprimentos de onda de emissão, 13 comprimentos de onda de excitação e 30 amostras. A decomposição desses dados produziu um modelo que, com três fatores, explicou 99,2% da variância total. A consistência trilinear desse modelo pôde ser avaliada por um parâmetro, CORCONDIA (seção 2.3.2) [44], que apresentou um valor de 95,3 %, indicando a boa adequação do modelo. Os fatores modelados foram associados ao AS e a dois possíveis interferentes presentes no plasma (*background*).

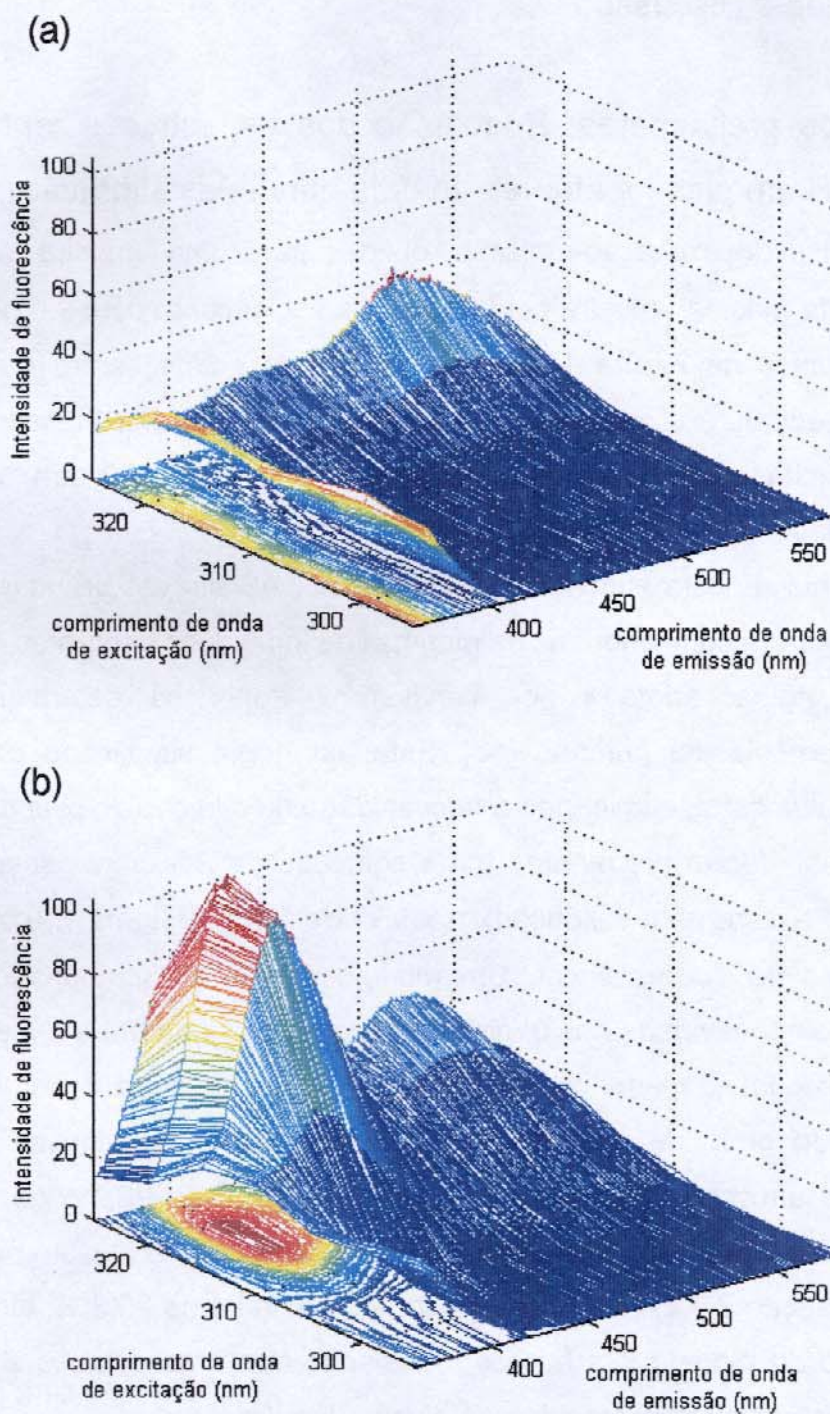


Figura 17. Superfícies de excitação-emissão de: (a) uma amostra de plasma puro e (b) uma amostra do mesmo plasma dopada com $9,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AS.

Os pesos obtidos no modelo PARAFAC, relativos às dimensões espectrais de excitação e de emissão, são mostrados na Figura 18. O fator atribuído ao AS apresentou máximos de excitação e de emissão entre 315 e 320 nm e 400 e 405 nm, respectivamente. Este fator foi comparado com espectros de AS obtidos em solução aquosa tamponada com fosfato em pH 7,4 (Figura 19), reproduzindo o pH aproximado do sangue humano. Os espectros de AS obtidos em plasma diferiram um pouco dos espectros em água: no plasma, ocorre um deslocamento para o azul do máximo de emissão, que em água aparece em 410 nm, assim como um pequeno desdobramento dessa banda, com o aparecimento de um “ombro” em 425 nm; o espectro de excitação também sofre um pequeno deslocamento no plasma, pois em água o máximo da banda está entre 300 e 310 nm; além disso, a emissão do AS em plasma sofre um efeito de supressão (*quenching*) significativo, provocado pelas proteínas. Todas essas mudanças espectrais foram consideradas conseqüências da forte interação do AS com as proteínas do plasma [139].

A tentativa de identificação dos interferentes modelados foi feita com base no artigo de Wolfbeis e Leiner, que mapearam a fluorescência total do soro humano nas regiões do UV e do visível [158]. O espectro do interferente 1, presente em comprimentos de onda de emissão mais curtos, foi atribuído ao triptofano (máximo de excitação/emissão em 278/348 nm). A caracterização do interferente 2, presente em comprimentos de onda de emissão mais longos, é mais difícil de ser feita e entre as possibilidades sugeridas estão a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e seu fosfato, livre ou ligado a enzimas, e a riboflavina (vitamina B₂) livre ou na forma de suas coenzimas, tais como a flavina mononucleotídeo (FMN) e a flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Os autores deste artigo ressaltaram que o perfil de fluorescência do soro humano na região do UV, onde fluoresce o triptofano, não costuma estar sujeito a grandes variações no caso de indivíduos saudáveis. Por outro lado, a região do UV próximo e do visível, onde fluoresce o interferente 2, costuma sofrer grandes variações dependendo da amostra, o que vem a dificultar a atribuição das espécies.

