UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Química Departamento de Química Analítica Laboratório de Quimiometria em Química Analítica - LAQQA



"Aplicação de métodos quimiométricos de calibração de segunda ordem e transferência de calibração na determinação simultânea de misturas de fármacos utilizando espectroscopia de fluorescência molecular em fase sólida"

- Dissertação de Mestrado -

Julio Cesar Laurentino Alves

Orientador: Prof. Dr. Ronei J. Poppi

Campinas-SP janeiro 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE

QUÍMICA DA UNICAMP

AL87a	Alves, Julio Cesar Laurentino. Aplicação de métodos quimiométricos de calibração de segunda ordem e transferência de calibração na determinação simultânea de misturas de fármacos utilizando espectroscopia de fluorescência molecular em fase sólida / Julio Cesar Laurentino Alves. – Campinas, SP: [s.n], 2008.
	Orientador: Ronei Jesus Poppi.
	Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
	 Análise em fase sólida. 2. Espectroscopia de fluorescência. 3. Formulação farmacêutica. 4. UPLS. I. Poppi, Ronei Jesus. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Aplication of chemometric methods of second order calibration and transfer of calibration for simultaneous determination of pharmaceutical mixture using solid-phase molecular fluorescence

Palavras-chaves em inglês: Solid-phase analysis, Fluorescence spectroscopy, Pharmaceutical formulation, UPLS

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi (orientador), Prof. Dr. Fabio Augusto (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Edenir R. Pereira Filho (IQ-UFSCAR)

Data de defesa: 30/01/2009

Agradecimentos

- Ao Prof. Dr. Ronei J. Poppi, pela oportunidade da realização desse trabalho, pela confiança e pela valorosa orientação;
- Aos meus pais, meu irmão e família, pelo apoio;
- Aos colegas do LAQQA: Marcelo G. Trevisan, Jez W. B. Braga; Patrícia Valderrama, Paulo H. Março, Danilo A. Maretto, Werickson F. C. Rocha, Luiz A. F. de Godoy Jr. e Renato L. Carneiro, pelo apoio e companheirismo
- À técnica do Instituto de Química, Claudia Martelli, por sua disposição e auxílio no laboratório de espectroscopia;
- A CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo financiamento;
- À Ingrid K. Oliveira, pelo incentivo e pelos ensinamentos;
- Ao "Jaci" Câmara Bastos, pela importante presença em muitos momentos durante nosso período em Campinas

Curriculum Vitae

1. Dados Pessoais

Julio Cesar L. Alves Brasileiro, natural de São Paulo julio@iqm.unicamp.br

2. Formação Acadêmica

Bacharelado em química com atribuições tecnológicas, graduação em 2006 Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas-SP

3. - Experiência profissional

Instituição: Petróleo Brasileiro S.A. – PETROBRAS – Refinaria de Paulínia
Período: 05/2005 a 07/2007
Função: Técnico de operação em processos de ETA
Atividades: - Supervisão e controle de pessoal em planta de tratamento de água

para fins potáveis e industriais. - Atuação em operação e controle, visando o aprimoramento do

- Atuação em operação e controle, visando o aprimoramento do processo de tratamento da água para fins industriais e potáveis, através de tratamento convencional, resinas de troca iônica, ultrafiltração e osmose reversa.

4. Atividades acadêmicas

4.1 Iniciação ciêntífica

Projeto: "Investigação sobre a utilidade do fosfato de vanadila como sensor para gases, reatividade frente a amonia gasosa".
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Airoldi – IQ-UNICAMP
Período: 06/2002 a 12/2002

4.2 Trabalhos apresentados em cogressos

Julio Cesar L. Alves, Cláudio Airoldi, "Investigação sobre a utilidade do fosfato de vanadila como sensor para gases, reatividade frente a amônia gasosa". 26º Reunião anual da SBQ – Poços de Caldas – MG – 26 a 29 de maio de 2003

Julio Cesar L. Alves, Ronei J. Poppi, "Determinação simultânea de AAS, paracetamol e cafeína através de fluorescência molecular em fase sólida e UPLS" 31º Reunião anual da SBQ – Águas de Lindóia – SP – 26 a 29 de maio de 2008

Julio Cesar L. Alves, Ronei J. Poppi, "Simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine using solid-phase molecular fluorescence and PARAFAC"

11º International conference on chemometrics for analytical chemistry – CAC 2008 – Montpellier – France- 30 de Junho a 4 de Julho de 2008

4.3 Publicação

Julio C. L. Alves, Ronei J. Poppi, "Simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine using solid-phase molecular fluorescence and Parallel Factor Analysis"

Analytica Chimica Acta, aceito para publicação

5 – Estágios de nível universitário

1) Instituição:	Petróleo Brasileiro S.A. – PETROBRAS – Refinaria de Paulínia
Duração :	02/2006 a 07/2006
Área [.]	Química analítica

Atividades: - atuação no desenvolvimento de projeto para determinação de parâmetros nas correntes que compõem o sistema de misturador em linha para otimização da produção de óleo diesel utilizando espectroscopia FT-NIR e construção de modelos de calibração multivariada;

2) Instituição: Sociedade de abastecimento de água e saneamento S/A - SANASA

Período: 01/2004 a 12/2004

Área: Química analítica

- Atividades: desenvolvimento de métodos analíticos por GC e ICP-OES;
 - acessoria nas adaptações necessárias nos laboratórios para implantação das normas de qualidade ISO 9001;
 - desenvolvimento de pesquisa relativa à otimização do processo de coagulação no tratamento de água;
- 3) Instituição: EMS Indústria Farmacêutica S/C Ltda
- Período: 01/2003 a 12/2003

Área: Química Analítica.

Atividades: - validação de métodos analíticos através de HPLC e espectroscopia no UV-VIS e elaboração de relatórios técnicos.

Resumo

Aplicação de métodos quimiométricos de calibração de segunda ordem e transferência de calibração na determinação simultânea de misturas de fármacos utilizando espectroscopia de fluorescência molecular em fase sólida

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia para determinação simultânea da mistura farmacêutica de ácido acetilsalicílico (AAS), paracetamol e cafeína, através de fluorescência de excitação-emissão em fase sólida. Esta metodologia é aplicável mesmo na presença de interferentes e com sobreposição espectral dos componentes da mistura, sem prejuízo da boa reprodutibilidade e exatidão, obtendo erros menores que 5%. Para tanto utilizou-se os métodos quimiométricos de calibração de segunda ordem PARAFAC e UPLS, além do método de calibração de primeira ordem PLS2. Vantagens observadas em relação aos métodos de referência como o menor custo, a não necessidade de longo preparo da amostra e análise simples e rápida, além de não haver geração de resíduos, tornam esse método bastante atrativo, permitindo a determinação simultânea dos compostos na mistura estudada.

Ainda, a fim de propor uma solução para o problema que foi observado durante o desenvolvimento dos modelos, relativo à mudança da matriz da amostra, utilizou-se transferência de calibração. Nesse estudo, a padronização de espectros através do método da Padronização Direta por Partes (PDS) foi aplicada a modelos UPLS construídos a partir dos espectros de fluorescência de excitação-emissão de amostras de misturas farmacêuticas com excipiente amido/celulose, e amostras utilizando como excipiente a lactose. Excelentes resultados de previsão foram obtidos, com erros relativos abaixo de 5%. Também, comprovou-se que os resultados de previsão obtidos a partir dos dados de transferência de calibração aplicados ao modelo UPLS, não apresentam diferença em relação a previsão de amostras idênticas às usadas no modelo de calibração.

ix

Abstract

Aplication of chemometric methods of second order calibration and transfer of calibration for simultaneous determination of pharmaceutical mixture using solidphase molecular fluorescence.

In this work it was developed a methodology for determination of acetylsalicylic acid (ASA), paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using solidphase molecular fluorescence and second order calibration methods. This methodology is usefull even in the presence of unknown interferences and with spectral overlap of the components in the mixture. Parallel Factor Analysis (PARAFAC) and Unfolded Partial Least Squares (UPLS) were used for second order calibration models development. Errors below to 5% were obtained for all compounds using an external validation set. Advantages not included in the reference methods such as low cost, no need of sample preparation, simple and fast analysis and no generation of waste, make this method very attractive, allowing to the simultaneous determination of compounds with good reproducibility and accuracy.

Also, to propose a solution for the problem observed during the models development, due to change of sample matrix, the transfer of calibration was used. In this study it was used the method of Piecewise Direct Standardization applied to UPLS models constructed from samples of pharmaceutical mixtures of acetilsalicilic acid (ASA), paracetamol and caffeine with starch/cellulose 1:1 as excipient and samples with lactose as excipient, for accomplishment of the calibration transfer procedures. The transfer of calibration through Piecewise Direct Standardization method (PDS) applied to the UPLS calibration models provided excellent prediction results for pharmaceutical mixture in diferent excipient with relative errors less than 5%. From the values of RMSEP obtained for the results of the models of reference and the models of calibration transference, it was evaluated through a F test, that there is no difference, with 99% of significance level, in the results obtained by two models.

Lista de abreviaturas

AAS acetylsalicylic acid (ácido acetilsalicílico) ALS alternating least squares (mínimos quadrados alternados) ANOVA analysis of variance (análise de variância) EEM excitation-emission matrix (matriz de excitação-emissão) HPLC high performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta performance) PARAFAC parallel factor analysis (análise de fatores paralelos) PCA principal component analysis (análise de componentes principais) PDS piecewise direct standardization (padronização direta por partes) PLS partial least squares (mínimos quadrados parciais) RMSEP root mean square error of prediction (raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão) RMSEC root mean square error of calibration (raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração) RMSECV root mean square error of cross validation (raiz guadrada do erro médio quadrático da validação cruzada) RSD relative standard deviation (desvio padrão relativo) SVD singular value decomposition (decomposição em valores singulares) UPLS unfolded partial least squares (mínimos quadrados parciais desdobrados)

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Tabela de análise da variância para o ajuste de um modelo linear	42
Tabela 2 - Comprimentos de onda de intensidade máxima de excitação-emissão	
de fluorescência para os analitos na mistura farmacêutica utilizada.	51
Tabela 3 - Resultados obtidos para o conjunto de validação no modelo PLS-25	55
Tabela 4 - ANOVA para o ajuste do modelo para cada analito	58
Tabela 5 - Resultados obtidos para o conjunto de validação com o	
modelo PARAFAC	30
Tabela 6 - Resultados para as amostras de validação com o modelo UPLS6	32
Tabela 7 - Resultados do teste F na comparação dos modelos	
PARAFAC e UPLS6	33
Tabela 8 - Resultados dos modelos de calibração UPLS aplicados ao	
conjunto de validação 1 (excipiente amido/celulose)	76
Tabela 9 - Resultados dos modelos de calibração UPLS aplicados ao	
conjunto de validação 2 (excipiente lactose)	77
Tabela 10 - Resultados dos modelos de calibração UPLS aplicados ao	
conjunto de validação 2 transformado (excipiente lactose)	78
Tabela 11 - Resultados do teste F na comparação dos resultados	
antes e depois da transferência de calibração	79

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura química do : (a) Ácido acetilsalicílico,	
(b) Paracetamol, (c) Cafeína	_05
Figura 2 - Estados excitados singleto e tripleto: (a) estado fundamental singleto,	
(b) estado excitado singleto, (c) estado excitado tripleto	<u> 10 </u>
Figura 3 - Diagrama parcial de energia de um sistema fotoluminescente	<u>.</u> 11
Figura 4 - Grafico da intensidade de fluorescência em função da concentração	_16
Figura 5 - Representação da obtenção das matrizes de	
excitação-emissão de fluorescência	_17
Figura 6 - Representação da estrutura de dados tridimensional formada pela	
união das matrizes de excitação-emissão de várias amostras.	_18
Figura 7 - Representação gráfica da somatória dos produtos dos vetores	
escores e pesos.	_23
Figura 8 - Representação de uma Componente Principal (CP) no caso	
de duas variáveis: (A) os pesos são os ângulos do vetor direção;	
(B) os escores são as projeções das amostras 1-6 na direção da CP	
(os dados estão centrados na média).	_24
Figura 9 - Representação do rearranjo do cubo de dados para a análise por	
UPLS. Um cubo $\underline{X}(I,J,K)$ é colocado na forma de uma matriz $X(I,JK)$	_27
Figura 10 - Representação gráfica do modelo PARAFAC. Decomposição	
de um arranjo de dados tridimensional em F tríades de vetores peso	_29
Figura 11 - Relação entre os espectros em diferentes instrumentos no PDS	_36
Figura 12 - Estrutura da matriz de transformação F do modelo	

	de transferência PDS	37
Figura 13	 Representação dos desvios em relação a reta obtida, 	
	utilizado na ANOVA	40
Figura 14	 Variação na proporção de cada ativo em relação a massa total de 	
	fármacos na mistura em cada ponto da curva de calibração	48
Figura 15	- Efeito da presença unicamente do excipiente amido/celulose 1:1	
	na emissão de fluorescência dos fármacos individualmente:	
	(a) AAS, (b) AAS + excipiente, (c) paracetamol,	
	(d) paracetamol + excipiente, (e) cafeína, (f) cafeína + excipiente	50
Figura 16	 Resultado da análise por DSC das amostras da mistura 	
	farmacêutica submetida e não submetida ao método de preparo.	52
Figura 17	- Espectros de emissão de fluorescência em fase sólida individuais dos	
	fármacos presentes na mistura farmacêutica + excipiente	53
Figura 18	- Espectro de excitação-emissão para a mistura farmacêutica	54
Figura 19	- Pesos de emissão (a) excitação (b) e escores (c) para	
	o modelo PARAFAC utilizando 5 fatores.	57
Figura 20	- Curvas analíticas para (a) AAS, (b) cafeína e (c) paracetamol	59
Figura 21	 Comparação entre os valores previstos para o AAS nos 	
	modelos PARAFAC, UPLS e PLS-2 e respectivos desvios padrão	64
Figura 22	 Comparação entre os valores previstos para o paracetamol nos 	
	modelos PARAFAC, UPLS e PLS-2 e respectivos desvios padrão	64
Figura 23	 Comparação entre os valores previstos para a cafeína nos 	
	modelos PARAFAC, UPLS e PLS-2 e respectivos desvios padrão	65

