



**UNICAMP**  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Instituto de Química  
Departamento de Química Analítica

***“Calibração multivariada de primeira e segunda ordem e figuras de mérito na quantificação de enantiômeros por espectroscopia”***

**Tese de Doutorado**

**Autora: Patrícia Valderrama**

**Orientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi**

**Campinas-SP, abril de 2009**

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

V233c Valderrama, Patrícia.  
Calibração multivariada de primeira e segunda ordem e figuras de mérito na quantificação de enantiômeros por espectroscopia / Patrícia Valderrama. -- Campinas, SP: [s.n], 2009.

Orientador: Ronei Jesus Poppi.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Calibração multivariada. 2. Figuras de mérito.  
3. Enantiomêros. 4. Espectroscopia. I. Poppi, Ronei Jesus. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** First and second order multivariate calibration and figures of merit in the quantification of enantiomers by spectroscopy

**Palavras-chaves em inglês:** Multivariate calibration, Figures of merit, Enantiomers, Spectroscopy

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi (orientador), Adriana Vitorino Rossi (IQ-UNICAMP), Jarbas José Rodrigues Rohwedder (IQ-UNICAMP), Marco Flôres Ferrão (DQF-UNISC), Cesar Alexandre de Mello (IQ-UNIFRAN)

**Data de defesa:** 03/04/2009

Dedico este trabalho aos meus amados pais *Elizabeth Martins Valderrama* e *Osmar Valderrama*, pelo amor, dedicação, por seus exemplos de vida e por estarem sempre presentes. Aos meus irmãos *Osmar Rogério Valderrama* e *Leonardo Valderrama* pelo amor e carinho. À minha avó *Aparecida Valério Valderrama (in memorian)* pelo seu exemplo. Dedico ainda ao meu querido namorado *Paulo Henrique Março* por todo amor, compreensão, carinho, apoio, incentivo e companheirismo.

*“Portanto a sabedoria entrará no  
teu coração, e o conhecimento  
será suave à tua alma.”*

*Pv. 2:10*

## **Agradecimentos**

- A Deus por ter me permitido alcançar mais essa vitória.
- Ao Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi, pela oportunidade da realização desse trabalho, pela orientação, confiança, convivência e amizade.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo número 05/56188-1) que financiou o projeto.
- À Universidade Estadual de Campinas, especialmente ao Instituto de Química - Departamento de Química Analítica, pela valiosa oportunidade concedida.
- Ao Prof. Dr. Paulo Imamura e seu aluno de doutorado Adriano Lopes Romero pela colaboração, parceria e ajuda com as análises de HPLC para os enantiômeros do ibuprofeno e disponibilização de solventes e coluna quiral para as análises de HPLC dos enantiômeros do propranolol.
- À Prof. Dra. Pierina Sueli Bonato e seu aluno de doutorado Igor Rafael dos Santos Magalhães pela colaboração, parceria e ajuda nas análises de HPLC para os enantiômeros da clorfeniramina.
- Aos técnicos: Ricardo do HPLC e Cláudia da espectroscopia e aos técnicos do ensino: Beth, Miria, Divino, Magnólia, Vilma, Micheli e Eraldo, por todo auxílio e amizade.
- Ao Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga, que enquanto colega integrante do grupo LAQQA forneceu os programas para os cálculos das figuras de mérito e por todo conhecimento transmitido.

- À minha família, meus pais Elizabeth Martins Valderrama e Osmar Valderrama, meus irmãos Leonardo Valderrama e Osmar Rogério Valderrama, obrigada pelo amor, carinho, incentivo e força durante toda minha vida e por sempre acreditar e incentivar todas as minhas decisões.
- Ao meu namorado, Paulo Henrique Março, pelo amor, carinho, companheirismo, ajuda e incentivo em todo esse período e por sua presença fundamental e incontestável para a realização deste trabalho.
- Aos colegas do grupo LAQQA: PH, Danilo, Laura, Luiz, Julio, Werickson, Diorginis, Renato e Marcelo, aos colegas ex-integrantes do grupo LAQQA: Gilmare, Jez, Alessandra, Ingrid, Luix, Waldomiro e Luciana, aos agregados do grupo LAQQA: Marcelo Sena e Cristina. Obrigada pelo apoio, companheirismo, amizade e pelos agradáveis momentos.
- A todos os meus familiares pelo incentivo.
- Às minhas amigas Geovanna, Gilmare e Rafaelle e ao Adriano, pelo convívio, companheirismo e amizade.
- Aos meus amigos de graduação e da minha cidade, que mesmo com a distância nunca deixaram de me apoiar e incentivar.
- A todos os doadores de plasma e urina.
- Enfim, meu agradecimento a todos os amigos, professores e funcionários do Instituto de Química da UNICAMP, e a todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho e para esta etapa de minha vida. Muito Obrigada!

## **Súmula curricular**

### **Dados Pessoais**

Nome – Patrícia Valderrama  
Nascimento – 09/04/1980  
Naturalidade – Japurá-PR  
E-mail: pativalderrama@gmail.com

### **Formação Acadêmica**

Mestre em Química, na área de Química Analítica – 2003/2004  
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas-SP, Brasil  
Título da dissertação: Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo.  
Orientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi

Graduação – Bacharelado em Química – 1998/2002  
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá-PR, Brasil

### **Experiência Profissional**

COCAMAR – Cooperativa Agroindustrial – 2002/2003  
Steviafarma Industrial S/A – 2001

### **Atividades Acadêmicas**

Monitoria Acadêmica – Programa de estágio docente (PED B) 08/2007 a 12/2007  
Disciplina – Química Analítica IV (QA416)  
Curso – Química  
Instituto de Química – UNICAMP

Monitoria Acadêmica – Programa de estágio docente (PED C) 03/2007 a 07/2007  
Disciplina – Química Analítica III (QA316)  
Curso – Química  
Instituto de Química – UNICAMP

Monitoria Acadêmica – Programa de estágio docente (PED C) 03/2005 a 07/2005  
Disciplina – Química Geral Experimental (QG109)  
Curso – Química e Farmácia  
Instituto de Química – UNICAMP

## **Publicações – últimos 5 anos**

1. Valderrama, P.; Poppi, R.J.; Determination of propranolol enantiomers in biological fluids by spectrofluorimetry using second-order standard addition method. *Analytical Biochemistry*, 2009, submetido para publicação.
2. Valderrama, P.; Romero, A.L.; Imamura, P.M.; Poppi, R.J.; Figures of merit in the quantification of ibuprofen enantiomers by chiral HPLC. *Journal of Chromatography Science*, 2009, aceito para publicação.
3. Valderrama, P.; Braga, J.W.B.; Poppi, R.J.; Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. *Química Nova*, 2009, aceito para publicação.
4. Valderrama, P.; Poppi, R.J.; Bilinear least squares (BLLS) and molecular fluorescence in the quantification of the propranolol enantiomers. *Analytica Chimica Acta*, 623(1), 38-45, 2008.
5. Valderrama, P.; Braga, J.W.B.; Poppi, R. J.; Validation of multivariate calibration models in the determination of sugar cane quality parameters by near infrared spectroscopy. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(2), 259-266, 2007.
6. Valderrama, P.; Braga, J.W.B.; Poppi, R. J.; Variable selection, outlier detection, and figures of merit in a partial least-squares regression multivariate calibration model. A case study for the determination of quality parameters in the alcohol industry by near-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8331-8338, 2007.

## **Trabalhos em eventos internacionais – últimos 5 anos**

1. Valderrama, P.; Poppi, R.J.; Direct determination of ibuprofen enantiomers in urine by spectrofluorimetry with the aid of second order advantage. 11<sup>th</sup> International Conference on Chemometrics for Analytical Chemistry. 2008, Montpellier – França.
2. Valderrama, P.; Poppi, R.J.; Quantification of propranolol enantiomers by partial least squares regression and near-infrared spectroscopy. 11<sup>th</sup> International Conference on Chemometrics for Analytical Chemistry. 2008, Montpellier – França.
3. Valderrama, P.; Romero, A.L.; Imamura, P.M.; Poppi, R.J.; Figuras de mérito na quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno por HPLC quiral. XII Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas. 2008, Florianópolis – Brasil.
4. Valderrama, P.; Poppi, R.J.; Determinação da composição enantiomérica de (R)- e (S)-propranolol para controle de qualidade em medicamento por calibração multivariada de primeira e segunda ordem a partir de espectros de fluorescência molecular. II Congreso Iberoamericano y IV Congreso Argentino de Química Analítica. Apresentação Oral. 2007, Buenos Aires – Argentina.

5. Valderrama, P.; Poppi, R.J.; Calibração multivariada de primeira e segunda ordem para controle de qualidade de matéria-prima dos enantiômeros (R)- e (S)-propranolol por espectroscopia de fluorescência molecular. II Congresso Iberoamericano y IV Congreso Argentino de Química Analítica. 2007, Buenos Aires – Argentina.

6. Valderrama, P.; Poppi, R.J.; Figures of merit for the determination of quality parameters in sugar cane industry by near infrared spectroscopy and multivariate calibration. 12<sup>th</sup> International Conference on Near-InfraRed Spectroscopy. 2005, Auckland – Nova Zelândia.

### **Trabalhos em eventos nacionais – últimos 5 anos**

1. Valderrama, P.; Poppi, R.J.; Determinação de enantiômeros do ibuprofeno em plasma e urina por espectrofluorimetria e método de adição padrão de segunda ordem. 32<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2009, Fortaleza – CE.

2. Valderrama, P.; Poppi, R.J.; Quantificação de enantiômeros empregando espectroscopia na região do ultravioleta e calibração multivariada. 31<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2008, Águas de Lindóia – SP.

3. Valderrama, P.; Poppi, R.J.; Mínimos quadrados bilineares e fluorescência molecular na quantificação de enantiômeros do propranolol. 14<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica. Apresentação Oral. 2007, João Pessoa - PB.

4. Valderrama, P.; Braga, J.W.B.; Poppi, R.J.; Determinação de (R)- e (S)-propranolol por calibração multivariada de primeira e segunda ordem utilizando fluorescência molecular. 30<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2007, Águas de Lindóia – SP.

5. Valderrama, P.; Silva, G.A.; Augusto, F.; Poppi, R.J.; Análise exploratória do perfil volátil de cervejas comerciais brasileiras através de HS-MEFS-CG e redes neurais artificiais. 39<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2007, Águas de Lindóia – SP.

6. Valderrama, P.; Braga, J.W.B.; Poppi, R.J.; Calibração multivariada e espectroscopia no infravermelho próximo na determinação do parâmetro POL em caldo de cana. 29<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2006, Águas de Lindóia – SP.

7. Valderrama, P.; Braga, J.W.B.; Poppi, R.J.; Figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de açúcares polarizáveis para indústria alcooleira utilizando espectroscopia no infravermelho próximo. 13<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica. 2005, Niterói - RJ.

8. Valderrama, P.; Braga, J.W.B.; Poppi, R.J.; Figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de sólidos solúveis em indústria alcooleira utilizando NIR. 28<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2005, Poços de Caldas - MG.

9. Valderrama, P.; Poppi, R.J.; Seleção de variáveis através de iPLS em calibração multivariada utilizando NIR para parâmetros de qualidade da indústria alcooleira. 28<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2005, Poços de Caldas - MG.

10. Valderrama, P.; Braga, J.W.B.; Poppi, R.J.; Identificação de amostras anômalas em calibração multivariada. Aplicação na determinação do Brix em caldo de cana por NIR. 28<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2005, Poços de Caldas - MG.

## **Cursos**

1. Multi-way analysis in chemistry – Learn to do it yourself

Ministrante: Rasmus Bro

10<sup>th</sup> International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, 2006, Águas de Lindóia – SP.

2. Multivariate and multiway calibration with special focus on uncertainty estimation

Ministrante: Klaas Faber

10<sup>th</sup> International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, 2006, Águas de Lindóia – SP.

3. Amostragem e validação de método analítico

Ministrante: Flávio Leite

V Semana de Química da UNICAMP, 2006, Campinas – SP.

4. Aplicações analíticas da espectroscopia no infravermelho próximo – NIR

Ministrante: Ronei Jesus Poppi

Associação Brasileira de Química – Seção Regional São Paulo, 2002, USP – São Paulo – SP.

## Resumo

### CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA DE PRIMEIRA E SEGUNDA ORDEM E FIGURAS DE MÉRITO NA QUANTIFICAÇÃO DE ENANTIÔMEROS POR ESPECTROSCOPIA

Autora: Patrícia Valderrama

Orientador: Ronei Jesus Poppi

Modelos de calibração de primeira e segunda ordem foram empregados no desenvolvimento de métodos para a quantificação de enantiômeros através de espectroscopia e complexação com  $\beta$ -ciclodextrina. No primeiro estudo, modelos de calibração de primeira ordem através do método de mínimos quadrados parciais (PLS) foram desenvolvidos para a quantificação dos enantiômeros do maleato de clorfeniramina através de espectroscopia no ultravioleta (UV) e na região do infravermelho próximo (NIR). No segundo caso, modelos de calibração de segunda ordem através dos métodos de análise de fatores paralelos (PARAFAC) e mínimos quadrados bilineares (BLLS) foram aplicados para a quantificação de enantiômeros do ibuprofeno por fluorescência molecular. Os enantiômeros do ibuprofeno foram também quantificados em plasma sanguíneo humano e urina humana pelo método de adição padrão de segunda ordem (SOSAM). O terceiro estudo consistiu na quantificação dos enantiômeros do propranolol por espectroscopia no UV, infravermelho médio, NIR e fluorescência molecular com calibração por PLS. Modelos de segunda ordem foram aplicados para a quantificação através dos métodos PARAFAC e BLLS. Por fim, os enantiômeros do propranolol foram quantificados em plasma sanguíneo humano e urina humana a partir do método SOSAM. Os métodos propostos foram validados através do cálculo de figuras de mérito e comparados com métodos de referência como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados obtidos pelos métodos desenvolvidos não apresentaram diferenças significativas em relação aos resultados obtidos pelo HPLC, conforme testes estatísticos aplicados. Os métodos propostos envolvendo espectroscopia e quimiometria para quantificação de enantiômeros se mostraram mais rápidos, eficientes, precisos e sensíveis e são uma alternativa aos métodos já existentes.

## Abstract

### FIRST AND SECOND ORDER MULTIVARIATE CALIBRATION AND FIGURES OF MERIT IN THE QUANTIFICATION OF THE ENANTIOMERS BY SPECTROSCOPY

Author: Patrícia Valderrama

Adviser: Ronei Jesus Poppi

First and second order multivariate calibration were developed for the quantification of enantiomers by spectroscopy and  $\beta$ -cyclodextrin guest-host complexes. In the first case, first order multivariate calibration was employed based on partial least square regression (PLS) for the quantification of the chlorpheniramine maleate enantiomers by ultraviolet (UV) and near infrared (NIR) spectroscopy. In the second case, second order multivariate calibration based on parallel factor analysis (PARAFAC) and bilinear least squares (BLLS) was applied for the quantification of the ibuprofen enantiomers by espectrofluorimetry. The ibuprofen enantiomers were, also, quantified in human plasma and urine samples by second order standard addition method (SOSAM). The third case, PLS was used for quantification of the propranolol enantiomers by UV, NIR, middle infrared and fluorescence spectroscopy. Second order multivariate calibration with PARAFAC e BLLS were, also, applied in the quantification. Finally, the propranolol enantiomers in human plasma and urine samples were analysed by SOSAM method. The proposed methods were validated through figures of merit calculation and compared with reference method as high performance liquid chromatography (HPLC). The results for the proposed methods do not presented significative difference, in conformity with statistic tests. The proposed methods using chemometrics and spectroscopy for the enantiomers quantification showed fast, efficient, with good precision and sensibility being an alternative to standard methods.

## Lista de Abreviaturas

ALS.....	Mínimos quadrados alternados
ANOVA.....	Análise de variância
ANVISA.....	Agência nacional de vigilância sanitária
ASTM.....	American society for testing and materials
BLLS.....	Mínimos quadrados bilineares
CLOR.....	Clorfeniramina
CLS.....	Mínimos quadrados clássicos
CD.....	Ciclodextrina
$\alpha$ -CD.....	Alfa-ciclodextrina
$\beta$ -CD.....	Beta-ciclodextrina
$\gamma$ -CD.....	Gama-ciclodextrina
DC.....	Dicroísmo circular
DTLD.....	Decomposição trilinear direta
EIV.....	Erros em variáveis
FDA.....	Food and drug administration
FIOCRUZ.....	Fundação Oswaldo Cruz
GA.....	Algoritmo genético
GC x GC-MS.....	Cromatografia gasosa bidimensional acoplada a espectrometria de massa
GC-MS.....	Cromatografia gasosa com detecção por espectrômetro de massas
HCD.....	Metodologia para o cálculo do sinal analítico líquido em dados de segunda ordem
HPLC.....	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD.....	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos
HPLC-MS.....	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrômetro de massas
IBU.....	Ibuprofeno
ICH.....	International conference on harmonisation's
INMETRO.....	Instituto nacional de metrologia, normalização e qualidade industrial

iPLS.....Mínimos quadrados parciais por intervalos  
 ISO.....International standard organization  
 IUPAC.....União internacional de química pura e aplicada  
 LD.....Limite de detecção  
 LQ.....Limite de quantificação  
 MCR.....Resolução multivariada de curvas  
 MIR.....Infravermelho médio  
 MKL.....Metodologia para o cálculo do sinal analítico líquido em dados de segunda ordem  
 MLR.....Regressão linear múltipla  
 MQ.....Média quadrática  
 MQ<sub>R</sub>.....Média quadrática devido à regressão  
 MQ<sub>r</sub>.....Média quadrática devido aos resíduos  
 MSEC.....Erro médio quadrático da calibração  
 MSEC<sub>p</sub>.....Pseudo erro médio quadrático da calibração  
 MSEC<sub>v</sub>.....Erro médio quadrático estimado por validação cruzada  
 NAR.....Posto analítico líquido  
 NAS.....Sinal analítico líquido  
 NIPALS.....Nonlinear interative partial least squares  
 NIR.....Infravermelho próximo  
 N-PLS.....Mínimos quadrados parciais multidimensional  
 PARAFAC .....Análise de fatores paralelos  
 PARALIND.....Análise de fatores com dependência linear  
 PCA.....Análise de componentes principais  
 PC.....Componente principal  
 PCR.....Regressão por componentes principais  
 PDF.....Pseudograus de liberdade  
 PHAs.....Hidrocarbonetos poliaromáticos  
 PLS .....Mínimos quadrados parciais  
 PRO.....Propranolol  
 RMSEC.....Raiz quadrada do erro médio quadrático da calibração  
 RMSEC<sub>v</sub>.....Raiz quadrado do erro médio quadrático de validação cruzada

RMSEP.....Raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão  
RMN<sup>1</sup>H.....Ressonância magnética nuclear de próton  
s(ê).....Desvio padrão residual total do conjunto de calibração  
s(ê<sub>i</sub>).....Desvio padrão residual de uma amostra i  
SDV.....Desvio padrão dos erros da validação  
SOSAM.....Método de adição padrão de segunda ordem  
SQ<sub>R</sub>.....Soma quadrática devido à regressão  
SQ<sub>r</sub>.....Soma quadrática residual  
SQ<sub>T</sub>.....Soma quadrática total  
SVD.....Decomposição em valores singulares  
TPhT.....Trifeniltina  
USP.....United States Pharmacopeia  
UV.....Ultravioleta  
VL.....Variável latente  
V(PE).....Variância nos erros de previsão  
WBKGT.....Metodologia para o cálculo do sinal analítico líquido em dados de segunda ordem

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Propriedades físico-químicas das CDs. ....	10
<b>Tabela 2.</b> Resultados para os testes de identificação de anomalias para os modelos PLS para os enantiômeros da CLOR.....	92
<b>Tabela 3.</b> Figuras de mérito para o modelo PLS/UV na quantificação da (S)-CLOR. ....	97
<b>Tabela 4.</b> Percentagem de recobrimento dos intervalos de confiança.....	102
<b>Tabela 5.</b> Limites médios dos intervalos de confiança estimados.....	103
<b>Tabela 6.</b> Figuras de mérito para a técnica HPLC na quantificação da (S)-CLOR. ....	105
<b>Tabela 7.</b> Resultados para a quantificação da (S)-CLOR. ....	106
<b>Tabela 8.</b> Resultados para os modelos de segunda ordem na quantificação do (S)-IBU. ....	121
<b>Tabela 9.</b> Figuras de mérito para os modelos BLLS na quantificação do (S)-IBU. ....	125
<b>Tabela 10.</b> Figuras de mérito para a técnica HPLC na quantificação do (S)-IBU. ....	129
<b>Tabela 11.</b> Resultados para a quantificação do (S)-IBU. ....	130
<b>Tabela 12.</b> Resultados SOSAM para quantificação do (S)-IBU. ....	135
<b>Tabela 13.</b> Número de amostras anômalas excluídas para a validação dos modelos PLS na quantificação dos enantiômeros do PRO.....	153
<b>Tabela 14.</b> Resultados para os modelos PLS na quantificação do (R)-PRO.....	154
<b>Tabela 15.</b> Resultados dos modelos de segunda ordem na quantificação do (R)-PRO.....	162
<b>Tabela 16.</b> Figuras de mérito para os modelos BLLS na quantificação do (R)-PRO. ....	164
<b>Tabela 17.</b> Figuras de mérito para a técnica HPLC na quantificação do (R)-PRO. ....	168
<b>Tabela 18.</b> Resultados para a quantificação do (R)-PRO. ....	170
<b>Tabela 19.</b> Resultados SOSAM para quantificação do (R)-PRO. ....	177

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Efeitos teratogênicos decorrentes do uso de talidomida durante a gravidez.....	4
<b>Figura 2.</b> Estrutura das ciclodextrinas.....	9
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da formação do complexo de inclusão....	11
<b>Figura 4.</b> Decomposição em variáveis latentes das matrizes <b>X</b> e <b>Y</b> para modelos PLS.....	20
<b>Figura 5.</b> Seleção de variáveis pelo iPLS. ....	26
<b>Figura 6.</b> Elementos do GA. ....	28
<b>Figura 7.</b> Cruzamento único e duplo no GA.....	29
<b>Figura 8.</b> Codificação de espectros na forma de cromossomo.....	32
<b>Figura 9.</b> Decomposição efetuada pelo PARAFAC. ....	37
<b>Figura 10.</b> Decomposição dos dados em tríades. ....	37
<b>Figura 11.</b> Método BLLS. <b>a.</b> Procedimento de Vetorização e CLS. <b>b.</b> Obtenção do perfil espectral da matriz estimada por SVD. <b>c.</b> Estimativa da concentração para uma amostra. ....	40
<b>Figura 12.</b> Representação geométrica da propriedade de ortogonalidade do NAS. ....	56
<b>Figura 13.</b> Sinal analítico líquido em calibração de segunda ordem.....	60
<b>Figura 14.</b> Estrutura do maleato de clorfeniramina. <b>(A)</b> isômero (S)-CLOR. <b>(B)</b> isômero (R)-CLOR. ....	79
<b>Figura 15.</b> Complexo de inclusão. <b>(A)</b> clorfeniramina com a $\beta$ -CD. <b>(B)</b> substrato da feniramina com $\gamma$ -CD.....	82
<b>Figura 16.</b> Espectros na região do infravermelho próximo para as amostras do maleato de clorfeniramina. <b>(A)</b> região total. <b>(B)</b> região utilizada na calibração com eliminação da absorção da água.....	87
<b>Figura 17.</b> Espectros na região do ultravioleta para as amostras do maleato de clorfeniramina.....	88
<b>Figura 18.</b> RMSECV para cada intervalo dos espectros NIR onde foi desenvolvido um modelo PLS independente. ....	93

<b>Figura 19.</b> Região da elipse de confiança para o intercepto e a inclinação da regressão entre as frações molares previstas pelo modelo PLS e as frações molares teóricas para o enantiômero (S)-CLOR na mistura. (•) ponto onde o intercepto é igual a zero e a inclinação igual a um. ....	97
<b>Figura 20.</b> Ajuste do modelo PLS para quantificação do enantiômero (S)-CLOR. (A) Referência versus estimado. (B) Ajuste NAS. Amostras de calibração (•) e validação (*). ....	99
<b>Figura 21.</b> Resíduos do modelo para quantificação dos enantiômeros da clorfeniramina. Amostras de calibração (•) e validação (*). ....	101
<b>Figura 22.</b> Cromatograma do derivado do maleato de clorfeniramina racêmico. ....	104
<b>Figura 23.</b> Estrutura do ibuprofeno. (A) isômero (S)-IBU. (B) isômero (R)-IBU. ....	112
<b>Figura 24.</b> Complexação do ibuprofeno com a $\beta$ -ciclodextrina. ....	113
<b>Figura 25.</b> Mapas de contorno de fluorescência molecular do ibuprofeno complexado com $\beta$ -CD na presença de 1-butanol. (A) ibuprofeno racêmico (B) (S)-IBU. ....	120
<b>Figura 26.</b> Scores do modelo PARAFAC para os enantiômeros do ibuprofeno. ....	120
<b>Figura 27.</b> Perfis espectrais recuperados pelo método PARAFAC. (A) Excitação. (B) Emissão. - (S)-IBU; - (R)-IBU. ....	122
<b>Figura 28.</b> Perfis espectrais recuperados pelo método BLLS para o enantiômero (S)-IBU. (A) Excitação. (B) Emissão. ....	122
<b>Figura 29.</b> Perfis espectrais experimentais para o enantiômero (S)-IBU. (A) Excitação. (B) Emissão. ....	123
<b>Figura 30.</b> Mapas de contorno de fluorescência para o enantiômero (S)-IBU. (A) superfície experimental, (B) superfície reconstruída pelo método BLLS. ....	124
<b>Figura 31.</b> Ajuste do modelo BLLS para quantificação do enantiômero (S)-IBU. Amostras de calibração (•) e validação (*). ....	126
<b>Figura 32.</b> Região da elipse de confiança para o intercepto e a inclinação da regressão entre as frações molares previstas pelo modelo BLLS e as frações molares teóricas para o enantiômero (S)-IBU na mistura. (•) ponto onde o intercepto é igual a zero e a inclinação igual a um. ....	127
<b>Figura 33.</b> Cromatograma do ibuprofeno racêmico. ....	129

- Figura 34.** Mapas de contorno para uma amostra de plasma. **(A)** amostra de plasma puro. **(B)** amostra de plasma na presença de ibuprofeno racêmico na concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L..... 132
- Figura 35.** Mapas de contorno para uma amostra de urina. **(A)** amostra de urina pura. **(B)** amostra de urina na presença de ibuprofeno racêmico na concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L..... 133
- Figura 36.** Scores do modelo PARAFAC para três amostras diferentes na quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno. **(A)** plasma dos três doadores, **(B)** urina dos três doadores..... 134
- Figura 37.** Curva de adição padrão de segunda ordem para os enantiômeros do ibuprofeno. **(A)** plasma de um doador, **(B)** urina de um doador..... 136
- Figura 38.** Estrutura do propranolol. **(A)** isômero (R)-PRO. **(B)** isômero (S)-PRO. .... 142
- Figura 39.** Projeção computacional do complexo de inclusão do propranolol com a  $\beta$ -CD. **(A)** (S)-PRO. **(B)** (R)-PRO..... 143
- Figura 40.** Imagem gráfico-computacional do complexo de inclusão do (R)-PRO com a  $\beta$ -CD. .... 144
- Figura 41.** Espectros dos enantiômeros do propranolol. **(A)** região UV. **(B)** Emissão de fluorescência molecular. **(C)** região NIR. **(D)** região MIR..... 152
- Figura 42.** Ajuste do modelo PLS para quantificação dos enantiômeros do propranolol no fármaco. **(A)** UV. **(B)** Fluorescência molecular. **(C)** NIR. **(D)** MIR. (•) amostra de calibração. (\*) amostra de validação. .... 155
- Figura 43.** Ajuste do modelo PLS para quantificação dos enantiômeros do propranolol na preparação farmacêutica. **(A)** UV. **(B)** Fluorescência molecular. **(C)** NIR. **(D)** MIR. (•) amostra de calibração. (\*) amostra de validação..... 156
- Figura 44.** Superfície de fluorescência **(A)** e mapa de contorno **(B)** para uma amostra de fármaco..... 158
- Figura 45.** Seleção de variáveis pelo iPLS para os enantiômeros do propranolol. .... 160
- Figura 46.** Mapas de contorno de fluorescência molecular do propranolol complexado com  $\beta$ -CD na presença de 1-butanol. **(A)** (S)-PRO. **(B)** propranolol racêmico. **(C)** (R)-PRO..... 161
- Figura 47.** Mapas de contorno de fluorescência para o enantiômero (R)-PRO. **(A)** superfície experimental, **(B)** superfície reconstruída pelo método BLLS..... 164

<b>Figura 48.</b> Ajuste do modelo BLLS para quantificação do enantiômero (R)-PRO. (A) Fármaco. (B) Preparação farmacêutica. Amostras de calibração (•) e validação (*).	165
<b>Figura 49.</b> Região da elipse de confiança para o intercepto e a inclinação da regressão entre as frações molares previstas pelo modelo BLLS e as frações molares teóricas para o enantiômero (R)-PRO. (A) Fármaco. (B) Preparação farmacêutica. (•) ponto onde o intercepto é igual a zero e a inclinação igual a um.	166
<b>Figura 50.</b> Cromatograma do propranolol racêmico.	168
<b>Figura 51.</b> Estrutura do dipiridamol (A) e da amilorida (B).	171
<b>Figura 52.</b> Mapas de contorno para uma amostra de plasma. (A) amostra de plasma puro. (B) amostra de plasma na presença de propranolol racêmico na concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L.	172
<b>Figura 53.</b> Mapas de contorno para uma amostra de urina. (A) amostra de urina pura. (B) amostra de urina na presença de propranolol racêmico na concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L.	173
<b>Figura 54.</b> Scores do modelo PARAFAC para três amostras diferentes na quantificação dos enantiômeros do propranolol. (A) plasma dos três doadores. (B) urina dos três doadores.	174
<b>Figura 55.</b> Perfis espectrais do plasma recuperados pelo método PARAFAC. (A) Excitação. (B) Emissão. - (S)-PRO; - (R)-PRO; - interferente 1.	176
<b>Figura 56.</b> Perfis espectrais da urina recuperados pelo método PARAFAC. (A) Excitação. (B) Emissão. - (S)-PRO; - (R)-PRO; - interferente 1; - interferente 2.	176
<b>Figura 57.</b> Curva de adição padrão de segunda ordem para os enantiômeros do propranolol. (A) plasma de um doador. (B) urina de um doador.	178