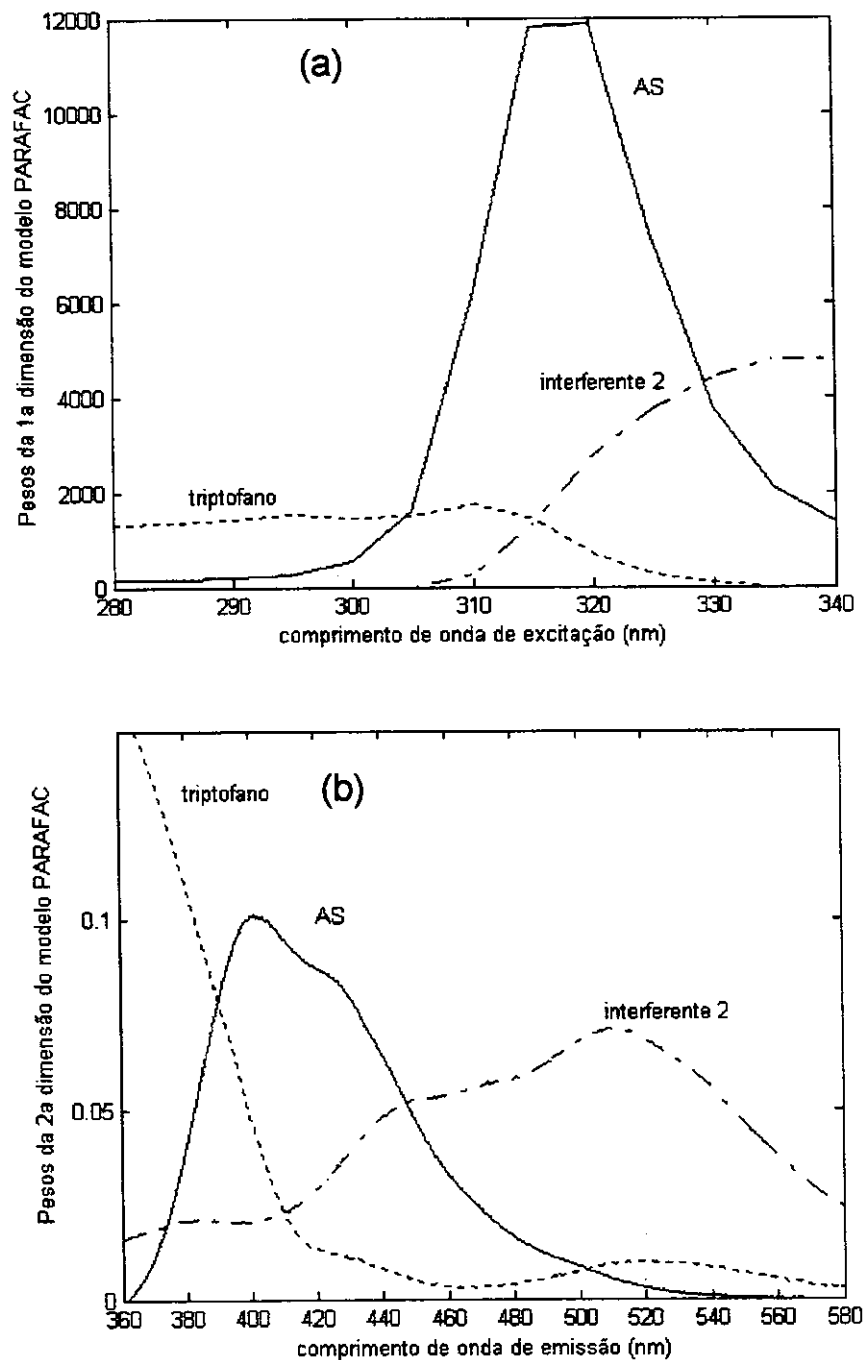


Figura 18. Espectros de fluorescência deconvoluídos, obtidos através dos pesos do modelo PARAFAC. (a) excitação e (b) emissão.

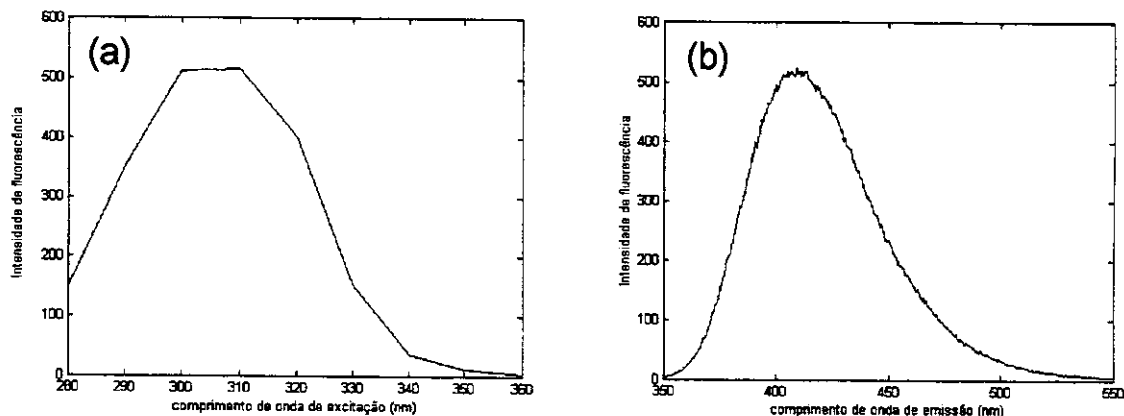


Figura 19. Espectros de fluorescência de uma solução $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AS em tampão fosfato (pH = 7,4). (a) Espectro de excitação obtido na emissão em 410 nm. (b) Espectro de emissão obtido pela excitação em 300 nm.

Os pesos do modelo PARAFAC relativos à dimensão das amostras poderiam ser usados para calibração, através de uma regressão linear (seção 2.3.2). Contudo, os pesos obtidos para este modelo não apresentaram um comportamento linear em função da concentração de AS, impossibilitando a construção de uma curva de calibração. Adicionalmente, verificou-se que replicatas de mesma concentração de AS em diferentes plasmas mostravam uma diferença de até 30% nos valores de seus pesos, enquanto amostras de mesma concentração no mesmo plasma mostravam diferenças insignificantes. A conclusão é de que não é possível construir um modelo para calibração de AS em diferentes plasmas, pois o efeito da supressão do seu sinal varia de acordo com a composição do plasma de cada indivíduo. Em outras palavras, um forte efeito de matriz foi observado. Como, obviamente, não é viável construir uma curva de calibração específica para cada indivíduo, optou-se por uma outra estratégia.

6.4.2. Determinação de AS em plasma usando o método da adição padrão

A opção escolhida para a determinação de AS em plasma foi o uso do método da adição padrão, indicado para situações como esta, em que o efeito de matriz inviabiliza a construção de uma curva de calibração robusta. Um dos aspectos a ser destacado nesta metodologia é o fato de que a curva de adição padrão foi construída usando os pesos de um modelo PARAFAC, ao invés do sinal instrumental puro. Esses pesos equivaleram ao sinal “filtrado”, livre do sinal dos interferentes.

As determinações foram feitas em uma situação de volume total variável em função da adição do padrão. Nesta situação a resposta instrumental pode ser dada pela seguinte equação [159]:

$$R = k \left[\frac{V_x C_x}{V_x + NV_s} + \frac{NV_s C_s}{V_x + NV_s} \right] \quad (21)$$

onde R é a resposta instrumental (ou, no caso desta aplicação, os pesos de um modelo PARAFAC), V_x e C_x são o volume e a concentração iniciais da amostra, C_s é a concentração da solução padrão, V_s é o volume e de cada adição de padrão, N é o número de adições e k é uma constante de proporcionalidade. A Equação 21 pode ser rescrita na seguinte forma:

$$(V_x + NV_s)R = kV_x C_x + NkV_s C_s \quad (22)$$

Se o lado esquerdo inteiro da Equação 22 for graficado em função de N, será obtida uma reta com coeficiente angular, $\beta = kV_s C_s$, e coeficiente linear, $\alpha = kV_x C_x$. Desta forma, a concentração da amostra será determinada através da seguinte equação:

$$C_x = \frac{\alpha V_s C_s}{\beta V_x} \quad (23)$$

Para esta análise, a faixa inicial de comprimento de onda de excitação (280-340 nm) foi restrita entre 295 e 325 nm, ao redor da banda do AS. A região eliminada não alterou significativamente os modelos. Os modelos PARAFAC foram construídos a partir de arranjos de dados tridimensionais formados por 442 comprimentos de onda de emissão, 7 comprimentos de onda de excitação e 5 medidas (a amostra original mais quatro adições). A Figura 20 representa a montagem desses arranjos de dados.