Figura 24	 Erros relativos obtidos no conjunto de validação para previsão 	
	do AAS utilizando os modelos: (a) PLS-2 (b) PARAFAC e (c) UPLS	.66
Figura 25	 Erros relativos obtidos no conjunto de validação para previsão 	
	do paracetamol utilizando os modelos:	
	(a) PLS-2 (b) PARAFAC e (c) UPLS	.66
Figura 26	 Erros relativos obtidos no conjunto de validação para previsão 	
	da cafeína utilizando os modelos:	
	(a) PLS-2 (b) PARAFAC e (c) UPLS	<u>.</u> 66
Figura 27	- Efeito da utilização de diferentes excipientes na intensidade	
	de fluorescência dos fármacos na mistura farmacêutica em	
	estudo: (a) excipiente amido/celulose 1:1 (b) excipiente lactose;	
	e (c) espectro transformado	72
Figura 28	- PCA para as 25 amostras com excipiente amido/celulose 1:1	
	destacando as amostras 3, 10, 13, 19 e 23 utilizadas na transferência	<u>74</u>
Figura 29	 Resultados dos modelos de calibração UPLS para o AAS 	
	e respectivos desvios padrão	.80
Figura 30	- Resultados dos modelos de calibração UPLS para o paracetamol	
	e respectivos desvios padrão	.80
Figura 31	- Resultados dos modelos de calibração UPLS para a cafeína	
	e respectivos desvios padrão	.81
Figura 32	- Erros relativos para o conjunto de validação 2 (antes da	
	transferência) para: (a) AAS, (c) paracetamol, (e) cafeína.	
	Erros relativos para o conjunto de validação 2 transformado	
	(após transferência) para (b) AAS, (d) paracetamol e (f) cafeína.	82

Sumário

1 – Introdução	01
1.1 – Introdução geral	03
1.2 – Ácido acetilsalicílico, paracetamol e cafeína	04
1.3 – Métodos analíticos para determinação de AAS, paracetamol e cafeína	06

2- Fundamentos da espectroscopia de fluorescência molecular	07
2.1 – Introdução à fluorescência molecular	09
2.2 – Fatores que afetam a fluorescência	12
2.3 – Efeito da concentração na intensidade da fluorescência	14
2.4 – Matrizes de excitação-emissão de fluorescência (EEM)	17

3 – Métodos quimiométricos	19
3.1 – Introdução	_21
3.2 – Análise de Componentes Principais (PCA)	_22
3.3 – Mínimos Quadrados Parciais (PLS)	_25
3.4 – Mínimos Quadrados Parciais Desdobrados (UPLS)	27
3.5 – Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC)	_28
3.6 – Transferência de calibração	.32
3.6.1 – Padronização Direta por Partes (PDS)	34
3.7 – Parâmetros de qualidade dos modelos	_37
3.7.1 – Raiz quadrada do erro médio quadrático	_37

3.7.2 - Comparação de conjuntos de c	lados – Teste F39
3.7.3 – Análise de variância (ANOVA)	40

4 – Aplicação 1: Determinação simultânea de AAS, paracetamol e cafeína através	s de
fluorescência molecular em fase sólida e utilização de métodos quimiométricos	de
calibração de segunda ordem	43
4.1 – Introdução	45
4.2 – Parte Experimental	_46
4.2.1 – Materiais e condições analíticas	.46
4.2.2 – Procedimento experimental	_47
4.3 – Resultados e discussão	48
4.3.1 – Espectros dos compostos estudados	52
4.3.2 – Construção do modelo com PLS-2	.54
4.3.3 – Construção do modelo com PARAFAC	.56
4.3.4 – Construção do modelo com UPLS	<u>61</u>
4.3.5 – Comparação dos resultados dos modelos PARAFAC e UPLS	.62
4.4 – Conclusão	67

5 – Aplicação 2: Determinação simultânea de AAS, paracetamol e cafeína em diferentes matrizes em fase sólida utilizando espectroscopia de fluorescência molecular, UPLS e Transferência de calibração ______69
5.1 – Introdução ______71
5.2 – Parte experimental _____73
5.2.1 – Materiais e condições analíticas _____73

5.2.2 – Procedimento experimental	73
5.3 – Resultados e discussão	75
5.3.1 – Comparação dos resultados antes e depois da transferência	
de calibração	79
5.4 – Conclusão	83
6 – Conclusão geral	85
7 – Referências	89

1 - Introdução

1.1 – Introdução geral

Na indústria, é essencial para a garantia da qualidade do produto, um rigoroso controle efetuado antes, durante e após a produção, desde a chegada da matériaprima até a liberação do produto final. O constante aperfeiçoamento das técnicas de processo e controle, com intuito de melhorar a qualidade e reduzir os custos de produção e a geração de resíduos é uma prática indispensável na indústria farmacêutica em face de um mercado cada vez mais exigente e competitivo.

Assim, há grande interesse das indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e que envolvam uma mínima ou nenhuma manipulação da amostra e se possível sem geração de resíduos (como solventes orgânicos).

O setor produtivo em todo o mundo está voltado para tais exigências do mercado, em que a competitividade demanda reduzir custos com a eliminação de desperdícios e desenvolvimento de tecnologias limpas.

Nesse trabalho, propõe-se a utilização da espectroscopia de fluorescência molecular em fase sólida, que dispensa uma longa etapa de preparação de amostras e sem geração de resíduos, em combinação com a utilização de métodos quimiométricos de ordem superior, para determinação simultânea dos componentes da mistura de ácido acetilsalicílico (AAS), paracetamol e cafeína em uma formulação farmacêutica com excipientes.

A primeira parte do trabalho, consiste na construção de modelos de calibração utilizando os métodos: Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares* – PLS),

Análise de Fatores Paralelos (*Parallel Factor Analysis* – PARAFAC)¹ e Mínimos Quadrados Parciais Desdobrados (*Unfolded Partial Least Squares* – UPLS) e posterior comparação dos mesmos na determinação dos três fármacos citados.

Na segunda parte do trabalho, realizou-se uma transferência de calibração, através do método da Padronização Direta por Partes (*Piecewise Direct Standardization* - PDS)², de modo que seja possível quantificar os analitos em formulações cujo excipiente seja diferente do inicialmente utilizado na calibração, uma vez que esse fator causa variação do sinal analítico.

1.2 - Ácido acetilsalicílico, paracetamol e cafeína

O ácido acetilsalicílico - AAS - (ácido 2-acetoxi-benzóico) é o mais comum entre os analgésicos. Ele começou a ser sintetizado em 1853³ e passou a ter larga aceitação na prática médica no século 20, tornando-se o fármaco mais utilizado no tratamento de doenças e no alívio da dor. O ácido acetilsalicílico é facilmente preparado a partir da reação de anidrido acético com o ácido salicílico e é mais conhecido pelo nome comercial aspirina. Ele tem ação analgésica (para aliviar a dor), antipirética (para reduzir a febre) e como agente anti-inflamatório⁴. Tem ação efetiva no tratamento de artrite reumatóide e na prevenção de ataques cardíacos, além de ter também demonstrado potencial na diminuição do risco de ocorrência de certos tipos de câncer. É assim um dos medicamentos mais comuns, de baixo custo e facilmente disponível⁵.

Com ação terapêutica semelhante a do AAS, o paracetamol (acetaminofen; Nacetil-4-aminofenol) é também bastante usado como alternativa ao AAS ou em combinação com o mesmo. O acetominofen é o membro menos tóxico de uma classe de medicamentos analgésicos e antipiréticos (mas não anti-inflamatório) conhecidos como p-aminofenóis⁵⁻⁷.

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é provavelmente o alcalóide mais largamente utilizado. Trata-se de uma substância de caráter básico derivada de plantas e está presente naturalmente no café, guaraná, erva-mate, entre outras. No ser humano ela pode produzir um estado de excitação psíquica que afasta o sono e a sensação de fadiga. É empregada para combater a sonolência e a depressão provocada pelos analgésicos⁸ e também potencializar o efeito de fármacos semelhantes ao AAS⁹. A quantidade de cafeína presente em uma xícara de café é geralmente de 100 a 150 mg. Excessiva ingestão de cafeína pode causar efeitos indesejáveis como tremor, taquicardia e problemas gastro-intestinais^{5, 10-11}.



A Figura 1 apresenta as estruturas das três espécies.



1.3 – Métodos analíticos para determinação de AAS, paracetamol e cafeína

Os procedimentos comuns para determinação desses fármacos em sua maioria envolvem elevado consumo de reagentes e longo tempo de análise além de uma trabalhosa preparação da amostra⁶.

Técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)¹²⁻¹⁶, espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)¹⁷⁻¹⁹, espectroscopia Raman²⁰, técnicas eletroquímicas²¹⁻²² e espectroscopia de absorção no UV-VIS²³⁻²⁷ têm sido utilizadas para determinação do AAS, paracetamol e cafeína em solução e no estado sólido, na forma individual e em mistura.

Para a maioria dos procedimentos existentes é requerido um elevado consumo de reagentes e longo tempo de preparação das amostras, porém, tanto em indústrias químicas como farmacêuticas, um grande número de amostras devem ser analisadas em curto espaço de tempo, assim, métodos simples e rápidos são necessários. Procedimentos analíticos que não requerem o uso de substâncias químicas e/ou etapas de pré-tratamento, como as espectroscopias NIR e Raman são boas alternativas aos métodos convencionais.

A técnica de espectroscopia de fluorescência molecular na região do UV-VIS também permite a determinação desses compostos em fase sólida²⁸⁻³¹, porém, análises de misturas somente tornaram-se possíveis com o advento de métodos quimiométricos, que possibilitaram a análise de misturas complexas, com sobreposição dos espectros e mesmo na presença de interferentes.

2 - Fundamentos da espectroscopia de fluorescência molecular

2.1 – Introdução à fluorescência molecular

A luminescência molecular é a emissão de radiação eletromagnética (na região do UV-VIS) proveniente de moléculas que foram excitadas, retornando ao seu estado fundamental. Esse fenômeno é denominado de fotoluminescência, guando a absorção de fótons de luz é o responsável pela excitação da molécula pela elevação de elétrons de valência de um orbital menos energético para um orbital de maior energia. A luminescência molecular é formalmente dividida em fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado envolvido no processo. Se o estado excitado envolvido é singleto, onde o spin do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original, tem-se a fluorescência. Por outro lado, na fosforescência, a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida (estado excitado tripleto), conforme ilustra a Figura 2. Em consegüência da retenção da orientação original, o retorno de uma população que se encontra no estado excitado singleto para o estado fundamental (que tem caráter singleto), é permitido e ocorre muito rapidamente. Assim, a fluorescência é intrinsecamente um fenômeno luminescente mais comum que a fosforescência, competindo eficientemente com processos de desativação não-radiativos do estado excitado. Como consegüência direta disso, é possível observar facilmente fluorescência na temperatura ambiente e diretamente em solução, o que torna o procedimento experimental fluorimétrico mais simples.



Capítulo 2

Figura 2 – Estados excitados singleto e tripleto: (a) estado fundamental singleto, (b) estado excitado singleto, (c) estado excitado tripleto

O princípio da fluorescência é a base da fluorimetria, que engloba o conjunto de técnicas analíticas baseadas na detecção dos fótons emitidos por moléculas excitadas de caráter singleto quando estas retornam para o estado fundamental, como ilustrado na Figura 3.

No processo de desativação do estado excitado uma molécula pode voltar ao seu estado fundamental por uma combinação de várias etapas mecanísticas. Duas destas etapas, fluorescência e fosforescência, envolvem a emissão de um fóton de radiação. As outras etapas de desativação: relaxação vibracional, conversão interna, conversão externa e cruzamento intersistemas, são processos não-radiativos. A trajetória favorecida para o estado fundamental é aquela que minimiza o tempo de vida do estado excitado. Assim, se a desativação por fluorescência é rápida em relação aos processos sem radiação, tal emissão é observada³².

A relaxação vibracional ocorre devido às colisões entre moléculas excitadas e o solvente, sendo um processo de desativação bastante eficiente pois o tempo de vida médio de uma molécula excitada vibracionalmente é de 10⁻¹²s. Uma conseqüência da eficiência da relaxação vibracional é o fato de a banda de

fluorescência para uma dada transição eletrônica estar deslocada para comprimentos de onda maiores em relação à banda de absorção (deslocamento Stokes)³².