## Sumário

Prefácio .....	xxix
Capítulo I .....	1
1.1. Introdução .....	3
1.2. Análise de enantiômeros .....	5
1.3. Auxiliares quirais .....	8
1.4. Álcoois e complexos de inclusão com ciclodextrinas .....	12
Capítulo II .....	15
2.1. Calibração multivariada de primeira ordem .....	17
2.1.1. Mínimos quadrados parciais (PLS) .....	18
2.1.2. Identificação de amostras anômalas em calibração de primeira ordem .....	21
2.1.3. Seleção de variáveis em calibração de primeira ordem .....	24
2.2. Calibração multivariada de segunda ordem .....	35
2.2.1. Análise de fatores paralelos (PARAFAC) .....	36
2.2.2. Mínimos quadrados bilineares (BLLS) .....	39
2.2.3. Adição padrão de segunda ordem (SOSAM) .....	41
2.3. Avaliação dos modelos de calibração – Teste de significância .....	43
2.3.1. Análise da variância (ANOVA) .....	43
2.3.2. Teste t-pareado .....	45
Capítulo III .....	47
3.1. Validação e figuras de mérito .....	49
3.2. Figuras de mérito e calibração univariada .....	50
3.3. Figuras de mérito e calibração multivariada .....	54
3.3.1. Sinal analítico líquido (NAS) .....	54
3.3.2. Cálculo de figuras de mérito em calibração multivariada .....	62
3.4. Considerações finais .....	74
Capítulo IV .....	77
Quantificação de enantiômeros do maleato de clorfeniramina .....	79
4.1. Objetivos .....	79
4.2. Maleato de clorfeniramina .....	79
4.3. Análise de enantiômeros da clorfeniramina .....	80
4.4. Descrição experimental .....	83
4.4.1. Reagentes .....	83
4.4.2. Preparo das amostras para medidas espectroscópicas .....	84
4.4.3. Preparo das amostras para análise por HPLC .....	84
4.5. Resultados e discussão .....	86
4.6. Conclusões do capítulo .....	106
Capítulo V .....	109
Quantificação de enantiômeros do ibuprofeno .....	111
5.1. Objetivos .....	111

<b>5.2. Ibuprofeno</b> .....	111
<b>5.3. Análise de enantiômeros do ibuprofeno</b> .....	112
<b>5.4. Descrição experimental</b> .....	114
<b>5.4.1. Reagentes</b> .....	114
<b>5.4.2. Preparo das amostras para medidas espectroscópicas</b> .....	115
<i>Fluorescência molecular do ibuprofeno</i> .....	115
<i>Fluorescência molecular no ibuprofeno em plasma e urina</i> .....	115
<b>5.4.3. Preparo das amostras para análise por HPLC</b> .....	117
<b>5.5. Resultados e discussão</b> .....	118
<b>5.5.1. Resultados e discussão para a quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno</b> .....	118
<b>5.5.2. Resultados e discussão para a quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma e urina</b> .....	131
<b>5.6. Conclusões do capítulo</b> .....	137
<b>Capítulo VI</b> .....	139
<b>Quantificação de enantiômeros do propranolol</b> .....	141
<b>6.1. Objetivos</b> .....	141
<b>6.2. Propranolol</b> .....	141
<b>6.3. Análise de enantiômeros do propranolol</b> .....	143
<b>6.4. Descrição experimental</b> .....	145
<b>6.4.1. Reagentes</b> .....	145
<b>6.4.2. Preparo das amostras para medidas espectroscópicas</b> .....	146
<i>Ultravioleta, infravermelho próximo e médio do fármaco e da preparação farmacêutica</i> .....	146
<i>Fluorescência molecular do fármaco e da preparação farmacêutica</i> .....	147
<i>Fluorescência molecular do fármaco em plasma sanguíneo e urina</i> .....	148
<b>6.4.3. Preparo das amostras para análise por HPLC</b> .....	150
<b>6.5. Resultados e discussão</b> .....	151
<b>6.5.1. Resultados e discussão para a quantificação dos enantiômeros do propranolol com calibração de primeira ordem</b> .....	151
<b>6.5.2. Resultados e discussão para a quantificação dos enantiômeros do propranolol com calibração de segunda ordem</b> .....	157
<b>6.5.3. Resultados e discussão para a quantificação dos enantiômeros do propranolol em plasma e urina</b> .....	170
<b>6.6. Conclusões do capítulo</b> .....	179
<b>Capítulo VII</b> .....	181
<b>7.1. Conclusões gerais</b> .....	183
<b>Capítulo VIII</b> .....	187
<b>8.1. Perspectivas futuras</b> .....	189
<b>Capítulo IX</b> .....	191
<b>9.1. Referências</b> .....	193

## Prefácio

A questão da quiralidade dos fármacos passou a ter maior importância com os problemas gerados na administração da talidomida. A partir de então, a química analítica se preocupa em desenvolver métodos eficientes e seguros para a quantificação de enantiômeros em fármacos e em fluidos biológicos, visando estudos de farmacocinética e farmacodinâmica.

Dentre as técnicas para analisar enantiômeros, a cromatografia líquida de alta eficiência é, sem dúvida, a mais difundida e utilizada. Porém, com esta técnica, muitas vezes a análise é demorada e dispendiosa sendo necessário empregar derivatizações do fármaco e gerando muitos resíduos.

Com o avanço da instrumentação uma quantidade cada vez maior de dados está sendo gerada. Para o processamento e tratamento desses dados a quimiometria muitas vezes se faz presente.

As medidas físicas são relacionadas à propriedade de interesse através de uma função matemática em uma prática conhecida como calibração. Quando se obtém um único valor escalar para cada amostra a calibração é dita univariada ou de ordem zero. Por outro lado, quando os dados obtidos para uma amostra podem ser arranjados no formato de um vetor a calibração é conhecida como sendo de primeira ordem. Ainda, podendo se obter uma matriz de dados para cada amostra tem-se uma calibração de segunda ordem.

Dentre os métodos de calibração, a calibração de ordem zero é a mais conhecida e aplicada. Seu emprego é relativamente fácil e a maioria das técnicas para quantificar enantiômeros fazem uso desse tipo de calibração. Porém, a calibração univariada é muito restrita, tendo em vista que a amostra deve estar livre de interferentes. Assim, muitas vezes é necessário muito trabalho com preparo da amostra para a análise. A calibração de primeira ordem permite a calibração na presença de interferentes, desde que, estes também estejam presentes na etapa de calibração. Por outro lado, a calibração de segunda ordem pode ser realizada na presença de interferentes desconhecidos, mesmo que estes não estejam presentes nas amostras da calibração. A calibração multivariada permite ainda que sejam realizadas determinações simultâneas e análise mesmo

sem resolução, o que as torna uma alternativa bastante atrativa quando os métodos univariados não têm aplicabilidade.

Os métodos para analisar enantiômeros sempre utilizam um auxiliar quiral para a separação e em muitas aplicações este auxiliar é a  $\beta$ -ciclodextrina. A formação de um complexo de inclusão dos enantiômeros de um fármaco com moléculas como a  $\beta$ -ciclodextrina vem se mostrando muito eficiente na determinação da composição enantiomérica. A medida deste complexo através de métodos espectroscópicos permite observar diferenças espectrais sutis, de acordo com a quantidade de enantiômero presente na amostra.

Desta forma, a aplicação de métodos quimiométricos a estes espectros pode fornecer resultados favoráveis para a quantificação de enantiômeros. Além disso, favorece a determinação em fluidos biológicos onde sempre estarão presentes muitos interferentes.

Toda vez que um procedimento analítico é proposto ou desenvolvido é necessário que este seja validado para garantir um desempenho adequado para as condições nas quais ele será aplicado. Essa validação pode ser atestada pela determinação de parâmetros conhecidos como figuras de mérito.

A validação de modelos de calibração de primeira ordem já é bem estabelecida, porém, para a calibração de segunda ordem ainda existe certa dificuldade que, de certa forma, limita suas aplicações. A maneira correta de realizar a validação em calibração de segunda ordem vem sendo tema de pesquisas recentes e o número de trabalhos que determinam tais parâmetros ainda é bem pequeno. Portanto, para o desenvolvimento da calibração de segunda ordem é necessária uma quantidade maior de pesquisas que verifiquem a coerência dos resultados já encontrados.

Levando em consideração os aspectos descritos, o presente trabalho de tese de doutorado teve como principal objetivo a aplicação de métodos quimiométricos associados à técnicas espectroscópicas para a quantificação de enantiômeros. Os modelos de calibração multivariada desenvolvidos foram validados através do cálculo das figuras de mérito e por comparação com resultados obtidos com técnicas de referência como a cromatografia líquida de alta eficiência.

A presente tese está dividida em 9 capítulos, incluindo conclusões, perspectivas futuras e as referências utilizadas. No primeiro capítulo, é feita uma introdução sobre o assunto abordado, as técnicas empregadas para a análise de enantiômeros e os auxiliares quirais utilizados.

Nos capítulos 2 e 3 são descritos os métodos quimiométricos e estatísticos utilizados e a maneira como devem ser estimadas as figuras de mérito, respectivamente.

O capítulo 4 trata da quantificação dos enantiômeros do maleato de clorfeniramina a partir de espectros na região do ultravioleta e infravermelho próximo e calibração multivariada de primeira ordem através do método PLS.

No capítulo 5 é proposta a quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno por calibração multivariada de segunda ordem através dos métodos PARAFAC e BLLS a partir de dados de fluorescência molecular. Neste capítulo também é abordado a quantificação direta dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma sanguíneo humano e urina humana através do método de adição padrão de segunda ordem.

O capítulo 6 apresenta os resultados para a quantificação dos enantiômeros do propranolol a partir de calibração multivariada de primeira e segunda ordem e a quantificação desses enantiômeros em fluidos biológicos como o plasma sanguíneo e a urina humana. Na calibração de primeira ordem o método PLS é aplicado à espectros na região do ultravioleta, infravermelho próximo e médio e espectros de emissão de fluorescência obtidos em comprimento de onda de excitação fixo. A calibração de segunda ordem emprega os métodos PARAFAC e BLLS na quantificação dos enantiômeros a partir da espectroscopia de fluorescência molecular. Por fim, a quantificação dos enantiômeros do propranolol no plasma sanguíneo humano e na urina humana é realizada através do método SOSAM.

Os capítulos 7, 8 e 9 apresentam as conclusões da tese em termos gerais, as perspectivas futuras e as referências utilizadas durante a tese, respectivamente.

# ***Capítulo I***

## 1.1. Introdução

Os medicamentos racêmicos apresentam em sua composição quantidades iguais dos dois enantiômeros. Estes medicamentos, entretanto, podem apresentar atividades farmacológicas estereosseletivas através de processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção<sup>1</sup>.

Observações a respeito de diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmicas em medicamentos racêmicos levaram a questão da quiralidade a ser considerada na síntese de produtos farmacêuticos e órgãos governamentais em diversos países vêm enfatizando a necessidade de se ter informações sobre estereosseletividade de fármacos quirais além de recomendar a produção de fármacos na forma de enantiômeros puros. Os fármacos já comercializados na forma de racematos passaram a ser exaustivamente estudados, no sentido de se avaliar se existem vantagens na produção como enantiômero puro<sup>1</sup>.

A necessidade de informações sobre as propriedades físico-químicas, cinéticas e dinâmicas estereosseletivas de fármacos quirais bem como a recomendação da produção de novos fármacos na forma de enantiômeros puros e estudos sobre fármacos já comercializados como racemato vem sendo regularizada por autoridades governamentais como, por exemplo, o Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos e órgãos equivalentes no Japão, Canadá e Comunidade Européia<sup>1</sup>. No Brasil, os aspectos conceituais dos medicamentos enantiomericamente puros, o impacto no mercado mundial e a política de medicamentos são tópicos considerados pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e a Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina<sup>2</sup>.

A importância do desenvolvimento de metodologias para o estudo e quantificação de enantiômeros em fármacos, matéria-prima na indústria farmacêutica e mesmo no organismo humano, por exemplo, através da quantificação de enantiômeros em fluídos biológicos como plasma sanguíneo e urina, podem ser ressaltados pelo exemplo mais clássico de problemas causados por uso de medicamentos racêmicos, o do fármaco talidomida.

A administração deste fármaco para combater sintomas associados à gravidez, como insônia e enjoos, trouxe como consequência entre os anos de 1958 e 1962, principalmente na Alemanha e Inglaterra, o nascimento de milhares de crianças com deformações físicas<sup>3</sup>. A Figura 1 mostra algumas anomalias de formação causadas pelo enantiômero (S)-talidomida.



**Figura 1.** Efeitos teratogênicos decorrentes do uso de talidomida durante a gravidez<sup>4,5</sup>.

O principal efeito teratogênico é caracterizado por malformações raras nos membros, redução no comprimento ósseo dos membros, geralmente afetando mais os braços do que as pernas e envolvendo ambos os lados, direito e esquerdo, em diferentes proporções. Doenças cardíacas congênitas, anomalias oculares, intestinais e do trato genitourinário, hipoplasia óssea, paralisia facial e malformações no ouvido externo e interno são também efeitos causados pela talidomida<sup>5,6</sup>.

As propriedades teratogênicas da talidomida foram relacionadas ao enantiômero (S)-talidomida após investigações a respeito de sua estereosseletividade<sup>1,7</sup>. Infelizmente, estudos posteriores constataram uma inversão de configuração da talidomida, evidenciando que mesmo com a administração do enantiômero (R)-talidomida, este sofreria conversão parcial no isômero responsável pelo efeito teratogênico<sup>1</sup>.

A constatação dos efeitos teratogênicos provocados pela talidomida no início da década de 60 representou um marco na conscientização do risco da administração de fármacos em sua forma racêmica<sup>7</sup>.

## 1.2. Análise de enantiômeros

A análise de enantiômeros é um assunto importante tanto na ciência quanto na tecnologia. As diferenças entre as propriedades fisiológicas e os efeitos terapêuticos da forma enantiomérica de muitos compostos, bem como a interconversão de isômeros *in vivo*, vem sendo reconhecidos e estudados. Entretanto, por razões econômicas e dificuldades nos processos de produção, a maioria dos fármacos quirais obtidos por vias sintéticas são ainda comercializados

como racemato, ou seja, mistura contendo quantidades iguais dos dois enantiômeros.

Dentre os métodos já estudados para a análise de enantiômeros a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês, High Performance Liquid Chromatographic) é a técnica mais utilizada para a separação de enantiômeros. Porém, essa técnica requer além de coluna com fase estacionária quiral, altos volumes de solventes orgânicos que compõem a fase móvel para a eluição do fármaco, os quais são caros e podem levar à contaminação ambiental se não forem descartados corretamente<sup>1</sup>. Aliado a esses fatores, um número limitado de combinações seguras entre fases quirais (seletores) e enantiômeros tem sido desenvolvida com respeito à separabilidade, magnitude da enantioseletividade, ordem de eluição e condições cromatográficas apropriadas. Frequentemente, o desenvolvimento de uma fase quiral para um par específico de enantiômeros requer um número considerável de experimentos e pode demandar muito tempo, muito material e muito trabalho<sup>8</sup>.

Os últimos anos foram marcados pela implementação da eletroforese capilar<sup>9,10</sup> na separação de enantiômeros. A grande desvantagem apresentada por esta técnica para esta finalidade são os procedimentos de preparo de amostra, cujo principal objetivo é a eliminação de interferentes e concentração dos analitos para se tornarem compatíveis com o sistema utilizado. Deste modo, técnicas como a extração líquido-líquido, extração em fase sólida, microextração em fase sólida e extração com membranas são empregadas para viabilizar a aplicação da eletroforese capilar<sup>1</sup>.

Outra técnica analítica bastante empregada na separação de enantiômeros é a cromatografia gasosa. Esta técnica também emprega colunas com fases estacionárias quirais e, além disso, requer como pré-requisito para sua utilização a volatilidade e estabilidade térmica o que restringe seu uso<sup>11</sup>.

Muitas outras técnicas têm sido empregadas na análise de enantiômeros como: ressonância magnética nuclear de hidrogênio<sup>12</sup>, dicroísmo circular<sup>13</sup>, fluorescência com primeira derivada<sup>14</sup>, dentre outras.

Recentemente, a aplicação de técnicas associadas à métodos quimiométricos para determinação de enantiômeros começou a se desenvolver. A espectroscopia de reflectância difusa no infravermelho combinada com redes neurais artificiais foi empregada na análise da pureza enantiomérica de terbutalina<sup>15</sup>. Busch, et. all<sup>16</sup> determinaram a composição enantiomérica de 2-fenilglicina através de espectroscopia na região do ultravioleta-visível e calibração por mínimos quadrados parciais (PLS). Estes mesmos autores possuem uma patente<sup>17</sup> sobre o assunto e determinaram a composição enantiomérica do ibuprofeno e da norefedrina<sup>18</sup>, norepinefrina-L-bitartarato, efedrina, norefedrina e triptofano<sup>19</sup> através da mesma metodologia. A composição enantiomérica da fenilalanina foi determinada através do espectro de emissão de fluorescência molecular e calibração multivariada<sup>20</sup>. Tran et. all.<sup>21</sup> determinaram a composição enantiomérica de aminoácidos através de espectroscopia na região do infravermelho próximo e calibração multivariada. Estes autores determinaram também a composição enantiomérica do propranolol, atenolol e ibuprofeno pela mesma metodologia<sup>22</sup>.

O desenvolvimento de métodos analíticos adequados para determinar precisamente as quantidades dos enantiômeros de um fármaco, seja em fluídos biológicos ou em preparações farmacêuticas, é um pré-requisito essencial para estabelecer os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos e controlar a qualidade, respectivamente. Desta maneira, métodos mais rápidos e com menor custo, bem como métodos precisos e confiáveis, devem ser desenvolvidos e testados.

### 1.3. Auxiliares quirais

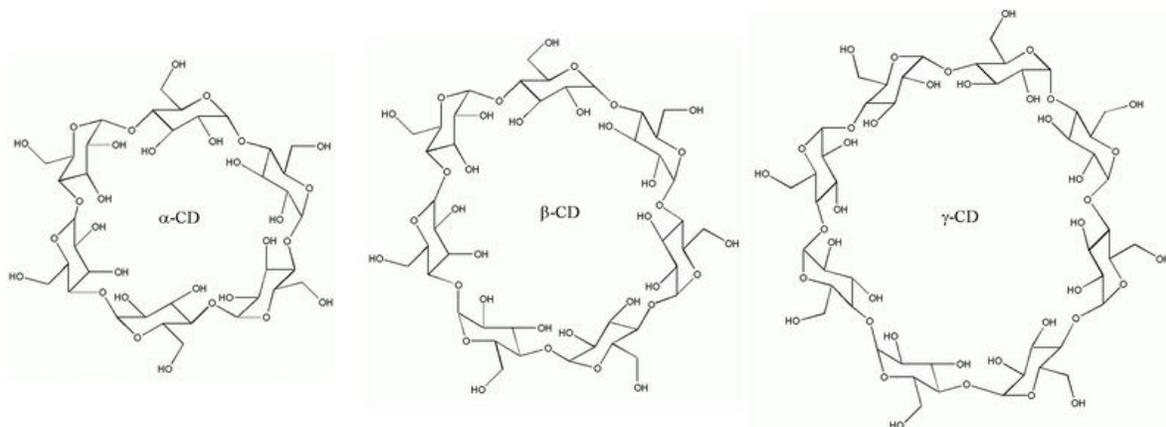
Os auxiliares quirais são reagentes que promovem interações seletivas entre os dois isômeros ópticos. Atualmente uma grande variedade de auxiliares quirais está disponível, podendo ser de origem natural, semi-sintéticos e sintéticos<sup>9</sup>.

Na classe de auxiliares quirais de origem natural estão disponíveis os carboidratos como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -ciclodextrinas (oligossacarídeos), sacarose (dissacarídeo), amido e celulose (polissacarídeos), dentre outros<sup>9</sup>.

As técnicas cromatográficas para separação de enantiômeros empregam os auxiliares quirais imobilizados sob um suporte inerte, são as chamadas colunas com fase estacionárias quirais<sup>23</sup>.

Dentre os vários auxiliares quirais ou seletores quirais existentes, as ciclodextrinas, CDs, e seus derivados são reconhecidos como os mais importantes e estima-se que cerca de 80% das separações enantioméricas são obtidas por seu uso<sup>1</sup>.

As CDs são moléculas cíclicas de oligossacarídeos quirais de origem natural com forma similar à de um cone truncado e suas dimensões variam com o número de unidades de glicose sendo, então, denominadas de  $\alpha$ -  $\beta$ - ou  $\gamma$ -CD<sup>24</sup>, como mostra a Figura 2.



**Figura 2.** Estrutura das ciclodextrinas<sup>25</sup>.

O diâmetro e o volume da cavidade variam com o número de unidades de glicose no anel da ciclodextrina e a diferença no diâmetro da cavidade interna de cada CD mostra uma capacidade diferente de formação de complexos de inclusão, com diferentes tamanhos de moléculas hóspedes<sup>25,26</sup>.

A Tabela 1 mostra as propriedades físico-químicas das CDs e as diferenças entre as formas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .

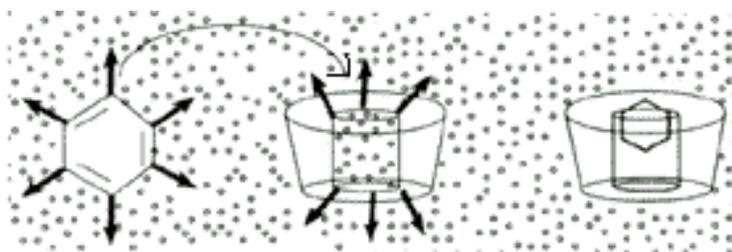
**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas das CDs<sup>25</sup>.

<b>Propriedades</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b><math>\beta</math></b>	<b><math>\gamma</math></b>
<b>Número de unidades de glicose</b>	6	7	8
<b>Massa Molar (g/mol)</b>	972	1135	1297
<b>Solubilidade em água (g/100mL), 25°C</b>	14,5	1,85	23,2
<b>Diâmetro interno da cavidade (nm)</b>	47 – 53	60 – 65	75 – 83
<b>Diâmetro externo da cavidade (nm)</b>	146	154	175
<b>Volume da cavidade (nm<sup>3</sup>)</b>	1740	2620	4720
<b>Profundidade da cavidade (nm)</b>	7,9	7,9	7,9
<b>pka (25°C)</b>	12,3	12,2	12,1
<b>Número de moléculas de água na cavidade</b>	6	11	17
<b>Ponto de fusão (°C)</b>	275	280	275

A natureza hidrofóbica da cavidade interna é outro fator que contribui para formação de complexos por inclusão molecular. Moléculas de tamanho, forma e hidrofobicidade adequada são capazes de interagir de forma não covalente<sup>26</sup>. Desta interação resultam complexos de inclusão que são estabilizados por várias forças intermoleculares, tais como: forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio<sup>8,25</sup>.

As condições mínimas para a formação de complexos de inclusão com CDs é que a molécula hóspede se adeque inteiramente, ou ao menos parcialmente, dentro da cavidade da CD. Complexos estáveis não serão formados com moléculas hóspedes pequenas que poderão escapar do interior da cavidade da CD. A formação de complexo de inclusão com CD é impossível com moléculas que não possam penetrar em sua cavidade, mas, se certos grupos ou cadeias laterais da molécula volumosa conseguem se acomodar na cavidade da CD, a formação do complexo se torna possível<sup>25,26</sup>.

A Figura 3 apresenta um exemplo típico de formação de complexo de inclusão com CD. As moléculas de água internas à cavidade da CD no início da reação são substituídas pela molécula hóspede.



**Figura 3.** Representação esquemática da formação do complexo de inclusão<sup>25</sup>.

Na ausência de uma molécula hóspede, a cavidade menos hidrofílica, que atua como hospedeira, é ocupada por moléculas de água. Contudo, uma molécula hóspede adequada, quando adicionada à solução de CD, expulsa as moléculas de água e ocupa ela própria esta cavidade<sup>25,26</sup>.

No caso de reconhecimento quiral os analitos apresentam tipicamente funções aromáticas ligadas ao centro quiral da molécula bem como um grupo polar ou ligação de hidrogênio. Assim, a parte aromática será a porção que entrará na cavidade hidrofóbica da CD enquanto o grupo polar interage com as hidroxilas que cercam sua cavidade<sup>24,27</sup>.

Alguns autores compararam as Cds e sua eficiência na formação do complexo de inclusão. Busch et. al.<sup>19</sup> fizeram a complexação dos fármacos ibuprofeno e norefedrina com  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD. Os autores empregaram calibração de primeira ordem através de mínimos quadrados parciais (PLS) em espectros na região do ultravioleta e melhores resultados para a calibração são obtidos quando os fármacos são complexados com as formas  $\beta$  e  $\gamma$ -CD. Isto indica que o tamanho da cavidade da CD influencia diretamente na qualidade do modelo de regressão.

Tran et. all.<sup>23</sup> determinaram a composição enantiomérica de aminoácidos e dos fármacos ibuprofeno, atenolol e propranolol a partir de espectroscopia na região do infravermelho próximo, formando complexos de inclusão com  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD e empregando calibração pelo método PLS. Os autores encontram resultados semelhantes para a calibração dos aminoácidos e fármacos complexados com as três formas das CDs. Entretanto, segundo os autores, com a forma  $\alpha$ -CD poderia estar ocorrendo também uma forte adsorção externa que contribuiria para o resultado. Fakayode et. all.<sup>21</sup> fizeram a determinação de enantiômeros de fenilalanina formando complexo de inclusão com  $\beta$  e  $\gamma$ -CD, empregando fluorescência molecular e PLS. Resultados semelhantes foram obtidos pelos autores para os modelos de calibração desenvolvidos a partir do complexo formado com a  $\beta$  e  $\gamma$ -CD.

Nesta tese o auxiliar quiral utilizado foi a  $\beta$ -CD que apresenta menor custo em relação às formas  $\alpha$  e  $\gamma$ -CD e é de mais fácil aquisição. Além disso, os resultados apresentados nos trabalhos descritos acima sugerem que não ocorrem diferenças significativas para os modelos de calibração quando as formas  $\beta$  ou  $\gamma$ -CD são utilizadas na formação do complexo de inclusão.

#### **1.4. Álcoois e complexos de inclusão com ciclodextrinas**

A formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas é importante em muitas áreas além de sua aplicação como auxiliar quiral, por exemplo: no aumento da solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de drogas e em estudos

enzimáticos<sup>28</sup>. As ciclodextrinas também encontram aplicação em alimentos, cosméticos, produtos agrícolas e biotecnologia<sup>25</sup>.

Todas as aplicações apresentam o mesmo ponto crítico em comum, ou seja, os fatores que afetam a formação do complexo de inclusão, discutidos no tópico anterior.

Alguns estudos apontam a adição de um terceiro componente com a consequente formação de um complexo ternário. Alguns desses trabalhos tratam da formação de complexos ternários entre ciclodextrinas, hidrocarbonetos poliaromáticos (PHAs) e álcoois<sup>29-31</sup>. Os resultados sugerem que uma pequena concentração de álcool pode aumentar muito a hidrofobicidade do complexo formado entre PHAs e CDs, especificamente,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD<sup>30</sup>. Além disso, um álcool pode atuar como um “regulador de espaço” na formação do complexo ternário e adicionalmente, por ser menos polar que a água, irá com certeza preferir a cavidade hidrofóbica que a parte externa hidrofílica de uma CD<sup>29</sup>.

O tamanho e a geometria do álcool parecem ser fatores importantes na habilidade de alterar a hidrofobicidade da cavidade interna da CD<sup>27</sup>. Os grupos hidroxilas primário (lado mais estreito) e secundário (lado mais largo) da CD são também cruciais na formação do complexo ternário<sup>28</sup> e a natureza e polaridade do grupo funcional do álcool pode ter efeito na força e extensão da ligação de hidrogênio que ocorre na periferia da CD<sup>32</sup>.

A estereoquímica do complexo vai depender do tipo de CD, tipo do álcool e da molécula que formarão o complexo ternário<sup>27,29</sup>. Como a adição de álcool em um sistema com CDs pode reforçar a associação da molécula no interior da cavidade da CD a extensão dessa associação é governada pelo próprio tamanho

e volume do álcool e depende também do espaço restante na cavidade depois da formação do complexo de inclusão com a molécula<sup>33</sup>.

Glenn et. all.<sup>32</sup> avaliaram a formação do complexo de inclusão dos enantiômeros do propranolol com  $\beta$ -CD por fluorescência molecular na presença de álcoois. Os resultados sugerem que na presença do álcool 1-butanol ocorre um aumento na distinção entre os enantiômeros do propranolol.

Nesta tese o álcool 1-butanol foi empregado para aumentar a eficiência na formação de complexos enantioseletivos entre fármacos e  $\beta$ -CD.