Foi construído um modelo específico para cada triplicata de cada amostra, totalizando trinta modelos. Em todos os casos, eles foram construídos com três fatores, sem restrições, e explicaram mais do que 99,90% da variância total dos dados. Observou-se que modelos sem restrições produziram resultados com erros menores em relação aos que foram construídos com restrição de não negatividade nas duas dimensões espectrais. Além disso, os modelos sem restrição convergiram bem mais rápido que os restritos (cerca de 10 a 20 segundos contra alguns minutos). Os valores de CORCONDIA obtidos estiveram entre 25 e 80%, indicando, em vários casos, deficiência de trilinearidade. Modelos com dois fatores apresentaram quase 100% de trilinearidade, mas forneceram erros de previsão muito superiores aos modelos com três fatores. Além disso, eles apresentaram variância residual sistemática e significativa, indicando que existia mais um fator a ser extraído. Em todos os casos, os pesos que foram obtidos em relação aos espectros de emissão e excitação apresentaram boa similaridade com os pesos mostrados na Figura 18. Os resultados das determinações das dez amostras (estimativas da média e do desvio padrão das triplicatas) são mostrados na Tabela 16, juntamente com os erros em relação aos valores esperados. Na grande maioria dos casos, as retas de adição padrão apresentaram coeficientes de correlação (r) superiores a 0,990; em alguns poucos casos, esse valor esteve entre 0,970 e 0,990. Uma reta de adição padrão típica é mostrada na Figura 21, para uma das triplicatas da amostra $9,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em AS.

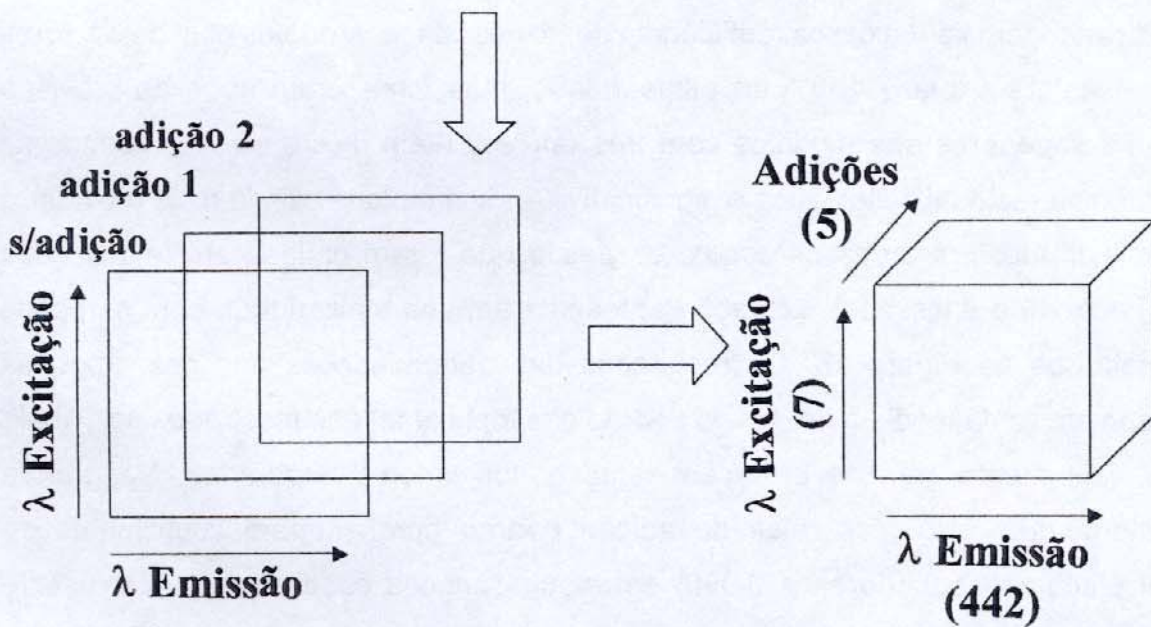
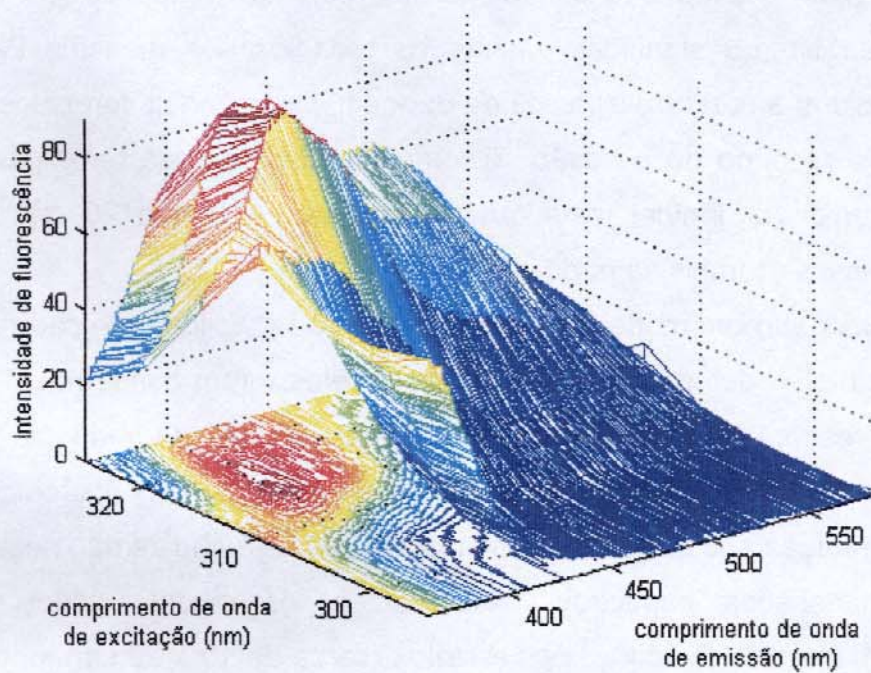


Figura 20. Representação da montagem dos arranjos de dados tratados nesta aplicação. Superfície de excitação-emissão para a amostra de plasma $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em AS.

Tabela 16. Determinação de AS em plasma usando PARAFAC e adição padrão

Quantidade adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Quantidade prevista ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ¹	Erro de previsão (%)
1,5	1,82 ± 0,16	21,3
3,0	3,19 ± 0,28	6,3
4,5	4,65 ± 0,33	3,3
6,0	6,27 ± 0,26	4,5
7,5	7,76 ± 0,37	3,5
9,0	8,94 ± 0,24	- 0,7
12,0	12,49 ± 0,48	4,1
15,0	15,66 ± 0,53	4,4
21,0	20,73 ± 0,42	1,3
24,0	24,37 ± 0,46	1,5

¹ Valores médios e desvios padrão de três determinações.