Figura 3 – Diagrama parcial de energia de um sistema fotoluminescente

A conversão interna é particularmente eficiente quando dois níveis eletrônicos de energia estão próximos o suficiente para que haja uma superposição de níveis de energia vibracionais. A conversão interna pode resultar no fenômeno da prédissociação, em que a molécula vai de um nível eletrônico superior para um nível vibracional superior de um estado eletrônico mais baixo, no qual a energia vibracional é grande o suficiente para causar ruptura de uma ligação. A prédissociação deve ser diferenciada da dissociação, na qual a energia absorvida excita um cromóforo diretamente a um nível vibracional alto o suficiente para causar uma ruptura da ligação cromofórica; a conversão interna não está envolvida.

Pode também ocorrer uma conversão externa, em que a desativação de um estado eletrônico excitado envolve interação e transferência de energia entre a molécula excitada e o solvente ou outros solutos.

No cruzamento intersistemas ocorre alteração do spin do elétron do estado excitado, alterando a multiplicidade (singlete para triplete). Esse processo ocorre com maior freqüência quando há sobreposição de níveis vibracionais e em moléculas com átomos pesados, como iodo e bromo³².

2.2 - Fatores que afetam a fluorescência

Para que ocorra a fluorescência, uma molécula precisa ter estrutura apropriada e estar em um meio que favoreça a desativação radiativa de S₁ para S₀, sendo esses dois fatores críticos na magnitude do rendimento quântico fluorescente de uma substância.

O rendimento quântico (Φ) fluorescente de uma substância é a razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência e o número de fótons absorvidos ou o numero de moléculas que luminescem pelo numero de moléculas que são excitadas.

De acordo com a equação 1, o valor de Φ depende das constantes de velocidade relativa dos processos pelos quais o estado excitado singleto de menor energia é desativado, onde k_f é a da fluorescência, k_i do cruzamento intersistemas, k_{ce} da conversão externa, k_{ci} da conversão interna, k_{pd} da pré-dissociação e k_d da

dissociação. Estas duas ultimas constantes são dependentes principalmente da estrutura química, enquanto que as restantes são influenciadas pelo ambiente.

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{ce} + k_{ci} + k_{pd} + k_d}$$
(1)

Embora seja difícil prever teoricamente se uma molécula exibirá luminescência sem o prévio conhecimento da diferença de energia relativa entre o estado excitado singleto e o fundamental, de um modo geral podemos observar alguns requisitos: moléculas relativamente rígidas e ricas em elétrons π (como no caso das moléculas aromáticas), contendo ou não heteroátomos em sua cadeia principal, são potencialmente fluorescentes. Estruturas moleculares rígidas (com restrições de liberdade vibracional) têm o processo de desativação não-radiativo por conversão interna significantemente minimizado com conseqüente aumento da eficiência quântica. Já uma estrutura molecular planar favorece a fluorescência, pois aumenta a interação e conjugação entre o sistema de elétrons π . A fluorescência advém de transições entre orbitais $\pi - \pi *$ e em menor escala entre orbitais $n - \pi *$.

A fluorescência mais intensa e mais útil é encontrada em compostos contendo grupos funcionais aromáticos com níveis de transição $\pi - \pi^*$ de baixa energia. Compostos contendo estruturas alifáticas, alicíclicas carbonílicas ou estruturas de ligações duplas altamente conjugadas também podem apresentar fluorescência, mas em menor número se comparado ao dos sistemas aromáticos. A maioria dos hidrocarbonetos aromáticos não-substituídos fluoresce em solução e a eficiência

quântica aumenta com o número de anéis e seu grau de condensação. A condensação de anéis benzênicos a núcleos heterocíclicos resulta em um aumento da absortividade molar do pico de absorção e o tempo de vida de um estado excitado é menor em tais estruturas.

A presença de grupos substituintes na molécula também é fator importante, pois afeta a intensidade e o tipo de luminescência, sendo que a presença de grupos hidroxi (OH⁻), metoxi (OR), amino (NR₂), e cianeto (CN⁻) têm tendência em amplificar a fluorescência. Por outro lado, grupos carbonílicos (C=O), carboxílicos (COOH) e halogênios (X) favorecem o cruzamento intersistemas, trocando a multiplicidade da população excitada e por conseqüência diminuindo a fluorescência.

Outros fatores também são essenciais, tais como: a temperatura, pH, solvente e a presença de outras espécies que podem ter um profundo efeito nas características luminescentes de uma substância, afetando não somente a velocidades dos processos luminescentes e dos processos não-radiativos, mas também a natureza e a energia relativa do estado excitado de menor energia³².

2.3 – Efeito da concentração na intensidade da fluorescência

A potência de emissão de fluorescência F é proporcional a potência radiante do feixe de excitação que é absorvido pelo sistema, isto é,

$$F = K'(P_0 - P)$$
⁽²⁾

onde, P₀ é a potencia do feixe que incide na solução e P é a potencia após atravessar uma distância "b" do meio. A constante K' depende da eficiência quântica do processo de fluorescência. Para relacionarmos F com a concentração da espécie fluorescente c, escrevemos a lei de Beer na forma:

$$P/P_0 = 10^{-\varepsilon bc}$$
(3)

onde ε é a absortividade molar das moléculas fluorescentes e ε bc é a absorbância (A). Substituindo (3) em (2) obtemos:

$$F = K'P_0(1-10^{-\varepsilon bc})$$
(4)

realizando a expansão de MacLaurin e truncando os termos de ordem dois e superior:

$$F = K'P_0[2,303\varepsilon bc - (2,303\varepsilon bc)^2 / 2! + (2,303\varepsilon bc)^3 / 3! \dots]$$
(5)

$$F = 2,3 \text{ K'} \text{sbc } P_0 \tag{6}$$

Como temos as constantes: 2,3, K', ε , b e P₀, então:

$$F = K c$$
(7)

Assim, um gráfico da potência de fluorescência de uma solução em função da concentração da espécie emissora deve ser linear para concentrações baixas.

Quando "c" torna-se grande, os termos de ordem maior na equação 5 tornam-se importantes e a linearidade é perdida.

Dois outros fatores, também responsáveis por desvios negativos da linearidade em concentrações altas, são a auto-supressão e a auto-absorção. A primeira é resultado da colisão entre moléculas excitadas. Isso promove uma transferência de energia não radiativa, talvez de modo semelhante à conversão externa. Espera-se que a auto-supressão aumente com a concentração pela maior probabilidade da ocorrência de colisões.

A auto-absorção ocorre quando o comprimento de onda de emissão se superpõe a um pico de absorção; a fluorescência diminui à medida que a emissão atravessa a solução e é reabsorvida por outras moléculas fluorescentes³².

Os efeitos desses fenômenos são tais que um gráfico de fluorescência em função da concentração pode exibir um máximo, como ilustra a Figura 4.



Figura 4 – Gráfico da intensidade de fluorescência em função da concentração

2.4 – Matrizes de excitação-emissão de fluorescência (EEM)

Dados multi-modo como as matrizes formadas por espectros de excitaçãoemissão (*Excitation-Emission Matrix* – EEM), podem ser obtidas a partir de espectros de excitação e de espectros de emissão de uma amostra. Os espectros de excitação são produzidos pela medida da intensidade de luminescência mantendo constante o comprimento de onda de emissão e varrendo o de excitação. Espectros de emissão são obtidos de forma contrária, mas através do mesmo princípio, mantendo a excitação constante e varrendo o modo de emissão.

Assim, matrizes de excitação-emissão são geradas por duas dimensões independentes de comprimentos de onda, em que uma destas dimensões caracteriza-se pelos perfis de excitação e outra, possui informação referente ao espectro de emissão, como ilustra a Figura 5.



Figura 5 – Representação da obtenção das matrizes de excitação-emissão de fluorescência

A junção destes espectros para várias amostras gera uma superfície tridimensional de fluorescência total, com todas as bandas de excitação e emissão dos fluoróforos presentes, como mostrado na Figura 6.





Para amostras onde existe mais de um fluoróforo presente (na matriz da amostra ou em diferentes analitos), a dificuldade de interpretação direta desta superfície é maior, pois podem ocorrer grandes superposições espectrais.

Com os dados multi-modo, baseada em sinais de emissão e excitação para diferentes amostras, pode-se utilizar modelos de calibração de segunda ordem¹, onde a maior quantidade de informação proporciona a obtenção de algumas vantagens em relação aos métodos de primeira ordem, como discutido no capítulo 3.

3 - Métodos quimiométricos

3.1 – Introdução

A Calibração Multivariada é um meio para construir modelos de previsão em que se considera a correlação entre muitas variáveis analisadas simultaneamente, permitindo a extração de uma grande quantidade de informação, que podem fornecer melhores resultados em relação a utilização de uma única variável x quando esta não proporciona seletividade suficiente para uma boa previsão do parâmetro de interesse y. Assim, em vez de utilizar dados e modelos de calibração de ordem zero³³⁻³⁴, a utilização de dados de primeira ordem, obtidos com técnicas analíticas que podem fornecer um vetor de dados para cada amostra, permite contornar esses problemas.

Técnicas analíticas que podem fornecer uma matriz de dados para cada amostra, fornecem dados de segunda ordem ou dados multi-modo, como os obtidos por espectrofluorimetria de excitação-emissão. Realizando a medida de várias amostras tem-se um arranjo de dados multidimensional.

Métodos de calibração de segunda ordem, como a Análise de Fatores Paralelos (*Parallel Factor Analysis* - PARAFAC)³⁵ e o Quadrados Mínimos Parciais Desdobrados (*Unfolded Partial Least Squares* - UPLS)³⁶, podem ser aplicados a esse tipo de dados fornecendo uma série de vantagens em relação a métodos de ordem zero ou de primeira ordem. Entre elas pode-se citar: a necessidade de um conjunto de amostras de calibração muito menor em relação ao necessário para construção de modelos de primeira ordem; a possibilidade de obtenção dos espectros puros de cada componente do sistema, aplicando um número mínimo de

restrições ao modelo (no caso do PARAFAC); e a possibilidade de realizar previsões na presença de interferentes desconhecidos, que não estejam presentes no conjunto de calibração (vantagem de segunda ordem)^{1,37-39}.

A seguir será feita uma descrição introdutória dos métodos quimiométricos utilizados nesse trabalho, iniciando pela Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis* - PCA), base para o desenvolvimento de modelos de regressão multivariado como o PLS. Após isso, serão apresentados os métodos para calibração de segunda ordem e finalmente os métodos para transferência de calibração.

3.2 - Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais tem por finalidade básica a redução de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais. A PCA decompõe uma matriz de dados X (onde as *m* linhas são as amostras e as *n* colunas, as variáveis) de posto (*rank*) *h*, em uma soma de h matrizes de posto igual a 1, como na equação 8:

$$X = M_1 + M_2 + M_3 + \dots + M_h$$
(8)

onde o posto expressa o número de vetores linearmente independentes de uma matriz. Essas novas matrizes de posto um, são produtos de vetores chamados escores, **t**_h, e pesos, **p**_h. Estes escores e pesos podem ser calculados por um ajuste

de mínimos quadrados. A operação é equivalente ao cálculo de autovetores e autovalores de uma matriz pela Decomposição em Valores Singulares (*Singular Value Decomposition* - SVD)⁴⁰. A equação pode ser representada na forma vetorial,

$$X = t_1 p'_1 + t_2 p'_2 + \dots + t_h p'_h$$
(9)

na forma matricial,

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^{\prime} \tag{10}$$

ou graficamente, como na Figura 7.



Figura 7. Representação gráfica da somatória dos produtos dos vetores escores e pesos.

Para exemplificar $\mathbf{t}_h \in \mathbf{p'}_h$, a Figura 8 ilustra no plano bidimensional duas variáveis x₁ e x₂. A Figura 8A mostra uma componente principal (CP), a reta que aponta na direção de maior variabilidade das amostras da Figura 8B. Os escores \mathbf{t}_h são as projeções das amostras na direção da CP (Fig. 8B) e os pesos $\mathbf{p'}_h$ são os cossenos dos ângulos formados entre a CP e cada variável (Fig. 8A).



Figura 8. Representação de uma Componente Principal (CP) no caso de duas variáveis: (A) os pesos são os cossenos dos ângulos do vetor direção; (B) os escores são as projeções das amostras na direção da CP (os dados estão centrados na média).

As novas variáveis, as componentes principais (CP), são ortogonais entre si e, portanto, não correlacionadas. Normalmente, as primeiras CP explicam a maior parte da variância total contida nos dados e podem ser usadas para representá-los. A Análise de Fatores é adotada em boa parte da literatura como sinônimo de PCA. Porém alguns autores definem esses termos como métodos diferentes, com base no modo como os fatores (ou CP's) são definidos. Na PCA os fatores devem explicar o máximo da variância contida em todas as variáveis observadas, enquanto que na Análise de Fatores, eles devem explicar o máximo da intercorrelação entre as variáveis. Neste trabalho, de acordo com a maioria da literatura, ambos os termos, fatores e CP, serão tratados como equivalentes⁴¹⁻⁴⁵.
3.3 – Mínimos quadrados parciais (PLS)

A Calibração Multivariada tem como princípio básico a utilização simultânea de muitas variáveis x1,x2,...xn (como valores de intensidade de fluorescência a vários comprimentos de onda), para quantificar alguma outra variável de interesse *y* (como concentração). O Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares* - PLS), é o método mais usado em calibração multivariada e utiliza a informação de *y* no cálculo das chamadas variáveis latentes (equivalentes às CPs). As matrizes **X** (relacionada aos espectros) e **Y** (relacionada às concentrações) são decompostas simultaneamente em uma soma de "i" componentes principais, como nas equações a seguir:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^{\mathrm{T}} + \mathbf{E} = \sum_{i=1}^{L} \mathbf{t}_{i}\mathbf{p}_{i}^{\mathrm{T}} + \mathbf{E}$$
(11)

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U}\mathbf{Q}^{\mathsf{T}} + \mathbf{F} = \sum_{i=1}^{L} \mathbf{u}_{i}\mathbf{q}_{i}^{\mathsf{T}} + \mathbf{F}$$
(12)

onde, as matrizes **E** e **F** contém a informação de **X** e **Y**, respectivamente, que não é explicada pelo modelo; **T** e **U** são as matrizes de escores; **P** e **Q** as matrizes de pesos e L é o número de componentes principais utilizadas pelo modelo.