## ***Capítulo II***

## 2.1. Calibração multivariada de primeira ordem

Em calibração multivariada, mais de uma resposta instrumental é relacionada com a propriedade de interesse. Em calibrações de primeira ordem tem-se um vetor de medidas instrumentais para cada amostra, por exemplo, um espectro por amostra. Esses métodos apresentam a chamada “vantagem de primeira ordem” que é a possibilidade de realizar análises mesmo na presença de interferentes, desde que esses interferentes estejam presentes nas amostras de calibração. Outras possibilidades apresentadas por este tipo de calibração são determinações simultâneas e análises sem resolução. Isso faz com que os modelos de calibração multivariada possam ser uma alternativa quando os métodos univariados não encontram aplicação<sup>34</sup>.

Uma diversidade de métodos de regressão vem sendo utilizada em química analítica para a construção de modelos de calibração multivariada. Dentre os métodos de primeira ordem os mais empregados tem sido a regressão linear múltipla (MLR – do inglês, Multiple Linear Regression), regressão por componentes principais (PCR – do inglês, Principal Components Regression) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS – do inglês, Partial Least Squares), que são métodos para ajuste linear entre as variáveis. Tem-se verificado que a maioria dos métodos de calibração multivariada empregados em espectroscopia utiliza ajuste linear entre as variáveis, uma vez que este representa o modelo de mais fácil elaboração e interpretação.

O modelo mais simples em calibração multivariada consiste na resolução de um sistema de equações lineares em uma regressão linear múltipla (MLR)<sup>35-37</sup>. MLR apresenta dois problemas que limitam sua aplicação. O primeiro deles é que

o número de amostras deve ser igual ou superior ao número de variáveis, uma vez que o modelo consiste na resolução de um sistema de equações lineares simultâneas, quando o número de variáveis é superior ao número de amostras, ou vice-versa, o sistema de equações a ser resolvido torna-se indeterminado. O segundo problema constatado para a MLR é que na resolução por mínimos quadrados a matriz  $(\mathbf{X}^T\mathbf{X})$  pode não apresentar inversa devido a alta correlação entre as variáveis<sup>38</sup>.

No intuito de contornar os problemas apresentados pela MLR, surge como alternativa a regressão por componentes principais (PCR). Neste método de regressão utiliza-se a análise de componentes principais (PCA – do inglês, Principal Component Analysis) como a técnica de ortogonalização baseada em mudança de base vetorial. Este procedimento resolve os dois principais problemas da MLR, uma vez que a PCA pode ser utilizada para a redução do número original de variáveis sem acarretar na perda significativa de informação resolvendo, assim, o problema de existência de alta colinearidade entre as colunas de  $\mathbf{X}$  e a necessidade de um número excessivo de amostras para a construção do modelo por MLR<sup>35-39</sup>.

### **2.1.1. Mínimos quadrados parciais (PLS)**

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) é considerada o método de regressão mais utilizado para a construção de modelos de calibração multivariada a partir de dados de primeira ordem<sup>38</sup>.

Enquanto no método de regressão PCR, a decomposição da matriz  $\mathbf{X}$ , realizada pelo PCA, é feita de forma independente do vetor  $\mathbf{y}$ , no método de

regressão PLS a informação de  $\mathbf{y}$  é incorporada, de forma que cada componente principal (PC) do modelo sofre uma pequena modificação para buscar a máxima covariância entre  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{y}$  e passa a receber a terminologia de Variável Latente (VL)<sup>39</sup>.

O modelo PLS é obtido através de um processo iterativo, no qual se otimiza ao mesmo tempo a projeção das amostras sobre os *loadings* para a determinação dos *scores* e o ajuste por uma função linear dos *scores* da matriz  $\mathbf{X}$  aos *scores* da matriz  $\mathbf{Y}$  de modo a minimizar os desvios. Essa otimização simultânea ocasiona pequenas distorções nas direções dos *loadings*, de modo que, rigorosamente eles perdem a ortogonalidade, levando a pequenas redundâncias de informação. No entanto, são essas pequenas redundâncias que otimizam a relação linear entre os *scores* e estas distorções da ortogonalidade entre os PCs no PLS fazem com que os mesmos não sejam mais componentes principais (que são ortogonais) e sim variáveis latentes<sup>35,36,38,39</sup>.

A regressão por mínimos quadrados parciais estende o conceito do modelo inverso (propriedade como função da resposta instrumental) trocando as variáveis originais por um subconjunto truncado das variáveis latentes dos dados originais<sup>35,36,38,39</sup>. Considerando um caso geral para a determinação de mais de uma espécie de interesse, logo  $\mathbf{Y}$  é uma matriz de dimensão  $(n \times z)$ , onde  $z$  é o número de colunas de  $\mathbf{Y}$ , tem-se a decomposição de ambas as matrizes  $\mathbf{X}$  de dimensão  $(n \times m)$  e  $\mathbf{Y}$  em suas matrizes de *scores* e *loadings*<sup>39</sup>:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E}_x = \sum \mathbf{t}_A \mathbf{p}_A^T + \mathbf{E}_x \quad (1)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^T + \mathbf{E}_y = \sum \mathbf{u}_A \mathbf{q}_A^T + \mathbf{E}_y \quad (2)$$

em que,  $\mathbf{X}$  é a matriz de respostas instrumentais,  $\mathbf{Y}$  é a matriz de respostas da propriedade de interesse ou os valores tidos como verdadeiros,  $\mathbf{T}$  e  $\mathbf{U}$  são os *scores* de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ , respectivamente,  $A$  é o número de variáveis latentes,  $\mathbf{P}$  e  $\mathbf{Q}$  são os *loadings* de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ , respectivamente,  $\mathbf{E}_x$  e  $\mathbf{E}_y$  correspondem às matrizes de resíduos composta pelas variáveis latentes descartadas, ou seja, as matrizes que contem a parte não modelada.

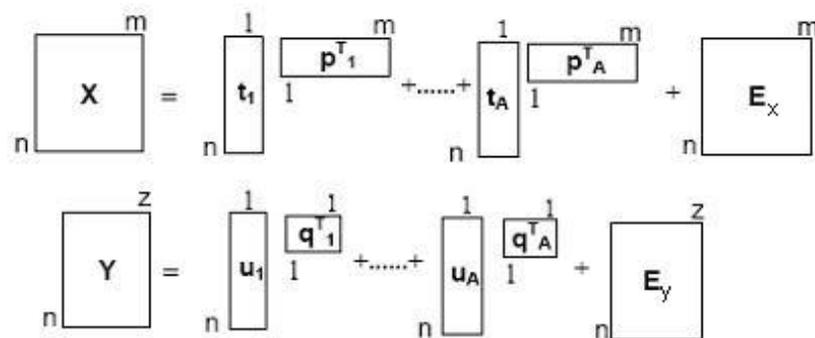
Entre os *scores* de  $\mathbf{X}$  e os *scores* de  $\mathbf{Y}$ , uma relação linear é, então, estabelecida<sup>39</sup>:

$$\hat{\mathbf{u}}_A = \mathbf{b}_A \hat{\mathbf{t}}_A \tag{3}$$

em que,  $\mathbf{b}_A$  é o vetor de coeficientes de regressão do modelo linear para cada variável latente, obtido através de:

$$\mathbf{b}_A = \frac{\mathbf{u}_A^T \mathbf{t}_A}{\mathbf{t}_A^T \mathbf{t}_A} \tag{4}$$

A Figura 4 ilustra a decomposição das matrizes  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  no produto das matrizes de *scores* e *loadings*. A decomposição pode ser realizada através de diversos algoritmos que procedem a referida decomposição por passos diferentes chegando ao final em resultados praticamente iguais. Um desses algoritmos é o NIPALS (do inglês, Nonlinear Iterative Partial Least Squares)<sup>40</sup>.



**Figura 4.** Decomposição em variáveis latentes das matrizes  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  para modelos PLS.

### 2.1.2. Identificação de amostras anômalas em calibração de primeira ordem

Amostras anômalas (*outliers*) é o termo utilizado para designar amostras com problemas que podem estar presentes nos conjuntos de calibração e de validação. Normalmente, esse tipo de amostra possui um comportamento diferente das demais amostras e a sua presença no conjunto de calibração pode conduzir a modelos com baixa capacidade de previsão, ou seja, que produzem altos valores de erro<sup>34,41</sup>.

Quando presentes no conjunto de validação, as amostras anômalas podem influenciar os resultados, geralmente, indicando que o modelo não é adequado ou que a sua capacidade é inferior à que poderia ser apresentada na sua ausência. Assim, a identificação desse tipo de amostra é um passo importante para a otimização dos conjuntos de calibração e validação, sendo que, a exclusão destas permite a construção de modelos mais eficientes, exatos e com melhor capacidade de previsão<sup>34</sup>.

No conjunto de amostras da calibração as amostras anômalas são identificadas com base no *leverage* extremo, resíduos não modelados nos dados espectrais e resíduos não modelados na variável dependente<sup>34,41</sup>.

O *leverage* representa o quanto uma amostra está distante da média do conjunto de dados. Em outras palavras o *leverage* indica o “peso relativo” de uma amostra em relação às demais presentes em um mesmo conjunto. Qualitativamente, tomando como exemplo dados espectrais, o *leverage* mede o quanto o espectro de uma amostra difere dos espectros das demais amostras em um mesmo conjunto. Quantitativamente, o *leverage* é estimado por<sup>34,41</sup>:

$$h_i = \hat{\mathbf{t}}_i^T (\hat{\mathbf{T}}^T \hat{\mathbf{T}})^{-1} \hat{\mathbf{t}}_i \quad (5)$$

em que:  $\mathbf{T}$  é a matriz de *scores* das amostras de calibração,  $\mathbf{t}_i$  é o vetor de *scores* de uma amostra em particular.

A partir da equação (5) amostras com altos valores de  $h$  são consideradas como amostras anômalas. A norma E1955-00 da ASTM<sup>41</sup> sugere que amostras que apresentem valor de  $h_i > 3 \frac{A+1}{n}$ , em que  $n$  corresponde ao número de amostras da calibração e  $A$  corresponde ao número de variáveis latentes utilizado na construção do modelo multivariado, são consideradas como amostras anômalas e devem ser removidas do conjunto de calibração que posteriormente deve ser reconstruído na ausência dessas amostras.

No entanto, é comum um novo espectro apresentar  $h_i > 3 \frac{A+1}{n}$  após a construção do novo modelo. Neste caso, quando aplicações repetidas do teste continuam a identificar novas amostras como sendo anômalas, um fenômeno conhecido como “snowball” (do inglês, efeito bola de neve) pode estar acontecendo. Isto é um indicativo de que algum problema com a estrutura dos dados espectrais pode estar acontecendo e o teste pode ser reavaliado da seguinte maneira:

- 1. constrói-se inicialmente um modelo de calibração;
- 2. espectros de calibração com  $h_i > 3 \frac{A+1}{n}$  são eliminados do conjunto de calibração;
- 3. o modelo é reconstruído com o mesmo número de variáveis latentes na ausência das amostras eliminadas;

- 4. novamente, espectros de calibração com  $h_i > 3 \frac{A+1}{n}$  são indicadores de amostras anômalas, para o segundo modelo.

Este segundo modelo pode ser utilizado como critério de parada do teste para identificação de amostras anômalas baseado no *leverage*, desde que as amostras de calibração apresentem valor de  $h$  por volta de 0,5. Se for o caso, as amostras anômalas para o segundo modelo são removidas e um terceiro modelo é, ainda, reconstruído<sup>41</sup>.

O teste para identificação de amostras anômalas com relação aos resíduos espectrais é aplicado pela comparação do desvio padrão residual total do conjunto de calibração ( $s(\hat{\epsilon})$ ) com o desvio padrão residual de uma amostra  $i$  ( $s(\hat{\epsilon}_i)$ )<sup>34,41</sup>.

O desvio padrão residual total ( $s(\hat{\epsilon})$ ), é definido como:

$$s(\hat{\epsilon})^2 = \frac{1}{nJ - J - A \max(n, J)} \sum_{i=1}^n \left( \sum_{j=1}^J (x_{i,j} - \hat{x}_{i,j})^2 \right) \quad (6)$$

em que,  $J$  é o número de variáveis espectrais e  $n$  é o número de amostras da calibração.

Por outro lado, o desvio padrão residual de uma amostra  $i$  ( $s(\hat{\epsilon}_i)$ ) é calculado por:

$$s(\hat{\epsilon}_i)^2 = \frac{n}{nJ - J - A \max(n, J)} \sum_{j=1}^J (x_{i,j} - \hat{x}_{i,j})^2 \quad (7)$$

As amostras que apresentarem  $s(\hat{\epsilon}_i) > 2s(\hat{\epsilon})$  são consideradas como anômalas e removidas do conjunto de calibração<sup>34</sup>.

Os resíduos não modelados na variável dependente identificam as amostras anômalas através da comparação da raiz quadrada do erro médio quadrático da calibração (RMSEC) com o erro absoluto de cada amostra<sup>34</sup>.

As amostras com erro absoluto ( $y_i - \hat{y}_i$ ) maior do que ( $3 \times \text{RMSEC}$ ) são consideradas amostras anômalas e removidas do conjunto de calibração. A estimativa do RMSEC é dada por<sup>34</sup>:

$$\text{RMSEC} = \frac{1}{n - A - 1} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (8)$$

em que,  $y_i$  é o valor de referência e  $\hat{y}_i$  é o valor estimado.

Na identificação das amostras anômalas no conjunto de validação são aplicados os testes baseados no *leverage* e no resíduo espectral. O cálculo é idêntico ao teste aplicado no conjunto de calibração só que são empregadas as amostras do conjunto de validação<sup>34,41</sup>.

### 2.1.3. Seleção de variáveis em calibração de primeira ordem

O emprego da quimiometria vem permitindo o tratamento de um grande número de dados para uma mesma amostra. Os modelos de calibração multivariada vêm contribuindo de forma significativa para a obtenção de modelos de regressão que relacionam um conjunto de variáveis experimentais à propriedade de interesse, como a concentração, por exemplo. Conseqüentemente, o tratamento desses dados passou a exigir modelos mais complexos que vão além da tradicional calibração univariada.

As muitas variáveis experimentais geradas, muitas vezes, podem dificultar a obtenção de suas relações com a propriedade de interesse e, evidências teóricas e experimentais, indicam que a escolha adequada de regiões espectrais pode melhorar significativamente a eficiência do modelo de calibração multivariada. Por outro lado, é interessante também identificar quais dessas variáveis são realmente

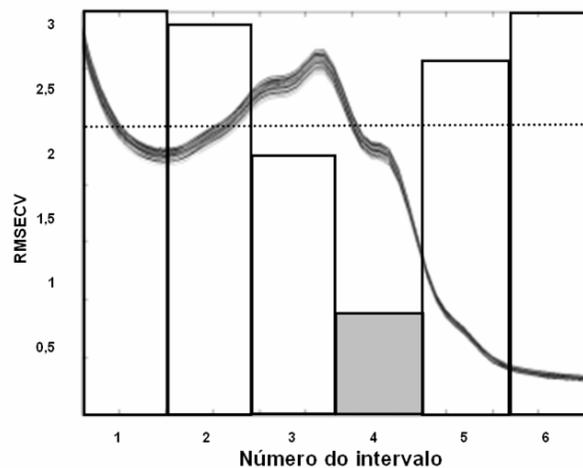
significativas por se mostrarem diretamente correlacionadas com o objetivo do estudo em questão, isto também é importante do ponto de vista químico, praticidade do trabalho, além da economia de tempo. Além disso, o emprego de variáveis que contenham mais informações acerca do sistema estudado pode proporcionar maior segurança e facilidade na construção e interpretação de um modelo de regressão<sup>42</sup>.

A seleção de variáveis envolve a escolha de determinadas regiões do espectro (um conjunto de comprimentos de onda) independente e mais restrito, que permitem ao modelo de calibração minimizar os erros de previsão. Como consequência da seleção de variáveis, é possível produzir um modelo mais robusto, simples de interpretar e com melhor precisão nas previsões<sup>43</sup>. Assim, comprimentos de onda que não possuam informações diretamente correlacionadas com a propriedade de interesse, que apenas induzem a ruídos, informações irrelevantes ou não linearidades, além de potenciais interferentes e variáveis que geram uma menor relação sinal/ruído (indicativo de baixa sensibilidade) podem ser eliminados<sup>44</sup>.

Existem diferentes algoritmos que são empregados para a seleção de variáveis<sup>34,45</sup>, nesta tese, os métodos abordados foram o algoritmo de mínimos quadrados parciais por intervalos<sup>44,46</sup> (iPLS - do inglês, interval Partial Least Squares) e o método baseado em inteligência artificial denominado algoritmo genético<sup>47,48</sup> (GA – do inglês, Genetic Algorithm).

O iPLS é uma extensão iterativa desenvolvida para o PLS, onde é feita uma regressão por mínimos quadrados parciais em cada sub-intervalo equidistante ao longo de toda a extensão do espectro, como ilustrado na Figura 5. Desta forma é

avaliada a relevância da informação nas diferentes sub-divisões espectrais, de onde é possível identificar e selecionar apenas as variáveis que apresentam informações mais relevantes. As regiões espectrais, cujas variáveis se apresentam como supostamente de menor importância e detentoras de possíveis ruídos, são removidas, e um novo modelo é construído a partir das variáveis selecionadas<sup>46</sup>.



**Figura 5.** Seleção de variáveis pelo iPLS.

A seletividade do algoritmo PLS para as variáveis que apresentam ruído é realçada através da informação do erro de validação cruzada em função de cada intervalo no qual o espectro é sub-dividido. Na Figura 5, cada barra representa o valor do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV – do inglês, Root Mean Square Error of Cross Validation) para o intervalo e a linha horizontal pontilhada, RMSECV para o modelo com todo o espectro. Através dos valores de RMSECV, para cada intervalo de subdivisão do espectro, em relação ao valor de RMSECV para o modelo global, com todas as variáveis, avalia-se a performance da previsão de cada intervalo. O RMSECV é estimado por:

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-1}} \quad (9)$$

em que,  $\hat{y}_i$  representa o valor previsto pelo modelo;  $y_i$  representa o valor de referência, ou tido como verdadeiro;  $n$  corresponde ao número de amostras.

O melhor intervalo, ou seja, a melhor seleção de variáveis será aquela que apresentar valor de RMSECV menor em relação ao modelo global (intervalo 4 da Figura 5). Normalmente, a construção de modelos PLS, a partir dessas variáveis, necessita de um número de VL diferente daquele necessário ao modelo global para alcançar uma variância relevante de  $\mathbf{y}$ . Isso ocorre, principalmente, devido à largura dos subintervalos, número de substâncias que absorvem/interferem e ruído<sup>46</sup>.

Com a seleção de variáveis busca-se encontrar um conjunto de variáveis independentes mais restrito que produza um menor erro de previsão, o algoritmo do iPLS monitora, concomitantemente à seleção das variáveis, um parâmetro regulador,  $E(\mathbf{b})$ , que descreve o desvio das previsões em relação aos valores esperados, conforme a equação<sup>46</sup>:

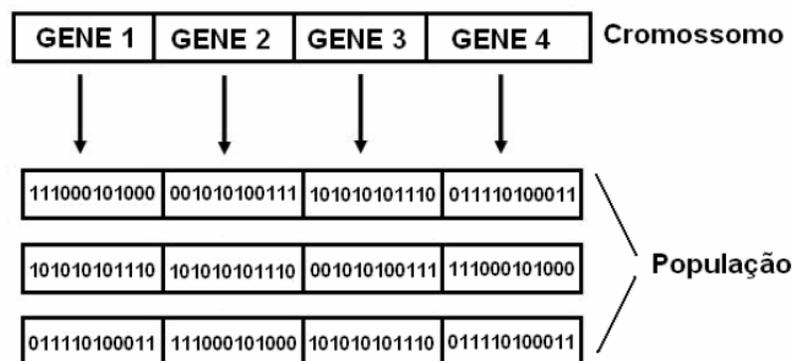
$$E(\mathbf{b}) = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (10)$$

em que,  $y_i$  e  $\hat{y}_i$  consistem nos valores de referência e previstos, respectivamente,  $N$  é o número de amostras e  $\mathbf{b}$  são os coeficientes de regressão calculados pelo PLS.

A eliminação de qualquer variável fica, portanto, vinculada à minimização da função descrita pela equação (10), ou seja, é necessário atingir um mínimo da

função simultaneamente à eliminação do valor de um determinado coeficiente de regressão (b) do modelo global referente à variável eliminada.

O algoritmo genético (GA) é um método para seleção de variáveis baseado em inteligência artificial que segue a abordagem “o mais adaptado sobrevive”<sup>49</sup>. Este método compreende um conjunto de elementos individuais ao qual dá-se o nome de população e os indivíduos nomeiam-se de cromossomos. Os cromossomos são organizados em séries de genes, onde cada um representa uma variável específica<sup>50</sup>. A Figura 6 apresenta a representação hipotética de 4 genes constituintes de um cromossomo e uma população formada por três cromossomos. Os genes são codificados na forma de código binário (0,1), de acordo com o algoritmo matemático para otimização de sistemas complexos<sup>51,52</sup>.



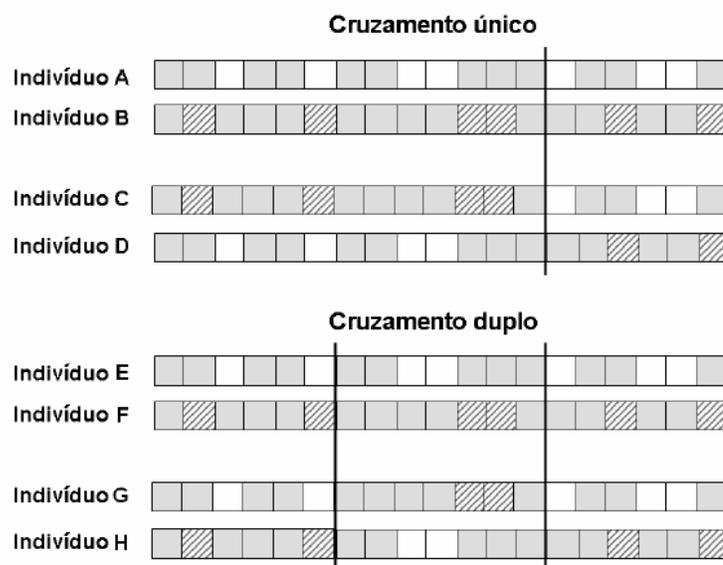
**Figura 6.** Elementos do GA.

Segundo a teoria evolucionária somente os indivíduos mais adaptados da população poderão sobreviver e gerar descendentes, transmitindo assim sua hereditariedade para futuras gerações. Esse comportamento também é observado no GA onde indivíduos mais adaptados serão gerados de acordo com uma série

de operadores inspirados biologicamente, definidos como seleção, cruzamento e mutação<sup>53</sup>.

A seleção é baseada na aptidão, isto é, quanto mais adaptado ou ajustado for um indivíduo, maior a sua chance em ser selecionado para reprodução e contribuir com seus genes para a próxima geração.

O cruzamento considera dois cromossomos e troca parte de suas informações genéticas para produzir novos cromossomos. O cruzamento pode ser feito por dois métodos: o cruzamento único ou o cruzamento duplo. Esses métodos podem ser observados através do exemplo da Figura 7.



**Figura 7.** Cruzamento único e duplo no GA.

As denotações em branco e com hachuras indicam os genes que foram trocados entre os indivíduos. No processo de cruzamento único os genes de dois indivíduos aleatórios, por exemplo, A e B são separados em dois segmentos, em algum ponto aleatório do cromossomo. A primeira parte de um dos cromossomos é permutada com a primeira do outro cromossomo, e dois novos indivíduos com

genes híbridos são originados para a população, por exemplo, os indivíduos C e D. O cruzamento duplo é similar ao cruzamento único, porém, neste caso, dois pontos aleatórios de ruptura nos cromossomos são selecionados e as porções médias são trocadas, por exemplo, as barras que cortam os indivíduos E e F. Na prática, a maior diferença é que o cruzamento duplo usualmente produz novos indivíduos (G e H) com características mais semelhantes aos cromossomos originais (E e F). Em termos de seleção de variáveis, o cruzamento duplo gera novos conjuntos com maior número de variáveis iguais a um dos cromossomos de origem, A ou B, por exemplo.

Após a adição dos novos indivíduos à população, todos os genes individuais têm a chance de sofrer mutação aleatória. A mutação é implementada pela alteração ocasional de um gene de um cromossomo, antes de uma determinada descendência ser inserida na nova população. Isto permite o uso de variáveis que possam estar super- ou sub-representadas na população.

O GA pode ser sumarizado em um ciclo de três estágios:

1. A criação aleatória de uma população inicial de indivíduos (cromossomos).
2. A execução dos sub-passos seguintes de forma iterativa para cada geração até que a condições de término do processamento seja efetuada:

Avaliação da aptidão de cada indivíduo na população e manutenção do melhor indivíduo de todas as populações antecedentes.

Criação de uma nova população pela aplicação dos operadores genéticos:

Seleção

Cruzamento

Mutação

Reposição da população em vigor pela nova população

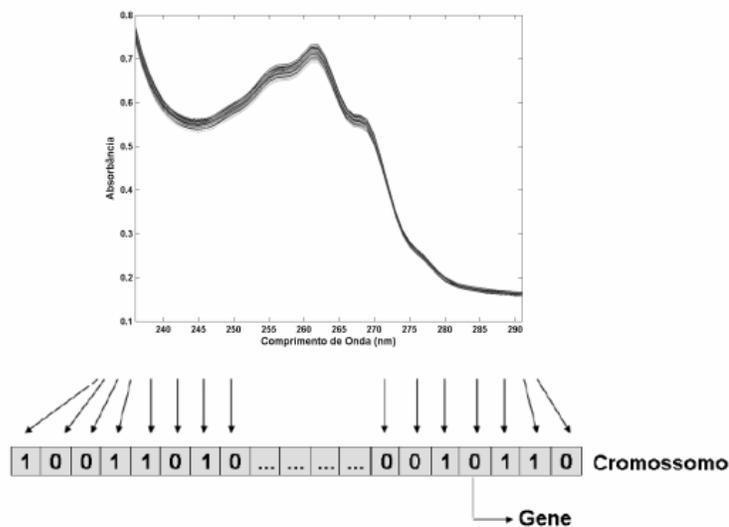
3. Saída do indivíduo com a melhor aptidão como solução ótima.

O funcionamento do GA é criticamente controlado por um balanço que define o desempenho do algoritmo com base na escolha certa dos parâmetros de controle, por exemplo, as probabilidades de cruzamento e mutação e os tamanhos das populações. Em relação a esses parâmetros algumas considerações podem ser abordadas<sup>53</sup>:

1. Aumento da probabilidade de cruzamento aumenta a recombinação das estruturas, mas também aumenta a possibilidade de rompimento de boas seqüências de genes geradas.
2. Aumento na probabilidade de mutação tende a transformar a busca genética em uma busca aleatória, mas também ajuda a re-introduzir a perda de material genético.
3. Aumento do tamanho da população aumenta sua diversidade e reduz a probabilidade que o algoritmo prematuramente convirja a um ótimo local, mas também aumenta o tempo requerido para a população convergir para as regiões ótimas no espaço de busca.

O GA pode ser aplicado para outras funções além da seleção de variáveis, como por exemplo, em casos de otimização<sup>54</sup>, onde tem se mostrado apto na resolução de problemas lineares e não-lineares.

Em seleção de variáveis a implementação do GA se difere de suas outras aplicações em relação à codificação do problema e da função resposta, as outras etapas permanecem inalteradas. Na codificação do problema assume-se que o cromossomo possui  $n$  genes, onde cada um representa uma das variáveis (por exemplo, valor de absorbância em um determinado comprimento de onda). O cromossomo, portanto, terá o mesmo número de variáveis contidas no espectro, como ilustrado para um espectro hipotético na Figura 8.



**Figura 8.** Codificação de espectros na forma de cromossomo.

Na seleção de variáveis por GA o código binário (0,1) é empregado para codificar o problema. Neste caso, cada gene pode assumir o valor 1 ou 0. Quando a posição referente a uma determinada variável for igual a 1, isto implica na seleção desta variável. Ao contrário, se a posição contiver o valor 0, isto indica que a variável não foi selecionada.

Para uma matriz de variáveis independentes  $X$ , e os vetores de dados  $y$ , o algoritmo genético seleciona subconjuntos aleatórios do conjunto de dados  $X$  e calcula o erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV), conforme a

equação 9. Este valor implicará no erro de previsão quando somente aquele conjunto de variáveis é utilizado na construção do modelo de regressão. O melhor subconjunto de variáveis considerado é aquele que gera o menor valor de RMSECV.

Primeiramente, um grande número de seleções randômicas de variáveis é realizado pelo GA e os valores de RMSECV para cada um dos subconjuntos dados são calculados. Cada subconjunto de variáveis é chamado de um indivíduo e cada variável utilizada nesse subconjunto é um gene. O conjunto de todos os indivíduos testados constitui uma população. Os valores de RMSECV, descrito como os ajustes dos indivíduos, indicam o nível de predição de cada indivíduo selecionado em relação ao vetor  $\mathbf{y}$  e quanto menor o valor do RMSECV, melhor será o ajuste para o modelo.

Na seleção, os indivíduos com ajustes inferiores em relação ao ajuste médio são descartados. Os demais indivíduos utilizam as variáveis que proporcionam os menores valores de RMSECV ou os melhores ajustes para os dados. Nesse ponto, a população foi diminuída para a metade do seu tamanho original e o cruzamento dos indivíduos conservados é realizado.

Todos os genes individuais podem ainda ter a chance de sofrer mutação randômica. Após todos os indivíduos terem sido pareados e cruzados, a população retorna ao tamanho original e o processo pode prosseguir novamente até o passo de avaliação do ajuste, conforme o resumo para o processo completo:

1. Geração de subconjuntos randômicos de variáveis;
2. Avaliação de cada subconjunto das variáveis selecionadas individualmente em relação ao ajuste para a previsão de  $\mathbf{y}$ ;

3. Descarte de metade dos indivíduos apresentando pior ajuste;
4. Cruzamento dos indivíduos remanescentes;
5. Mutação;
6. Repetição dos passos 2 a 5 até que o critério de parada seja alcançado.