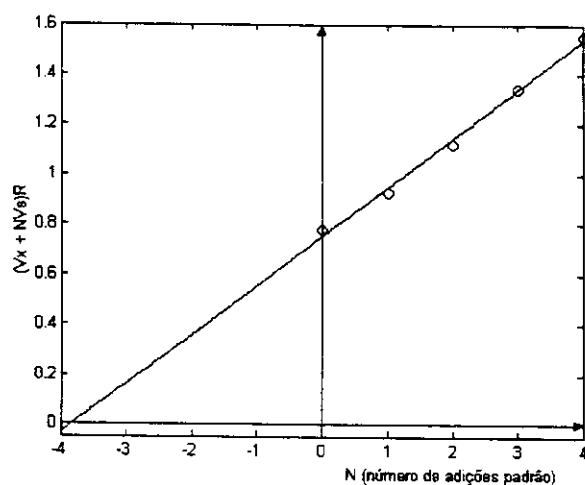


Figura 21. Retas de adição padrão para a amostra de plasma 9,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em AS.

A amostra no nível inferior de concentração, $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, apresentou os piores resultados, com um erro de previsão em torno de 20%. Este resultado pode indicar um possível limite de quantificação do método, levando em conta que nessa concentração, o sinal do AS encontra-se completamente encoberto pelo sinal da fluorescência natural (*background*) do plasma. As previsões das demais amostras apresentaram erros de, no máximo, 6,3 %, sendo que a grande maioria apresentou erros inferiores a 5 %. Um detalhe interessante a ser notado é que quase todas as previsões apresentaram erros positivos, sendo que parece haver uma tendência de diminuição dos erros com o aumento da concentração de AS. Estas observações indicam a presença de algum erro sistemático nessas determinações. Uma hipótese para explicar este erro é a presença no plasma de alguma interferência de intensidade de fluorescência pequena, a qual não foi modelada pelo PARAFAC. A observação de uma pequena variância sistemática residual corroborou esta explicação. Além disso, à medida que a concentração de AS aumentou, o erro diminuiu porque a interferência se tornou menos significativa. No entanto, essa possível interferência não pôde ser extraída, pois modelos PARAFAC com quatro fatores não convergiram ou produziram soluções degeneradas.

6.5. Conclusão

Esta aplicação representou um exemplo interessante de uso da vantagem de segunda ordem. Os resultados mostraram ser possível a determinação direta de AS em plasma pela combinação de espectrofluorimetria, PARAFAC e adição padrão. Foram obtidos bons resultados para a faixa de concentração de 3 a 24 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As vantagens potenciais dessa determinação, menor custo e maior rapidez, podem ser ainda mais evidenciadas considerando-se a possibilidade de automação do método proposto. A escala da análise pode ser diminuída, assim como os erros causados pela manipulação, e o ganho de tempo pode ser enormemente aumentado. A contribuição deste trabalho foi, mais do que a determinação específica de salicilato em plasma, a proposição de uma nova alternativa para a determinação de substâncias fluorescentes em matrizes complexas. Além da possível aplicação em análises clínicas, esta alternativa pode ser usada em outros tipos de matrizes, tais como leite, alimentos, plantas, etc.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

FUTURAS

Esta tese veio contribuir na divulgação de novas perspectivas para a determinação de fármacos, abertas pelo desenvolvimento da quimiometria. Ela mostrou que metodologias baseadas na separação do sinal, ao invés da separação das espécies, são possíveis e possuem potencial para se tornarem alternativas simples, rápidas e de menor custo. As quatro aplicações apresentadas aqui mostraram apenas um pouco do potencial desses métodos nas áreas de análises clínicas e de controle de qualidade de fármacos em formulações farmacêuticas.

Embora os métodos quimiométricos de primeira ordem, como o PLS, já estejam razoavelmente popularizados entre a comunidade de química analítica, os métodos de ordem superior ainda são relativamente pouco conhecidos e muito do seu potencial ainda está por ser explorado. A contínua automação e miniaturização dos processos abrem também novas perspectivas, como, por exemplo, a obtenção de dados multidimensionais de absorção no UV pela análise em fluxo com gradiente de pH e detecção por arranjo de diodos. Outros sistemas de detecção, como sensores de fluorescência, e outras situações, como a obtenção de dados em função do tempo, permitem imaginar aplicações que envolvam quatro, cinco ou até mais dimensões dos dados, uma área ainda pouco estudada. Além disso, métodos que procurem se adequar a situações de desvio na trilinearidade (ou multilinearidade) dos dados, tais como o PARAFAC2 [17,160] e o PARALIND (*PARAllel profiles with LINear Dependence*) ou análise de fatores paralelos com dependência linear [161] (originalmente denominado PARATUCK2 [17]) já foram propostos e são uma alternativa para situações em que métodos como o PARAFAC não funcionem bem, como no caso de dados com deficiência de posto (*rank deficiency*) [17]. A deficiência ou sobreposição de posto nos dados ocorre quando há dependência linear entre os componentes, como no caso de experimentos cinéticos em que a formação de alguns produtos e, portanto, a sua concentração, depende da quantidade de seus precursores, ou em experimentos envolvendo gradiente de pH, nos quais ambas as formas, ácida e básica, estão

relacionadas ao mesmo analito. Nestes casos, o posto total dos dados não será igual à soma dos postos das espécies contribuintes [162].

O uso da vantagem de segunda ordem na calibração de sistemas que contenham interferentes desconhecidos também abre a possibilidade de se elaborar novas estratégias de análise. Por exemplo, pode-se imaginar a determinação espectrofluorimétrica de fármacos em plasma ou soro, a partir de um conjunto de calibração preparado em água. Para isto, as amostras deveriam ser diluídas até um ponto em que o efeito da supressão das proteínas sobre o sinal do analito se torne insignificante. O PARAFAC pode ser usado então, para separar o sinal do analito dos sinais dos interferentes presentes na matriz.

Outro aspecto a ser comentado é a necessidade do estabelecimento de figuras de mérito como requisito para o reconhecimento deste tipo de métodos por órgãos oficiais, tais como as Farmacopéias. Nesta tese, elas foram calculadas apenas para a terceira aplicação, envolvendo um método de primeira ordem, o PLS. A determinação de figuras de mérito para métodos de ordem superior [15] é uma área ainda pouco explorada e que apresenta muitas perspectivas de desenvolvimento.