A correlação entre os dois blocos **X** e **Y** é simplesmente uma relação linear obtida pelo coeficiente de regressão linear (**b**), tal como descrito abaixo:

(13)

 $\mathbf{u}_{i} = \mathbf{b}_{i} \mathbf{t}_{i}$

para "L" variáveis latentes, sendo que os valores de **b**_i são agrupados na matriz diagonal **B**, que contém os coeficientes de regressão entre a matriz de escores **T** e **U**. A melhor relação linear possível entre os escores desses dois blocos é obtida através de pequenas rotações das variáveis latentes dos blocos de **X** e **Y**. A matriz **Y** pode ser calculada de **u**_i,

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T} \mathbf{B} \mathbf{Q}^{\mathsf{T}} + \mathbf{F}$$
(14)

e a concentração de novas amostras prevista a partir dos novos escores, **T***, substituídos na equação acima

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T}^* \mathbf{B} \mathbf{Q}^\mathsf{T}$$
(15)

Nesse processo é necessário identificar o melhor número de variáveis latentes, o que normalmente é feito por um procedimento chamado validação cruzada ("cross validation"), no qual o erro mínimo de previsão é determinado⁴⁵⁻⁴⁹. Existe ainda a diferenciação entre PLS1, em que a regressão é feita para uma variável dependente de cada vez (a matriz **Y** é um vetor coluna), e PLS-2, onde o modelo é desenvolvido para todas as variáveis dependentes simultaneamente.

3.4 – Mínimos quadrados parciais desdobrados (UPLS)

A primeira tentativa de extensão do PLS para utilização com dados de segunda ordem foi proposta por Wold et al³⁶, onde as matrizes de dados eram vetorizadas, como ilustrado na Figura 9, e o modelo PLS de primeira ordem era aplicado.

O Mínimos Quadrados Parcias Desdobrados (*Unfolded Partial Least Squares* – UPLS) consiste do mesmo modelo PLS aplicado à dados de segunda ordem, quando as I_c matrizes de calibração são vetorizados dando origem a uma matriz **X** de dimensão (I,JK), como ilustrado na Figura 9 e as concentrações de referência são dispostas em um vetor **Y**. Em seguida, **X** e **Y** são decompostas por análise em componentes principais, da mesma maneira que as mostradas nas equações 11 e 12^{50-55} .



Figura 9 - Representação do rearranjo do cubo de dados para a análise por UPLS. Um cubo $\underline{X}(I,J,K)$ é colocado na forma de uma matriz $\underline{X}(I,JK)$.

Uma vez construído o modelo, a estimativa do valor da propriedade de interesse em uma amostra desconhecida "i" é obtida pela multiplicação do vetor resultante do desdobramento da matriz de dados instrumentais para essa amostra (\mathbf{x}_{un}) por um vetor de coeficientes de regressão (\mathbf{b}_{uPLS}):

$$y_{un} = \mathbf{u}_{un}\mathbf{q}^{\mathsf{T}} = \mathbf{x}_{un}\mathbf{b}_{upls} = \mathbf{x}_{un}\mathbf{W}(\mathbf{P}^{\mathsf{T}}\mathbf{W})^{-1}\mathbf{q}^{\mathsf{T}}$$
(16)

onde, W é uma segunda matriz de pesos obtida durante o algoritmo PLS.

3.5 – Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC)

A análise de fatores paralelos (Parallel Factor Analysis – PARAFAC), é um método para decomposição de dados de ordem superior, cuja base estrutural, para dados trilineares, é dada pelas matrizes de pesos **A**, **B** e **C**, que contêm os elementos a_{if}, b_{jf} e c_{kf}, respectivamente, relativos às três dimensões dos dados³⁵. O modelo trilinear é ajustado para minimizar a soma dos quadrados dos resíduos e_{ijk}, de acordo com a Equação 17.

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^{F} a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk}$$
(17)

onde $x_{i,j,k}$ é um elemento do cubo de dados, a, b e c são os elementos das matrizes e F é o número de fatores. A Figura 10 mostra a representação gráfica da equação 17,

indicando a decomposição de um arranjo tridimensional de dados em F tríades de vetores pesos. Cada tríade equivale a um fator do modelo PARAFAC.



Figura 10 – 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

$$\underline{X} = A(C | \otimes | B)' + \underline{E}$$
(18)

onde as matrizes A, B e C tem dimensões I x F, J x F e K x F, respectivamente, e o símbolo "⊗"representa o produto de KhatriRao.

Para dados de fluorescência, na equação 17, temos: 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.

Para a aplicação do modelo PARAFAC, os seguintes aspectos devem ser levados em conta:

(1) a concordância da estrutura dos dados e a assumida pelo modelo;

 (2) o método de inicialização do algoritmo, as restrições impostas ao modelo e o critério de convergência;

(3) o número de componentes ou fatores;

 (4) identificação dos perfis fornecidos pelo modelo em cada fator com a espécie de interesse e interferentes presentes; e

(5) construção de um modelo de regressão que permita estimar a concentração da espécie de interesse.

A estrutura requerida pelo modelo PARAFAC exige que não haja desvio da trilinearidade dos dados. Considerando que o perfil relacionado a concentração de um componente F seja **a**, é necessário que cada fator apresente um único perfil **b** e **c**.

O PARAFAC utiliza o algoritmo de quadrados mínimos alternantes (*alternating least squares* - ALS) na decomposição dos dados. Para isso ele necessita de uma estimativa inicial dos perfis das dimensões das variáveis **B** e **C** para sua inicialização, que podem ser obtidos pelo método da Decomposição em Valores Singulares (SVD). Uma vez obtida a estimativa inicial de **B** e **C**, uma estimativa de **A** pode ser obtida por quadrados mínimos.

Nas análises por espectroscopia deve-se utilizar como restrição a nãonegatividade, pois absorções negativas não têm sentido físico.

A escolha do número de fatores pode em alguns casos ser feita com base no conhecimento prévio do número de espécies responsáveis pelo sinal instrumental medido, pela quantidade de variância explicada pelo modelo e pelo ajuste da curva de calibração entre os pesos e as concentrações conhecidas. Pode-se também utilizar o parâmetro denominado consistência do núcleo (*core consistency*) e ainda o método *split half*, que têm demonstrado ser eficientes.

Dessa forma, uma vez obtidos os perfis de excitação e de emissão (**B** e **C**), a identificação do componente que corresponde à espécie de interesse é feita pela comparação entre os perfis obtidos e espectros conhecidos ou esperados. Caso essa identificação possa ser feita enquanto se procura o número ideal de fatores, a qualidade do ajuste da reta entre os pesos da coluna de **A** correspondente à espécie de interesse e as concentrações de referência para uma série de amostras de concentração conhecida pode ser utilizada como critério de escolha do número de fatores, uma vez que se espera que o número ideal de fatores forneça valores de **A** que se relacionem melhor com a concentração da espécie de interesse

Para análise de uma amostra de composição desconhecida, o cubo de dados é formado por I_c amostras de concentração conhecida da espécie de interesse (amostras de calibração) e uma ou mais amostras de composição desconhecida, que pode conter interferentes presentes ou não nas amostras de calibração, constituindo assim a vantagem de segunda ordem.

Pode-se assim, utilizar o PARAFAC para construção de modelos de calibração. As amostras de concentrações conhecidas e desconhecidas são decompostas simultaneamente. Os pesos obtidos para cada componente de

interesse na amostra desconhecida são relacionados com as concentrações conhecidas do conjunto de calibração através de uma regressão linear.

3.6 – Transferência de calibração

Na construção de modelos de calibração multivariada utilizando espectroscopia de fluorescência de excitação-emissão é necessário utilizar um grupo de amostras de calibração razoavelmente grande, principalmente no caso de amostras em fase sólida, onde é aconselhável que o número de réplicas para um mesmo padrão seja no mínimo três. Porém esses modelos podem fornecer resultados insatisfatórios quando se necessita fazer novas medidas de previsão para amostras em condições diferentes das usadas na construção do modelo.

As duas principais fontes de variação são: (a) quando o modelo de calibração é desenvolvido utilizando um equipamento e a previsão de uma nova amostra é feita em outro equipamento ou, (b) a fonte de variação vem de diferenças físicas entre amostras de calibração e previsão, tais como mudança na matriz da amostra, tamanho de partícula, variações de temperatura, etc.

Existem alguns meios de tornar a primeira calibração útil para a previsão de amostras em outras condições de equipamento ou propriedades físicas, de modo a não desenvolver todo um novo procedimento de calibração.

Um desses meios é a padronização de espectros⁶¹⁻⁶⁵. Nesse método o espectro é obtido em determinada situação e reconstruído como se houvesse sido obtido na mesma situação a qual foram obtidos os espectros na etapa de calibração.

Esse procedimento envolve três passos principais:

- (a) estimativa da diferença entre os espectros obtidos para o instrumento ou situação mestre em relação aos espectros medidos no instrumento ou situação escrava. Para tanto, são medidas amostras nas duas situações.
- (b) cálculo dos parâmetros de padronização capazes de estimar as diferenças.
- (c) validação dos parâmetros de padronização.

Na transferência de calibração, um modelo matemático é desenvolvido para transformar um espectro **X**' de uma amostra medida em dada condição (escravo), para aquela que seria obtida (**X**) na condição de referência (mestre):

$$\mathbf{X} = \mathbf{g} \, (\mathbf{X}') \tag{19}$$

Para isso, utilizam-se amostras de transferência que devem ser padrões das espécies a se determinar, proporcionando boa representatividade, de modo a reproduzir com fidelidade as condições da amostra de calibração.

Existem três critérios para escolha de amostras para transferência de calibração:

 (a) seleção de um grupo de amostras que foram utilizadas para calibração na situação mestre utilizando-as para obter a propriedade de interesse na fase

de previsão da situação escravo. A principal vantagem desse método é que as amostras de calibração e transferência são as mesmas. A representatividade da transferência está na escolha apropriada das amostras.

- (b) seleção de um grupo de amostras entre as novas amostras medidas na fase de previsão (escravo) e, então, tomar novas medidas nas condições da situação mestre. A principal vantagem desse método é permitir a escolha de amostras de transferência com boa representatividade, sempre quando os padrões de calibração não são armazenados por causa de sua instabilidade física ou química.
- (c) Seleção de amostras independentes em relação a ambas as condições, servindo para estimar as diferenças entre as duas respostas instrumentais. A principal vantagem desse procedimento é que as amostras mais estáveis, podem ser usadas para a transferência.

3.6.1 - Padronização Direta por Partes (PDS)

Wang e colaboradores² desenvolveram um método denominado Padronização Direta por Partes (*Piecewise Direct Standardization* – PDS), que possibilita, através de calibração multivariada, a transformação de um conjunto de dados obtidos a partir de um instrumento escravo (X_E) de maneira que reproduza um conjunto de dados do instrumento mestre (X_M)⁶⁶. Para tanto é utilizada uma matriz de transformação **F**, que descreve a relação existente entre essas duas situações:

$$X_{\rm M} = X_{\rm E} \,\mathbf{F} + \mathbf{E} \tag{20}$$

onde E é o resíduo não modelado da equação.

Para estimar a matriz **F**, são necessárias amostras padrões medidas nos dois equipamentos ou em condições diversas que influenciam na diferença de sinal em um mesmo equipamento ($X_{EP} \in X_{MP}$), sendo válida a seguinte relação:

$$\mathbf{F} = \mathbf{X}^{+}_{\mathbf{EP}} \mathbf{X}_{\mathbf{MP}}$$
(21)

onde X^+_{EP} é a matriz pseudoinversa de X_{EP} a matriz dos espectros medidos no instrumento escravo, e X_{MP} a matriz dos espectros obtidos no instrumento mestre. A matriz **F** é obtida por modelagem com PLS.

Utilizando a matriz **F**, um novo espectro obtido no instrumento escravo (X_E) pode ser transformado em uma nova matriz (X_T) .

$$\mathbf{X}_{\mathsf{T}} = \mathbf{X}_{\mathsf{E}} \, \mathbf{F} \tag{22}$$

Dessa forma, a previsão pode ser feita utilizando o modelo de calibração construído no instrumento mestre.

O modelo PDS considera que uma variável correspondente ao espectro obtido no instrumento mestre está relacionada com uma região delimitada ao redor desta mesma variável obtida a partir do instrumento escravo, conforme ilustra a figura 11.