A seleção será interrompida após um número finito de iterações ou quando alguma percentagem dos indivíduos na população seja constituída de variáveis idênticas. Os indivíduos usando variáveis que contenham ruídos tenderão a ser descartadas e, desse modo, as variáveis usadas por estes indivíduos serão menos representadas na população de genes. Do mesmo modo, as variáveis com menos ruído serão mais e mais representadas. Dependendo do número de variáveis e da taxa de mutação, muitos dos indivíduos eventualmente conterão os mesmos genes.

O maior risco da utilização do GA em seleção de variáveis está na ocorrência de sobre ajuste (over-fitting). É possível que as variáveis selecionadas sejam particularmente “boas” para a construção do modelo de um determinado conjunto de dados, mas não seja útil para a previsão de dados futuros. Isto é particularmente problemático quando se analisa conjuntos com menores números de amostras. Por outro lado, a seleção de variáveis realizada pelo GA, ao gerar um subconjunto com o melhor e mais reduzido número de variáveis, pode fazer com que os dados apresentem maior sensibilidade e linearidade para a calibração.

## 2.2. Calibração multivariada de segunda ordem

Os métodos de calibração multivariada de segunda ordem empregam uma matriz de dados por amostra na construção do modelo de calibração. Esse tipo de dados pode ser gerado através de diversas técnicas como, por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia gasosa com detecção por espectrômetro de massas (HPLC-MS e GC-MS), fluorescência molecular de excitação e emissão, análise por injeção em fluxo com gradiente de pH e detecção por arranjo de diodos, etc.

A maior vantagem da calibração de segunda ordem é a de permitir a determinação da espécie de interesse na presença de interferentes, mesmo que estes interferentes não tenham sido incluídos nas amostras de calibração, característica que é chamada de vantagem de segunda ordem. Além disso, o perfil de cada composto linearmente independente, presente na amostra, pode ser estimado com dados de segunda ordem<sup>55</sup>.

Diversos métodos vêm sendo empregados em calibrações de segunda ordem<sup>56</sup>, dentre eles destacam-se a análise de fatores paralelos<sup>57</sup> (PARAFAC – do inglês, Parallel Factor Analysis) e o método de mínimos quadrados bilineares<sup>58</sup> (BLLS – do inglês, Bilinear Least Squares). A principal diferença entre os dois métodos está no fato de o PARAFAC ser um método de decomposição trilinear dos dados enquanto o BLLS é um método bilinear de decomposição.

### 2.2.1. Análise de fatores paralelos (PARAFAC)

O PARAFAC é um método de calibração multivariada de segunda ordem que apresenta grandes vantagens na modelagem de dados espectroscópicos, principalmente de fluorescência de excitação e emissão e dados cromatográficos. Isso ocorre, devido à estrutura desses dados que parecem se ajustar perfeitamente ao modelo. Além da calibração, este método também pode ser empregado na análise espectral de misturas onde os espectros reais das espécies puras podem ser recuperados se os dados forem de fato trilineares, se o número de fatores for correto e se a razão sinal/ruído for adequada<sup>57</sup>.

O PARAFAC é um método estável e robusto na decomposição espectral de dados multidimensionais trilineares. Neste método os componentes não são obrigatoriamente ortogonais, de modo que a variância somada para cada componente não é igual à variância total do modelo. Esta observação não pode ser considerada em métodos de segunda ordem bilineares que são obrigatoriamente seqüenciais, ou seja, cada novo fator adicionado ao modelo é projetado ortogonalmente ao anterior, de modo que a variância explicada total é somada em cada fator<sup>59</sup>.

A Figura 9 mostra a representação da decomposição efetuada pelo método PARAFAC.

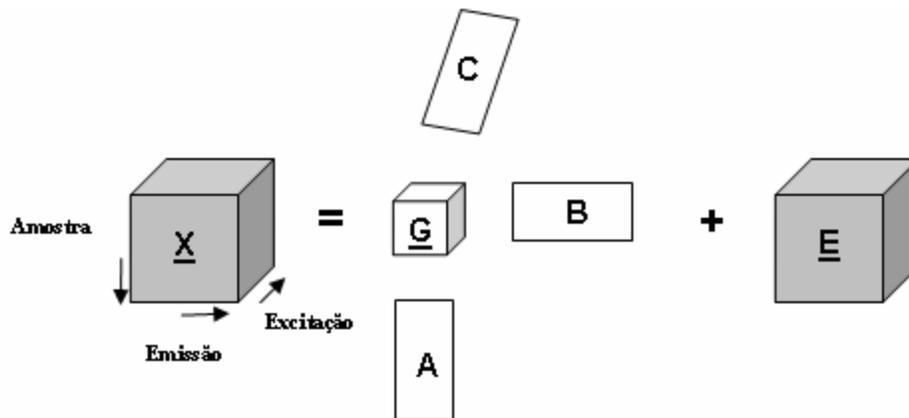


Figura 9. Decomposição efetuada pelo PARAFAC.

Os dados decompostos em tríades são relacionados através de um tensor núcleo  $\underline{G}$  que apresenta em sua superdiagonal valores unitários e nas demais posições zeros, de modo que o posto é o mesmo nos três modos. Este tensor núcleo pode ser facilmente eliminado da estrutura, conforme representação da Figura 10, pois o modelo é um produto direto das matrizes de *loadings*, descrito através da equação:

$$\underline{X} = \mathbf{A}(\mathbf{C} \otimes \mathbf{B})^T + \underline{E} \quad (11)$$

em que,  $\otimes$  indica o produto de Kronecker.

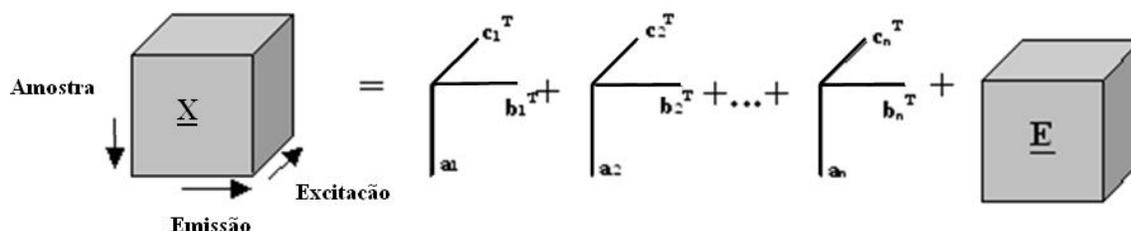


Figura 10. Decomposição dos dados em tríades.

O modelo é constituído por uma matriz de *scores*  $\mathbf{A}$  e duas matrizes de *loadings*  $\mathbf{B}$  e  $\mathbf{C}$ , descritas pelos elementos  $a_{if}$ ,  $b_{jf}$  e  $c_{kf}$ . Isso torna o modelo menos

flexível, pois utiliza menos graus de liberdade, o que determina solução única do sistema. Se por um lado esta característica é a grande vantagem na modelagem de dados espectroscópicos, por outro lado é necessário conhecimento à priori do sistema para a escolha do número correto de fatores que deverão ser utilizados para efetuar a decomposição dos dados. A otimização do modelo é obtida pela minimização da soma dos erros dos quadrados dos resíduos,  $e_{ijk}$ , no modelo:

$$\mathbf{x}_{ijk} = \sum_{f=1}^F \mathbf{a}_{if} \mathbf{b}_{jf} \mathbf{c}_{kf} + \mathbf{e}_{ijk} \quad (12)$$

em que,  $r_{ijk}$  é um elemento do tensor de dados definido pelas dimensões I x J x K.

Esta otimização é realizada através do algoritmo de mínimos quadrados alternados (ALS – do inglês, Alternating Least Squares), que inicializa assumindo os *loadings* em dois modos e usa-os para estimar os *loadings* do próximo modo até a minimização dos resíduos. O processo é realizado para cada modo até a convergência total do algoritmo. Em algumas situações, certas restrições como não-negatividade, unimodalidade e ortogonalidade podem ser empregadas para melhorar a convergência do algoritmo e/ou obter uma melhor interpretação física dos *loadings*, como semelhanças espectrais, perfis de pH ou tempo de retenção.

Quando o modelo de segunda ordem construído é utilizado na quantificação, o modelo de regressão é obtido por mínimos quadrados entre o vetor de *scores* relacionado com a concentração e um vetor que contém os valores de referência para a concentração, conforme a equação (13). Desta forma, novas amostras de concentração desconhecida podem ser analisadas com a sua inserção em um tensor contendo as amostras de calibração, de modo que tanto as amostras desconhecidas como as de calibração são utilizadas na decomposição, reduzindo-se desta maneira a presença de erros sistemáticos<sup>57</sup>.

$$\mathbf{x} = \mathbf{bc} \quad (13)$$

em que,  $\mathbf{x}$  é o vetor de *scores* do PARAFAC,  $\mathbf{b}$  é o coeficiente de regressão e  $\mathbf{c}$  é o vetor de concentração.

### 2.2.2. Mínimos quadrados bilineares (BLLS)

No BLLS a concentração dos compostos de interesse é inserida na etapa de calibração, onde apenas matrizes de composição conhecida são utilizadas. Nesta etapa, estimativas das matrizes dos analitos puros ( $\mathbf{S}_n$ ) em concentração unitária são obtidas. Primeiramente, as matrizes de calibração  $\mathbf{X}$  são vetorizadas e agrupadas em uma matriz  $\mathbf{V}_X$  de dimensão  $JK \times I$ <sup>58,60,61</sup>:

$$\mathbf{V}_X = [\text{vec}(\mathbf{X}_1) | \text{vec}(\mathbf{X}_2) | \dots | \text{vec}(\mathbf{X}_n)] \quad (14)$$

onde “vec” indica a operação de desdobramento da matriz em um vetor.

Em seguida um procedimento de quadrados mínimos clássico é utilizado para obter a informação dos compostos puros:

$$\mathbf{V}_S = \mathbf{V}_X \mathbf{y}^+ \quad (15)$$

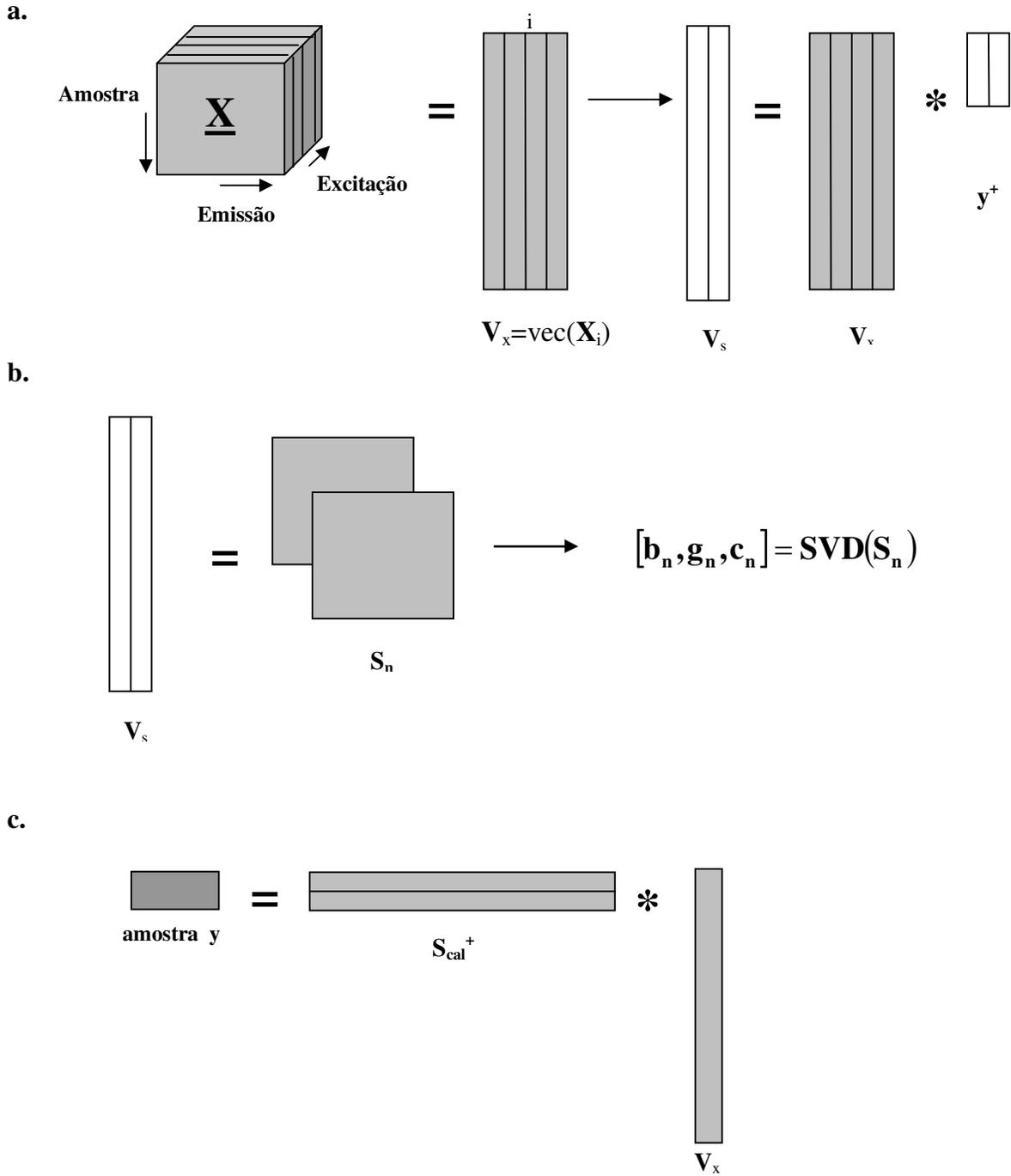
A Figura 11.a mostra os procedimentos de vetorização e CLS.  $\mathbf{V}_S$  contém as matrizes desejadas  $\mathbf{S}_n$  na forma de vetores.

$$\mathbf{V}_S = [\text{vec}(\mathbf{S}_1) | \text{vec}(\mathbf{S}_2) | \dots | \text{vec}(\mathbf{S}_n)] \quad (16)$$

De modo a obter os perfis espectrais a partir das matrizes  $\mathbf{S}_n$ , um estimador baseado na decomposição em valores singulares (SVD - do inglês, Singular Value Decomposition) é empregado em cada matriz  $\mathbf{S}_n$ <sup>58</sup>. Este processo é demonstrado na Figura 11.b.

$$(\mathbf{b}_n, \mathbf{g}_n, \mathbf{c}_n) = \text{SDV}(\mathbf{S}_n) \tag{17}$$

em que,  $\mathbf{g}_n$  é o primeiro valor singular,  $\mathbf{b}_n$  e  $\mathbf{c}_n$  são os primeiros vetores singulares direito e esquerdo de  $\mathbf{S}_n$ , respectivamente.



**Figura 11.** Método BLLS. **a.** Procedimento de Vetorização e CLS. **b.** Obtenção do perfil espectral da matriz estimada por SVD. **c.** Estimativa da concentração para uma amostra.

As concentrações em uma amostra desconhecida ( $\mathbf{X}_u$ ) são estimadas, contanto que não haja interferentes presentes, por um outro procedimento de quadrados mínimos clássico<sup>58,60</sup>, como mostrado na Figura 11.c:

$$\mathbf{y}_u = \mathbf{S}_{\text{cal}}^+ \text{vec}(\mathbf{X}_u) \quad (18)$$

em que,  $\mathbf{y}_u$  é o vetor 1 x Nc que contém as concentrações estimadas para os Nc analitos em  $\mathbf{X}_u$ , e  $\mathbf{S}_{\text{cal}}$  é uma matrix de calibração JK x Nc dada por:

$$\mathbf{S}_{\text{cal}} = [g_1(\mathbf{c}_1 \otimes \mathbf{b}_1 | g_2(\mathbf{c}_2 \otimes \mathbf{b}_2 | \dots | g_n(\mathbf{c}_n \otimes \mathbf{b}_n)] \quad (19)$$

em que,  $\otimes$  indica o produto de Kronecker.

### 2.2.3. Adição padrão de segunda ordem (SOSAM)

Na química analítica, em calibração univariada, o método de adição padrão é empregado em situações onde a calibração convencional não é praticável. Isto é feito, basicamente, para superar os efeitos da matriz que afetam a resposta instrumental do analito<sup>62</sup>. Em calibração de primeira ordem o método de adição padrão foi descrito pela primeira vez em 1979 por Saxberg e por Kowalski<sup>63</sup>.

Uma extensão do método de adição padrão para dados de segunda ordem, foi publicada em 1995 por Booksh et. all. e nomeada como método de adição padrão de segunda ordem (SOSAM - do inglês, Second Order Standard Addition Method)<sup>64</sup>. No trabalho, os autores determinaram tricloroetileno a partir de dados de segunda ordem obtidos da cinética com detecção espectrofotométrica. Para a decomposição dos dados foi empregada a decomposição trilinear direta (DTLD - do inglês, Direct Tri-Linear Decomposition)<sup>65</sup>.

Como já discutido ao longo deste capítulo, a vantagem de segunda ordem é definida como a capacidade de um modelo de calibração de executar uma determinação ou previsão na presença de interferentes desconhecidos que não estiveram presentes na etapa de calibração<sup>55</sup>. Em SOSAM o uso da vantagem segunda ordem exige duas suposições: os dados devem ser trilineares e o método de segunda ordem utilizado deve decompor o conjunto de dados de calibração e validação simultaneamente<sup>66</sup>, assim o método BLLS não pode ser utilizado para adição padrão de segunda ordem.

A aplicação de SOSAM pode ser sumarizada em três passos:

1. Um algoritmo como DTLTD, PARAFAC ou PARALIND (Análise de Fatores com Dependência Linear - do inglês, Parallel Profiles with Linear Dependencies) é aplicado para a decomposição do cubo de dados formado pelas matrizes de dados obtidas para cada adição sucessiva. O número correto de fatores usados na decomposição deve corresponder ao número de analitos mais interferentes.

2. A matriz de *loadings* do modo correspondente à composição das amostras, denominada de *scores*, deve conter em suas colunas as informações relativas às concentrações do analito e dos interferentes. Para identificar a coluna correspondente ao analito de interesse, os *loadings* do modo espectral pode ser comparado com o espectro do analito puro.

3. Os valores correspondentes à concentração do analito são utilizados em uma regressão linear, da mesma maneira que em uma adição padrão univariada<sup>66</sup>.

O número de aplicações do método SOSAM é relativamente pequeno. Herrero et. al.<sup>67</sup> aplicaram o método em dados espectroeletróquímicos e Sinha et.

all.<sup>68</sup> empregou o método em dados de cromatografia gasosa bidimensional acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo (GC x GC-MS). Para dados espectrofluorimétricos as aplicações do método SOSAM são principalmente para determinações farmacêuticas em fluidos biológicos<sup>66,69,70</sup>.

## 2.3. Avaliação dos modelos de calibração – Teste de significância

### 2.3.1. Análise da variância (ANOVA)

A análise da variância (ANOVA) é o método mais usado para se avaliar numericamente a qualidade do ajuste de um modelo. A avaliação dos resíduos, que devem ser pequenos, é fundamental para se avaliar a qualidade desse ajuste<sup>71,72</sup>.

Através da ANOVA são avaliadas a média dos valores obtidos por um determinado método em relação à média dos valores tidos como verdadeiros e é possível verificar se estas médias apresentam diferenças significativas do ponto de vista estatístico<sup>71</sup>.

O primeiro passo na análise da variância é verificar o desvio de cada resposta individual em relação à média de todas as respostas observadas:

$$(y_i - y_M) = (\hat{y}_i - y_M) + (y_i - \hat{y}_i) \quad (20)$$

$(\hat{y}_i - y_M)$  representa o desvio da previsão de um modelo para um ponto,  $\hat{y}_i$ , em relação à média global,  $y_M$ . O valor  $(y_i - \hat{y}_i)$  representa a diferença entre o valor experimental e o valor previsto pelo modelo.

Para expressar essas comparações em termos quantitativos a equação (20) é elevada ao quadrado e realiza-se o somatório sobre todos os pontos:

$$\sum (y_i - y_M)^2 = \sum (\hat{y}_i - y_M)^2 + \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (21)$$

Esta equação é chamada de soma quadrática total ( $SQ_T$ ) e o termo  $\sum (\hat{y}_i - y_M)^2$  representa a soma quadrática devido à regressão ( $SQ_R$ ), enquanto o termo  $\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$  representa a soma quadrática residual ( $SQ_r$ ). Através desta equação verifica-se que uma parte da variação total das observações,  $y_i$ , em torno da média,  $y_M$ , é descrita pela equação de regressão e o restante fica por conta dos resíduos.

A  $SQ_R$  evidencia o ajuste de uma equação aos pontos da reta, assim, quanto maior a  $SQ_R$  maior será a fração descrita pela regressão e, portanto melhor será o ajuste para o modelo.

O ajuste do modelo, representado por  $R^2$ , também chamado de coeficiente de determinação, pode ser quantificado através da razão:

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_r} \quad (22)$$

O valor máximo para  $R^2$  é 1 e só será possível se o modelo apresentar resíduo nulo, ou seja, toda variação em torno da média será explicada pela regressão. Isto é equivalente a dizer que a  $SQ_r$  deve ser o menor possível para que a reta apresente um bom ajuste aos pontos. Assim, quanto mais perto de 1 estiver o valor de  $R^2$  melhor terá sido o ajuste do modelo às respostas observadas.

A razão entre a soma quadrática e seu respectivo número de graus de liberdade fornece a média quadrática (MQ). Os valores da MQ podem ser

utilizados para testar se a equação de regressão é estatisticamente significativa. Para tanto, são calculados a MQ devido à regressão ( $MQ_R$ ) e a MQ devido aos resíduos ( $MQ_r$ ). Se os valores estimados pelo modelo não apresentarem relação com os valores reais então a razão das médias quadráticas seguirá uma distribuição F:

$$\frac{MQ_R}{MQ_r} = F_{1,n-2} \quad (23)$$

em que, 1 e n-2 representam o número de graus de liberdade para a  $MQ_R$  e a  $MQ_r$ , respectivamente.

Se o valor de F calculado for maior que o valor para F tabelado, dentro da percentagem de confiança desejada, então o valor médio para os resultados obtidos não se diferem significativamente do valor médio tido como verdadeiro, e desta forma, a ANOVA pode ser utilizada para avaliar a linearidade de um modelo de calibração de segunda-ordem.

### 2.3.2. Teste t-pareado

O teste t-pareado é um teste de significância empregado para comparação entre dois métodos de análise diferentes e verifica se estes métodos são diferentes. Nele são utilizados pares de medidas para minimizar fontes de variabilidade que não são de interesse<sup>71</sup>.

O primeiro passo consiste em calcular a média dos resultados obtidos por cada um dos métodos ( $d_M$ ) e o somatório da diferença ao quadrado entre os resultados obtidos pelo método 1 e o método 2 para cada amostra como na equação (25), assim:

$$d_M = \bar{M}_1 - \bar{M}_2 \quad (24)$$

$$\sum_{i=1}^n d_i^2 \quad (25)$$

O próximo passo consiste no cálculo do desvio padrão das diferenças:

$$s_d^2 = \frac{\sum d_i^2 - nd_M^2}{n-1} \quad (26)$$

onde  $n$  é o número de amostras analisadas e  $s_d = \sqrt{\frac{\sum d_i^2 - nd_M^2}{n-1}}$ .

Por fim, o valor de  $t$  é calculado através da equação:

$$t = \frac{\sqrt{nd_M}}{s_d} \quad (27)$$

Se o valor de  $t$  calculado for menor que o valor para  $t$  tabelado, dentro da percentagem de confiança desejada, então não é possível detectar diferença entre os dois métodos no nível de significância considerado.

## ***Capítulo III***

### 3.1. Validação e figuras de mérito

A necessidade pela qualidade em medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está cada vez mais reconhecida e exigida, uma vez que dados analíticos não confiáveis ou resultados distorcidos podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros consideráveis<sup>73</sup>. Sempre que um procedimento analítico é proposto ou desenvolvido, existe a necessidade de se averiguar se o método apresenta uma performance adequada para as condições nas quais ele será aplicado. Esse processo de averiguação é conhecido como validação<sup>74</sup>. A validação de um método estabelece, por estudos sistemáticos realizados em laboratório, que o método atende ao seu propósito e às normas estabelecidas por agências reguladoras e órgãos de fiscalização nacionais e internacionais como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>75</sup>, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)<sup>76</sup>, United States Pharmacopeia (USP)<sup>77</sup>, International Conference on Harmonisation's (ICH)<sup>78,79</sup>, International Standard Organization (ISO)<sup>80</sup>, American Society for Testing and Materials (ASTM)<sup>41</sup>, etc.

A validação de um procedimento analítico pode ser atestada através da determinação de parâmetros conhecidos como figuras de mérito. Esses parâmetros, dependendo de onde o método será aplicado, do seu propósito e ou do órgão de fiscalização a que estará sujeito podem variar, sendo as principais<sup>41, 74,78,79</sup>: exatidão, precisão, sensibilidade, seletividade, linearidade, razão sinal/ruído, limite de detecção, limite de quantificação, robustez, intervalos de confiança, teste para erros sistemáticos, extensão da faixa de trabalho ou faixa linear dinâmica.

A maneira pela qual essas figuras de mérito devem ser determinadas geralmente é estabelecida por órgãos de fiscalização e encontra-se descrita em normas específicas<sup>41</sup>, guias de validação<sup>74,78,79,81-84</sup> e trabalhos científicos<sup>55,73,85-94</sup>. A maioria dos guias, normas e trabalhos científicos, ainda são referentes à calibração univariada. Trabalhos científicos que abordam a validação em calibração multivariada são recentes<sup>87-91,95-97</sup>. Para modelos multivariados que utilizam um vetor de dados por amostra, descritos na literatura como calibração de primeira ordem<sup>55,98</sup> a validação pode ser considerada relativamente complexa, porém definida. Entretanto, para modelos que empregam uma matriz de dados por amostra, conhecidos como calibração de segunda ordem<sup>98</sup> a validação é muito complexa e ainda não se encontra completamente investigada ou ainda não foi devidamente testada em condições que garantam a sua veracidade. Logo, ainda são necessários estudos mais aprofundados que investiguem e comparem esses procedimentos de validação para os modelos de calibração de segunda ordem atualmente empregados.

### **3.2. Figuras de mérito e calibração univariada**

A metodologia para validação de modelos de calibração univariada parece estar consolidada. No Brasil, há duas agências que disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos baseados nesse tipo de calibração, sendo eles: a ANVISA (RE nº 899, de 29/05/2003)<sup>75</sup> e o INMETRO (DOQ-CGCRE-008, de março/2003)<sup>76</sup>. A IUPAC<sup>95</sup> dispôs no ano de 2006 a última proposta para validação de métodos univariados. De acordo com esses guias e com trabalhos científicos<sup>73,85</sup>, a seguir são definidas as figuras de mérito para

calibração univariada e as respectivas equações para a determinação de cada parâmetro são dispostas no Quadro 1.

**Seletividade:** é a capacidade de determinar uma espécie de interesse em misturas ou matrizes na presença de componentes que possam interferir com a sua determinação em uma amostra<sup>95,99</sup>. O mesmo significado tem sido utilizado para o termo especificidade, o qual deve ser evitado empregando-se apenas o termo seletividade conforme a IUPAC<sup>95</sup>. Para calibração de ordem zero, a seletividade pode ser obtida de várias maneiras: comparando-se a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada desta substância (padrão), através da avaliação com detectores seletivos para o caso de métodos de separação, método de adição padrão quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse, análise por outras técnicas. A IUPAC<sup>95</sup> apresenta uma equação proposta por Thompson, Ellison e Wood<sup>100</sup> para estimar a seletividade de um método univariado. Essa estimativa é realizada com base na razão entre a sensibilidade da propriedade de interesse e a sensibilidade dos interferentes de acordo com a equação (28) disposta no Quadro 1.

**Linearidade:** corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de um determinado intervalo de concentrações onde o método será aplicado<sup>77,79</sup>. Normalmente a linearidade pode ser inferida pela observação de parâmetros como o coeficiente de regressão “b”, o intercepto “a” e o coeficiente de correlação “R”. A ANVISA<sup>75</sup> recomenda um  $R=0,99$  e o INMETRO<sup>76</sup> um valor de  $R>0,90$ .

**Sensibilidade:** expressa a fração de sinal que é acrescida quando a concentração da espécie de interesse tem seu valor elevado em uma unidade. Geralmente é

feita uma regressão, pelo método de mínimos quadrados, entre os valores instrumentais em função da concentração (calibração clássica) ou admitindo a concentração como função das medidas instrumentais (calibração inversa) e a sensibilidade em ambos os casos é determinada pela inclinação (coeficiente angular) ou o inverso da inclinação da curva analítica<sup>73,76</sup>.

**Sensibilidade Analítica:** Indica a menor diferença de concentração que pode ser distinguida na faixa linear dinâmica do modelo univariado. Este parâmetro representa o melhor valor ou valor limite que poderia ser obtido caso se tivesse um ajuste perfeito do modelo de calibração, sendo limitado apenas pelo ruído instrumental. É definida como a razão entre a sensibilidade e o ruído instrumental, o qual é definido como o desvio padrão do branco<sup>71</sup>.

**Faixa linear dinâmica:** corresponde ao intervalo de massas ou concentrações no qual se pode construir uma curva analítica linear<sup>73</sup>.