Finalmente, apesar de se considerar que ainda existe um longo caminho a ser percorrido até que os métodos baseados em quimiometria sejam aceitos por órgãos reguladores das áreas clínica e farmacêutica, e levando em conta todo o rigor necessário para a o controle de qualidade nessas áreas, não se pode deixar de reconhecer o enorme potencial e os muitos caminhos abertos para as pesquisas direcionadas a esses problemas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MA Sharaf, DL Illman, BR Kowalski, "Chemometrics", Wiley, New York, 1986.
- [2] M Otto, W Wegscheider, PG Zambonin, "Chemometrics", em: R Kellner, JM Mermet, M Otto, HM Widmer (Eds.), "Analytical Chemistry", Wiley-VCH, Berlin, 1998, p. 709-808.
- [3] H Martens, T Naes, "Multivariate Calibration", Wiley, Chichester, 1989.
- [4] RG Brereton, "Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry", *Analyst* 125:2125 (2000).
- [5] The United States Pharmacopoeia, 25th revision, U.S.P. Convention, Rockville, MD, 2002.
- [6] RK Gilpin, LA Pachla, "Pharmaceutical and related drugs", *Anal. Chem.* 75:2907 (2003).
- [7] RD Bautista, AI Jimenez, F Jimenez, JJ Arias, "Simultaneous determination of drugs in concentration ratios above 40:1 by application of multivariate calibration to absorbance and derivative spectrophotometric signals", *Fresenius J. Anal. Chem.* 357:449 (1997).
- [8] Z Bouhsain, S Garrigues, M de la Guardiã, "PLS-UV spectrophotometric method for the simultaneous determination of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceutical formulations", *Fresenius J. Anal. Chem.* 357:973 (1997).
- [9] K Wiberg, A Hagman, P Buren, SP Jacobsson, "Determination of the content and identity of lidocaine solutions with UV-visible spectroscopy and multivariate calibration", *Analyst* 126:1142 (2001).
- [10] MCF Ferraro, PM Castellano, TS Kaufman, "Simultaneous determination of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in synthetic samples and pharmaceutical formulations by multivariate analysis of spectrophotometric data", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30:1121 (2002).
- [11] A Navalón, R Blanc, M del Olmo, JL Vilchez, "Simultaneous determination of naproxen, salicylic acid and acetylsalicylic acid by spectrofluorimetry using partial least-squares (PLS) multivariate calibration", *Talanta* 48:469 (1999).
- [12] PC Damiani, MD Borraccetti, AC Olivieri, "Direct and simultaneous determination of naproxen and salicylate in human serum assisted by chemometric analysis", *Anal. Chim. Acta* 471:87 (2002).
- [13] JA Arancibia, AC Olivieri, GM Escandar, "First- and second-order multivariate calibration applied to biological samples: determination of anti-inflammatories in serum and urine", *Anal. Bioanal. Chem.* 374:451 (2002).
- [14] JA Arancibia, GM Escandar, "Two different strategies for the fluorimetric determination of piroxicam in serum", *Talanta* 60:1113 (2003).
- [15] A Muñoz de la Peña, A Espinosa Mansilla, D González Gómez, AC Olivieri, HC Goicoechea, "Interference-free analysis using three-way fluorescence data and the parallel factor model. Determination of fluoroquinolone antibiotics in human serum", *Anal. Chem.* 75:2640 (2003).
- [16] KS Booksh, BR Kowalski, "Theory of analytical chemistry", *Anal. Chem.* 66:782A (1994).
- [17] R Bro, "Multi-way Analysis in the Food Industry", tese de doutorado, Universidade de Amsterdam, 1998.

- [18] RPH Nikolajsen, KS Booksh, AM Hansen, R Bro, "Quantifying catecholamines using multi-way kinetic modelling", *Anal. Chim. Acta* 475:137 (2003).
- [19] SR Durell, CH Lee, RT Ross, EL Gross, "Factor analysis of near-ultraviolet absorption spectrum of plastocyanin using, bilinear, trilinear and quadrilinear models", *Arch. Biochem. Biophys.* 278:148 (1990).
- [20] HAL Kiers, "Hierarchical relations among three-way methods", *Psychometrika* 56:449 (1991).
- [21] PM Kroonenberg, "Three Mode Principal Component Analysis: Theory and Applications", DSWO, Leiden, 1983.
- [22] LR Tucker, "Some mathematical notes on three-mode factor analysis", *Psychometrika* 31:279 (1966).
- [23] RA Harshman, "Foundations of the PARAFAC procedure: Models and conditions for an explanatory multimodal factor analysis", *UCLA Working Papers in Phonetics* 16:1 (1970).
- [24] JD Carroll, JJ Chang, "Analysis of individual differences in multidimensional scaling via an N-way generalization of Eckart-Young decomposition", *Psychometrika* 35:283 (1970).
- [25] CN Ho, GD Christian, ER Davidson, "Application of the method of rank annihilation to quantitative analyses of multicomponent fluorescence data from the video fluorometer", *Anal. Chem.* 50:1108 (1978).
- [26] CJ Appellof, ER Davidson, "Strategies for analyzing data from video fluorometric monitoring of liquid-chromatographic effluents", *Anal. Chem.* 53:2053 (1981).
- [27] MD Russell, M Gouterman, "Excitation-emission-lifetime analysis of multicomponent systems - 1. Principal component factor-analysis", *Spectrochim. Acta A* 44:857 (1988).
- [28] MD Russell, M Gouterman, "Excitation-emission-lifetime analysis of multicomponent systems - 2. Synthetic model data", *Spectrochim. Acta A* 44:863 (1988).
- [29] MD Russell, M Gouterman, JA Vanzee, "Excitation-emission-lifetime analysis of multicomponent systems - 3. Platinum, palladium and rhodium porphyrins", *Spectrochim. Acta A* 44:873 (1988).
- [30] E Sanchez e BR Kowalski, "Generalized rank annihilation factor analysis", *Anal. Chem.* 58:496 (1986).
- [31] E Sanchez e BR Kowalski, "Tensorial resolution: a direct trilinear decomposition", *J. Chemom.* 4:29 (1990).
- [32] BE Wilson, W Lindberg, BR Kowalski, "Multicomponent quantitative analysis using second-order nonbilinear data - Theory and simulations", *J. Am. Chem. Soc.* 111:3797 (1989).
- [33] P Geladi, "Analysis of multi-way (multi-mode) data", *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 7:11 (1989).
- [34] AK Smilde, "Three-way analyses - Problems and prospects", *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 15:143 (1992).
- [35] R Bro, "PARAFAC. Tutorial and applications", *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38:149 (1997).
- [36] R Bro, "Multiway calibration. Multilinear PLS", *J. Chemom.* 10:47 (1996).
- [37] CA Andersson, R Bro, "The N-way Toolbox for MATLAB", *Chemom. Intell.*

- Lab. Syst. 52:1 (2000).
- [38] MG Trevisan, "Aplicação de Métodos Quimiométricos de Ordem Superior e Fluorescências Molecular na Análise de Matrizes Biológicas", Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas, 2003, p. 77-80.
- [39] A Graham, "Kronecker Products and Matrix Calculus with Applications", Wiley, New York, 1981.
- [40] CG Khatri, CR Rao, "Generalized Inverse of Matrices and its Applications", Wiley, New York, 1968, p. 12.
- [41] R Hoffmann, VI Minkin, BK Carpenter, "Ockham's Razor and chemistry", Hyle 3:3 (1997).
- [42] MM Reis, DN Biloti, MMC Ferreira, FBT Pessine, GM Teixeira, "PARAFAC for spectral curve resolution: A case study using total luminescence in human dental tartar", Appl. Spectrosc. 55:847 (2001).
- [43] MG Trevisan, RJ Poppi, "Determination of doxorubicin in human plasma by excitation-emission matrix fluorescence and multi-way analysis", Anal. Chim. Acta 493:69 (2003).
- [44] R Bro, HAL Kiers, "A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models", J. Chemom. 17:274 (2003).
- [45] L Munck, L Norgaard, SB Engelsen, R Bro, CA Andersson, "Chemometrics in food science - a demonstration of the feasibility of a highly exploratory, inductive evaluation strategy of fundamental scientific significance", Chemom. Intell. Lab. Syst. 44:31 (1998).
- [46] ER Pereira-Filho, MM Sena, MAZ Arruda, RJ Poppi, "Exploratory analysis of L'vov platform surfaces for electrothermal atomic absorption spectrometry by using three-way chemometric tools", Anal. Chim. Acta 495:177 (2003).
- [47] R Bro, H Heimdal, "Enzymatic browning of vegetables. Calibration and analysis of variance by multiway methods", Chemom. Intell. Lab. Syst. 34:85 (1996).
- [48] R Bro, Jakobsen M, "Exploring complex interactions in designed data using GEMANOVA. Color changes in fresh beef during storage", J. Chemom. 16:294 (2002).
- [49] R Bro, AK Smilde, "Centering and scaling in component analysis", J. Chemom. 17:16 (2003).
- [50] S Wold, P Geladi, K Esbensen, J Ohman, "Multi-way principal components and PLS-analysis" J. Chemom. 1:41 (1987).
- [51] L Stahle, "Aspects of the analysis of three-way data", Chemom. Intell. Lab. Syst. 7:95 (1989).
- [52] K Florey, "Aspirin", em: K Florey (ed.), Analytical Profiles of Drug Substances 8:1 (1979).
- [53] CAB Clemetson, "Vitamin C", CRC Press, Boca Raton, 1989.
- [54] British Pharmacopoeia, Her Majesty's Stationary Office, London, 1980.
- [55] KK Verma, A Jain, A Verma, A Chaurasia, "Spectrophotometric determination of ascorbic-acid in pharmaceuticals by background correction and flow-injection", Analyst 116:641 (1991).
- [56] A Jain, A Chaurasia, KK Verma, "Determination of ascorbic-acid in soft drinks, preserved fruit juices and pharmaceuticals by flow-injection spectrophotometry