Figura 11 - Relação entre os espectros em diferentes instrumentos no PDS

Para obtenção da matriz de transformação, o método PDS utiliza uma janela móvel (**J**) que relaciona cada variável do instrumento mestre com variáveis do instrumento escravo contidas na janela.

$$\mathbf{J}_{i} = [\mathbf{X}_{E,i-g}, \mathbf{X}_{E,i-g+1}, \dots \mathbf{X}_{E,i}, \dots \mathbf{X}_{E,i+h-1}, \mathbf{X}_{E,i+h}]$$
(23)

sendo que a janela contém as variáveis entre i-g até i+h, não necessariamente simétrico em torno de i.

Os vetores de regressão para cada variável \mathbf{x}_{i} , que relacionam as duas situações, são obtidos da seguinte maneira:

 $\mathbf{b}_{i} = \mathbf{J}_{i}^{+} \mathbf{x}_{m,i}$

(24)

onde J_i^+ é a matriz pseudo inversa de J_i .

Os vetores **b**_i são colocados na diagonal principal da matriz de transformação **F**, sendo que os outros elementos são iguais a zero, como ilustra a figura 12.



Figura 12 – Estrutura da matriz de transformação F do modelo de transferência PDS

Para uma amostra desconhecida obtida no instrumento escravo, a reconstrução do espectro é executada como mostrada na equação 22.

A previsão da amostra é feita como se o espectro houvesse sido medido na situação de calibração⁶⁷⁻⁷¹.

3.7 – Parâmetros de qualidade dos modelos

3.7.1 - Raiz quadrada do erro médio quadrático

Comumente em aplicações com Calibração Multivariada utiliza-se o parâmetro RMSEP (*Root Mean Square Error of Prediction*) ou Raiz Quadrada do Erro Médio quadrático de Previsão, que expressa o grau de concordância entre os valores estimados por um modelo previamente construído e o valor considerado real ou de referência.

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (y_p - y_r)^2}{n}}$$
(25)

onde y_p são os valores previstos pelo modelo, y_r são os valores de referência e n é o número de amostras utilizadas no conjunto de validação.

O RMSEC (*Root Mean Square Error of Calibration*) ou raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração nos fornece informação sobre o ajuste do modelo aos dados de calibração. O RMSEC é calculado como na equação 25, sendo utilizados os *n* valores previstos no conjunto de calibração.

O RMSECV (*Root Mean Square Error of Cross-Validation*) ou raiz quadrada do erro médio quadrático da validação cruzada, nos fornece uma medida sobre a habilidade do modelo em prever novas amostras. O RMSECV é definido como na equação 25, com a exceção de que y_p são as previsões para amostras não incluídas no modelo.

Como pode ser observado na equação 25, o RMSEP é uma medida de dispersão semelhante ao desvio padrão, mas que mede a dispersão entre os valores estimados pelo modelo e de referência. Outra propriedade que se assemelha à do desvio padrão é que o RMSEP é uma medida que considera apenas erros aleatórios, que é uma decorrência da elevação dos erros ao quadrado na equação 25. Por exemplo, considerando os resultados de dois métodos distintos, supondo que um

apresente erros sistemáticos negativos e o outro tenha erros com o mesmo valor em módulo mas que sejam distribuídos de forma aleatória, ambos fornecem os mesmos valores de RMSEP. Assim, a constatação de que dois RMSEP são estatisticamente equivalentes por meio de um teste-F torna possível afirmar que os erros médios na estimativa da propriedade de interesse dos dois métodos são equivalentes não podendo ser utilizada para inferir sobre a exatidão do método^{59, 72-73}.

3.7.2 - Comparação de conjuntos de dados - Teste F

Em trabalhos experimentais, especialmente no desenvolvimento de um novo procedimento de análise, é comum realizar-se uma avaliação estatística dos resultados obtidos, visando identificar a existência de uma diferença significativa na variância entre este conjunto de dados e outro conjunto obtido por um procedimento de referência. Esta avaliação é feita usando-se o teste F. Este teste usa a razão das variâncias dos dois conjuntos de dados para estabelecer se efetivamente existe uma diferença estatisticamente significativa entre os valores que estão sendo comparados. O valor de F é calculado pela seguinte expressão:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$
(26)

O valor de F obtido é comparado a valores críticos calculados para um determinado nível de confiança. Quando o valor experimental de F excede o valor crítico tabelado, então a diferença na variância é tomada como estatisticamente significante^{59,73-74}.

3.7.3 – Análise de Variância (ANOVA)

Para a verificação do ajuste do modelo PARAFAC foi realizada uma Análise de Variância (*Analysis of Variance –* ANOVA).

Dado um ajuste linear por meio de uma equação do tipo: $\hat{y} = ax + b$, onde x são as variáveis independentes e y as dependentes, para cada dado com valores y₁, y₂, ... y_i, e valor médio \bar{y} , o termo $\Sigma(y_i - \bar{y})^2$ é chamado de "soma dos quadrados (SQ_{Total}) de \bar{y} ". Ele é igual a soma de dois outros termos: a SQ_R "soma dos quadrados devido a regressão", $\Sigma(\hat{y}_i - \bar{y})^2$, e a SQ_r "soma dos quadrados residual, $\Sigma(y_i - \hat{y}_i)^2$, conforme pode ser visualizado na Figura 13.⁷⁵⁻⁷⁶



Figura 13 - Representação dos desvios em relação a reta obtida, utilizado na ANOVA, onde \bar{y} é a média de todos os valores de y, \hat{y}_i é o valor previsto pelo modelo e y_i é o valor experimental.

A soma dos quadrados devido à regressão é claramente a parte da SQ_{Total} a qual se deve o bom ajuste de uma equação aos pontos da reta e ele deve ser tão grande quanto possível. Por outro lado, a soma dos quadrados residual é igual a soma dos quadrados dos erros, que deve ser o menor possível, para que a reta apresente um bom ajuste aos pontos. Deste modo, o coeficiente de determinação do modelo é definido como:

$$R^2 = SQ_R / SQ_{Total}$$
(27)

O coeficiente de determinação é uma medida descritiva da proporção da variação da variável dependente (y) que pode ser explicada pela variável independente (x), segundo o modelo especificado. No caso do modelo de Regressão Linear Simples, o coeficiente de determinação coincide com o quadrado do coeficiente de correlação.

A obtenção de valores altos de R² (próximos de 1) mostra que a variação total em torno da média é explicada pelo modelo. Para os erros sobra apenas uma pequena e aceitável contribuição.

Se os erros seguirem uma distribuição normal (aleatória em torno de zero), a Média Quadrática (MQ) pode ser usada para testar se a equação de regressão é estatisticamente significante. A Média Quadrática é calculada pela razão entre a soma dos quadrados e os graus de liberdade. Duas MQ são calculadas: MQ_R (média quadrática devido a regressão) e MQ_r (média quadrática devido aos resíduos). Se

não há relação entre os valores estimados pelo modelo e as concentrações reais, a razão das médias quadráticas seguem uma distribuição F⁷⁵⁻⁷⁶:

$$MQ_{\rm R}/MQ_{\rm r} = F_{\rm p-1,n-p} \tag{28}$$

onde: p é o número de parâmetros do modelo e p-1 e n-p são os número de graus de liberdade da MQ_R e da MQ_r , respectivamente.

Os resultados da ANOVA são reunidos na Tabela 1, chamada Tabela de Análise de Variância.

|--|

Fonte de variação	Soma Quadrática	Número de graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	$\Sigma(\hat{y}_i - \bar{y})^2$	p - 1	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p-1}$
Resíduos	$\Sigma(y_i - \hat{y}_i)^2$	n - p	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n-p} = s^2$
Total	$\Sigma(y_i - y)^2$	n - 1	

4 – Determinação simultânea de AAS, paracetamol e cafeína através
de fluorescência molecular em fase sólida e utilização de métodos
quimiométricos de calibração de segunda ordem

4.1 - Introdução

A combinação dos fármacos ácido acetilsalicílico, paracetamol e cafeína é bastante empregada devido à sua ação analgésica, antitérmica e anti-inflamatória.

Na indústria farmacêutica os métodos de referência⁶ normalmente utilizados para determinação desses fármacos envolvem alto custo fixo e por análise e/ou geração de resíduos e longo tempo de preparação da amostra.

Com esse estudo buscou-se o desenvolvimento de um método adequado para determinação simultânea dessa mistura farmacêutica com redução dos custos, sem geração de resíduos e com análise direta da mistura em estado sólido, facilitando significativamente a etapa de preparação da amostra.

Para tanto foi utilizada a espectroscopia de fluorescência molecular em combinação com métodos quimiométricos de primeira e de segunda ordem. Porém devido à ocorrência de forte sobreposição espectral entre os componentes da amostra e da relativa baixa intensidade de fluorescência que ocorre entre os componentes dependendo de suas concentrações na amostra, a utilização de apenas um comprimento de onda de excitação não proporciona informação suficiente para obtenção de resultados satisfatórios. Por outro lado, a utilização de matrizes de excitação-emissão e a construção de modelos de calibração utilizando os métodos de segunda ordem proporcionam a quantidade de informação necessária para obtenção de resultados que atendem as necessidades requeridas nesse tipo de análise.

4.2 - Parte experimental

4.2.1 - Materiais e condições analíticas

As medidas foram realizadas em um espectrofluorímetro Perkin Elmer modelo LS-55 equipado com acessório para amostras em fase sólida e cela com janela de quartzo. O ângulo da cela em relação ao feixe de radiação incidente é de 22,5º, pois este é o ângulo que proporciona o menor espalhamento da radiação incidente (reflexão não especular) na cela contendo a amostra em fase sólida.

As condições das medidas foram:

- fendas de excitação e emissão: 7 nm,
- voltagem da fotomultiplicadora: 775 mV
- velocidade de varredura do monocromador: 500 nm/min.

Obteve-se os espectros de excitação-emissão nas faixas de 265-405 nm (intervalos de 5 nm) e 300-480 nm (intervalos de 0,5 nm) respectivamente, com temperatura ambiente de 24 ºC.

Os excipientes utilizados foram: celulose microcristalina, para cromatografia de camada fina (VETEC), amido solúvel P.A. - A.C.S. (Synth) e lactose P.A. - A.C.S. (Nuclear). Os analitos foram cafeína pura (VETEC), ácido acetil salicílico 99% (VETEC) e paracetamol U.S.P. (Synth).

Para homogeneização das misturas utilizou-se um micromoinho analítico Ika Works Inc. – modelo A 11 basic.

4.2.2 - Procedimento experimental

Afim de obter as concentrações comercialmente utilizadas quando da mistura desses fármacos, foram preparadas amostras contendo AAS, cafeína, paracetamol e excipiente (amido/celulose 1:1) com massa total de 1g. A quantidade de excipiente foi fixada em 200 mg, ou 20 % da massa total, que é uma proporção empregada na fabricação comercial desse tipo de mistura⁷⁷. As concentrações dos ativos AAS, cafeína e paracetamol variaram nos intervalos: 316-484 mg/g, 52-108 mg/g e 208-432 mg/g, respectivamente, para os quais verificou-se a linearidade do sinal analítico. O ponto central desses intervalos proporciona uma mistura conforme a relação mássica encontrada em misturas comerciais. A Figura 14 ilustra a variação na proporção de cada ativo em relação a massa total dos fármacos na mistura para cada um dos cinco níveis de concentrações estabelecidos, cujos valores são mostrados na Tabela 3.

As amostras dos fármacos com excipiente foram pulverizadas em almofariz por 30 s para homogeneização do tamanho de partículas e em seguida submetidas a um micromoinho analítico por 30 s para homogeneização da mistura.

Os modelos de calibração para AAS, paracetamol e cafeína, utilizando PLS2, PARAFAC e UPLS, foram construídos utilizando 25 amostras em cinco níveis de concentração, com cinco réplicas para cada nível. Prepararam-se também 15 amostras de validação, com concentrações em cinco níveis diferentes dos utilizados na construção do modelo, sendo feitas três réplicas para cada nível.



Figura 14 – Variação na proporção de cada ativo em relação a massa total de fármacos na mistura em cada ponto da curva de calibração

4.3 - Resultados e discussão

Na construção do modelo de calibração, conforme já demonstrado em estudos anteriores⁷⁸⁻⁸⁰, verificou-se que diferentes proporções em massa dos componentes da mistura, suas propriedades físicas (como tamanho de partícula), bem como o uso de diferentes excipientes, proporcionam alteração no sinal analítico dos ativos de interesse. Essa variação pode ser o deslocamento da região de fluorescência, mudança na intensidade do sinal e no perfil da banda. De fato, o método proposto depende da quantidade e do tipo dos ingredientes utilizados no medicamento.

Os efeitos dos ingredientes e proporções utilizadas na mistura são devidos a uma provável competição no processo de desativação resultante das interações entre os fluoróforos e os ingredientes presentes na amostra. No entanto, verificou-se que pequenas variações mássicas do excipiente e para as proporções mássicas de AAS, cafeína e paracetamol utilizadas na mistura farmacêutica, esse efeito não causa alterações significativas de sinal.

Assim, antes da utilização desse método é importante ter conhecimento das proporções utilizadas e características físicas dos ingredientes. Como no processo de produção industrial essas características podem ser conhecidas, esses efeitos podem ser satisfatoriamente contornados.