**Precisão:** Expressa o grau de concordância entre os resultados de uma série de medidas realizadas para uma mesma amostra homogênea em condições determinadas. A precisão é calculada através da equação (29), por uma estimativa do desvio padrão absoluto (s). Outra maneira de estimar a precisão é através do intervalo de confiança da média, que também atesta a *Incerteza da medição*, por meio da equação (30)<sup>95</sup>. Finalmente uma última maneira de estimar-se a precisão é por meio da equação (31), pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV). Em geral a precisão pode ser obtida nos níveis de repetibilidade (mesmas condições e um curto intervalo de tempo), precisão intermediária (diferentes dias ou diferentes analistas, por exemplo) e reprodutibilidade (ensaios interlaboratoriais)<sup>75,76,79</sup>.

**Exatidão:** Expressa o grau de concordância entre o valor estimado ou medido e o valor tido como verdadeiro ou de referência<sup>76,79</sup>. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação, adição de padrão<sup>73</sup>.

**Limite de Detecção (LD):** equivale a menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada<sup>76,79,101</sup>. O LD pode ser calculado através do método visual<sup>73</sup>, método da relação sinal-ruído<sup>73</sup> ou pelo método baseado em parâmetros da curva analítica (equação (32))<sup>71,73</sup>.

**Limite de Quantificação (LQ):** representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser medida com uma incerteza máxima de 10%<sup>76,79</sup>. O LQ, assim como o LD, pode ser calculado através do método visual<sup>73</sup>, da relação sinal-ruído<sup>73</sup> ou com base em parâmetros da curva analítica (equação (33))<sup>71,73</sup>.

**Robustez:** é uma medida da sensibilidade frente a pequenas variações de determinados fatores a que o método pode estar sujeito, como por exemplo: temperatura, umidade, analista, etc. O método é dito robusto quando ele não é afetado por essas pequenas variações<sup>76</sup>.

**Razão Sinal/Ruído:** é definido pela razão do sinal analítico da propriedade de interesse e o sinal do ruído instrumental que é estimado pela flutuação do sinal do branco<sup>95</sup>. Pode ser estimado através de parâmetros da curva analítica<sup>71</sup>.

**Intervalo de Confiança:** em calibração univariada é caracterizado pela incerteza nos valores de y na calibração<sup>85</sup>.

**Quadro 1.** Equações para figuras de mérito em calibrações de ordem zero

$\xi_{i,a} = \frac{S_a}{S_i} \quad (28)$	$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (29)$
Intervalo de confiança da média = $\bar{x} \pm t_{n-1} \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (30)$	RSD (%) ou CV (%) = $\frac{S}{\bar{x}} 100 \quad (31)$
$LD = 3,3 \frac{S}{S} \quad (32)$	$LQ = 10 \frac{S}{S} \quad (33)$

$S_a$  = sensibilidade da propriedade de interesse;  $S_i$  = sensibilidade de um interferente;  $\bar{x}$  = média aritmética de um pequeno número de determinações, sendo uma estimativa de  $\mu$  a média da população;  $x_i$  = valor individual de uma medição;  $n$  = número de medições;  $t_{n-1}$  = valor crítico da distribuição de Student no nível desejado de confiança, com  $n-1$  graus de liberdade;  $S$  = inclinação ("slope") ou coeficiente angular da curva analítica.

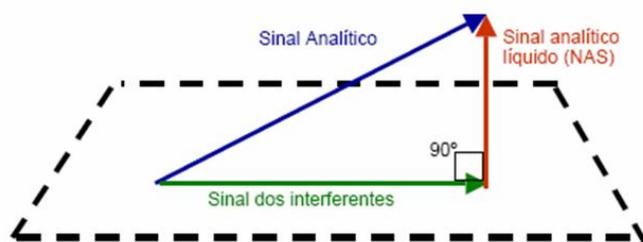
### 3.3. Figuras de mérito e calibração multivariada

#### 3.3.1. Sinal analítico líquido (NAS)

O conceito de sinal analítico líquido (NAS – do inglês, Net Analyte Signal) exerce uma importante função na determinação de algumas figuras de mérito em calibrações multivariadas. Cálculos de seletividade e razão sinal/ruído requerem o cálculo do sinal analítico líquido do analito de interesse, que é a fração do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos demais compostos presentes na amostra<sup>102</sup>. Para métodos de calibração de primeira ordem obtém-se um vetor de sinal analítico líquido que pode ser representado em sua forma escalar sem perda de informação. Em métodos de calibração de segunda ordem, a contribuição individual de cada componente é armazenada em um fator do modelo, logo o sinal analítico líquido para cada espécie linearmente independente, presente na amostra é armazenado separadamente.

A maior parte dos trabalhos publicados com calibração multivariada atribuem o método para o cálculo do NAS para modelos multivariados ao trabalho

descrito por Lorber em 1986<sup>102</sup>. Recentemente, Brown<sup>103</sup> citou em um de seus trabalhos que, embora raramente citado, Morgan<sup>104</sup> teria discutido um conceito similar ao NAS, antes que Lorber, no ano de 1977, entretanto, o trabalho proposto por Morgan teria alguns erros<sup>103</sup>. O método original proposto por Lorber em 1986 foi desenvolvido para modelos de calibração direta ou baseada em mínimos quadrados clássicos (CLS - Classical Least Squares). Em 1997, Lorber, Faber e Kowalski<sup>105</sup> propuseram o cálculo para modelos multivariados de calibração inversa. Paralelo ao método proposto por esses autores, no mesmo ano foi publicado por Xu e Schechter<sup>106</sup> uma proposta para o cálculo do NAS com base na proposta de Lorber, entretanto, o vetor NAS para cada amostra seria relacionado à concentração por regressão nas componentes principais. A proposta do método foi mais voltada para criação de um novo algoritmo capaz de definir automaticamente o número ótimo de fatores, e não propriamente uma modificação na maneira de calcular o NAS. Ainda em 1997, Wentzell, Andrews e Kowalski<sup>107</sup> propuseram um método para o cálculo do NAS que implicava no conhecimento do espectro puro do analito de interesse e que, portanto não é geralmente aplicável. Os três métodos trazem em comum o cálculo de uma matriz de projeção ortogonal e a propriedade de ortogonalidade do NAS pode ser observada pela representação geométrica da Figura 12<sup>108</sup>.



**Figura 12.** Representação geométrica da propriedade de ortogonalidade do NAS.

O método proposto por Lorber<sup>102,105</sup>, foi corrigido por Ferré, Brown e Rius<sup>109</sup> para possibilitar o cálculo exato do NAS para modelos de calibração construídos a partir dos métodos de regressão por PLS e PCR. As equações citadas ao longo deste tópico estão dispostas no Quadro 2.

Diversos trabalhos apresentam diferentes propostas para o cálculo do NAS, onde pode-se demonstrar a sua equivalência como discutido por Andersen e Bro<sup>110</sup>. Em uma das primeiras propostas sugeridas na literatura, primeiramente  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{y}$  são reconstruídos com “A” variáveis latentes gerando  $\hat{\mathbf{X}}_A$  e  $\hat{\mathbf{y}}_A$ , segundo as equações (34) e (35)<sup>109</sup>:

O próximo passo é a determinação da matriz  $\hat{\mathbf{X}}_{A,-k}$ , que contém a informação de todas as espécies presentes na amostra exceto a informação referente à espécie k. Essa determinação é realizada através de uma projeção ortogonal baseada na operação matricial que estabelece que para uma matriz  $\mathbf{X}$  qualquer, a matriz  $\mathbf{X}\mathbf{X}^+$  (onde “+” indica a Moore-Penrose pseudo inversa da matriz) é uma matriz de projeção com as propriedades das equações (36) e (37)<sup>102</sup>:

A partir dessas propriedades, se qualquer vetor  $\mathbf{z}$  for uma combinação linear da matriz  $\mathbf{X}$ , a multiplicação de  $\mathbf{z}$  pela matriz  $\mathbf{X}\mathbf{X}^+$  fornecerá como resultado o

próprio vetor  $\mathbf{z}$ . No entanto, a multiplicação de  $\mathbf{z}$  por  $(\mathbf{I}-\mathbf{X}\mathbf{X}^+)$ , (onde  $\mathbf{I}$  representa a matriz identidade de dimensões adequadas) resultará em um vetor de zeros. Assim, a multiplicação de um vetor pela matriz  $(\mathbf{I}-\mathbf{X}\mathbf{X}^+)$  fornecerá como resultado um vetor que será ortogonal à matriz  $\mathbf{X}$ . Dessa forma, a matriz  $\hat{\mathbf{X}}_{\mathbf{A},-\mathbf{k}}$  é obtida como na equação (38)<sup>111</sup>:

Agora, a matriz  $\hat{\mathbf{X}}_{\mathbf{A},-\mathbf{k}}$  está livre de qualquer contribuição da espécie  $k$  uma vez que a projeção realizada na equação (38) indica a parte da matriz  $\mathbf{X}$  que é ortogonal ao vetor  $\mathbf{y}$  que contém os valores do método de referência e, portanto, a matriz  $\hat{\mathbf{X}}_{\mathbf{A},-\mathbf{k}}$  contém a parte de  $\mathbf{X}$  que não possui relação com  $\mathbf{y}$ . O vetor NAS pode, então, ser obtido com uma nova projeção que indicará a parte da matriz  $\mathbf{X}$  que é ortogonal à matriz de interferentes  $\hat{\mathbf{X}}_{\mathbf{A},-\mathbf{k}}$ , resultando assim, na parte de  $\mathbf{X}$  que não possui relação com os interferentes, conforme a equação (40):

Uma vez que  $\hat{\mathbf{x}}_{\mathbf{A},\mathbf{K}}^{\text{nas}}$  é livre de interferentes, é possível substituí-lo por uma representação escalar, sem perda de informação, como mostrado na equação (41). Com a possibilidade de calcular um valor escalar livre de interferentes, a partir de um vetor contendo contribuições de constituintes desconhecidos, é possível construir uma nova forma de calibração multivariada, em que o modelo pode ser representado em uma forma pseudo-univariada. A representação univariada de um modelo de calibração multivariada possibilita avaliar a porção do sinal que eficientemente participa do modelo<sup>112</sup>.

De posse do cálculo do NAS para as “i” amostras de calibração, o coeficiente de regressão pode ser determinado, por mínimos quadrados, entre o

vetor **nâs** e o vetor de concentrações **y** como na equação (42), e o modelo de regressão pode ser, então, representado pela equação (43).

Quando os dados são centrados na média para a construção do modelo de calibração multivariada, o vetor **nâs** precisa ser corrigido para evitar um erro de sinal que é introduzido pelo uso na norma Euclidiana, antes da determinação do coeficiente de regressão  $\hat{b}_{nas}$ . Esta correção pode ser feita multiplicando cada elemento do vetor **nâs** pelo seu sinal correspondente no vetor  $(y - \bar{y})$ , onde  $\bar{y}$  é a média do vetor **y** que contém os valores de referência<sup>113</sup>.

Após todo esse desenvolvimento surgiram ainda outras proposições para o cálculo do NAS. Andersen e Bro<sup>110</sup> propõem o cálculo do NAS com base na projeção da matriz de *loadings*, enquanto Goicoechea e Olivieri<sup>111</sup> propõem o cálculo do NAS com base na projeção da matriz dos *scores*. No fundo os métodos existentes para o cálculo do NAS são equivalentes<sup>110</sup> e o método proposto inicialmente por Lorber é o mais empregado em trabalhos científicos<sup>114</sup>.

Um exemplo de aplicação foi mostrado por Poppi et. al.<sup>115</sup> que empregaram o conceito do NAS considerado por Lorber na validação de modelos PLS para determinações diretas de diclofenaco em formulações farmacêuticas utilizando espectrofotometria no ultravioleta. O cálculo do NAS para dados analíticos de primeira ordem parece estar consolidado de acordo com a definição inicial proposta por Lorber e se encontra, inclusive, na última recomendação da IUPAC<sup>95</sup> para cálculo da incerteza e estimativa de figuras de mérito em calibração multivariada publicada no ano de 2006.

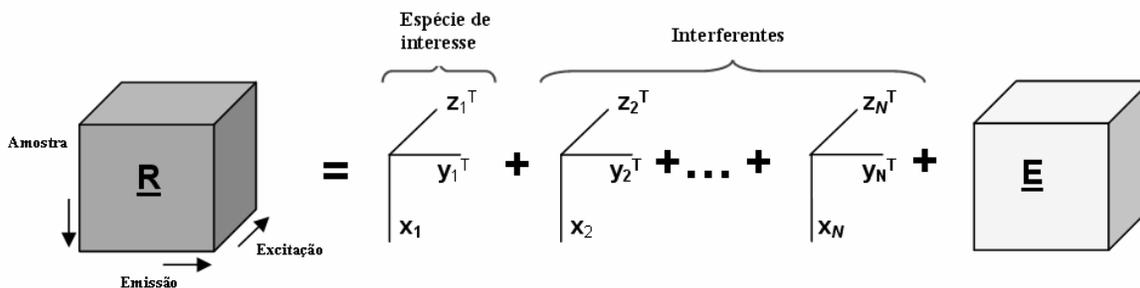
O sinal analítico líquido para dados de segunda ordem é análogo ao de dados de primeira ordem no sentido de que buscam informação da parte do sinal que é relacionado à propriedade de interesse, o cálculo, porém é diferente.

O primeiro método para o cálculo do NAS em dados de segunda ordem foi proposto por Ho, Christian e Davidson<sup>116</sup> no ano de 1980, antes mesmo que Lorber propusesse o princípio para dados de primeira ordem. Este método ficou conhecido como HCD e para sua aplicação é necessário que os dados sejam bilineares calibrados por métodos como PARAFAC e BLLS. O cálculo do NAS através deste método tem como resultado a parte da matriz de dados de uma amostra que possui somente informação da propriedade de interesse.

Em 1993, Wang, Borgen, Kowalski, Gu e Turecek<sup>117</sup> propõem o cálculo do NAS para dados de segunda ordem estimando o posto analítico líquido (NAR – do inglês, Net Analyte Rank), conforme a equação (44) e o método ficou conhecido como WBKGT.

Como o  $NAR_N$  é o posto da propriedade de interesse, o NAS, para dados bilineares modelados por PARAFAC ou BLLS pode ser calculado pela equação (45).

Através desta proposta, o NAS é a parte do sinal relativa à propriedade de interesse da amostra obtida na decomposição do tensor. Uma representação geométrica deste método pode ser observada através da Figura 13<sup>55</sup>:



**Figura 13.** Sinal analítico líquido em calibração de segunda ordem.

onde,  $\underline{X}$  é o tensor de dados e  $\underline{E}$  corresponde aos resíduos deixados pela decomposição do tensor  $\underline{X}$  em suas matrizes de *loadings*  $\mathbf{X}$ ,  $\mathbf{Y}$  e  $\mathbf{Z}$ .

Um exemplo de aplicação do método WBKGT foi realizado por Trevisan e Poppi<sup>118</sup> na determinação direta de doxorubicina em plasma sanguíneo humano por fluorescência e calibração por PARAFAC. O cálculo do NAS segundo a metodologia WBKGT possibilitou estimar figuras de mérito como sensibilidade, seletividade e limite de detecção.

No ano de 1996, Bro<sup>119</sup> propôs uma nova metodologia, conhecida como N-PLS (Mínimos Quadrados Parciais N-dimensional – do inglês, N-way Partial Least Squares), para modelar dados de segunda ordem. Com N-PLS e com metodologias de calibração de segunda ordem, como por exemplo, PLS desdobrado e PCR desdobrado, o tensor de dados é decomposto em *scores* e *loadings* mais os resíduos não modelados. Para este tipo de estrutura dos dados o método WBKGT e o método HCD não podem ser aplicados, assim, um outro método para o cálculo do NAS deve ser empregado. Messick, Kalivas e Lang<sup>120</sup>, propõem um método, conhecido como MKL, onde o NAS é calculado a partir de um vetor de dados que é obtido do desdobramento do tensor de dados inicial. A

partir de então, o cálculo pode ser obtido como no método proposto por Lorber para dados de primeira ordem.

Um exemplo de aplicação do cálculo do NAS através dos métodos HCD e MKL foi mostrado por Olivieri et al<sup>94</sup> que monitoraram naproxeno em urina humana e ibuprofeno em soro sanguíneo humano por fluorescência e calibração por BLLS. O NAS, estimado através dos métodos HCD e MKL, possibilitou uma comparação no cálculo da sensibilidade que se mostrou mais condizente a partir da estimativa do NAS pelo método HCD.

Com relação aos três métodos propostos para o cálculo do NAS em dados de segunda ordem, pode-se concluir que a aplicação de um ou outro método fica restrita ao método de calibração de segunda ordem empregado. Para dados modelados por PARAFAC e BLLS, o método MKL também pode ser empregado no cálculo do NAS, entretanto, devido à decomposição dos dados originais que é obtida empregando o PARAFAC e o BLLS a estimativa do NAS através do método MBKGT ou HCD torna-se muito mais consistente, recuperando os perfis das espécies puras.

**Quadro 2.** Equações para o desenvolvimento da teoria de sinal analítico líquido.

$\hat{\mathbf{X}}_A = \mathbf{T}_A \mathbf{P}_A^T + \mathbf{E}$ (34)	$n\hat{a}s_i = \ \hat{\mathbf{x}}_{A,K}^{nas}\ $ (41)
$\hat{\mathbf{y}}_A = \mathbf{U}_A \mathbf{q}_A + \mathbf{f}$ (35)	$\hat{\mathbf{b}}_{nas} = (\mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}s^T \mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}s)^{-1} \mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}s^T \mathbf{y}$ (42)
$\mathbf{X} = (\mathbf{X}\mathbf{X}^+) \mathbf{X}$ (36)	$\hat{\mathbf{y}} = \hat{\mathbf{b}}_{nas} \mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}s + \mathbf{E}$ (43)
$\mathbf{X}^+ = \mathbf{X}^+ (\mathbf{X}\mathbf{X}^+)$ (37)	$NAR_N = \text{rank}(\mathbf{M}) - \text{rank}(\mathbf{M}/N)$ (44)
$\hat{\mathbf{X}}_{A,-k} = (\mathbf{I} - \hat{\mathbf{y}}_{A,k} \hat{\mathbf{y}}_{A,k}^+) \hat{\mathbf{X}}_A$ (38)	$NAS_N = \mathbf{z}_{iN} \sum_{i=1}^{NAR_N} \mathbf{x}_i \mathbf{y}_i^T$ (45)
$\hat{\mathbf{y}}_{A,k} = \hat{\mathbf{X}}_A \hat{\mathbf{X}}_A^+ \mathbf{y}_k$ (39)	$\mathbf{R}_{ijk} = \sum_{n=1}^N \mathbf{X}_{in} \mathbf{Y}_{jn} \mathbf{Z}_{kn}$ (46)
$\hat{\mathbf{x}}_{A,k}^{nas} = (\mathbf{I} - \hat{\mathbf{X}}_{A,-k}^T (\hat{\mathbf{X}}_{A,-k}^T)^+ ) \hat{\mathbf{x}}_A$ (40)	

$\mathbf{T}$  e  $\mathbf{U}$  são os *scores*;  $\mathbf{P}$  e  $\mathbf{q}$  são os *loadings*; e  $\mathbf{E}$  e  $\mathbf{f}$  representam o erro de decomposição da matrix  $\mathbf{X}$  e do vetor  $\mathbf{y}$ , respectivamente;  $\hat{\mathbf{y}}_{A,k}$  é o vetor de concentrações da espécie de interesse  $k$  estimado com  $A$  variáveis latentes segundo a equação (12);  $\hat{\mathbf{x}}_A$  é o vetor de respostas instrumentais de uma amostra estimado com  $A$  variáveis latentes;  $\|\cdot\|$  representa a norma Euclidiana do vetor  $\hat{\mathbf{x}}_{A,k}^{nas}$ ;  $N$  e  $M$  são a espécie de interesse e a mistura de espectros, respectivamente. O rank do tensor de dados (matrizes de dados para cada amostra organizadas no formato de um cubo de dados) é definido como o número de componentes principais utilizados na decomposição do tensor;  $\mathbf{x}_i$ ,  $\mathbf{y}_i$  e  $\mathbf{z}_{iN}$  são obtidos por decomposição do conjunto de calibração como na equação (19).

### 3.3.2. Cálculo de figuras de mérito em calibração multivariada

Figuras de mérito, como já mencionado, são parâmetros que certificam que o procedimento proposto é confiável e atende a determinadas especificações impostas pela indústria ou por algum órgão de fiscalização. A determinação de alguns desses parâmetros em modelos de calibração multivariada como, por exemplo, exatidão, precisão, robustez, ajuste e bias, não apresentam maiores dificuldades e são estimados de maneira bastante similar aos métodos de calibração univariada. Por outro lado, essa similaridade não pode ser observada para a estimativa de parâmetros como a linearidade, sensibilidade, razão sinal/ruído, seletividade e intervalos de confiança ou incerteza.

A seletividade e a razão sinal/ruído somente podem ser estimadas mediante o cálculo do NAS para a propriedade de interesse a ser quantificada.

Quando se trata de métodos de calibração de segunda ordem são observadas algumas diferenças com relação ao cálculo de algumas figuras de mérito em relação à calibração de primeira ordem. Ainda não se tem um consenso na literatura de uma proposta para a determinação da seletividade para modelos multivariados. Diferenças nas estimativas também são observadas principalmente para sensibilidade comparando as equações empregadas em diversos modelos.

Uma exceção é o modelo de Resolução Multivariada de Curvas (MCR – do inglês, Multivariate Curve Resolution), onde as estimativas das figuras de mérito podem ser realizadas de forma análoga à que é feita em calibração univariada. Tauler et. al.<sup>91</sup> propuseram uma abordagem simples para determinação de figuras de mérito em resolução multivariada de curvas de segunda ordem. Neste procedimento, os perfis puros de resposta da propriedade de interesse são obtidos possibilitando o cálculo de figuras de mérito como limite de detecção, sensibilidade, precisão e exatidão, como em calibração univariada. Os autores determinam trifeniltina (TPhT) em amostras sintéticas e em água do mar utilizando fluorescência de excitação e emissão. Garrido Frenich et. al.<sup>93</sup> validaram um método para determinação de pesticidas em águas subterrâneas. Os dados foram obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) e os espectros puros foram obtidos utilizando MCR. A validação da metodologia foi realizada por determinação das figuras de mérito calculadas da mesma forma que em calibração univariada.

As figuras de mérito que serão comentadas a seguir estão de acordo com normas específicas, como a ASTM<sup>41</sup>, para validação em calibração multivariada a partir de espectroscopia no infravermelho, e trabalhos científicos divulgados por

meio de periódicos. As equações citadas ao longo deste tópico estão dispostas no Quadro 3.

**Exatidão:** Algumas vezes o erro médio de estimativa da propriedade de interesse é referido como uma estimativa da exatidão e utilizado para a comparação dos resultados obtidos em trabalhos com calibração multivariada através da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP – do inglês, Root Mean Squares Error of Prediction)<sup>34</sup>, equação (47). Entretanto, estes são os parâmetros globais que incorporam tanto erros sistemáticos quanto aleatórios. Na comparação de resultados entre os dois métodos distintos, a exatidão pode ser acessada por meio da comparação dos valores obtidos para a inclinação e o intercepto de uma reta ajustada entre os valores de referência e os estimados pelo modelo. Isto pode ser melhor observado através da elipse de confiança, onde, caso os intervalos de confiança para esses parâmetros contiverem os seus valores esperados iguais a 1 e 0, para a inclinação e o intercepto, respectivamente, os modelos podem ser considerados estatisticamente equivalentes no nível de confiança considerado. Valores estimados para a inclinação e intercepto fora de seus intervalos de confiança indicam erros sistemáticos proporcionais e constantes, respectivamente<sup>121</sup>. Trabalhos recentes com calibração multivariada mostram essa consideração da elipse de confiança tanto para calibração de primeira ordem<sup>90</sup> quanto para a calibração de segunda ordem<sup>96,97</sup>.

**Precisão:** Assim como na calibração univariada, em geral é considerada em três níveis:

- Repetibilidade: É a precisão do método em um curto intervalo de tempo. Segundo a norma E1655-00 da ASTM<sup>41</sup>, são necessárias um mínimo de

três amostras em concentrações diferentes, cobrindo a faixa útil do modelo de calibração e seis replicatas para cada nível de concentração. Segundo a ICH<sup>79</sup> são necessárias apenas três replicatas para cada nível de concentração. O cálculo é realizado conforme a equação (48).

- Precisão intermediária: A extensão em que a precisão intermediária deve ser determinada depende das circunstâncias em que o método será aplicado.
- Reprodutibilidade: É acessada por meio de ensaios interlaboratoriais.

**Robustez:** Consiste em testar a performance do modelo de calibração multivariada frente a alguns tipos de variações e averiguar se estas são ou não significativas<sup>74</sup>.

**Bias (Vies):** Segundo a IUPAC<sup>86</sup>, o termo bias é atribuído a erros sistemáticos que são calculados pela diferença entre a média da população e o valor verdadeiro e são todas as componentes de erro que não são aleatórias. A norma E1655-00 da ASTM<sup>41</sup> aborda a investigação desse parâmetro através de um teste-t para as amostras de validação no nível de 95% de confiança. O bias médio para o conjunto de validação é calculado pela equação (49). A seguir, o desvio padrão dos erros de validação (SDV – do inglês, Standard Deviation of Validation) é estimado através da equação (50) e por fim o valor de t é obtido da equação (51). Caso o valor encontrado apresente resultado maior do que seu valor crítico para  $n_v-1$  graus de liberdade, em que  $n_v$  corresponde ao número de amostras da validação, é um indicativo de que erros sistemáticos presentes no modelo multivariado são significativos.

**Sensibilidade:** Corresponde à fração do sinal responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração à propriedade de interesse<sup>102,109</sup>. É determinada através da equação (52)<sup>95</sup> e quando o NAS é determinado, o vetor de sensibilidade líquida  $s_k^{nas}$  para cada amostra do conjunto de calibração, pode ser determinado a partir do vetor  $\hat{x}_{A,k}^{nas}$  como na equação (53) de onde o escalar pode ser obtido como na equação (54)<sup>88-90</sup>. Para dados de segunda ordem, quando o NAS é calculado a partir: 1. HCD, a sensibilidade é definida pela equação (55)<sup>122</sup>; 2. WBKGT, a sensibilidade é definida pela equação (56)<sup>55,117</sup>; 3. MKL, a sensibilidade é definida pela equação (57)<sup>123</sup>; Olivieri et. al.<sup>94</sup> fazem uso das equações (55) e (57) para estimar a sensibilidade de modelos de calibração de segunda ordem desenvolvidos a partir de BLLS e fluorescência, para determinação de naproxeno em urina humana e ibuprofeno em soro sanguíneo humano. Os resultados são comparados com os obtidos através de simulação de Monte Carlo, um método para simulação de dados baseado em testes randômicos e aleatoriedade, mostrando que para este método de calibração a sensibilidade obtida por HCD é mais condizente com valores teóricos obtidos da simulação. Trevisan e Poppi<sup>118</sup> utilizam a equação (56) para calcular a sensibilidade de modelos de calibração de segunda ordem por PARAFAC. Braga e Poppi<sup>87,88</sup> calculam a sensibilidade de modelos de primeira ordem para determinação da pureza polimórfica de carbamazepina por infravermelho e PLS. Valderrama, Braga e Poppi<sup>89,90</sup> calculam a sensibilidade para modelos de primeira ordem empregados na quantificação de parâmetros de controle de qualidade na indústria alcooleira por espectroscopia na região do infravermelho próximo.

Olivieri e Faber<sup>123</sup> propõem uma equação geral, equação (58), para o cálculo da sensibilidade de modelos de calibração de segunda ordem. Esta é a última proposta para o cálculo da sensibilidade de dados de segunda ordem aplicável independentemente do método utilizado para calcular o NAS e que, até o momento, parece ser a mais condizente.

**Sensibilidade Analítica:** Apresenta a sensibilidade do método em termos da unidade de concentração que é utilizada, sendo definida como a razão entre a sensibilidade e o desvio padrão do sinal de referência de acordo com a equação (59)<sup>87,89,90,95,124-126</sup>. Em dados de segunda ordem a equação (59) também é aplicável<sup>127</sup>.

**Seletividade:** É a medida do grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e os interferentes presentes na amostra, indicando também, a parte do sinal que é perdida por essa sobreposição<sup>99</sup>. É definida pela equação (60)<sup>105,109</sup>. Para dados de segunda ordem quando o NAS é calculado a partir do método HCD ou MKL, a seletividade é obtida pela divisão das equações (55) e (57) pelo sinal total da espécie de interesse<sup>128</sup>. Por outro lado, quando o NAS é obtido por WBKGT a equação (61) é a correspondente para o cálculo da seletividade<sup>55,117</sup>.

Trevisan e Poppi<sup>118</sup> utilizam a equação (60) para estimar a seletividade da calibração de segunda ordem para determinação de doxorubicina em plasma humano por fluorescência e PARAFAC, enquanto Olivieri<sup>128</sup> estima a seletividade para vários métodos de calibração de segunda ordem em sistemas binários e ternários obtidos por simulação de Monte Carlo.

**Linearidade:** A avaliação deste parâmetro em calibração multivariada utilizando PLS ou PCR é problemática, uma vez que as variáveis são decompostas pelas

componentes principais. Assim, uma medida quantitativa para a linearidade não corresponde a uma tarefa simples, ou mesmo possível. Qualitativamente, o gráfico dos resíduos para as amostras de calibração e validação pode indicar se os dados seguem um comportamento linear se a distribuição destes resíduos for aleatória<sup>34</sup>.

Vuorela et. al.<sup>129</sup>, mostram que a distribuição aleatória dos resíduos atesta a linearidade de modelos PLS na quantificação de cafeína em tabletes intactos por espectroscopia no infravermelho próximo.

Em calibrações multivariadas de segunda-ordem a linearidade pode ser atestada através da análise de variância, como descrito na seção 2.3.1 do Capítulo II.