- matrix absorbency correction by treatment with sodium-hydroxide", *Talanta* 42:779 (1995).
- [57] P Trinder, "Rapid determination of salicylate in biological fluids", *Biochem. J.* 57:301 (1954).
- [58] AM di Pietra, R Gatti, V Andrisano, V Cavrini, "Application of high-performance liquid chromatography with diode-array detection and on-line post-column photochemical derivatization to the determination of analgesics", *J. Chromatogr. A* 729:355 (1996).
- [59] GP McMahon, MT Kelly, "Determination of aspirin and salicylic acid in human plasma by column-switching liquid chromatography using on-line solid-phase extraction", *Anal. Chem.* 70:409 (1998).
- [60] LT Kubota, JCB Fernandes, L Rover Jr., GO Neto, "Determination of acetylsalicylic acid by FIA-potentiometric system in drugs after on-line hydrolysis", *Talanta* 50:661 (1999).
- [61] P Wimalasiri, RBH Wills, "Simultaneous analysis of ascorbic-acid and dehydroascorbic acid in fruit and vegetables by high-performance liquid-chromatography", *J. Chromatogr.* 256:368 (1983).
- [62] P Janda, J Weber, L Dunsch, ABP Lever, "Detection of ascorbic acid using a carbon fiber microelectrode coated with cobalt tetramethylpyridoporphyrazine", *Anal. Chem.* 68:960 (1996).
- [63] JCB Fernandes, LT Kubota, GO Neto, "Potentiometric sensor for L-ascorbic acid based on EVA membrane doped with copper(II)", *Electroanalysis* 11:475 (1999).
- [64] V Kmetec, "Simultaneous determination of acetylsalicylic, salicylic, ascorbic and dehydroascorbic acid by HPLC", *J. Pharm. Biom. Anal.* 10:1073 (1992).
- [65] MI Toral, N Lara, P Richter, A Tassara, AE Tapia, C Rodriguez, "Simultaneous determination of ascorbic acid and acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations", *J. AOAC Int.* 84:37 (2001).
- [66] HN Dogan, A Duran, "Simultaneous spectrophotometric determination of aspirin, acetaminophen and ascorbic acid in pharmaceutical preparations", *Pharmazie*, 53:781 (1998).
- [67] MM Sena, JCB Fernandes, L Rover Jr, RJ Poppi, LT Kubota, "Application of two and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid mixtures using ultraviolet spectrophotometry", *Anal. Chim. Acta* 409:159 (2000).
- [68] The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 12th edition, Merck & Co., Whitehouse Station, 1996.
- [69] MLSS Gonçalves, "Métodos Instrumentais para Análise de Soluções - Análise Quantitativa", Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1983.
- [70] MJ Charles, NW Martin, HZ Msimanga, "Simultaneous determination of aspirin, salicylamide, and caffeine in pain relievers by target factor analysis", *J. Chem. Educ.* 74:1114 (1997).
- [71] Fernandes JCB, Neto GD, Kubota LT, "Use of column with modified silica for interfering retention in a FIA spectrophotometric method for direct determination of vitamin C in medicine", *Anal. Chim. Acta* 366:11 (1998).
- [72] BGM Vandeginste, W Derks, G Kateman, "Multicomponent self-modeling curve resolution in high-performance liquid chromatography by iterative target

- transformation analysis"; *Anal. Chim. Acta* 173:253 (1985).
- [73] W Windig, J Guilment, "Interactive self-modeling mixture analysis"; *Anal. Chem* 63:1425 (1991).
- [74] MM Sena, IS Scarminio, KE Collins, CH Collins, "Speciation of aqueous chromium(VI) solutions with the aid of Q-mode factor analysis followed by oblique projection", *Talanta* 52:453 (2000).
- [75] MU Zubair, MMA Hassan, IA Al-Meshal, "Caffeine", K Florey (ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances* 15:71 (1986).
- [76] HA El-Obeid, AA Al-Badr, "Acetaminophen", K Florey (ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances* 14:551 (1985).
- [77] N Ramos-Martos, F Aguirre-Gomez, A Molinz-Diaz, LF Capitan-Vallvey, "Application of liquid chromatography to the simultaneous determination of acetylsalicylic acid, caffeine, codeine, paracetamol, pyridoxine, and thiamine in pharmaceutical preparations", *J. AOAC Int.* 84:676 (2001).
- [78] JT Franeta, D Agbaba, S Eric, S Pavkov, M Aleksic, S Vladimirov, "HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets", *Farmaco* 57:709 (2002).
- [79] JT Franeta, DD Agbaba, SM Eric, SP Pavkov, SD Vladimirov, MB Alekusic, "Quantitative analysis of analgoantipyretics in dosage form using planar chromatography", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24:1169 (2001).
- [80] S Boonkerd, M Lauwers, MR Detaevernier, Y Michotte, "Separation and simultaneous determination of the components in an analgesic tablet formulation by micellar electrokinetic chromatography", *J. Chromatogr. A* 695:97 (1995).
- [81] Z Bouhsain, S Guarrigues, M de la Guardia, "Simultaneous stopped-flow determination of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceutical formulations by Fourier transform infrared spectrometry with partial least-squares data treatment", *Analyst* 121:1935 (1996).
- [82] A Ruiz Medina, ML Fernandez de Córdoba, A Molina Diaz, "Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid by means of a FI ultraviolet PLS multiptosensing device", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21:983 (1999).
- [83] RD Bautista, FJ Aberasturi, AI Jimenez, F Jimenez, "Simultaneous spectrophotometric determination of drugs in pharmaceutical preparations using multiple linear regression and partial least-squares regression, calibration and prediction methods", *Talanta* 43:2107 (1996).
- [84] MM Sena, RJ Poppi, "N-way PLS applied to simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34:27 (2004).
- [85] KY Tam, K Takacs-Novak, "Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: a validation study", *Anal. Chim. Acta* 434:157 (2001).
- [86] CM Adeyeye, PK Li, "Diclofenac sodium", em: K Florey (ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances* 19:123 (1990).