Foram obtidos espectros individuais de todos os componentes da mistura em toda a região de excitação-emissão utilizada para verificar o perfil de fluorescência dos fármacos e a presença de interferentes. Para os excipientes, como esperado, verificou-se que não ocorrem bandas de fluorescência, logo, também se conclui que nestes não ocorre a presença de interferentes. Porém, para o AAS padrão utilizado, foi encontrada a presença de uma banda de fluorescência que provavelmente se deve a um resíduo de ácido salicílico presente, com intensidade máxima de excitação e emissão em 315 nm e 435 nm, respectivamente⁸¹.

A Figura 15 ilustra os espectros de excitação-emissão de fluorescência que ilustram o efeito da presença unicamente do excipiente amido/celulose 1:1 na emissão de fluorescência dos fármacos individualmente. As concentrações dos fármacos em presença de excipiente são as do ponto central do modelo de calibração construído.





Figura 15 - Efeito da presença unicamente do excipiente amido/celulose 1:1 na emissão de fluorescência dos fármacos individualmente: (a) AAS, (b) AAS + excipiente, (c) paracetamol, (d) paracetamol + excipiente, (e) cafeína, (f) cafeína + excipiente. (obs.: as escalas de intensidade são distintas para cada espectro)

As regiões de excitação e emissão observadas para os analitos puros e para a mistura de um analito + excipiente também ficam deslocadas em relação às regiões encontradas para a mistura dos três analitos + excipiente nas concentrações utilizadas: o AAS apresenta uma banda com máximo de excitação e emissão em 265 nm e 335 nm, respectivamente; a cafeína apresenta duas bandas nessa região, uma pouco intensa nas condições utilizadas, com emissão em 367 nm (não utilizada na construção dos modelos), e outra com intensidade máxima de excitação e emissão em 355 nm e 400 nm, respectivamente⁸². O paracetamol apresenta apenas uma banda com intensidade máxima de excitação e emissão em 320 nm e 390 nm, respectivamente. A tabela 2 apresenta os comprimentos de onda de intensidade máxima de excitação-emissão de fluorescência para os fármacos utilizados.

Tabela 2 - Comprimentos de onda de intensidade máxima de excitação-emissão de fluorescência para os analitos na mistura farmacêutica utilizada.

	Intensidade máxima de excitação (nm)	intensidade máxima de emissão (nm)
AAS	265	335
Paracetamol	320	390
Cafeína	355	400

Também, para verificar a indução de polimorfismos nos constituintes da mistura farmacêutica, decorrente do método de preparo das amostras, foram realizadas análises por Calorimetria Diferencial de Varredura (Differential Scanning Calorimetry - DSC) em amostras da mistura submetida e não submetida ao método

de preparo descrito. As condições da análise foram: temperatura ambiente em 25 °C e rampa de aquecimento de 10 °C/min. até 260 °C. Os resultados são mostrados na Figura 16 e indicam que não há formação de polimorfos decorrente do método de preparo das amostras.



Figura 16 – Resultado da análise por DSC das amostras da mistura farmacêutica submetida e não submetida ao método de preparo.

4.3.1 - Espectros dos compostos estudados

Os espectros de emissão individuais dos fármacos presentes na mistura farmacêutica + excipiente, em seus respectivos máximos de intensidade de excitação são mostrados na figura 17. Os sinais devido aos espalhamentos Rayleigh

e Raman foram removidos e o sinal de fluorescência na região foi obtido por interpolação, para não prejudicar a continuidade do sinal.⁸³⁻⁸⁴.





Para melhor visualização da ocorrência da sobreposição espectral pode-se observar a Figura 18, que mostra o espectro de excitação-emissão para a mistura farmacêutica, nos intervalos de excitação-emissão estudados, onde observa-se que embora os máximos de excitação de cada analito sejam bem distintos, ainda assim, há ocorrência de sobreposição.



Figura 18 – Espectro de excitação-emissão para a mistura farmacêutica

4.3.2 – Construção do modelo com PLS-2

O comprimento de onda de excitação utilizado foi 320 nm, para o qual se pode obter o sinal de emissão dos três analitos.

Na construção do modelo PLS-2 os dados foram centrados na média e utilizou-se três variáveis latentes, que explicam 99,31 % da variância dos dados.

Os valores de previsão, mostrados na Tabela 3, foram obtidos utilizando a média aritmética da previsão das 3 réplicas em cada nível, onde se pode observar os resultados obtidos, com muitos erros relativos acima de 10 %. Também calcularam-

se os desvios padrão relativos (RSD), obtendo valores que não caracterizam boa reprodutibilidade do método.

	Nominal	Previsto	Erro relativo	RSD	RMSEP
	(mg/g)	(mg/g)	(%)	(%)	(mg/g)
	337,0	348,3	3,4	1,7	
	379,0	413,3	9,1	5,2	
AAS	400,0	435,0	8,8	6,7	29,8
	421,0	443,3	5,3	3,1	
	463,0	474,7	2,5	4,2	
Cafeína	59,0	62,7	6,2	3,3	
	73,0	84,0	15,0	8,3	
	80,0	91,7	14,6	11,2	9,8
	87,0	94,0	8,0	4,7	
	101,0	104,7	3,6	6,4	
Paracetamol	236,0	219,3	- 7,1	12,1	
	292,0	261,3	- 10,5	6,8	
	320,0	272,3	- 14,9	14,1	40,3
	348,0	301,3	- 13,4	9,3	
	404,0	388,7	- 3,8	2,0	

Tabela 3 - Resultados obtidos para o conjunto de validação no modelo PLS-2

Esse resultado era esperado por se tratar de uma mistura complexa em fase sólida, com forte sobreposição espectral e baixa intensidade de emissão, dependendo do nível de concentração, onde a leitura de apenas um comprimento de onda de excitação não fornece informação suficiente para tornar os dados de previsão obtidos confiáveis ou aproveitáveis na prática.

Optou-se, então, por realizar uma varredura dos comprimentos de onda de excitação entre 265 e 405 nm, com emissão entre 300 e 480 nm, para as amostras

de calibração e validação, obtendo os dados que foram utilizados com os algoritmos PARAFAC e UPLS.

4.3.3 - Construção do modelo com PARAFAC

As mesmas vinte e cinco amostras da mistura farmacêutica utilizadas anteriormente foram agora utilizadas para construção dos modelos de calibração com cinco níveis. Devido à complexidade da mistura, cinco réplicas autênticas foram feitas para cada nível e o valor médio dos escores obtidos para cada nível na decomposição com PARAFAC foi utilizado na construção das curvas analíticas, com retirada das amostras consideradas anômalas (pontos cuja intensidade do sinal diferiam em mais de 20% da média dos demais em um mesmo nível de concentração), sendo que para nenhum analito foi retirada mais de uma amostra por nível de concentração. Os pesos obtidos pelo PARAFAC são mostrados na Figura 19. Devido às características dos espectros, na construção do modelo utilizou-se a restrição de não-negatividade. A determinação do número apropriado de componentes baseou-se em uma análise visual dos pesos obtidos, na variância explicada pelo modelo e na qualidade do ajuste da reta de regressão obtida utilizando os escores e as concentrações conhecidas. Verificou-se que o melhor ajuste do modelo ocorre com utilização de cinco fatores, que explicam 99,8% da variância dos dados, com boa decomposição dos três analitos (três fatores) e dois interferentes (dois fatores), sendo que o interferente 2 é provavelmente devido a um residual de ácido salicílico⁸¹.





AAS, --- paracetamol, --- cafeína, -- interferente 1, --- interferente 2

Uma análise de variância (ANOVA) foi feita para verificação do ajuste do modelo linear para cada analito.

Duas MQ (médias quadráticas) foram calculadas: MQ_R (média quadrática devido a regressão) e MQ_r (média quadrática devido aos resíduos). Se não há relação entre os escores obtidos com o modelo produzido com o PARAFAC e as concentrações, a razão das médias quadráticas segue uma distribuição F, uma vez que a MQ_R deve estar da ordem dos ruídos (MQ_r), supondo que os resíduos tem distribuição aleatória.

A Tabela 4 mostra os valores de R² e MQ_R/MQ_r para os três analitos (modelo ajustado entre os escores do PARAFAC e as concentrações dos analitos). Como os valores obtidos para MQ_R/MQ_r são muito maiores do que o valor crítico de F _{1,3}, o qual é 10,13 ao nível de confiança de 95 % e R² tem valores próximos de 1, temos evidência suficiente para comprovar a adequação do modelo proposto para a relação entre os escores fornecidos pelo PARAFAC e as concentrações nas amostras de calibração, ou seja, uma relação linear.

	AAS	cafeína	paracetamol
R^2	0,9930	0,9741	0,9956
$\frac{MQ_{R}}{MQ_{r}}$	426,7	113,0	680,3

Tabela 4 – ANOVA para o ajuste do modelo para cada analito

A Figura 20 mostra as curvas analíticas ajustadas entre escores do PARAFAC e as concentrações.



Figura 20 – Curvas analíticas para (a) AAS, (b) cafeína e (c) paracetamol

A fim de testar o poder de previsão do método proposto, foram preparadas quinze amostras de validação, com cinco níveis de concentrações diferentes dos usados na calibração, porém dentro dos intervalos utilizados. Foram feitas três réplicas para cada nível, utilizando-se o valor médio dos escores obtidos para cada nível. Dessa forma, nas quinze previsões feitas, obteve-se erros de previsão aceitáveis e somente uma teve erro acima de 10 %, como mostrado na tabela 5, onde também são apresentados os valores dos desvios padrão relativos (RSD) e do RMSEP.

Tabela 5 – Resultados obtidos para o conjunto de validação com o modelo PARAFAC

	Nominal	Previsto	Erro relativo	RSD	RMSEP
	(mg/g)	(mg/g)	(%)	(%)	(mg/g)
	337,0	381,0	13,1	0,5	
	379,0	391,5	3,3	2,5	
AAS	400,0	418,9	4,7	3,1	20,4
	421,0	418,4	- 0,6	3,9	
	463,0	469,9	1,5	2,2	
	59,0	54,5	- 7,6	1,7	
Cafeína	73,0	74,6	2,2	0,7	
	80,0	79,8	- 0,2	1,8	8,8
	87,0	84,2	- 3,2	2,3	
	101,0	98,7	- 2,3	2,6	
Paracetamol	236,0	239,7	1,6	1,9	
	292,0	300,9	3,0	2,6	
	320,0	317,3	- 0,8	4,8	18,2
	348,0	350,9	0,8	3,3	
	404,0	442,0	9,4	1,2	

Sem utilização das médias dos escores tivemos quarenta e cinco previsões, das quais apenas seis delas têm erro acima de 10%.

4.3.4 - Construção do modelo com UPLS

Assim como no modelo anterior, esse modelo foi construído utilizando 25 amostras em 5 níveis de concentrações, sendo 5 réplicas para cada nível. No grupo de validação utilizou-se outras 15 amostras em 5 níveis de concentração diferentes dos usados na calibração, sendo 3 réplicas para cada nível.

Nesse modelo foram utilizadas três variáveis latentes, que explicam aproximadamente 99 % da variância dos dados, e os mesmos foram centrados na média.

Os valores de previsão, mostrados na tabela 6, foram obtidos utilizando a média aritmética da previsão das 3 réplicas em cada nível, onde se pode observar os bons resultados obtidos, com erros relativos abaixo de 5%. Também calculou-se os desvios padrão relativos (RSD), obtendo-se baixos valores, o que demonstra a boa reprodutibilidade do método e o RMSEP.
	Nominal	Previsto	Erro relativo	RSD	RMSEP
	(mg/g)	(mg/g)	(%)	(%)	(mg/g)
AAS Cafeína Paracetamol	337,0	340,8	1,1	0,9	
	379,0	386,1	1,9	1,6	
AAS	400,0	408,8	2,2	1,8	7,3
	421,0	417,4	- 0,8	0,4	
	463,0	457,4	- 1,2	0,6	
Cafeína	59,0	60,3	2,2	1,8	
	73,0	75,4	3,2	2,8	
	80,0	82,9	3,6	3,0	2,4
	87,0	85,8	- 1,4	0,7	
	101,0	99,1	- 1,8	0,9	
Paracetamol	236,0	243,4	3,1	1,6	
	292,0	296,8	1,6	0,8	
	320,0	308,3	- 3,7	3,2	9,7
	348,0	338,5	- 2,7	2,5	
	404,0	398,9	- 1,3	1,1	

Tabela 6 - Resultados para as amostras de validação com o modelo UPLS

4.3.5 - Comparação dos resultados dos modelos PARAFAC e UPLS

A avaliação da similaridade dos resultados obtidos através dos dois diferentes algoritmos foi feita através do teste F, utilizando os valores calculados do RMSEP para cada analito. Nesse caso o teste F é usado para comparação dos RMSEP:

$$F = \frac{RMSEP_1^2}{RMSEP_2^2}$$
(34)

O valor crítico de $F_{14,14}$ é 2,46 ao nível de significância de 95%. Os resultados são mostrados na tabela 7.

Tabela 7 - Resultados do teste F na comparação dos modelos PARAFAC e UPLS

		AAS	paracetamol	Cafeína
F _{14,14}	PARAFAC x UPLS	7,83	3,50	13,29

De acordo com os resultados mostrados na tabela 7 ,há evidências, ao nível de significância de 95%, de que o modelo UPLS fornece melhores resultados do que o modelo PARAFAC para os três analitos.