**Ajuste:** O ajuste para modelos multivariados não consiste em uma figura de mérito abordada com frequência em guias e normas oficiais. Entretanto, devido à dificuldade em realizar estimativas para linearidade, esse parâmetro é com frequência determinado em trabalhos que envolvem modelos de calibração multivariada. Este parâmetro pode ser estimado a partir da correlação entre os valores tidos como referência e os valores estimados pelo modelo de calibração multivariada, para a propriedade de interesse. Isso é feito determinando por mínimos quadrados, a reta que melhor se ajusta aos valores de referência e os valores estimados pelo modelo<sup>129,130</sup>. Quando o escalar “nas” é determinado, é possível também determinar o ajuste do modelo através da melhor reta que se ajusta à relação do “nas” contra a concentração, para as amostras de calibração<sup>87-89</sup>.

**Razão sinal/ruído:** Indica o quanto da intensidade do NAS da espécie de interesse está acima do desvio padrão do sinal de referência<sup>102,109</sup>. A equação (62)

ilustra a proposta para o cálculo. Para dados de segunda ordem, quando o NAS é estimado por WBKGT, a razão sinal/ruído é estimada através da equação (63)<sup>55</sup>.

**Extensão da faixa de trabalho:** é estabelecida determinando-se a concentração da espécie de interesse em diferentes níveis de concentração. Através dos resultados obtidos, determina-se qual a faixa de concentração na qual os resultados apresentam um nível aceitável de incerteza para o método empregado<sup>74</sup>.

**Limite de Detecção (LD):** Em calibração de primeira ordem, o cálculo do LD é proposto a partir da equação (64)<sup>131</sup>. Para dados de segunda ordem, quando o NAS é estimado por WBKGT o LD é calculado através da equação (65)<sup>55,117</sup>.

**Limite de Quantificação (LQ):** O cálculo do LQ para calibração multivariada é proposto a partir da equação (66)<sup>131</sup>.

**Intervalos de Confiança:** O valor estimado de  $y$  de uma amostra “ $i$ ” pode ser definido como o intervalo no qual se pode afirmar com certo grau de confiança, ou probabilidade, que inclui o valor verdadeiro da propriedade de interesse. O cálculo depende de uma estimativa razoável da variância dos erros de previsão para amostras desconhecidas. Em modelos de calibração multivariada uma determinação razoável de uma estimativa dessas variâncias não constitui uma tarefa simples, pois, ao contrário de modelos univariados (que utilizam uma estimativa de variância que representa a distribuição dos erros que é esperada para novas amostras), modelos de calibração multivariada, na maioria das vezes, necessitam de uma equação que forneça uma estimativa de variância específica para cada nova amostra que está sendo prevista. Estes intervalos podem ser estimados por um teste-t e uma estimativa aproximada para a variância nos erros

de previsão ( $V(PE)$ ) que para modelos de calibração multivariada, como PCR e PLS, vêm sendo focada em duas aproximações<sup>132</sup>. A primeira foi proposta por Hoy, Steen e Martens<sup>133</sup>, a qual foi adotada no pacote comercial Unscrambler e é representada pela equação (67). Essa equação foi posteriormente corrigida por De Vries e Ter Braak<sup>134</sup>, através da introdução de um fator de correção como pode ser observado através da equação (69). O segundo método é descrito por Faber e Kowalski<sup>135-137</sup> e tem base na aproximação de erros em variáveis (EIV – Error in Variable), mais conhecido como método de propagação de erros. A equação para a variância dos erros de previsão leva em consideração fontes de erro como a incerteza do método de referência e das medidas instrumentais como expresso pela equação (70). O segundo método apresenta uma simplificação abordada pela norma E1655-00 da ASTM<sup>41</sup>, cujo cálculo da variância dos erros de previsão é expresso pela equação (72). Esta estimativa é baseada no conceito de pseudo erro médio quadrático da calibração ( $MSEC_p$  – do inglês, Pseudo Mean Square Error of Calibration) calculado a partir da equação (73). Para dados de segunda ordem, quando N-PLS ou U-PLS (Mínimos Quadrados Parciais Desdobrado – do inglês, Unfolded Partial Least Squares) é utilizado para a calibração, Faber e Bro<sup>138</sup> propõem a equação (74) que é uma simplificação da equação (70).

O número efetivo de graus de liberdade envolvidos no cálculo do erro médio quadrático da calibração ( $MSEC$  – do inglês, Mean Square Error of Calibration) consiste em mais uma dificuldade para o cálculo dos intervalos de confiança. Nesse sentido Van der Voet<sup>139</sup> definiu o conceito de pseudograus de liberdade (PDF – Pseudo-Degrees of Freedom), que leva em consideração a diferença entre o erro médio quadrático de calibração estimado por validação cruzada ( $MSECV$  –

Mean Square Error of Cross Validation) e pela previsão das próprias amostras de calibração (MSEC), de modo que quanto maior for essa diferença, menor será o número de graus de liberdade conforme a equação (75). Quando a calibração de primeira ordem for desenvolvida através do método PCR, o conceito de pseudograus de liberdade deve ser desconsiderado. Assim, após o cálculo da variância, com um número apropriado de graus de liberdade, os limites de confiança ( $\varphi$ ) podem ser obtidos através da equação (76). Os limites calculados a partir da simplificação proposta pela ASTM para a estimativa de  $V(PE)$  admitem que a variância dos erros correspondentes às respostas instrumentais das amostras de calibração e previsão são iguais, que a variância dos erros devido ao método de referência é insignificante e que os erros correspondentes às concentrações estimadas, não são correlacionados e seguem uma distribuição normal. Esta última consideração pode ser atestada através de um teste de normalidade<sup>140</sup>. Estudos feitos por Faber<sup>132</sup> mostram que a primeira suposição é consistente com a maior parte das aplicações práticas, contudo em ocasiões em que a variância do método de referência for significativa, esta deve ser considerada no cálculo de  $V(PE)$  conforme a equação (70).

Com relação às estimativas de incerteza para modelos multivariados, principalmente em modelos de calibração de segunda ou ordens superiores, que ainda não se apresentam definidas adequadamente, pode-se citar a utilização de métodos de re-amostragem como *Bootstrap* e adição de ruído<sup>128,132,141-145</sup> como formas de se obter uma estimativa independente da incerteza desses modelos. Dessa forma é possível verificar a veracidade de estimativas obtidas por equações analíticas como as disponíveis para calibração de ordem zero. Esses métodos

procuram estimar a distribuição dos erros para a propriedade de interesse e a partir dela obter a incerteza. Para a obtenção dessa estimativa da distribuição geralmente são adicionados ruídos aleatórios e com intensidade apropriada aos dados instrumentais e/ou concentrações de referências e os cálculos são realizados em um número suficiente de vezes para que se tenha uma estimativa precisa e exata da distribuição dos erros ou de qualquer parâmetro de interesse no modelo. Trabalhos como os de Wehrens et. al.<sup>142,143</sup> e Massart et. all.<sup>132</sup> ilustram a implementação desses métodos para a estimativas de parâmetros em modelos multivariados. A utilização desses métodos para a validação das estimativas de incerteza ou sensibilidade em modelos de calibração de primeira ou segunda ordens foi descrita em diversos trabalhos<sup>143-145</sup>, onde a sua utilidade pode ser comprovada na avaliação de estimativas de incerteza e sensibilidade.

**Quadro 3.** Equações para figuras de mérito em calibração multivariada.

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n_v}} \quad (47) \quad \text{SEN}_{k,\text{MKL}} = k_k \left\{ \left[ (\mathbf{B}^T \mathbf{B}) * (\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \right]_{nn}^{-1/2} \right\} \quad (57) \quad V(\text{PE}_i)_{\text{HSM}} = V_{ry} \frac{1}{2} \left( h_i + \frac{V_{rxi}}{V_{rX}} + \frac{2}{n_c} \right) \quad (67)$$

$$\text{precisão} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (\hat{y}_{ij} - \hat{y}_i)^2}{n(m-1)}} \quad (48) \quad \text{SEN}_{k,\text{OF}} = k_k \left\{ \left[ (\mathbf{B}^T \mathbf{P}_{b,\text{unx}} \mathbf{B}) * (\mathbf{C}^T \mathbf{P}_{c,\text{unx}} \mathbf{C}) \right]^{-1} \right\}^{-1/2} \quad (58) \quad h_i = \sum_{a=1}^A \frac{\hat{t}_{i,a}^2}{\hat{t}^T \hat{t}} \quad (68)$$

$$\text{bias} = \frac{\sum_{i=1}^{n_v} (y_i - \hat{y}_i)}{n_v} \quad (49) \quad \gamma = \frac{\text{SÊN}}{\|\delta x\|} \quad (59) \quad V(\text{PE}_i)_{\text{VB}} = V_{rY} = \left( 1 - \frac{A+1}{n_c} \right) \left( h_i + \frac{V_{rxi}}{V_{rX}} + \frac{2}{n_c} \right) \quad (69)$$

$$\text{SDV} = \sqrt{\frac{\sum [(y_i - \hat{y}_i) - \text{bias}]^2}{n_v - 1}} \quad (50) \quad \text{SÊL}_{k,i} = \frac{n \hat{s}_{k,i}}{\|\mathbf{x}_{k,i}\|} \quad (60) \quad V(\text{PE}_i)_{\text{FK,EIV}} = \left( h_i + \frac{1}{n_c} \right) (V_E + V_y + \|\mathbf{b}\|^2 V_X) + V_{E,i} + \|\mathbf{b}\|^2 V_{xi} \quad (70)$$

$$t_{\text{bias}} = \frac{|\text{bias}| \sqrt{n_v}}{\text{SDV}} \quad (51) \quad \text{SEL}_{\text{WBKGT}} = \frac{\|\text{NAS}\|_F}{\|\mathbf{N}\|_F} \quad (61) \quad V_E = \text{MSEC} - (V_y + \|\mathbf{b}\|^2 V_X) \quad (71)$$

$$\text{SÊN} = \frac{1}{\|\mathbf{b}_k\|} \quad (52) \quad S/R_{k,i} = -\frac{n \hat{s}_{k,i}}{\delta x} \quad (62) \quad V(\text{PE}_i)_{\text{ASTM}} = \left( 1 + h_i + \frac{1}{n_c} \right) \text{MSEC}_p \quad (72)$$

$$s_{\mathbf{k}}^{\text{nas}} = \left\| \frac{\hat{\mathbf{x}}_{\mathbf{A},k}^{\text{nas}}}{\mathbf{y}} \right\| \quad (53) \quad S/R_{\text{WBKGT}} = \frac{\|\text{NAS}\|_F}{\|\mathbf{E}\|_F} \quad (63) \quad \text{MSEC}_p = \sum_{i=1}^{n_c} \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{n_{\text{GL}}} \quad (73)$$

$$\text{SÊN} = \|\mathbf{s}_{\mathbf{k}}^{\text{nas}}\| \quad (54) \quad \text{LD} = 3,3 \delta x \|\mathbf{b}_k\| = 3,3 \delta x \frac{1}{\text{SÊN}} \quad (64) \quad V(\text{PE}_i)_{\text{FB}} = \left( \frac{1}{n_c} + h_i \right) \text{MSEC} + V_y \quad (74)$$

$$\text{SEN}_{k,\text{HCD}} = k_k \left\{ \left[ (\mathbf{B}^T \mathbf{B})^{-1} \right]_{nn} \left[ (\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \right]_{nn} \right\}^{-1/2} \quad (55) \quad \text{LD}_{\text{WBKGT}} = \frac{C}{\left( \|\text{NAS}\|_F / 3 \|\mathbf{E}\|_{F-1} \right)} \quad (65) \quad n_{\text{GL}} = n \left( 1 - \sqrt{\frac{\text{MSEC}}{\text{MSECV}}} \right) \quad (75)$$

$$\text{SEN}_{\text{WBKGT}} = \frac{\|\text{NAS}\|_F}{C} \quad (56) \quad \text{LQ} = 10 \delta x \|\mathbf{b}_k\| = 10 \delta x \frac{1}{\text{SÊN}} \quad (66) \quad \varphi_i = t_{1-\alpha/2, n_{\text{GL}}} \sqrt{V(\text{PE}_i)} \quad (76)$$

$n_v$  é o número de amostras de validação;  $\mathbf{y}_i$  e  $\hat{y}_i$  correspondem aos valores de referência e aos previstos pelo modelo, respectivamente;  $n$  é o número de amostras utilizadas no cálculo da precisão;  $m$  é o número de replicatas de  $n$ ;  $\mathbf{b}_k$  é o vetor dos coeficientes de regressão para a espécie de interesse  $k$  estimados pelo modelo de calibração multivariada;  $s_{\mathbf{k}}^{\text{nas}}$  é o vetor de sensibilidades (deve ser igual para todas as amostras de calibração);  $\hat{\mathbf{x}}_{\mathbf{A},k}^{\text{nas}}$  é o vetor de sinal analítico líquido para a espécie  $k$  com  $A$  variáveis latentes;  $\mathbf{y}$  é o vetor que contém os valores de referência;  $\mathbf{B}$  e  $\mathbf{C}$  são matrizes que possuem nas colunas o perfil para todos os componentes na primeira e segunda dimensão, respectivamente; O subscrito 'nn' indicam o (n,n) elemento de uma matriz;  $k_k$  é o sinal total para o componente 'k';  $\|\cdot\|_F$  representa a norma de uma matriz;  $C$  é a concentração da espécie de interesse na mistura;  $\mathbf{P}_{b,\text{unx}}$  e  $\mathbf{P}_{c,\text{unx}}$  são matrizes identidade;  $\delta x$  é o desvio padrão do sinal de referência estimado através do desvio padrão do valor de NAS para 15 espectros do sinal de referência;  $\gamma^{-1}$  permite estabelecer a menor diferença de concentração entre amostras que pode ser distinguida pelo método;  $n \hat{s}_{k,i}$  é o valor escalar do sinal analítico líquido para a amostra 'i';  $\mathbf{x}_{k,i}$  é o vetor de resposta instrumental para a amostra 'i';  $\mathbf{N}$  é o sinal total para a espécie de interesse na mistura  $\mathbf{M}$ ;  $\mathbf{E}$  é a matriz de erros;  $V_{ry}$ ,  $V_{rx}$ ,  $V_{rxi}$  são a média do quadrado dos resíduos em  $\mathbf{E}$ ,  $\mathbf{f}$  e  $\mathbf{e}_i$  (equações (7) e (8)) para as amostras de calibração, valores de referência e uma amostra desconhecida, respectivamente;  $n_c$  é o número de amostras de calibração;  $h_i$  é o *leverage* de uma amostra desconhecida calculado pela equação (41); 'A' é o número de variáveis latentes;  $i$  e  $\hat{t}_i$  são os *scores* do conjunto de calibração e de uma amostra desconhecida, respectivamente;  $V_y$  é a variância do método padrão utilizado na obtenção dos valores de referência para a propriedade de interesse;  $V_X$  e  $V_{xi}$  são as variâncias das respostas instrumentais para as amostras do conjunto de calibração e de uma amostra 'i' desconhecida;  $\mathbf{b}$  é o vetor com os coeficientes de regressão estimados por PCR ou PLS;  $V_E$  e  $V_{E,i}$  são definidos pela equação (44); MSEC é estimado igual MSEC<sub>p</sub>;  $n_{\text{GL}}$  é o número de graus de liberdade determinado pela abordagem de pseudo-graus de liberdade.

### 3.4. Considerações finais

A confiabilidade dos dados analíticos vem sendo cada vez mais requerida. A necessidade de se averiguar que um método proposto atende ao seu propósito e a normas reguladoras ou órgãos de fiscalização vêm promovendo cada vez mais o desenvolvimento da validação de métodos analíticos através do cálculo das figuras de mérito.

Em calibrações univariadas o cálculo das figuras de mérito é simples e muito bem estabelecido enquanto que para calibrações multivariadas muitas pesquisas ainda estão em desenvolvimento principalmente no que diz respeito a calibrações de segunda ordem.

Em calibração multivariada de dados de primeira ordem, as figuras de mérito como exatidão, precisão, robustez e bias são estimadas de maneira bastante similar aos métodos de calibração univariada, o que não é verdadeiro para parâmetros como linearidade, sensibilidade, razão sinal/ruído, ajuste, seletividade e intervalos de confiança. A seletividade e a razão sinal/ruído são parâmetros ainda mais críticos e que somente podem ser estimados mediante o cálculo do sinal analítico líquido para a propriedade de interesse a ser quantificada. Quando se trata de métodos de calibração de segunda ordem são observadas algumas diferenças com relação ao cálculo de algumas figuras de mérito em relação aos métodos de calibração de primeira ordem. Essas diferenças são observadas principalmente para sensibilidade e estão relacionadas com o cálculo do sinal analítico líquido para a propriedade de interesse a ser quantificada. Por outro lado, para o MCR, a estimativa das figuras de mérito é realizada da mesma forma que em calibração univariada.

O cálculo das figuras de mérito para calibração multivariada de dados de primeira ordem, embora complexo, é bem desenvolvido. Para calibração multivariada de dados de segunda ordem, o cálculo é bem mais complexo e muito pouco desenvolvido, as pesquisas são recentes e muita coisa ainda encontra-se em desenvolvimento. Tanto para calibrações de primeira quanto de segunda ordem, a maioria dos trabalhos são mais no sentido do desenvolvimento e evolução, mostrando, comparando e até contestando equações e metodologias, do que no sentido de aplicações.

## ***Capítulo IV***

## Quantificação de enantiômeros do maleato de clorfeniramina

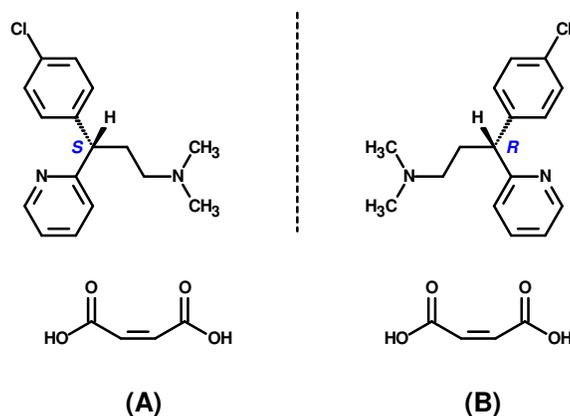
### 4.1. Objetivos

Esta aplicação teve por objetivo o desenvolvimento e a validação de uma metodologia para a quantificação dos enantiômeros do maleato de clorfeniramina a partir de espectroscopia na região do ultravioleta e infravermelho próximo e calibração multivariada de primeira ordem.

### 4.2. Maleato de clorfeniramina

A clorfeniramina ou clorfenamina (CLOR), 3-(4-clorofenil)-N,N-dimetil-3-piridina-2-yl-propano-1-amina, normalmente é comercializado na forma de seu sal, o maleato de clorfeniramina. Este fármaco possui isomeria ótica e os medicamentos que possuem o maleato de clorfeniramina como seus princípios ativos são apresentados em sua forma racêmica. Seu estereoisômero destrorotatório é comercializado como maleato de dexclorfeniramina<sup>146</sup>.

A Figura 14 ilustra a estrutura dos isômeros do maleato de clorfeniramina.



**Figura 14.** Estrutura do maleato de clorfeniramina. **(A)** isômero (S)-CLOR. **(B)** isômero (R)-CLOR.

A CLOR é um anti-histamínico, não sedativo, empregado no tratamento de várias alergias respiratórias e dermatológicas<sup>147</sup>. Muitos estudos têm apontado diferenças farmacodinâmicas entre os enantiômeros da CLOR, porém poucas diferenças farmacocinéticas são observadas. Em humanos foi observado redução da sonolência durante o dia com a administração da (S)-CLOR<sup>148</sup>.

Muitos trabalhos mostram a estereoseletividade da CLOR. Em humanos, o enantiômero (S)-CLOR foi encontrado em maior concentração no plasma sanguíneo quando a CLOR racêmica foi administrada<sup>149-151</sup>. Em cães, a estereoseletividade é observada após a administração da CLOR racêmica por via oral. Porém, na administração por via intravenosa o mesmo efeito não é observado sugerindo um efeito estereoseletivo de primeira passagem no processo de absorção<sup>152</sup>. Em ratos, após a administração da CLOR racêmica por via intravenosa foi observada uma alta concentração do enantiômero (R)-CLOR no plasma sanguíneo e os autores do estudo concluíram que a estereoseletividade pode ser devido à ligação protéica no plasma<sup>153</sup>. Por outro lado, outro estudo envolvendo a administração da CLOR racêmica por via oral e intravenosa também em ratos revelou farmacocinética estereoseletiva com maior concentração da (S)-CLOR em relação à enantiômero (R)<sup>148</sup>.

### **4.3. Análise de enantiômeros da clorfeniramina**

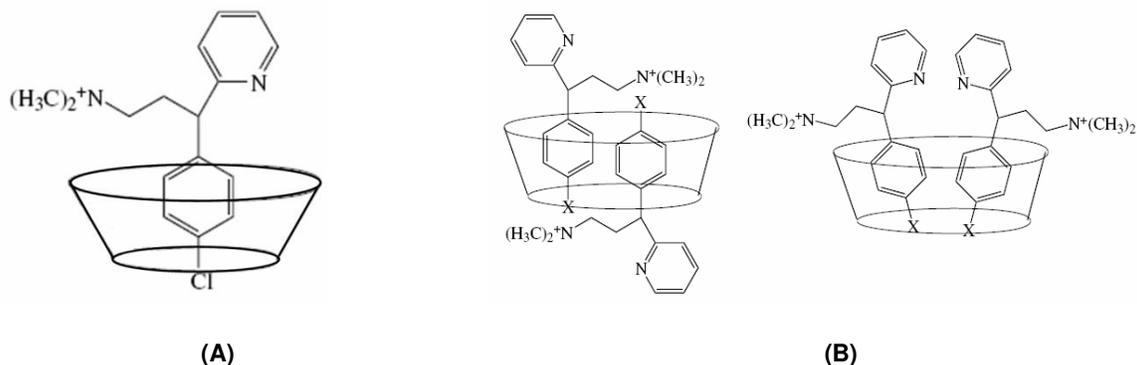
A análise dos enantiômeros da clorfeniramina está consolidada através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) cujo método é descrito na farmacopéia européia<sup>154</sup>. Neste método utiliza-se uma coluna quiral a base de

amilose (Chiralpak AD) e o maleato de clorfeniramina é derivado em sua amina correspondente para a quantificação. Este método já foi empregado na quantificação dos enantiômeros da CLOR em plasma<sup>148</sup> e urina<sup>155</sup>.

Muitas outras propostas já foram apresentadas para a quantificação dos enantiômeros da CLOR. Schuster et. all.<sup>156</sup> separa os enantiômeros da clorfeniramina através de HPLC utilizando uma coluna a base de  $\beta$ -ciclodextrina (Cyclobond I) e coluna de fase reversa revestida com  $\beta$ -ciclodextrina (LiChrosorb ODS). No mesmo trabalho, os autores também propõem a separação via eletroforese capilar empregando  $\gamma$ -ciclodextrina como seletor quiral. Os enantiômeros da CLOR foram determinados via eletroforese capilar empregando também  $\beta$ -CD<sup>157</sup> e seus derivados 2-O-(2-Hidroxibutil)- $\beta$ -ciclodextrina<sup>158</sup> e a carboximetil- $\beta$ -ciclodextrina<sup>159</sup>. Casy, et. all.<sup>160</sup> determinam os enantiômeros da CLOR utilizando HPLC com colunas a base de alfa 1-ácido glicoproteico (Enantiopac) e a base de  $\beta$ -ciclodextrina (Cyclobond I). Esses autores propõem a determinação também via ressonância magnética nuclear de próton (RMN <sup>1</sup>H) através da complexação do diastereoisômero com  $\beta$ -CD.

O método RMN <sup>1</sup>H foi também empregado na quantificação dos enantiômeros do maleato de clorfeniramina com o auxílio de ciclodextrinas. No método proposto os enantiômeros da CLOR não sofrem nenhum tipo de derivatização e são complexados à  $\alpha$ -,  $\beta$ -, e  $\gamma$ -ciclodextrina e seus derivados preparados pela incorporação de grupos carboximetila em posições primárias ou secundárias ou ainda a incorporação de forma indiscriminada<sup>12</sup>.

A Figura 15(A) mostra a formação do complexo de inclusão da clorfeniramina com a  $\beta$ -CD. Na Figura 15(B) observa-se duas possibilidades de formação do complexo de inclusão com os enantiômeros da clorfeniramina com a  $\gamma$ -CD, onde, a letra 'X' da estrutura do substrato da feniramina representa um átomo de cloro para o caso da clorfeniramina. Estas possibilidades mostram diferentes posições de interação dos enantiômeros da CLOR com a cavidade interna da  $\gamma$ -CD.



**Figura 15.** Complexo de inclusão. **(A)** clorfeniramina com a  $\beta$ -CD. **(B)** substrato da feniramina com  $\gamma$ -CD<sup>12</sup>.

A determinação de enantiômeros também pode ser realizada através de um método bastante simples, o dicroísmo circular (DC – do inglês, Circular Dichroism). A técnica aparece como um método oficial na sexta edição da farmacopéia européia<sup>161</sup>. Bossu et. al.<sup>162</sup> empregam DC como detector do método HPLC em estudos dos enantiômeros da CLOR.

A literatura apresenta o emprego de técnicas, como HPLC com detecção por UV, associada a métodos quimiométricos na quantificação da CLOR<sup>163-165</sup>. Entretanto, até o momento, nenhuma das referências encontradas utiliza métodos

espectroscópicos associados a métodos quimiométricos na quantificação dos enantiômeros da CLOR.

## 4.4. Descrição experimental

### 4.4.1. Reagentes

Nesta aplicação foram utilizados os seguintes reagentes:

- (R,S)-maleato de clorfeniramina (Sigma-Aldrich);
- (S)-maleato de clorfeniramina (Sigma-Aldrich);
- $\beta$ -ciclodextrina (Sigma-Aldrich);
- 1-butanol (VETEC);
- Isopropanol (TEDIA)
- Hidróxido de amônio (SICALAB)
- Diclorometano (MERCK)
- n-Hexano 60% (J. T. Baker)
- Dietilamina (J. T. Baker)
- Hidróxido de sódio (Synth)
- Iodoacetato de sódio (Sigma-Aldrich)
- Acetona (VETEC)

#### 4.4.2. Preparo das amostras para medidas espectroscópicas

A partir de soluções estoque de:  $\beta$ -ciclodextrina  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L (1,1350g/100mL), (R,S)-maleato de clorfeniramina, (R,S)-CLOR,  $8,0 \times 10^{-2}$  mol/L (0,15635g/5mL) e (S)-maleato de clorfeniramina, (S)-CLOR,  $8,0 \times 10^{-2}$  mol/L (0,15635g/5mL), preparou-se soluções por diluição com concentração de  $\beta$ -ciclodextrina de  $2,0 \times 10^{-3}$  mol/L e maleato de clorfeniramina com concentração fixa em  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L variando a fração molar dos enantiômeros em intervalos de 2% de 50 a 100% em relação ao isômero (S)-CLOR. Em todas as preparações foram adicionadas 1-butanol na concentração de 0,05 mol/L para auxiliar na complexação enantioseletiva e as amostras foram preparadas em água Mili-Q. Por fim, as amostras prontas passaram por um processo de 10 minutos em banho de ultra-som e foram utilizadas no dia seguinte.

As medidas na região do infravermelho próximo foram registradas em um espectrômetro Perkin Elmer Spectrum 100N, na região de 4400 a 8000  $\text{cm}^{-1}$ , resolução de 0,5  $\text{cm}^{-1}$  e uma média de 32 varreduras, utilizando cubeta de quartzo de 1mm e os espectros na região do ultravioleta foram registrados na faixa de 236 a 291 nm, resolução de 1nm, utilizando um espectrômetro de duplo feixe Cary 5G e cubeta de quartzo de 1mm.

#### 4.4.3. Preparo das amostras para análise por HPLC

A partir de soluções estoque de: (R,S)-maleato de clorfeniramina  $8,0 \times 10^{-2}$  mol/L (0,15635g/5mL) e (S)-maleato de clorfeniramina  $8,0 \times 10^{-2}$  mol/L (0,15635g/5mL),

preparou-se as soluções, por diluição, com concentração de maleato de clorfeniramina fixa em  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L variando a fração molar dos enantiômeros em intervalos de 2% de 50 a 100% em relação ao isômero (S)-CLOR.

Para análise dos enantiômeros da CLOR por HPLC, o método descrito na farmacopéia europeia<sup>154</sup> foi seguido. Nesta metodologia, a amostra do maleato de clorfeniramina em água é adicionada de amônia concentrada para produzir uma reação alcalina. Em seguida procede-se uma extração líquido-líquido com cloreto de metileno. O solvente orgânico é evaporado e o óleo residual, que consiste no composto na forma de uma amina, é dissolvido em isopropanol.

Este procedimento foi repetido para cada uma das amostras. O método proposto na farmacopéia sugeria que a partir da amostra solubilizada em isopropanol um volume de 10  $\mu$ L deveria ser injetado no sistema cromatográfico, porém, alguns testes mostraram dificuldades de eluição nestas condições e para resolver o problema 25  $\mu$ L de cada uma das amostras teve o isopropanol evaporado sendo posteriormente dissolvida em 100  $\mu$ L de fase móvel constituída de dietilamina:2-propanol:hexano (3:20:980 V/V/V) e homogeneizada em vortex por 15 segundos.

A partir desta preparação, um volume de 50  $\mu$ L foi injetado no sistema cromatográfico que consistiu em uma coluna de amilose tris(3,5-dimetilfenil carbamato) revestida sobre 10  $\mu$ m sílica-gel, Chiralpak AD, (Daicel Chemical Industries LTD), (250 mm x 4.6 mm, 10  $\mu$ m). A vazão utilizada foi de 1 mL/min com detecção espectrofotométrica em 254nm.

Sob estas condições o pico referente ao isômero (S)-CLOR aparece no menor tempo de retenção.