- [87] GD Bartoszyk, A Wild, "B-vitamins potentiate the antinociceptive effect of diclofenac in carrageenin-induced hyperalgesia in the rat tail pressure test", *Neurosci. Lett.* 101:95 (1989).
- [88] A Kuhlwein, HJ Meyer, CO Koehler, "Reduced need for diclofenac with concomitant B-vitamin therapy - Results of a double-blind clinical-study with reduced diclofenac-dosage (75 mg diclofenac vs 75 mg diclofenac plus B-vitamins daily) in patients with acute lumbago", *Klin. Wochenschr.* 68:107 (1990).
- [89] G Bruggemann, CO Koehler, EM Koch, "The therapy of acute lumbago with diclofenac and B-vitamins - Results of a double-blind clinical-study", *Klin. Wochenschr.* 68:116 (1990).
- [90] K Bromm, WM Herrmann, H Schulz, "Do the B-vitamins exhibit antinociceptive efficacy in men - Results of a placebo controlled repeated measures double-blind-study", *Neuropsychobiology* 31:156 (1995).
- [91] G Reyes-García, R Medina-Santillán, F Terán-Rosales, E Mateos-García, C Castillo-Henkel, "Characterization of the potentiation of the antinociceptive effect of diclofenac by vitamin B complex in the rat", *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 42:73 (1999).
- [92] KAM Al-Rashood, FJ Al-Shammary, NAA Mian, "Thiamine", em: K Florey (ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances* 18:413 (1989).
- [93] HY Aboul-Enein, MA Loutfy, "Pyridoxine hydrochloride", em: K Florey (ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances* 13:447 (1984).
- [94] Serviço de Atendimento ao Consumidor da Indústria fabricante do medicamento, setembro de 2003.
- [95] SA Abdelfattah, SZ Elkhateeb, SA Abdelrazeg, MS Tawakkol, "Application of proton magnetic-resonance spectrometry in the analysis of diclofenac sodium and its tablets", *Spectrosc. Lett.* 21:533 (1988).
- [96] R Bucci, AD Magri, AL Magri, "DSC in the chemical analysis of drugs - Determination of diclofenac in pharmaceutical formulations", *J. Thermal Anal. Calor.* 61:369 (2000).
- [97] AM Pimenta, AN Araújo, MCBSM Montenegro, "Simultaneous potentiometric and fluorimetric determination of diclofenac in a sequential injection analysis system", *Anal. Chim. Acta.* 470:185 (2002).
- [98] MG Donato, W Baeyens, W Vandebossche, P Sandra, "The determination of nonsteroidal antiinflammatory drugs in pharmaceuticals by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic capillary chromatography", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12:21 (1994).
- [99] MS Aurora-Prado, M Steppe, MFM Tavares, ERM Kedor-Hackmann, MIRM Santoro, "Comparison between capillary electrophoresis and liquid chromatography for the determination of diclofenac sodium in a pharmaceutical tablet", *J. AOAC Int.* 85:333 (2002).
- [100] L Gonzalez, G Yuln, MG Volonte, "Determination of cyanocobalamin, betamethasone, and diclofenac sodium in pharmaceutical formulations, by high performance liquid chromatography", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20:487 (1999).
- [101] R Hajkova, P Solich, M Pospisilova, J Sicha, "Simultaneous determination of methylparaben, propylparaben, sodium diclofenac and its degradation product

- in a topical emulgel by reversed-phase liquid chromatography", *Anal. Chim. Acta* 467:91 (2002).
- [102] J Krzek, M Starek, "Densitometric determination of diclofenac, 1-(2,6-dichlorophenyl)indolin-2-one and indolin-2-one in pharmaceutical preparations and model solutions", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28:227 (2002).
- [103] L Escuder-Gilabert, Y Martin-Biosca, S Sagrado, RM Villanueva-Camano, MJ Medina-Hernandez, "Quality control of pharmaceuticals containing non-steroidal anti-inflammatory drugs by micellar liquid chromatography," *Chromatographia* 55:283 (2002).
- [104] ME Abdel-Hamid, L Novotny, H Hamza, "Determination of diclofenac sodium, flufenamic acid, indomethacin and ketoprofen by LC-APCI-MS", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24:587 (2001).
- [105] JC Botello, G Perezcaballero, "Spectrophotometric determination of diclofenac sodium with methylene-blue", *Talanta* 42:105 (1995).
- [106] S AgatonovicKustrin, L Zivanovic, M Zecevic, D Radulovic, "Spectrophotometric study of diclofenac-Fe(III) complex", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16:147 (1997).
- [107] I Kramancheva, I Dobrev, L Brakalov, A Andreeva, "Spectrophotometric determination of diclofenac sodium in gel-ointment", *Anal. Lett.* 30:2235 (1997).
- [108] R Bucci, AD Magri, AL Magri, "Determination of diclofenac salts in pharmaceutical formulations", *Fresenius J. Anal. Chem.* 362:577 (1998).
- [109] PC Damiani, M Bearzotti, MA Cabezón, AC Olivieri, "Spectrofluorometric determination of diclofenac in tablets and ointments", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20:587 (1999).
- [110] JA Arancibia, GM Escandar, "Complexation study of diclofenac with β -cyclodextrin and spectrofluorimetric determination", *Analyst* 124:1833 (1999).
- [111] JA Arancibia, MA Boldrini, GM Escandar, "Spectrofluorimetric determination of diclofenac in the presence of α -cyclodextrin", *Talanta* 52:261 (2000).
- [112] GM Escandar, AJ Bystol, AD Campiglia, "Spectrofluorimetric method for the determination of piroxicam and pyridoxine", *Anal. Chim. Acta* 466:275 (2002).
- [113] MLF de Cordova, PO Barrales, AM Diaz, "Sensitive and selective determination of diclofenac sodium in pharmaceutical preparations by solid phase ultraviolet absorptiometry", *Anal. Chim. Acta* 369:263 (1998).
- [114] P Ortega-Barrales, A Ruiz-Medina, ML Fernandez de Cordova, A Molina-Diaz, "Sensitive and simple determination of diclofenac sodium by use of a continuous flow-injection procedure with solid-phase spectroscopic detection", *Anal. Sci.* 15:985 (1999).
- [115] MM Sena, ZF Chaudhry, CH Collins, RJ Poppi, "Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, artigo submetido.
- [116] RFW Hopmann, GP Brugnoli, "pK of thiamine C(2)H", *Nature-New Biol.* 246:157 (1973).
- [117] AK Lunn, RA Morton, "Ultra-violet absorption spectra of pyridoxine and related compounds", *Analyst* 77:718 (1952).