Analisando os resultados obtidos com os modelos PLS-2, PARAFAC e UPLS verifica-se que o último fornece os resultados mais reprodutíveis e com os menores erros. Porém, com a utilização do PARAFAC obtém-se os espectros de todos os constituintes da mistura, que podem ser utilizados para constatação de impurezas presentes.

Os resultados comparativos entre os modelos produzidos utilizando os algoritmos PLS-2 PARAFAC e o UPLS são mostrados nas Figuras 21, 22 e 23 para AAS, paracetamol e cafeína, respectivamente.



Figura 21 - Comparação entre os valores previstos para o AAS nos modelos PARAFAC, UPLS e PLS-2 e respectivos desvios padrão



Figura 22- Comparação entre os valores previstos para o paracetamol nos modelos PARAFAC, UPLS e PLS-2 e respectivos desvios padrão



Figura 23 - Comparação entre os valores previstos para a cafeína nos modelos PARAFAC, UPLS e PLS-2 e respectivos desvios padrão

As Figuras 24, 25 e 26 mostram os resultados comparativos entre os erros relativos produzidos nos modelos PLS-2, PARAFAC e UPLS, para a previsão do AAS, paracetamol e cafeína.



Figura 24 - Erros relativos obtidos no conjunto de validação para previsão do AAS utilizando os modelos: (a) PLS-2 (b) PARAFAC e (c) UPLS



Figura 25 - Erros relativos obtidos no conjunto de validação para previsão do paracetamol utilizando os modelos: (a) PLS-2 (b) PARAFAC e (c) UPLS



Figura 26 - Erros relativos obtidos no conjunto de validação para previsão da cafeína utilizando os modelos: (a) PLS-2 (b) PARAFAC e (c) UPLS

4.4 - Conclusão

A utilização do PARAFAC e do UPLS com dados de fluorescência de excitação-emissão em fase sólida, aplicada a mistura utilizada em formulações farmacêuticas com AAS, cafeína e paracetamol proporcionou a construção de modelos mais eficazes, cujos resultados de previsão são melhores que os obtidos com o modelo PLS-2. Devido à forte sobreposição espectral dos componentes conhecidos e dos interferentes além da baixa intensidade de emissão (dependendo das proporções da mistura), a utilização de maior quantidade de informação proporcionou obter resultados que podem ser utilizados em rotinas de controle de qualidade. Também, a eficácia do método se mostra ao permitir uma precisa determinação dos analitos na mistura em fase sólida, mesmo quando ocorre uma pequena variação de concentração, como ocorre entre os níveis de calibração estabelecidos para cafeína.

Vantagens observadas em relação aos métodos de referência como o menor custo, a não necessidade de preparo da amostra e sua análise simples e rápida no espectrofluorímetro, além de não haver geração de resíduos, tornam esse método bastante atrativo, permitindo a determinação simultânea de compostos com intensa sobreposição espectral. 5 - Determinação simultânea de AAS, paracetamol e cafeína em diferentes matrizes em fase sólida utilizando espectroscopia de fluorescência molecular, UPLS e Transferência de calibração.

5.1 – Introdução

Como verificado, os constituintes da mistura farmacêutica em fase sólida, bem como suas proporções relativas podem causar deslocamento e/ou uma variação da intensidade de fluorescência dos analitos. Observa-se que ocorre razoável variação na intensidade do sinal analítico, por exemplo, quando se utiliza como excipiente a mistura amido/celulose ou a lactose.

Para evitar a recalibração completa do modelo, com trabalho adicional de preparar novamente muitas amostras e analisá-las, em casos onde o sinal analítico é alterado em função de mudanças da matriz da amostra, uso de diferentes equipamentos, diferentes tamanhos de partículas, etc., pode-se utilizar a transferência de calibração.

Nesse estudo utilizou-se a transferência de calibração através do método da Padronização Direta por Partes aplicada a modelos UPLS construídos a partir de amostras de misturas farmacêuticas com excipiente amido/celulose já utilizados na primeira parte deste trabalho. Foram preparadas e analisadas novas amostras das mesmas misturas em excipiente lactose, para realização do modelo de transferência de calibração e validação do mesmo.

A figura 27 mostra espectros do nível central da curva de calibração para ilustrar o efeito da utilização de diferentes excipientes na intensidade de fluorescência dos fármacos na mistura farmacêutica em estudo e mostra também o espectro transformado, para o mesmo nível da curva de calibração, obtido após o procedimento de transferência de calibração.



Figura 27 - Efeito da utilização de diferentes excipientes na intensidade de fluorescência dos fármacos na mistura farmacêutica em estudo: (a) excipiente amido/celulose 1:1 (b) excipiente lactose; e (c) espectro transformado (obs.: as escalas de intensidade são distintas para cada espectro)

5.2 – Parte Experimental

5.2.1 – Materiais e condições analíticas

Os materiais utilizados, bem como as condições das análises realizadas são idênticas às descritas no item 4.2.1.

5.2.2 – Procedimento Experimental

No conjunto de calibração utilizou-se quinze amostras em cinco níveis de concentração, sendo três réplicas de cada nível para construção dos modelos UPLS para as amostras da mistura farmacêutica com excipiente amido/celulose 1:1.

O conjunto de transferência, utilizado para construção da matriz de transformação **F**, foi formado por dez amostras de concentrações idênticas a cada um dos níveis utilizados no conjunto de calibração, sendo cinco utilizando como excipiente a mistura amido/celulose 1:1 e cinco utilizando como excipiente a lactose.

O conjunto de **validação 1** foi formado por quinze amostras em cinco níveis de concentração diferentes dos utilizados no conjunto de calibração, dentro da mesma faixa, com três réplicas para cada nível, usando como excipiente a mistura amido/celulose. Esse conjunto foi empregado para proporcionar uma comparação com os resultados obtidos com o conjunto de **validação 2** e com o conjunto de **validação 2** transformado.

O conjunto de validação 2, formado por quinze amostras em cinco níveis de concentração diferentes dos utilizados no conjunto de calibração, dentro da mesma

Capítulo 5 Determinação em diferentes matrizes com transferência de calibração

faixa, com três réplicas para cada nível, utilizando como excipiente a lactose, foi utilizado juntamente com a matriz **F** para obtenção do conjunto de validação 2 transformado.

As mesmas vinte e cinco amostras utilizadas no conjunto de calibração do procedimento descrito no item 4.2.2 foram também utilizadas nessa parte do projeto, assim como as quinze amostras de validação.

As 15 amostras do conjunto de calibração e as 5 amostras de transferência (com excipiente amido/celulose) foram selecionadas a partir de 25 amostras, utilizado uma Análise de Componentes Principais (PCA) para os dados desdobrados, sem pré processamento, onde amostras dispostas em todo espaço amostral foram selecionadas, como ilustra a Figura 28.



Figura 28 - PCA para as 25 amostras com excipiente amido/celulose 1:1 destacando as amostras 3, 10, 13, 19 e 23 utilizadas na transferência

O método de preparação das amostras do conjunto de validação 2 foi idêntico ao descrito no item 4.2.2, exceto pela utilização do excipiente lactose.

5.3 – Resultados e discussão

Na construção dos modelos UPLS os dados foram centrados na média e utilizou-se a validação cruzada (*leave one out*), selecionando-se quatro variáveis latentes, que explicaram 99,34 % da variância dos dados.

Para determinação das concentrações dos componentes das misturas utilizando dados de fluorescência de excitação-emissão e transferência de calibração foi necessário desdobrar o tensor de dados tridimensional (I x J x K) para obtenção da matriz de dados onde I é o numero de amostras e J e K são os números de variáveis na primeira e na segunda dimensão, respectivamente, para ser utilizada na construção dos modelos UPLS para cada fármaco da mistura.

Na figura 9 são exemplificados esses dois modos de organização ilustrando a conversão de um cubo de dados \underline{X} em uma matriz X. Para construção dos modelos de calibração, o cubo de dados de dimensões 15 x 362 x 29 foi convertido em uma matriz de dimensões 15 x 10498.

Utilizou-se o conjunto de calibração para construir modelos UPLS independentes para cada fármaco. Esses modelos foram utilizados para prever as amostras do conjunto de validação 2 transformado (excipiente lactose), do conjunto de validação 1 (excipiente amido/celulose 1:1) e do conjunto de validação 2 (excipiente lactose), a fim de comparar a amplitude dos erros de previsão nas três

Capítulo 5 Determinação em diferentes matrizes com transferência de calibração

situações. Os resultados são mostrados nas Tabelas 8, 9 e 10 para os resultados das médias de cada nível de concentração.

	Nominal	Previsto	Erro relativo	RSD	RMSEP
	(mg/g)	(mg/g)	(%)	(%)	(mg/g)
	337,0	338,5	0,4	1,4	
	379,0	384,3	1,4	0,5	
AAS	400,0	407,4	1,8	1,0	5,0
	421,0	421,5	0,1	0,2	
	463,0	461,3	- 0,4	0,8	
Cafeína	59,0	59,5	0,8	2,6	
	73,0	74,7	2,4	0,9	
	80,0	82,4	3,0	1,7	1,7
	87,0	87,2	0,2	0,4	
	101,0	100,2	- 0,6	1,2	
Paracetamol	236,0	238,2	0,9	2,0	
	292,0	291,2	- 0,3	0,4	
	320,0	310,1	- 3,1	1,8	6,7
	348,0	340,8	- 2,0	0,8	
	404,0	401,9	- 0,5	1,5	

Tabela 8 – Resultados dos modelos de calibração UPLS aplicados ao conjunto de validação 1 (excipiente amido/celulose)

	Nominal	Previsto	Erro relativo	RSD	RMSEP
	(mg/g)	(mg/g)	(%)	(%)	(mg/g)
AAS Cafeína Paracetamol	337,0	266,8	- 20,8	7,3	
	379,0	315,9	- 16,6	1,9	
AAS	400,0	337,0	- 15,7	1,8	60,3
	421,0	365,3	- 13,2	1,8	
	463,0	420,5	- 9,2	2,2	
Cafeína	59,0	35,6	- 39,7	18,3	
	73,0	51,9	- 28,8	3,9	
	80,0	59,0	- 26,3	3,5	20,2
	87,0	68,4	- 21,3	3,2	
	101,0	86,8	- 14,0	3,6	
Paracetamol	236,0	292,5	23,9	4,2	
	292,0	366,1	25,4	2,4	
	320,0	403,9	26,2	2,0	80,2
	348,0	432,0	24,1	1,9	
	404,0	497,5	23,1	5,2	

Tabela 9 – Resultados dos modelos de calibração UPLS aplicados ao conjunto de validação 2 (excipiente lactose)

Os modelos de calibração foram então utilizados para prever as amostras resultantes do modelo de transferência utilizando as amostras do conjunto de validação 2 transformado, cujos resultados são mostrados na Tabela 10, para os resultados das médias de cada nível de concentração.

	Nominal	Previsto	Erro relativo	RSD	RMSEP
	(mg/g)	(mg/g)	(%)	(%)	(mg/g)
	337,0	345,0	2,4	2,3	
	379,0	380,5	0,4	1,4	
AAS	400,0	399,3	- 0,2	0,9	8,2
	421,0	421,1	0	3,0	
	463,0	461,0	- 0,4	2,5	
	59,0	61,6	4,5	4,3	
	73,0	73,5	0,6	2,4	
Cafeína	80,0	79,7	- 0,3	1,5	2,7
	87,0	87,0	0	4,8	
	101,0	100,3	- 0,7	3,8	
Paracetamol	236,0	238,5	1,1	6,4	
	292,0	291,8	0	5,8	
	320,0	320,9	0,3	1,5	10,9
	348,0	345,9	- 0,6	2,0	
	404,0	393,2	- 2,7	2,7	

Tabela 10 – Resultados dos modelos de calibração UPLS aplicados ao conjunto de validação 2 transformado (excipiente lactose)

Verifica-se que os modelo UPLS utilizados produzem ótimos resultados para o conjunto de validação 1 e para o conjunto de validação 2 transformado, com erros relativos que não ultrapassam 5 %, enquanto para o conjunto de validação 2 os erros são bastante altos.

5.3.1 – Comparação dos resultados obtidos antes e depois da transferência de calibração

A avaliação da similaridade dos resultados obtidos com o conjunto de validação 1 (excipiente amido/celulose) e com o conjunto de validação 2 transformado (excipiente lactose) foi feita através do teste F, utilizando os valores calculados do quadrado do RMSEP para cada analito e os resultados são mostrados na tabela 11. O valor crítico de $F_{14,14}$ é 2,46 ao nível de significância de 95% e 3,66 ao nível de significância de 99%.

Tabela 11 - Resultados do teste F na comparação dos resultados antes e depois da transferência de calibração

	AAS	paracetamol	Cafeína	
F _{14,14}	2,67	2,63	2,70	

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 11, os valores calculados são próximos, mas superiores ao valor crítico de $F_{14,14}$ ao nível de significância de 95%, no entanto, há evidências ao nível de significância de 99%, de que os resultados nos dois conjuntos de validação têm os mesmos erros.

Os resultados comparativos entre os dados obtidos antes e após a transferência de calibração são mostrados nas Figuras 29, 30 e 31.



Figura 29 - Resultados dos modelos de calibração UPLS para o AAS e respectivos desvios padrão



Figura 30- Resultados dos modelos de calibração UPLS para o paracetamol e respectivos desvios padrão



Figura 31- Resultados dos modelos de calibração UPLS para a cafeína e respectivos desvios padrão

A Figura 32 mostra uma comparação entre os erros relativos obtidos para os resultados dos modelos construídos com UPLS antes e após a transferência de calibração, para o AAS, paracetamol e cafeína.