O equipamento utilizado foi um Shimadzu LC-10AT<sub>VP</sub> equipado com bomba modelo LC-10AT<sub>VP</sub>, detector de arranjo de diodos SPD-10A<sub>VP</sub>, módulo de comunicação SCL-10AT<sub>VP</sub> e interface compatível com micro-computador através do software LC solution.

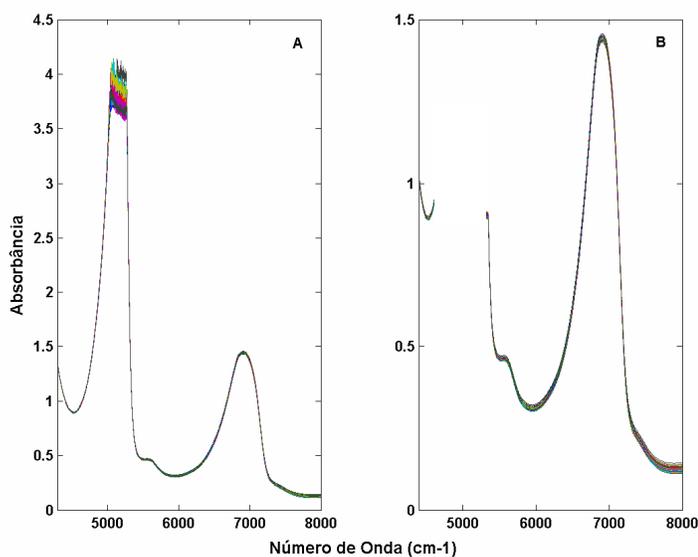
Esta parte do trabalho foi desenvolvida em parceria com Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Pierina Sueli Bonato e seu aluno de doutorado Igor Rafael dos Santos Magalhães do Departamento de Física e Química na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

#### **4.5. Resultados e discussão**

Os dados experimentais para a análise dos enantiômeros da CLOR por espectroscopia foram processados utilizando o programa MatLab 6.5 com aplicação das ferramentas de *PLS toolbox* 4.2. As ferramentas para identificação de amostras anômalas e cálculo das figuras de mérito foram desenvolvidas no laboratório em ambiente MatLab.

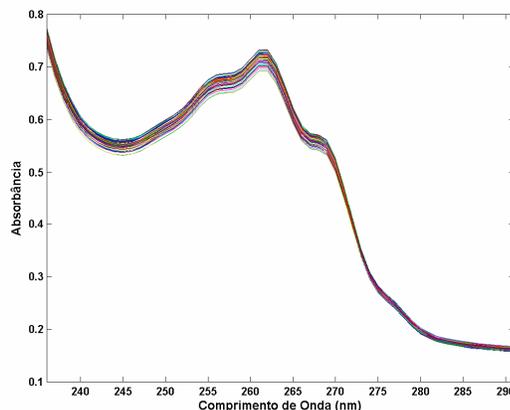
Na análise dos enantiômeros da CLOR por espectroscopia na região do UV e NIR obtém-se um vetor de respostas instrumentais para cada amostra analisada e, portanto modelos de calibração multivariada de primeira ordem através de mínimos quadrados parciais (PLS) são empregados. Vale ressaltar que para a análise dos enantiômeros da CLOR por espectroscopia, trata-se do maleato de clorfeniramina.

A Figura 16 mostra os espectros obtidos na região do infravermelho próximo para as amostras do maleato de clorfeniramina. A região entre 4650 a 5350  $\text{cm}^{-1}$ , (Figura 16B), foi excluída na construção do modelo de calibração. Esta região é referente à forte absorção da água e apresenta uma baixa relação sinal/ruído que contribui para má previsão dos modelos de calibração multivariada.



**Figura 16.** Espectros na região do infravermelho próximo para as amostras do maleato de clorfeniramina. **(A)** região total. **(B)** região utilizada na calibração com eliminação da absorção da água.

Para a construção do modelo de calibração na região do ultravioleta, os espectros das amostras do maleato de clorfeniramina são mostrados na Figura 17.



**Figura 17.** Espectros na região do ultravioleta para as amostras do maleato de clorfeniramina.

Na construção dos modelos de calibração as amostras foram separadas entre conjunto de calibração e validação através do algoritmo de Kennard-Stone<sup>166</sup>. Este algoritmo seleciona as amostras com base em suas distâncias e é de fácil aplicação. A primeira amostra selecionada é a que apresenta a maior distância em relação à amostra média. A segunda amostra a ser selecionada será a que apresentar maior distância em relação à primeira amostra selecionada. A próxima amostra a ser selecionada apresentará maior distância em relação à última amostra selecionada, e assim sucessivamente até atingir o número de amostras desejadas.

Esse algoritmo é aplicado para realizar a seleção das amostras que irão compor o conjunto de calibração, uma vez que procede a seleção das amostras de maior variabilidade, ou seja, as amostras mais “externas” do conjunto total. Assim, cada conjunto de calibração foi inicialmente composto por 32 amostras e o conjunto de validação para a região do infravermelho próximo e para a região do ultravioleta foi composto por 17 e 20 amostras, respectivamente.

O próximo passo consistiu na análise para identificação de amostras anômalas com o objetivo de eliminar amostras com comportamento muito diferente das demais amostras do conjunto de dados. A presença de amostras anômalas pode acarretar ao modelo de calibração uma baixa capacidade de previsão com altos valores de erro e quando presentes no conjunto de validação podem influenciar, geralmente, levando a resultados que indicam que o modelo não é adequado ou que a sua capacidade é inferior à que poderia ser apresentada na ausência destas amostras anômalas. Assim, a identificação desse tipo de amostras foi um passo importante para a otimização dos conjuntos de calibração e validação, sendo que, a sua exclusão permitiu a construção de modelos mais eficientes e precisos e com melhor capacidade de previsão.

Na identificação de amostras anômalas do conjunto de calibração, as amostras consideradas anômalas com base nos testes de *leverage*, resíduos espectrais não modelados e resíduos na variável dependente eram eliminadas e o modelo de calibração novamente reconstruído. Após a otimização dos modelos de calibração, os testes para identificação de amostras anômalas foram aplicados a cada conjunto de validação e os *outliers* para esses conjuntos também foram eliminados.

Todos os modelos foram centrados na média, construídos com 5 variáveis latentes determinado através dos resultados da raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV) para as amostras de calibração, obtido por validação cruzada leave-on-out. Nesse método de validação o modelo é construído e faz-se a previsão de uma das amostras de calibração que foi 'deixada

de fora' no momento da construção do modelo. Esse procedimento é repetido até que todas as amostras do conjunto de calibração tenham sido previstas.

A otimização dos conjuntos de calibração e validação pela eliminação das amostras anômalas resultaram em 29 e 28 amostras de calibração e 13 e 15 amostras de validação para os modelos PLS nas regiões do NIR e UV, respectivamente. A Tabela 2 mostra os resultados para os testes de identificação de amostras anômalas nos conjuntos de calibração e validação bem como os valores da raiz do erro médio quadrático da calibração (RMSEC) e validação (RMSEP) para os modelos à medida que os *outliers* são eliminados (Mod1= primeiro modelo; Mod2= segundo modelo; Mod3= terceiro modelo). Foram realizados os testes para a identificação de anomalias até o segundo modelo de calibração e as anomalias da validação foram avaliadas com base no terceiro modelo de calibração tido como otimizado. Os valores para o *leverage* limite ( $h_{lim}$ )

obtidos para cada modelo como  $3 \frac{A+1}{n}$  (onde, A é o número de variáveis latentes

e n o número de amostras da calibração) são apresentados, mostrando que nos modelos de calibração os valores para o  $h_{lim}$  são próximos a 0,5 que é o valor apresentado como limite, segundo a norma E1655-00 da ASTM, para o critério de parada dos testes de identificação de amostras anômalas no segundo modelo.

Nas amostras de calibração quando se calcula os valores para os resíduos na variável dependente y conforme a equação (8) utilizou-se como valor limite neste caso ( $2 \times RMSEC$ ). Estes valores, para o resíduo na variável dependente, são apresentados na Tabela 2 como o valor médio dos resíduos na variável dependente ( $\bar{y}_{lim}$ ) para cada modelo. Para as amostras de validação, quando o

erro absoluto da previsão é maior do que o valor de  $\bar{y}_{lim}$  do terceiro modelo de calibração, tido como otimizado, estas amostras são eliminadas do conjunto. É possível observar que os valores RMSEC e RMSEP diminuem de forma significativa nos modelos otimizados, indicando que os modelos tornaram-se mais eficientes apresentando maior exatidão.

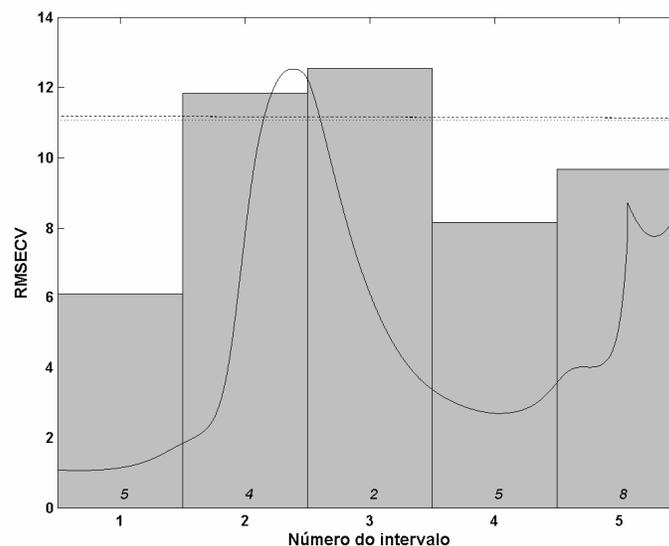
**Tabela 2.** Resultados para os testes de identificação de anomalias para os modelos PLS para os enantiômeros da CLOR.

<b>Testes</b>	<b>Nº Amostrs</b>	<b>Nº anomalias baseadas no Leverage</b>	<b><math>h_{lim}</math></b>	<b>Nº anomalias baseadas no resíduo espectral</b>	<b>Nº anomalias baseadas no Resíduo da variável dependente</b>	<b><math>\bar{y}_{lim}</math></b>	<b>Nº total de anomalias descartadas</b>	<b>RMSEC</b>	<b>RMSEP</b>
<b>Modelos</b>									
<b>NIR Mod1</b>	32	0	0,5625	0	2	1,0727	2	8,6125	12,7070
<b>NIR Mod2</b>	30	0	0,6000	0	1	1,0917	1	6,9101	13,0531
<b>NIR Mod3 Otimizado</b>	29	0	0,6207	0	2	0,1258	-	6,2765	12,7895
<b>NIR<sub>Validação</sub></b>	17	0	0,6207	0	4	0,1258	4	6,2765	12,7895
<b>NIR<sub>Validação</sub> Otimizado</b>	13	0	0,6207	0	0	0,1258	0	6,2765	7,3226
<b>UV Mod1</b>	32	0	0,5625	0	3	1,7942	3	4,5628	6,0504
<b>UV Mod2</b>	29	0	0,6207	0	1	2,0305	1	3,7888	6,3444
<b>UV Mod3 Otimizado</b>	28	0	0,6207	0	1	2,0305	-	3,6311	6,5442
<b>UV<sub>Validação</sub></b>	20	0	0,6207	0	5	2,0305	5	3,6311	6,5442
<b>UV<sub>Validação</sub> Otimizado</b>	15	0	0,6207	0	0	2,0305	0	3,6311	2,8266

O próximo passo do trabalho consistiu na seleção de variáveis através dos métodos iPLS e GA aplicada aos espectros na região do UV e NIR. O objetivo desta etapa foi o de melhorar os modelos desenvolvidos encontrando uma região espectral que apresentasse menores erros tanto de calibração quanto de previsão.

No método iPLS os espectros NIR e UV foram divididos em intervalos eqüidistantes: 10 intervalos, 8 intervalos e 5 intervalos. Em cada situação um modelo PLS foi desenvolvido para cada intervalo nos quais os espectros estavam divididos e o melhor intervalo foi escolhido de acordo com o menor erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV).

Para os espectros NIR um melhor modelo foi alcançado com a divisão em 5 intervalos, como pode ser observado através da Figura 18 que ilustra o valor do RMSECV para cada intervalo onde foi desenvolvido um modelo PLS independente.



**Figura 18.** RMSECV para cada intervalo dos espectros NIR onde foi desenvolvido um modelo PLS independente.

Através da Figura 18 verifica-se que os intervalos número 1, 4 e número 5 apresentam valores de RMSECV menores em relação ao modelo global, o qual é representado pela linha pontilhada na figura. Os números em *itálico* mostrados dentro de cada intervalo são referentes ao número de variáveis latentes ideal para a construção do modelo PLS empregando aquele determinado intervalo.

O intervalo número 1 é o que apresenta menor valor de RMSECV, porém o intervalo número 4, referente aos números de onda de 5680 a 6259  $\text{cm}^{-1}$ , foi o intervalo utilizado para o desenvolvimento de um novo modelo de calibração empregando os espectros NIR na quantificação dos enantiômeros da clorfeniramina. Isto porque, o modelo desenvolvido com este intervalo apresentou melhor capacidade de previsão em relação ao intervalo número 1.

Para o desenvolvimento do modelo, que inicialmente contou com 5801 variáveis, ocorreu uma redução para 1160 variáveis. Os modelos foram centrados na média, utilizando 5 variáveis latentes e o procedimento de identificação de amostras anômalas foi aplicado. Um modelo com menores valores de RMSEC e RMSEP foi alcançado em relação aos resultados do modelo NIR otimizado apresentado na Tabela 2. Entretanto, muitas amostras anômalas foram eliminadas na etapa de validação o que pode comprometer o modelo na previsão de amostras futuras.

Desta maneira, o método iPLS não apresentou resultados satisfatórios para a seleção de variáveis na região do NIR para desenvolvimentos de modelos de calibração multivariada na quantificação dos enantiômeros da CLOR.

Na implementação do GA o tamanho da população inicial foi de 64 com 0,005 de probabilidade de mutação, cruzamento duplo, máximo de 100 gerações e

10 replicatas. O GA selecionou um total de 1715 variáveis que foi empregada no desenvolvimento do novo modelo que também foi centrado na média e construído com 5 variáveis latentes. Os testes para identificação de amostras anômalas foram aplicados e um total de 5 amostras da calibração e 5 amostras da validação foram identificadas como anômalas e excluídas.

Os erros do modelo otimizado construído com as variáveis selecionadas pelo GA foram de 5,14 e 5,30 % (S)-CLOR para o RMSEC e RMSEP, respectivamente. Estes resultados são mais satisfatórios do que os apresentados na Tabela 2 onde todas as variáveis espectrais são utilizadas na construção do modelo.

Portanto, o GA mostrou melhores resultados em relação ao método iPLS na seleção de variáveis dos espectros NIR para a quantificação dos enantiômeros da CLOR e, o modelo desenvolvido com as variáveis selecionadas pelo GA, mostrou-se mais eficiente do que o modelo desenvolvido com todas as variáveis do espectro NIR.

A tentativa de melhorar os modelos construídos a partir dos espectros UV pela seleção de variáveis não mostrou sucesso. Com o método iPLS, os intervalos apresentaram maiores resultados para os valores de RMSECV do que o modelo global que utiliza todas as variáveis espectrais. Essa observação foi constatada para a divisão dos espectros em 10 intervalos, 8 intervalos e 5 intervalos. O GA também não promoveu uma seleção de variáveis que melhorasse o modelo de calibração construído empregando-se todas as variáveis do espectro UV, os valores de RMSEC e RMSEP foram de 3,10 e 4,08 % (S)-CLOR, respectivamente.

Isto pode ter ocorrido porque o modelo global para a região UV já foi construído com um pequeno número de variáveis espectrais, apenas 56 variáveis.

Apesar da região UV não mostrar melhora no modelo de calibração através da seleção de variáveis, o modelo construído com todas as variáveis espectrais do UV mostrou resultados superiores em relação aos modelos NIR. Assim, foram calculadas as figuras de mérito para o modelo PLS desenvolvido para a quantificação dos enantiômeros da CLOR empregando a região do UV.

Através dos resultados da Tabela 2 verifica-se que o modelo PLS desenvolvido na região do UV, modelo PLS/UV, apresenta menores erros de calibração e previsão em relação ao modelo PLS desenvolvido na região do NIR. Isto indica que a aplicação de espectroscopia na região UV é melhor do que na região NIR para a quantificação dos enantiômeros da CLOR.

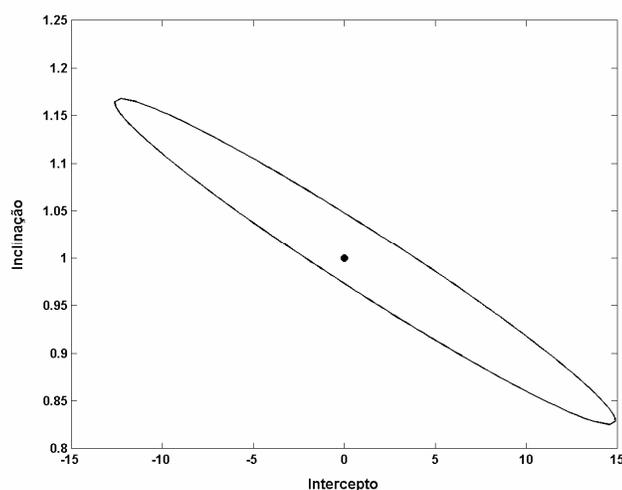
Os resultados das figuras de mérito são mostrados na Tabela 3. Os valores de exatidão são representados pela raiz quadrada do erro quadrático médio da calibração (RMSEC) e da previsão (RMSEP) e revelam que os valores estimados pelos modelos multivariados apresentaram concordância com os resultados esperados.

Os valores de RMSEP e RMSEC são parâmetros globais que incorporam tanto erros sistemáticos quanto aleatórios. Sendo assim, melhores indicadores de exatidão são a regressão entre os valores de referência e os valores estimados pelo modelo e os valores da inclinação e do intercepto incluindo a consideração da região da elipse de confiança, como ilustrado na Figura 19. O ajuste do modelo é ilustrado na Figura 20 e os valores para a inclinação e o intercepto dos ajustes das Figuras 20 são mostrados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Figuras de mérito para o modelo PLS/UV na quantificação da (S)-CLOR.

Figuras de Mérito		Modelo UV (5VL)
Exatidão <sup>a</sup>	RMSEC	3,63
	RMSEP	2,83
Precisão <sup>a</sup>		0,57
Sensibilidade <sup>b</sup>		$8,68 \times 10^{-5}$
Sensibilidade Analítica <sup>a</sup>		0,50
Seletividade		$6,30 \times 10^{-3}$
Ajuste	Inclinação	$0,95 \pm 0,04$
	Intercepto <sup>a</sup>	$3,70 \pm 3,23$
	Coef. Corr. (R)	0,9772
Ajuste NAS	Inclinação	$1,20 \times 10^4 \pm 1,20 \times 10^3$
	Intercepto <sup>a</sup>	$-2,1 \times 10^2 \pm 29,14$
	Coef. Corr. (R)	0,9499
Razão Sinal/Ruído	Máx.	89,70
	Min	64,40
Limite Detecção <sup>a</sup>		$1,10 \times 10^{-3}$
Limite Quantificação <sup>a</sup>		$3,50 \times 10^{-3}$

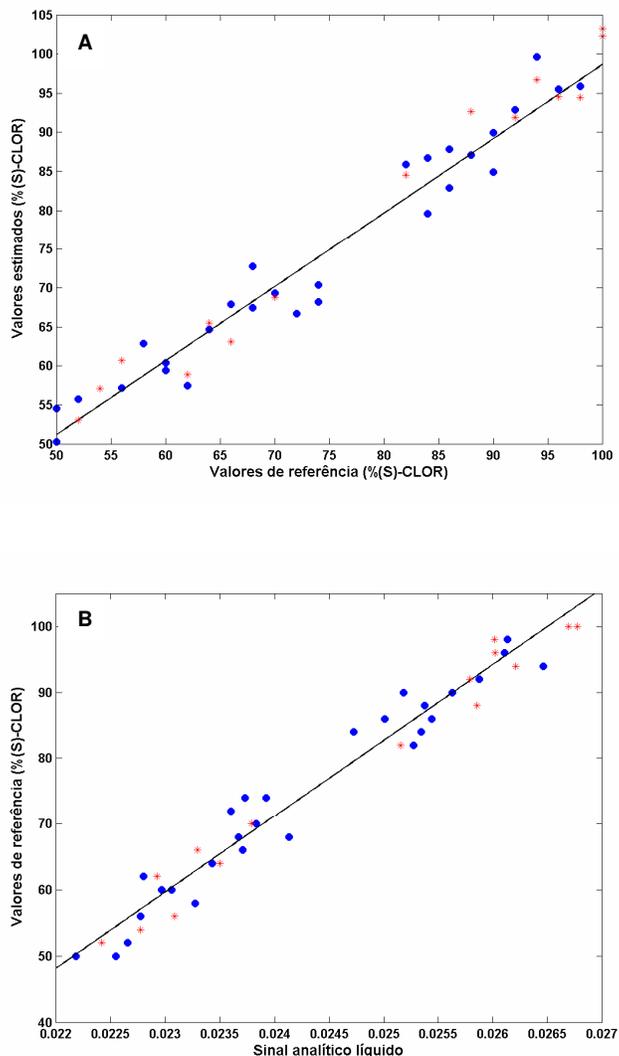
<sup>a</sup> %(S)-CLOR; <sup>b</sup> %(S)-CLOR<sup>-1</sup>



**Figura 19.** Região da elipse de confiança para o intercepto e a inclinação da regressão entre as frações molares previstas pelo modelo PLS e as frações molares teóricas para o enantiômero (S)-CLOR na mistura. (•) ponto onde o intercepto é igual a zero e a inclinação igual a um.

Como se pode observar na Figura 19, a região da elipse de confiança contém o ponto ideal (1,0), para a inclinação e o intercepto, respectivamente. Isto mostra que os valores de fração molar esperada para a (S)-CLOR na mistura e seus valores previstos pelo modelo PLS não apresentam diferença significativa com 99% de confiança.

O ajuste do modelo foi avaliado com base no gráfico dos valores para o enantiômero (S)-CLOR estimados pelo modelo PLS contra os seus valores esperados, como na Figura 20(A). Outra maneira de avaliar o ajuste de modelos de calibração multivariada é através dos gráficos dos valores escalares do sinal analítico líquido (NAS), determinado pela norma do vetor de sinal analítico líquido, em função do valor de referência ou esperados, como na Figura 20(B). Esta avaliação do ajuste através do NAS refere-se à representação pseudo-univariada dos modelos de calibração multivariada. A inclinação, o intercepto e o coeficiente de correlação para esta abordagem são mostrados na Tabela 3.



**Figura 20.** Ajuste do modelo PLS para quantificação do enantiômero (S)-CLOR. (A) Referência versus estimado. (B) Ajuste NAS. Amostras de calibração (•) e validação (\*).

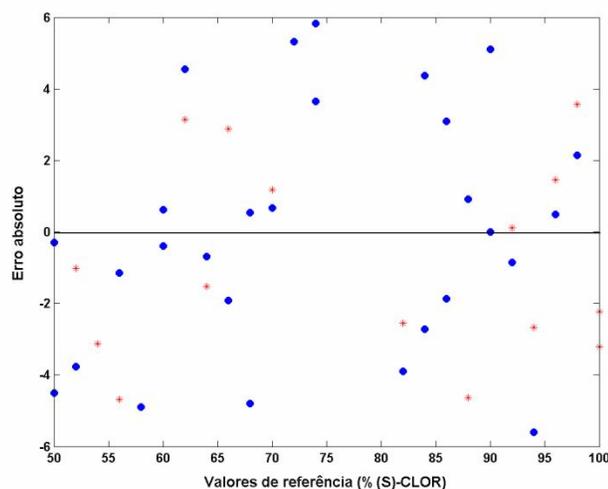
A precisão, no nível de repetibilidade, foi de 0,57% para o enantiômero (S)-CLOR. Este resultado foi obtido pela análise de amostras em três níveis de fração molar, cobrindo a faixa de frações molares utilizada na construção dos modelos, com três replicatas cada nível, e todas as determinações foram realizadas no mesmo dia.

A sensibilidade e sensibilidade analítica apresentaram bons resultados na quantificação da (S)-CLOR considerando-se as frações molares utilizadas no trabalho. A sensibilidade analítica é mais simples e informativa para comparações e julgamento de um método analítico, uma vez que esse parâmetro apresenta, de forma direta, a sensibilidade do método em termos da unidade de concentração que é utilizada, o inverso desse parâmetro permite estabelecer a menor diferença de concentração entre amostras que pode ser distinguida pelo método. Neste sentido, é possível fazer a distinção de amostras com diferença de fração molar em torno de 2,00 % de (S)-CLOR.

Os valores de seletividade em calibração multivariada referem-se à parte do sinal que é perdida devido à sobreposição entre o sinal do analito de interesse com outros componentes presentes na amostra. Levando em consideração a definição do NAS, o vetor  $\hat{\mathbf{x}}_{k,i}^{nas}$  é a parte do sinal que é ortogonal à matriz de interferentes ( $\hat{\mathbf{X}}_{A,-k}$ ) e os valores de seletividade apresentados na Tabela 3 foram determinados através da razão entre o escalar  $n\hat{s}_k$  e a norma do vetor de resposta instrumental representando quanto do sinal é utilizado para a quantificação da (S)-CLOR. Assim, o valor de seletividade de  $6,30 \times 10^{-3}$  indica que 99,37% do sinal foi perdido por não ser ortogonal ao sinal referente ao enantiômero (S)-CLOR e apenas 0,63% do sinal foi utilizado na quantificação.

A linearidade do modelo de calibração multivariada de primeira ordem foi avaliada através do gráfico dos resíduos da calibração e validação, mostrados na Figura 21. Qualitativamente, este tipo de gráfico pode indicar se os dados seguem ou não um comportamento linear, se a distribuição dos resíduos for aleatória.

Através da Figura 21 observa-se o comportamento aleatório para os resíduos da calibração e validação indicando que o modelo PLS na região do UV segue um comportamento linear.



**Figura 21.** Resíduos do modelo para quantificação dos enantiômeros da clorfeniramina. Amostras de calibração (•) e validação (\*).

Os valores para a razão sinal/ruído apresentados na Tabela 3 mostram o quanto o escalar “nas” está acima do desvio padrão da flutuação do sinal instrumental da referência. Para o modelo construído estes valores são elevados indicando que os valores do escalar “nas” estão bem acima do desvio padrão da flutuação do sinal instrumental de referência, o branco.

Os limites de detecção e quantificação do modelo multivariado mostram resultados coerentes com as quantidades medidas dos enantiômeros da CLOR. Portanto, O método UV não consegue quantificar amostras com fração molar de (S)-CLOR abaixo de 0,35 %.

A Tabela 4 mostra os resultados para as percentagens de recobrimento dos intervalos de confiança estimados nos níveis de probabilidade de 50,0, 80,0,

99,0, 95,0 e 90,0%. Esta percentagem de recobrimento representa a percentagem das amostras que possuem o valor verdadeiro dentro dos limites de confiança estimados. Assim, por exemplo, no nível de 95% de confiança, a percentagem de recobrimento de 100% indica que todas as amostras apresentam os valores de referência dentro do intervalo calculado.

**Tabela 4.** Percentagem de recobrimento dos intervalos de confiança.

<b>Níveis de Probabilidade (%)</b>	<b>% (S)-CLOR</b>
50,0	53,57
80,0	92,86
90,0	100
95,0	100
99,0	100

A percentagem de recobrimento dos intervalos de confiança, alcançada pelo modelo PLS, mostra-se mais abrangente do que deveria. Isso ocorre porque muitos graus de liberdade são perdidos já que o valor de RMSEC e RMSECV não são muito parecidos na construção do modelo. Este resultado pode também ser decorrente de um número restrito de amostras para avaliação do intervalo de recobrimento.

Os limites médios estimados dos intervalos de confiança nos níveis de probabilidade de 50,0, 80,0, 90,0, 95,0 e 99,0% são apresentados na Tabela 5. Uma característica dos limites estimados obtidos usando as variâncias calculadas pela equação (74) sugerida pela ASTM, é que se obtém um limite para cada amostra em cada nível de probabilidade estimado. Isto porque o *leverage* é um termo que é específico para cada amostra o que influencia diretamente a

estimativa dos limites de confiança. Para as amostras de calibração e amostras futuras, o esperado é que o *leverage* não apresente diferença significativa. Assim, os limites para todas as amostras devem apresentar praticamente os mesmos valores. Esta situação é similar à calibração univariada, onde os limites de confiança são os mesmos para todas as amostras. Uma hipótese para esta consideração é que o erro instrumental representa uma pequena contribuição para o erro total. Neste sentido, por exemplo, no nível de 50% de probabilidade, um valor de 50,0 % (S)-CLOR significa que o resultado pode estar entre 47,22 e 52,78%. Mais uma vez, deve-se reforçar que estes limites médios estão mais abrangentes do que deveriam porque muitos graus de liberdade são perdidos.