- [118] DE Metzler, EE Snell, "Spectra and ionization constants of the vitamin B₆ group and related 3-hydroxypyridine derivatives", *J. Am. Chem. Soc.* 77:2431 (1955).
- [119] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, "Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos", Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- [120] JWB Braga, "Avaliação de Figuras de Mérito em Calibração Multivariada, Aplicada na Determinação de Carbamazepina por Espectroscopia no Infravermelho Próximo e Médio", Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas, 2004.
- [121] A Lorber, K Faber, BR Kowalski, "Net analyte signal calculation in multivariate calibration", *Anal. Chem.* 69:1620 (1997).
- [122] L Cuadros-Rodriguez, AM García-Campaña, C Jimenez-Linares, M Román-Ceba, "Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment", *Anal. Lett.* 26:1243 (1993).
- [123] K Faber, A Lorber, BR Kowalski, "Analytical figures of merit for tensorial calibration", *J. Chemom.* 11:419 (1997).
- [124] R Boqué, K Faber, FX Rius, "Detection limits in classical multivariate calibration models", *Anal. Chim. Acta* 423:41 (2000).
- [125] CBG Bottoli, ZF Chaudhry, DA Fonseca, KE Collins, CH Collins, "Poly(alkylmethylsiloxanes) thermally immobilized on silica as stationary phases for high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A* 948:121 (2002).
- [126] J Kirschbaum, "Cyanocobalamin", em: K Florey (ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances* 10:183 (1981).
- [127] JR Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy", 3rd ed., Plenum, New York, 2002.
- [128] KS Booksh, AR Muroski, ML Myrick, "Single measurement excitation/emission matrix spectrofluorometer for determination of hydrocarbons in ocean water. 2. Calibration and quantitation of naphthalene and styrene", *Anal. Chem.* 68:3539 (1996).
- [129] JL Beltran, R Ferrer, J Guiteras, "Multivariate calibration of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures from excitation-emission fluorescence spectra", *Anal. Chim. Acta* 373:311 (1998).
- [130] RD Jiji, GA Cooper, KS Booksh, "Excitation-emission matrix fluorescence based determination of carbamate pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons", *Anal. Chim. Acta* 397:61 (1999).
- [131] RD Jiji, GG Andersson, KS Booksh, "Application of PARAFAC for calibration with excitation-emission matrix fluorescence spectra of three classes of environmental pollutants", *J. Chemom.* 14:171 (2000).
- [132] DK Pedersen, L Munck, SB Engelsen, "Screening for dioxin contamination in fish oil by PARAFAC and N-PLSR analysis of fluorescence landscapes", *J. Chemom.* 16:451 (2002).
- [133] R Bro, "Exploratory study of sugar production using fluorescence spectroscopy and multi-way analysis", *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 46:133 (1999).
- [134] Baunsgaard D, Andersson CA, Arndal A, Munck L, "Multi-way chemometrics for mathematical separation of fluorescent colorants and colour precursors

- from spectrofluorimetry of beet sugar and beet sugar thick juice as validated by HPLC analysis", *Food Chem.* 70:113 (2000).
- [135] JA Martins, MM Sena, RJ Poppi, FBT Pessine, "Fluorescence piroxicam study in the presence of cyclodextrins by using the PARAFAC method", *Appl. Spectrosc.* 53:510 (1999).
- [136] YX Tan, JH Jiang, HL Wu, H Cui, RQ Yu, "Resolution of kinetic system of simultaneous degradations of chlorophyll a and b by PARAFAC", *Anal. Chim. Acta* 412:195 (2000).
- [137] CM Andersen, R Bro, "Practical aspects of PARAFAC modelling of fluorescence excitation-emission data", *J. Chemom.* 17:200 (2003).
- [138] GM Escandar, DG Gomez, AE Mansilla, AM de la Pena, HC Goicoechea, "Determination of carbamazepine in serum and pharmaceutical preparations using immobilization on a nylon support and fluorescence detection", *Anal. Chim. Acta* 506:161 (2004).
- [139] MA Abounassif, MS Mian, NAA Mian, "Salicylic acid", em: HG Brittain (ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients* 23:421 (1994).
- [140] WR Snodgrass, "Salicylate toxicity", *Ped. Clin. N. Am.* 32:381 (1986).
- [141] F Kees, D Jehnich, H Grobecker, "Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. B* 677:172 (1996).
- [142] JH Liu, PC Smith, "Direct analysis of salicylic acid, salicyl acyl glucuronide, salicyluric acid and gentisic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. B* 675:61 (1996).
- [143] R Pirola, SR Bareggi, G DeBenedittis, "Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in skin and plasma by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. B* 705:309 (1998).
- [144] Y Goto, K Makino, Y Kataoka, H Shuto, R Oishi, "Determination of salicylic acid in human serum with capillary zone electrophoresis", *J. Chromatogr. B* 706:329 (1998).
- [145] L Rover Jr., GO Neto, JR Fernandes, LT Kubota, "Determination of salicylate in blood serum using an amperometric biosensor based on salicylate hydroxylase immobilized in a polypyrrole-glutaraldehyde matrix", *Talanta* 51:547 (2000).
- [146] A Muñoz de la Peña, MD Moreno, I Durán-Merás, F Salinas, "Synchronous fluorimetric determination of salicylic acid and diflunisal in human serum using partial least-squares calibration", *Talanta* 43:1349 (1996).
- [147] MM Sena, MG Trevisan, RJ Poppi, "Combining standard addition method and second-order advantage for direct determination of salicylate in human plasma by spectrofluorimetry", *Analyst*, artigo submetido.
- [148] DA Skoog, DM West, FJ Holler, "Fundamentals of Analytical Chemistry", 7th ed., Saunders College Publishing, Fort Worth, 1997, p. 572-576.
- [149] DC Harris, "Análise Química Quantitativa", 5^a ed., LTC, Rio de Janeiro, 2001, p. 87-89.
- [150] BEH Saxberg, BR Kowalski, "Generalized standard addition method", *Anal. Chem.* 51:1031 (1979).
- [151] K Booksh, JM Henshaw, LW Burgess, BR Kowalski, "A second-order standard addition method with application to calibration of a kinetics-

- spectroscopic sensor for quantitation of trichloroethylene", *J. Chemom.* 9:263 (1995).
- [152] BJ Prazen, RE Synovec, BR Kowalski, "Standardization of second-order chromatographic/spectroscopic data for optimum chemical analysis", *Anal. Chem.* 70:218 (1998).
- [153] A Herrero, S Zamponi, R Marassi, P Conti, MC Ortiz, LA Sarabia, "Determination of the capability of detection of a hyphenated method: application to spectroelectrochemistry", *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 61:63 (2002).
- [154] HL Wu, RQ Yu, M Shibukawa, K Oguma, "Second-order standard addition method based on alternating trilinear decomposition", *Anal. Sci.* 16:217 (2000).
- [155] HL Wu, M Shibukawa, K Oguma, "An alternating trilinear decomposition algorithm with application to calibration of HPLC-DAD for simultaneous determination of overlapped chlorinated aromatic hydrocarbons", *J. Chemom.* 12:1 (1998).
- [156] E Comas, RA Gimeno, J Ferré, RM Marcé, F Borrull, Rius FX, "Using second-order calibration to identify and quantify aromatic sulfonates in water by high-performance liquid chromatography in the presence of coeluting interferences", *J. Chromatogr. A* 988:277 (2003).
- [157] RA Gimeno, E Comas, RM Marcé, J Ferré, Rius FX, F Borrull, "Second-order bilinear calibration for determining polycyclic aromatic compounds in marine sediments by solvent extraction and liquid chromatography with diode-array detection", *Anal. Chim. Acta* 498:47 (2003).
- [158] OS Wolfbeis, M Leiner, "Mapping of the total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterization", *Anal. Chim. Acta* 167:203 (1985).
- [159] M Bader, "A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis", *J. Chem. Educ.* 57:703 (1980).
- [160] R Bro, CA Andersson, HAL Kiers, "PARAFAC2 - Part II. Modeling chromatographic data with retention time shifts", *J. Chemom.* 13:295 (1999).
- [161] R Bro, R Harshman, ND Sidiropoulos, "New rank-deficient models for multi-way data", *J. Chemom.*, aceito para publicação.
- [162] MM Reis, SP Gurden, AK Smilde, MMC Ferreira, "Calibration and detailed analysis of second-order flow injection analysis data with rank overlap", *Anal. Chim. Acta* 422:21 (2000).