Figura 32 – Erros relativos para o conjunto de validação 2 (antes da transferência) para: (a) AAS, (c) paracetamol, (e) cafeína. Erros relativos para o conjunto de validação 2 transformado (após transferência) para (b) AAS, (d) paracetamol e (f) cafeína.

5.4 - Conclusão

A utilização de modelos UPLS e transferência de calibração pelo método PDS aplicada a dados de fluorescência de excitação-emissão em fase sólida, de formulações farmacêuticas, proporcionou resultados que demonstram boa aplicabilidade do método, verificando exatidão e reprodutibilidade aceitáveis, principalmente por se tratar de uma mistura de componentes em fase sólida. Assim, problemas relativos à diferença de excipientes das amostras puderam ser contornadas, tornando o método aplicável para análise dos fármacos em diferentes condições. 6 - Conclusão geral

6 - Conclusão geral

Os resultados obtidos com a aplicação da espectroscopia de fluorescência molecular e métodos quimiométricos como a modelagem de dados multi-modo (com utilização de métodos de calibração de segunda ordem) e a transferência de calibração, permitiram a construção de modelos de calibração eficazes para a determinação simultânea da mistura farmacêutica estudada mesmo com ocorrência de sobreposição espectral.

A utilização da transferência de calibração através do método PDS e dos modelos de calibração UPLS permitiu solucionar o problema do efeito produzido pela utilização de diferentes excipientes na mistura farmacêutica, tornando mais versátil e viável a utilização de tal metodologia de calibração para o fim proposto.

Considerando que o prévio conhecimento das proporções de cada fármaco e do excipiente utilizado na mistura é o mínimo necessário para iniciar o procedimento de calibração utilizando os modelos propostos, os mesmos tornam-se uma alternativa bastante viável para determinação analítica de rotina realizada pelas indústrias farmacêuticas, ainda que a princípio, os métodos convencionais utilizados para esse tipo de análise e descritos nas farmacopéias sejam os exigidos para obtenção de resultados finais mostrados nos relatórios enviados a Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Assim, os métodos ora desenvolvidos podem encontrar, num primeiro momento, utilização em controle de qualidade de processo, para acompanhamento do desempenho do mesmo, deixando os métodos de referência, mais caros e trabalhosos, para a análise final do lote produzido.

A eficácia dos modelos produzidos permite também vislumbrar a perspectiva da elaboração de modelos de calibração para determinação em linha de produção de misturas farmacêuticas como produtos acabados, através da utilização de fibras óticas para obtenção do sinal de fluorescência. 7 - Referências

7 - Referências

- [1] G. M. Escandar, N. M. Faber, H. C. Goicoechea, A. M. de la Pena, A. C. Olivieri,
- R. J. Poppi, Trends Anal. Chem., 26(2007)7
- [2] Y. Wang, D. J. Veltkamp, B. R. Kowalski, Anal. Chem. 63(1991)2750
- [3] A. Gerhardt, Manufacturing from salicylic acid and acetic anhydride: Faith, Keyes and Clarks Industrial Chemicals, 1853, Ed. F. A. Lowenheim, M. K. Moran, 4th ed., Wiley-Interscience, New York, (1975)
- [4] Q. Mingoia, Química Farmacêutica, Edusp, São Paulo, (1965)
- [5] C. H. Snyder, The extraordinary chemistry of ordinary things, 4^{th} ed., John Wiley &
- Sons Inc., Hoboken-NJ, (2003)
- [6] British Pharmacopeia, vol. II, HMSO, London, (2002).
- [7] D. Kuntz, R. Brossel, Presse Med., 25(1996)1171
- [8] K. J. Cole, D. L. Costill, R. D. Starling, B. H. Goodpaster, S. W. Trappe, W. J. Fink,
- Int. J. Sport. Nutr., 6(1996)14
- [9] J. Sawynok, Drugs, 49(1995)37
- [10] M. J. Shirlow, C. D. Mathers, Int. J. Epidemiol., 14(1985)239
- [11] A. Mehta, A. C. Jain, M. C. Mehta, M. Billie, Acta Cardiol. 52(1997)273
- [12] J. T. Franeta, D. Agbada, S. Eric, M. Aleksic, S. Vladimirov, Farmaco, 57(2002)709
- [13] M. L. Altun, T. Ceyhan, M. Kartal, T. Atay, N. Ozdemir, J. Pharm. Biomed. Anal., 25(2001)93
- [14] M. J. Nozal, J. L. Bernal, L. Toribio, J. J. Jimenez, M. T. Martin, J. Chromatogr.A, 870(2000)69

- [15] M. L. Qi, P. Wang, Y. X. Leng, J. L. Gu, R. N. Fu, Chromatographia 56(2002)295
- [16] A. Marin, E. Garcia, A. Garcia, C. Barbas, J. Pharm. Biomed. Anal., 29(2002)701
- [17] A. Eustaquio, M. Blanco, R. D. Jee, A. C. Moffat, Anal. Chim. Acta, 383(1999)283
- [18] M. Laasonen, T. Harmia-Pulkkinen, C. Simard, M. Rasanen, H. Vuorela, Anal. Chem., 75(2003)754
- [19] A. Eustaquio, P. Graham, R. D. Jee, A. C. Moffatt, A. D. Trafford, Analyst, 123(1998)2303
- [20] R. Szostak, S. Mazurek, Analyst, 127(2002)144
- [21] R. I. Catarino, M. B. Garcia, R. A. Lapa, J. L. Lima, J. AOAC Int., 85(2002)1253
- [22] M. D. Quintino, D. Corbo, M. Berlotti, L, Angnes, Talanta, 58(2002)943
- [23] M. M. de Sena, J. C. Fernandes, L. Rover, R. J. Poppi, L. T. Kubota, Anal. Chim. Acta, 409(2000)159
- [24] A. R. Medina, M. L. Cordova, A. Molina-Diaz, J. Pharm. Biomed. Anal., 21(1999)983
- [25] M. Nogowska, I. Muszalska, M. Zajac, Chem, Anal., 44(1999)1041
- [26] S. M. Sultan, I. Z. Alzamil, A. M. Alrahman, Analyst, 111(1986)919
- [27] A. Criado, S. Cardenas, M. Gallego, M. Valcarcel, Talanta, 53(2000)417
- [28] N. R. Martos, A. M. Diaz, A. Navalon, I. D. Paya, J. Pharm. Biomed. Anal., 23(2000)837
- [29] J. M. Calatayud, C. G. Benito, Anal. Chim. Acta, 231(1990)259
- [30] J. A. Pulgalrin, L. F. Bermejo, Anal. Chim. Acta, 333(1996)59
- [31] A. Villari, N. Micali, M. Fresta, G. Puglisi, Analyst, 119(1994)1561

- [32] A. D. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, Princípios de análise instrumental, 5^o ed., Bookman, Porto Alegre, 2002.
- [33] M. Otto, Chemometrics, Wiley, Weinheim, 1999
- [34] B. Barros Neto, M.F. Pimentel, M.C. Araújo, Quím. Nova, 25(2002)856.
- [35] R. Bro, Chemom. Intell. Lab. Syst., 38(1997)149
- [36] S. Wold, P. Geladi, K. Esbensem, J. Öhman, J. Chemom.,1(1987)41
- [37] C.M. Andersen, R. Bro, J. of Chemom., 17(2003)200
- [38] D. B. Gil, A. M. de la Pena, J. A. Arancibia, G. M. Escandar, A. C. Olivieri, Anal.
- Chem., 78(2006)8058
- [39] K. S. Booksh, B. R. Kowalski, Anal. Chem., 66(1994)782
- [40] S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi, Chemom. Intell. Lab. Syst., 2(1987)37
- [41] H. Martens, T. Næs, Multivariate Calibration. 1st ed., John Wiley & Sons, Chichester, (1989)
- [42] P. Geladi, B. R. Kowalski, Anal. Chim. Acta, 185(1986)1
- [43] D. M. Haaland, E. V. Thomas, Anal. Chem., 60(1988)1193
- [44] B. R. Kowalski, M. B. Seasholtz, J. Chemom., 5(1991)129
- [45] M. M. de Sena, R.J. Poppi, R. T. Frighetto, P. J. Valarini, Quím. Nova, 23(2004)547
- [46] B. S. Dayal, J. F. Macgregor, J. Chemom., 11(1997)73.
- [47] R. G. Brereton, Chemometrics Data analysis for the Laboratory and chemical plant. 1^ª ed., John Wiley & Sons, Chichester, (2003)
- [48] S. Jong, J. Chemom., 18(1993)251
- [49] M. M. C. Ferreira, A. M. Antunes, M. S. Melgo, P. L. O. Volpe, Quim. Nova, 22(1999)724

[50] A. García-Reiriz, P. C. Damiani, A. C. Olivieri, Talanta, 71(2007)806

[51] R. Bro, J. Chemom., 10(1996)47

[52] A. C. Olivieri, J. Chemom. 19(2005)253

[53] M. J. Culzoni, H. C. Goicoechea, A. P. Pagani, M. A. Cabezón, A. C. Olivieri, Analyst, 131(2006)718.

[54] S. P. Gurden, J. A. Westerhuis, R. Bro, A. K. Smilde, Chemom. Intell. Lab. Syst., 59(2001)121

[55] D. B. Gil, A. M. de la Peña, J. A. Arancibia, G. M. Escandar, A. C. Olivieri, Anal. Chem., 78(2006)8051

[56] E. Sanches, B. R. Kowalski, J Chemom.,4(1990)29

[57] R. Bro, Multi-way analysis in the food industry – Models, algorithms and applications, Tese de doutorado, Universidade de Amsterdam, Holanda, (1998)

[58] A. M. De La Pena, A. E. Mansilla, D. G. Gómez, A. C. Olivieri, H. C. Goicoechea, Anal. Chem. 75(2003)2640

[59] M. M. de Sena, M. G. Trevisan, R. J. Poppi, Talanta, 68(2006)1707

[60] J. W. B. Braga, Aplicação e validação de modelos de calibração de segunda ordem em química analítica, Tese de doutorado, Universidade de Campinas, Campinas, (2008)

[61] F. Despagne, D. L. Massart, M. Jansen, H. V. Daalen, Anal. Chim. Acta, 406(2000)233

[62] J. Lin, S. C. Lo, C. W. Brown, Anal. Chim. Acta, 349(1997)263

[63] O. E. Noard, Chemom. Intell. Lab. Syst., 25(1994)85

[64] E. Bouveresse, D. L. Massart, Vibr. Spectrosc., 11(1996)3

[65] C. E. Anderson, J. H. Kalivas, Appl. Spec., 53(1999)1268

- [66] F. D. Barbosa, R. J. Poppi, Anal. Bioanal. Chem. 377(2003)701
- [67] J. Lin, Appl. Spec., 52(1998)1591
- [68] E. Bouveresse, D. L. Massart, Chemom. Intell. Lab. Syst., 32(1996)201
- [69] Y. Wang, B. R. Kowalski, Anal. Chem., 65(1993)1301
- [70] Y. Wang, B. R. Kowalski, Appl. Spec., 46(1992)764
- [71]Y. Wang, B. R. Kowalski, Anal. Chem., 65(1993)1174
- [72] J. W. B. Braga, R. J. Poppi, Quím. Nova, 27(2007)1004
- [73] B. M. Wise, N. B. Gallagher, R. Bro, J. M. Shaver, W. Windig, R. S. Koch, PLS Toolbox version 3.5 for use with MATLAB, Eingenvector research Inc., Manson, (2005)
- [74] N. Baccan, J. C. de Andrade, O.E. Godinho, J.S. Barone, Quimica analítica quantitativa elementar; 3ª ed., Ed. Edgard Blucher Ltda, São Paulo, (2001).
- [75] J.C. Miller, J. N. Miller, Statistics for analytical chemistry, 3rd ed., Ellis Horwood Limited, Chichester, (1993)
- [76] B. Barros Neto, I. S. Scarminio, R. E. Bruns, Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, 2º ed., Ed. Unicamp, Campinas, (2003).
 [77] Handbook of pharmaceutical Excipients, 4th ed., pharmaceutical press London,
- (2002)
- [78] A. B. Moreira, I. L. Dias, G. Neto, E. Zagatto, M. M. C. Ferreira, L. T. Kubota, Talanta, 67(2005)65
- [79] A. B. Moreira, I. L. Dias, G. O. Neto, E. A. Zagatto, L. T. Kubota, Anal. Chim. Acta, 523(2004)49.
- [80] A. B. Moreira, H. P. Oliveira, T. D. Z. Atvars, I L. Dias, G. O. Neto, E. A. G. Zagatto, L. T. Kubota, Anal. Chim. Acta, 539(2005)257

[81] M. M. Karin, H. S. Lee, Y. S. Kim, H. S. Bae, S. H. Lee, Anal. Chim. Acta, 576(2006)136

[82] D. D. McKemy, W. Welch, J. A. Airey, Cell Calcium, 27(2000)117

[83] http://www.models.kvl.dk/users/rasmus/, acessado em 08-10-2008

[84] M. Bahram, R. Bro, C. Stedmon, A. Afkhami, J. Chemom, 20(2006)99