**Tabela 5.** Limites médios dos intervalos de confiança estimados.

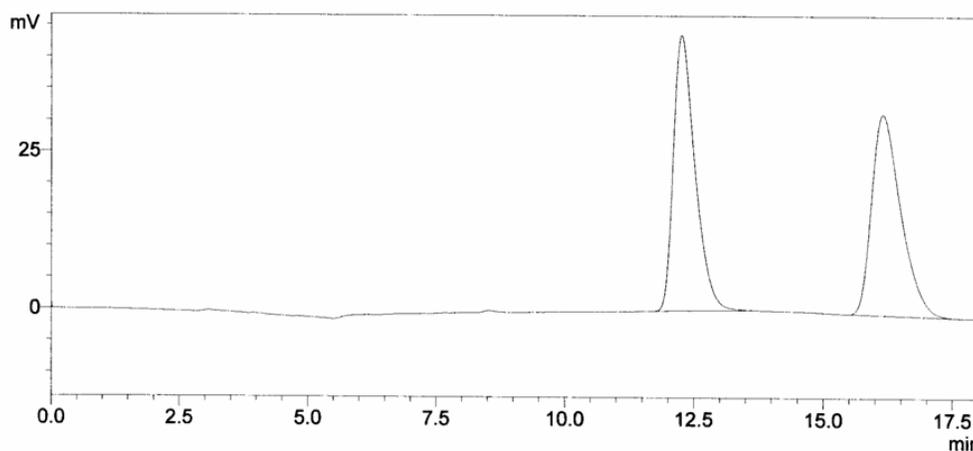
<b>Níveis de Probabilidade (%)</b>	<b>% (S)-clor</b>
50,0	2,78
80,0	5,36
90,0	6,70
95,0	8,42
99,0	11,44

Os limites calculados admitem que a variância dos erros correspondentes às respostas instrumentais das amostras de calibração e previsão são iguais, que a variância dos erros devido ao método de referência, neste caso devido à preparação das amostras, é insignificante e que os erros correspondentes às frações molares estimadas, não são correlacionados e seguem uma distribuição normal. Esta última consideração foi atestada através de um teste de normalidade<sup>140</sup>.

Os resultados alcançados para quantificação dos enantiômeros da CLOR por espectroscopia na região do UV e calibração multivariada de primeira ordem são muito promissores. Entretanto, o modelo só pode ser considerado realmente validado após a comparação desses resultados com os obtidos através de metodologias de referência e consolidadas.

A próxima etapa do trabalho consistiu, então, na validação do método proposto através da comparação dos resultados alcançados e os resultados obtidos através da análise por HPLC.

Com a técnica de HPLC, a análise univariada foi feita com base na razão entre as áreas do pico referente ao derivado do enantiômero (S)-CLOR e a área total. O cromatograma da Figura 22 apresenta o derivado referente ao enantiômero (S)-CLOR no tempo de retenção de 12,5 minutos.



**Figura 22.** Cromatograma do derivado do maleato de clorfeniramina racêmico.

A Tabela 6 apresenta as figuras de mérito para os resultados alcançados com a técnica de HPLC.

**Tabela 6.** Figuras de mérito para a técnica HPLC na quantificação da (S)-CLOR.

Figuras de Mérito		Técnica HPLC
Exatidão		0,73
Precisão <sup>a</sup>		$3,33 \times 10^{-3}$
Sensibilidade <sup>b</sup>		0,98
Sensibilidade Analítica <sup>-1 a</sup>		0,80
Seletividade		1,00
Ajuste	Inclinação	$0,975 \pm 0,004$
	Intercepto <sup>a</sup>	$0,010 \pm 0,003$
	Coef. Corr. (R)	0,9999
Limite Detecção <sup>a</sup>		2,41
Limite Quantificação <sup>a</sup>		8,04

<sup>a</sup> %(S)-CLOR; <sup>b</sup> %(S)-CLOR<sup>-1</sup>

Os limites de detecção e de quantificação obtidos pela cromatografia líquida de alta eficiência revelam que o método multivariado proposto é mais sensível, além de ser um método mais rápido e não necessitar de derivatização para a quantificação do maleato de clorfeniramina.

Os resultados obtidos com o método proposto e os resultados obtidos através da análise por HPLC, foram contrastados através de um teste t-pareado para avaliar a significância entre os métodos.

A Tabela 7 apresenta os valores esperados para as frações molares de (S)-CLOR, os resultados obtidos pelo método multivariado e os resultados obtidos com a técnica de HPLC.

**Tabela 7.** Resultados para a quantificação da (S)-CLOR.

Amostra	Valor esperado*	Valor obtido por HPLC*	Valor obtido pelo modelo PLS*
1	52	51,92	53,02
2	54	54,01	57,13
3	56	55,89	60,69
4	62	61,54	58,86
5	64	64,65	65,52
6	66	65,87	63,12
7	70	69,49	68,82
8	82	81,62	84,55
9	88	86,98	92,63
10	92	90,99	91,89
11	94	93,58	96,67
12	96	95,34	94,54
13	98	97,42	94,43
14	100	99,47	103,20
15	100	99,48	102,23

\* % (S)-CLOR

O teste t-pareado mostrou um valor para t calculado de 1,78, enquanto o valor de t tabelado é de 2,14 para 95% de confiança. Isso indica que não existem diferenças significativas entre o HPLC e o método multivariado na quantificação do enantiômero (S)-CLOR.

#### 4.6. Conclusões do capítulo

O desenvolvimento desta aplicação mostrou a possibilidade da utilização de métodos espectroscópicos associados à quimiometria para a quantificação de enantiômeros.

Modelos de calibração de primeira ordem através do método PLS mostraram resultados satisfatórios na quantificação dos enantiômeros da clorfeniramina utilizando-se a região do ultravioleta e infravermelho próximo,

porém foi necessário um procedimento prévio de eliminação de amostras anômalas.

A região do ultravioleta apresentou resultados superiores em relação à região do infravermelho próximo na quantificação dos enantiômeros da clorfeniramina com o método PLS.

A metodologia proposta foi validada através do cálculo de figuras de mérito e um teste de significância foi aplicado aos resultados obtidos pelo método desenvolvido e os resultados obtidos por HPLC mostrando que no nível de confiança de 95% os métodos não apresentam diferença significativa.

Os resultados para a análise das amostras de validação através do modelo PLS e da técnica de HPLC mostram que o método multivariado é mais sensível, além de ser mais rápido e não necessitar de derivatização para a quantificação do maleato de clorfeniramina.

## ***Capítulo V***

## Quantificação de enantiômeros do ibuprofeno

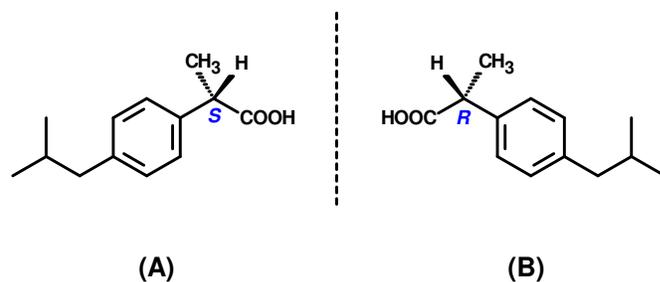
### 5.1. Objetivos

O primeiro objetivo desta aplicação foi o desenvolvimento e a validação de uma metodologia para a quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno a partir de espectroscopia de fluorescência molecular e calibração multivariada de segunda ordem.

O segundo objetivo deste capítulo foi o desenvolvimento de uma metodologia para a quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno em fluidos biológicos a partir de espectroscopia de fluorescência molecular com aplicação de método de adição padrão de segunda ordem

### 5.2. Ibuprofeno

O ibuprofeno (IBU), ácido propiônico ( $\pm$ )-(R,S)-2-(4-isobutilfenil), é um anti-inflamatório não-esteroidal utilizado como analgésico e anti-térmico e no tratamento de dor e inflamações em problemas reumáticos e músculo-esquelético. Este medicamento, com exceção da Áustria e da Suíça, é comercializado como racemato, porém, sua ação anti-inflamatória é associada ao enantiômero (S)-IBU<sup>167,168</sup>. A Figura 23 ilustra a estrutura dos isômeros do ibuprofeno.



**Figura 23.** Estrutura do ibuprofeno. **(A)** isômero (S)-IBU. **(B)** isômero (R)-IBU.

Estudos farmacocinéticos do ibuprofeno têm indicado que seu metabolismo é estereoseletivo com altas concentrações do enantiômero (S)-IBU no plasma e urina. Além disso, o enantiômero (R)-IBU sofre biotransformação com inversão da configuração no centro quiral aumentando a quantidade da forma (S)-IBU<sup>167,169</sup>.

O metabolismo do ibuprofeno foi estudado em mamíferos e mostrou que um de seus metabólitos é dextrorrotatório ou dextrógiro em ratos, cachorros e macacos<sup>170</sup>. Em humanos, os dois metabólitos do ibuprofeno são dextrógiros<sup>169,171</sup>.

### 5.3. Análise de enantiômeros do ibuprofeno

Os enantiômeros do ibuprofeno vem sendo analisados através de espectrometria de massas<sup>168</sup>, espectroscopia no infravermelho com reflectância difusa e transformada de Fourier<sup>172</sup>, espectroscopia no ultravioleta<sup>18</sup>, eletroforese capilar<sup>173</sup>, HPLC<sup>174</sup> e, recentemente, por eletrocromatografia capilar<sup>175</sup>. Os trabalhos mostram a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas e seus derivados para a separação enantioseletiva.

O trabalho de Hergert et al.<sup>176</sup> utilizou cálculos computacionais para mostrar os resultados da complexação do ibuprofeno com a  $\beta$ -CD. Como se pode verificar

na Figura 24 abaixo, a molécula do fármaco interage em pontos específicos na cavidade interna da  $\beta$ -CD.



**Figura 24.** Complexação do ibuprofeno com a  $\beta$ -ciclodextrina<sup>176</sup>.

Com relação aos métodos baseados na técnica HPLC uma variedade de metodologias está disponível na literatura, porém, esses métodos empregam análise indireta baseada na formação de diastereoisômero<sup>174,177-193</sup>. Nestes casos, muitas vezes a imprecisão da medida é bem maior devido à impurezas que podem estar presentes no reagente empregado na derivatização ou ocorrência de racemização durante o procedimento de derivatização<sup>177</sup>. Além disso, a cinética da reação para a formação dos dois diastereoisômeros pode ser diferente, gerando assim uma relação incorreta dos dois enantiômeros. Outra desvantagem é que impurezas no reagente empregado na derivatização podem levar a formação de quatro diastereoisômeros ao invés de apenas dois<sup>185</sup>.

O estudo de enantiômeros do ibuprofeno em fluidos biológicos foi realizado em plasma sanguíneo de ratos através de eletroforese capilar<sup>169</sup>, em urina humana através de cromatografia líquida de alta eficiência e micro extração em fase sólida<sup>194</sup>, em plasma sanguíneo humano, de ratos, cachorros e macacos por

cromatografia gás-líquido<sup>170</sup> e em urina humana, de ratos, cachorros e macacos empregando cromatografia de camada delgada<sup>171</sup>.

Empregando a calibração multivariada, Tran et. al.<sup>195</sup> quantificaram os enantiômeros do ibuprofeno através de espectroscopia no infravermelho-próximo e calibração por PLS. As formas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD mostraram resultados semelhantes como auxiliares quirais. Segundo os autores, com a forma  $\alpha$ -CD, pode estar ocorrendo também uma forte adsorção externa que contribui para o resultado similar em relação às formas  $\beta$  e  $\gamma$ -CD. Este trabalho encorajou-nos a tentar uma calibração que utilizasse mais informações, como a técnica de fluorescência molecular, a partir de métodos de segunda ordem, que possibilitasse trabalhar ao mesmo tempo com informações de excitação e emissão molecular.

## 5.4. Descrição experimental

### 5.4.1. Reagentes

Nesta aplicação foram utilizados os seguintes reagentes:

- (R,S)-ibuprofeno (Sigma-Aldrich);
- (S)-ibuprofeno (Sigma-Aldrich);
- $\beta$ -ciclodextrina (Sigma-Aldrich);
- 1-butanol (VETEC);
- Hidróxido de sódio (Synth)
- Fosfato de sódio bibásico anidro (Synth)
- Fosfato de potássio monobásico (Merck)

- n-Hexano 85% (TEDIA)
- isopropanol (TEDIA)
- Ácido trifluoroacético (FLUKA)

#### 5.4.2. Preparo das amostras para medidas espectroscópicas

##### *Fluorescência molecular do ibuprofeno*

Partiu-se de soluções estoque de:  $\beta$ -ciclodextrina  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L (1,1350g/100mL), (R,S)-ibuprofeno, (R,S)-IBU,  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L (0,02063g/10mL) em NaOH 0,1 mol/L, (S)-ibuprofeno, (S)-IBU,  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L (0,02063g/10mL) em NaOH 0,1 mol/L. Foram preparadas soluções por diluição de modo a se obter a concentração de  $\beta$ -ciclodextrina  $2,0 \times 10^{-4}$  mol/L e de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L para os enantiômeros ibuprofeno. Foram preparadas 12 amostras com a concentração de (S)-IBU variando de 50 a 100% de 5 em 5%. A cada uma das amostras foi adicionado 1-butanol na concentração de 0,05 mol/L e todas foram submetidas a um processo de 10 minutos em banho de ultra-som. Todas as amostras e soluções foram preparadas em água Mili-Q.

##### *Fluorescência molecular no ibuprofeno em plasma e urina*

Os enantiômeros do IBU também foram quantificados em plasma sanguíneo humano e urina humana, seguindo aprovação do comitê de ética da UNICAMP, processo número 727/2007.

O preparo das amostras para esta etapa foi idêntica ao preparo para as medidas do fármaco por fluorescência molecular. Foram preparadas 15 amostras com a concentração de (R,S)-IBU e (S)-IBU fixa em  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L, variando as frações molares de 50 a 100% em intervalos de 5%, contendo  $2,0 \times 10^{-4}$  mol/L de  $\beta$ -CD e 0,05 mol/L de 1-butanol. A cada amostra foram adicionados 2 mL do tampão  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,02 mol/L pH 7,00 e 100  $\mu\text{L}$  de urina proveniente de doadores do sexo masculino com idade entre 20 e 30 anos que não estavam fazendo uso de nenhum medicamento. Este procedimento foi realizado com urina de três indivíduos diferentes.

Para a quantificação dos enantiômeros no plasma sanguíneo humano seguiu-se o mesmo procedimento utilizado na preparação das amostras para a quantificação na urina substituindo-se os 100  $\mu\text{L}$  de urina por 100  $\mu\text{L}$  de plasma. O procedimento foi realizado para três bolsas de plasma sanguíneo provenientes de doadores diferentes e concedidas pelo hemocentro da UNICAMP.

Todas as amostras foram preparadas em água Mili-Q. Estas amostras foram preparadas visando uma calibração global, ou seja, empregando amostras de indivíduos diferentes em uma mesma calibração.

Para a quantificação através do método SOSAM foram preparadas cinco amostras como descrito acima, em triplicata. Partiu-se de uma amostra fração molar inicial com 50% de (S)-IBU para a urina de um indivíduo, 70% de (S)-IBU para a urina do outro indivíduo e 80% de (S)-IBU para a urina do último indivíduo. A essas amostras iniciais foram adicionadas 20%, 30%, 40% e 50% de (S)-IBU. As amostras passaram por um processo de 10 minutos em banho de ultra-som e

foram preparadas em água Mili-Q. As mesmas frações molares foram utilizadas na quantificação dos enantiômeros do IBU no plasma sanguíneo humano.

As medidas para quantificação dos enantiômeros do IBU foram realizadas em um espectrômetro de fluorescência molecular marca Varian modelo Cary Eclipse utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10mm. As fendas de excitação e emissão foram de 5 nm cada. O registro dos espectros para a quantificação do fármaco puro se deu de 200 a 290 nm para a excitação, resolução de 10nm, e de 268 a 332 nm para a emissão com resolução de 2nm. Para a quantificação dos enantiômeros no plasma sanguíneo os espectros foram registrados na faixa de 254 a 304 nm para a excitação e de 312 a 372 nm para a emissão. No caso da quantificação na urina o registro também se deu de 254 a 304 nm para a excitação enquanto a emissão foi registrada de 338 a 448 nm.

#### **5.4.3. Preparo das amostras para análise por HPLC**

A partir de soluções estoque de (R,S)-IBU  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L (0,02063g/10mL) em n-hexano e (S)-IBU  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L (0,02063g/10mL) em n-hexano, foram preparadas soluções por diluição de modo a se obter a concentração dos enantiômeros do IBU de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L com as mesmas frações molares empregadas na análise espectroscópica.

O sistema cromatográfico foi constituído de uma coluna com fase estacionária quiral a base de celulose tris(4-metilbenzoato) revestida sobre  $5 \mu\text{m}$  de sílica-gel, Chiralcel OJ-H (Daicel Chemical Industries LTD), (150 mm x 4.6 mm,  $5 \mu\text{m}$ ). A fase móvel foi composta por n-hexano:isopropanol:ácido trifluoroacético

(98:2:0.1, v/v/v). O volume de amostra injetada foi de 20  $\mu$ L. A vazão utilizada foi de 1,0 mL/min com detecção espectrofotométrica em 254 nm.

Sob estas condições o pico referente ao isômero (S)-IBU aparece no maior tempo de retenção.

O equipamento utilizado foi um Shimadzu LC-20AT equipado com bomba modelo LC-20AT, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, módulo de comunicação CBM-20A, degasser DGU-20A5 e interface compatível com micro-computador através do software LC solution.

Esta parte do trabalho foi desenvolvida em parceria com Prof. Dr. Paulo Mitsuo Imamura e seu aluno de doutorado Adriano Lopes Romero do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNICAMP.

## **5.5. Resultados e discussão**

### **5.5.1. Resultados e discussão para a quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno**

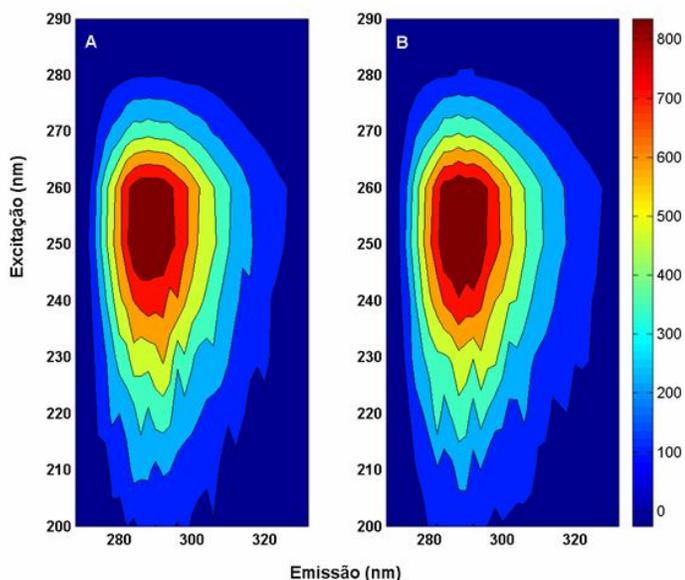
Os dados experimentais para a análise dos enantiômeros do IBU por espectrofluorimetria foram processados utilizando o programa MatLab 6.5 com aplicação das ferramentas de PLS toolbox 4.2.

Na análise dos enantiômeros do IBU por espectroscopia de fluorescência molecular obtém-se uma matriz de respostas instrumentais para cada amostra analisada. Estas amostras são organizadas no formato de um cubo de dados, também denominado de tensor de dados. Assim, modelos de calibração multivariada de segunda ordem são desenvolvidos empregando os métodos

quimiométricos PARAFAC e BLLS. Para a aplicação do método PARAFAC empregou-se as ferramentas N-way toolbox, disponibilizadas por Rasmus Bro em <http://www.models.kvl.dk/source>. O método BLLS foi empregado através de um programa desenvolvido no laboratório. As ferramentas para o cálculo das figuras de mérito também foram desenvolvidas no laboratório em ambiente MatLab.

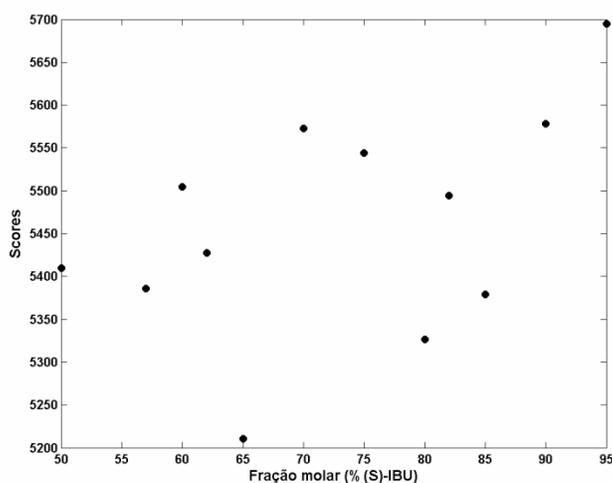
A principal diferença entre os métodos PARAFAC e BLLS está no fornecimento dos valores esperados da fração molar dos enantiômeros para a inicialização do algoritmo. Enquanto o PARAFAC não necessita dessas informações o método BLLS inicializa o algoritmo empregando esses valores.

A Figura 25 mostra os mapas de contorno de fluorescência molecular para uma amostra de ibuprofeno racêmica, Figura 25 (A), e uma amostra de ibuprofeno contendo apenas o enantiômero (S)-IBU, Figura 25 (B). Em ambas as amostras os enantiômeros estão complexados com  $\beta$ -CD na presença de 1-butanol e exibem a região de excitação e emissão utilizadas para a calibração de segunda ordem. A partir desta figura é possível também visualizar a diferença entre a amostra do ibuprofeno racêmico e quiral.



**Figura 25.** Mapas de contorno de fluorescência molecular do ibuprofeno complexado com  $\beta$ -CD na presença de 1-butanol. **(A)** ibuprofeno racêmico **(B)** (S)-IBU.

O método PARAFAC não forneceu resultados satisfatórios para a quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno. Isso porque os *scores* do modelo PARAFAC não se mostram lineares com relação à fração molar dos enantiômeros, como mostra a Figura 26.



**Figura 26.** Scores do modelo PARAFAC para os enantiômeros do ibuprofeno.

Além dos resultados apresentados na Figura 26, o modelo, que foi construído com 5 amostras, foi avaliado com relação aos valores de erro para a calibração e validação, representados pelo RMSEC e RMSEP, respectivamente, os valores de coeficiente de correlação, R, e o erro médio relativo. Estes resultados estão dispostos na Tabela 8 para o modelo PARAFAC e BLLS.

**Tabela 8.** Resultados para os modelos de segunda ordem na quantificação do (S)-IBU.

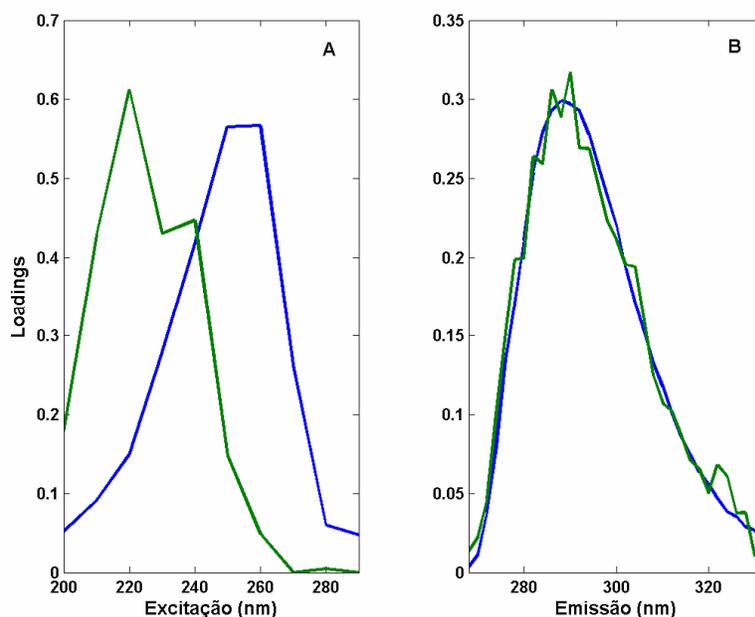
Método Quimiométrico	RMSEC (% S-IBU)	RMSEP (% S-IBU)	R*	Erro médio relativo
PARAFAC	25,33	36,19	0,2931	38,89
BLLS	2,15	4,80	0,9484	5,33

R\* Coeficiente de correlação da reta entre os valores esperados e os previstos pelo modelo.

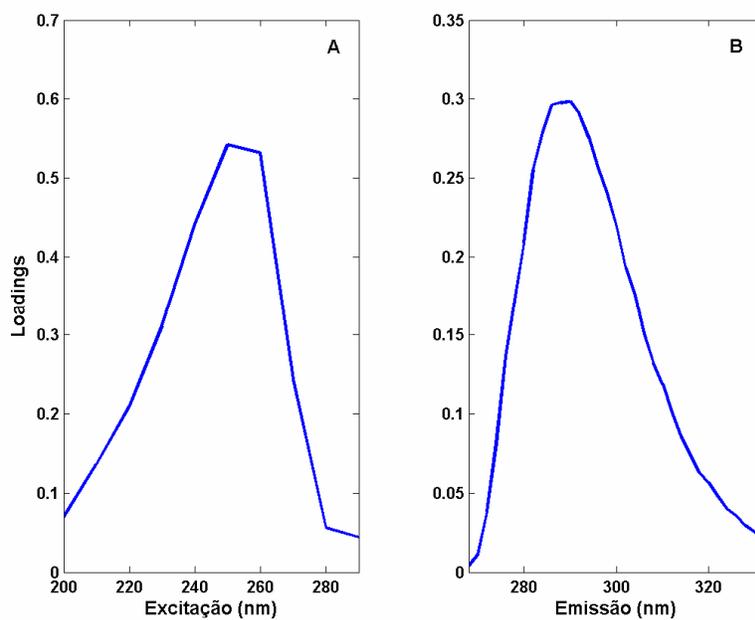
Para modelo BLLS resultados aceitáveis foram obtidos, com menores erros do que o método PARAFAC. Os resultados apresentados na Tabela 8 foram obtidos a partir da validação dos modelos PARAFAC e BLLS com um conjunto de 7 amostras independentes preparadas com os enantiômeros do ibuprofeno.

A aplicação de métodos de calibração de segunda ordem permite obter uma estimativa dos perfis espectrais de excitação e emissão em casos que empregam matrizes de fluorescência molecular para a calibração. Ambos os métodos, PARAFAC e BLLS, mostraram-se eficientes na recuperação destes perfis.

A Figura 27 mostra os perfis de excitação e emissão para os enantiômeros do ibuprofeno recuperados pelo método PARAFAC enquanto a Figura 28 mostra o perfil do enantiômero (S)-IBU recuperado pelo método BLLS.

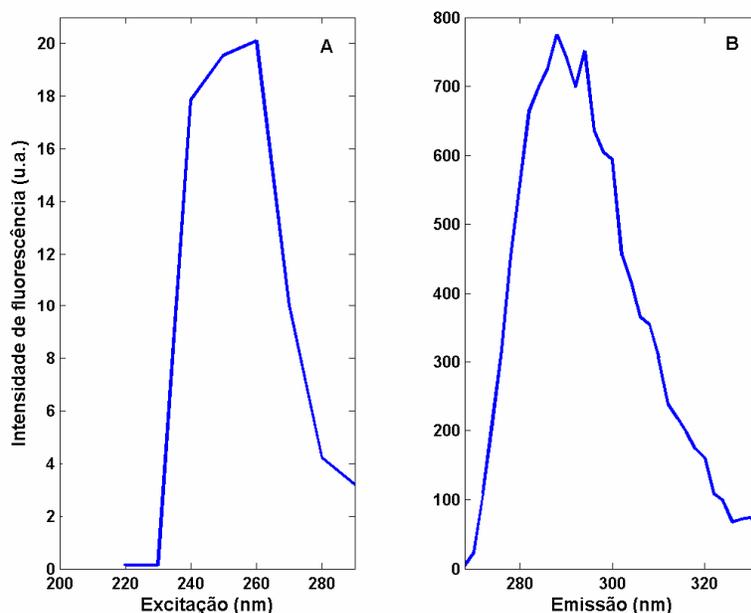


**Figura 27.** Perfis espectrais recuperados pelo método PARAFAC. (A) Excitação. (B) Emissão. ■ (S)-IBU; ■ (R)-IBU.



**Figura 28.** Perfis espectrais recuperados pelo método BLLS para o enantiômero (S)-IBU. (A) Excitação. (B) Emissão.

As Figuras 27 e 28 mostram que os espectros recuperados para os perfis de excitação e emissão do enantiômero (S)-IBU são muito semelhantes. Os resultados são condizentes com o perfil experimental para o enantiômero (S)-IBU mostrado na Figura 29.



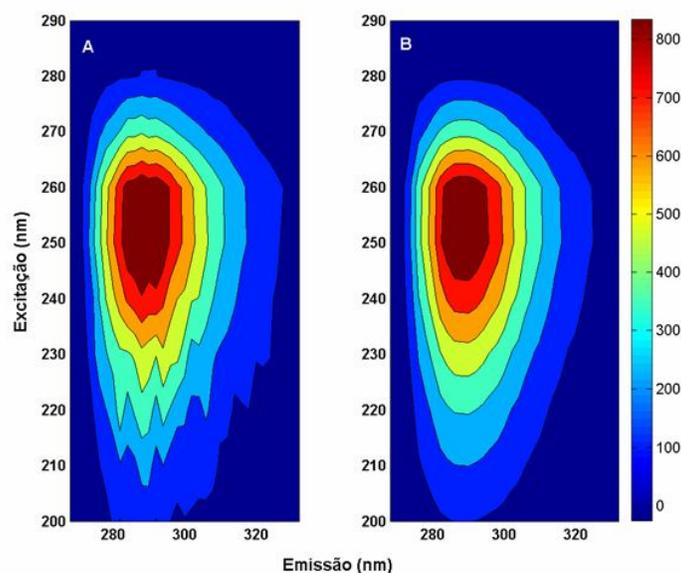
**Figura 29.** Perfis espectrais experimentais para o enantiômero (S)-IBU. **(A)** Excitação. **(B)** Emissão.

Os resultados mostrados pelo método PARAFAC na Figura 27 mostra que, apesar de não ter apresentado bons resultados para a quantificação, o PARAFAC consegue recuperar muito bem os perfis espectrais para os enantiômeros do ibuprofeno, neste caso, como o algoritmo não emprega informações do analito para a inicialização, o número de fatores utilizados na decomposição dos dados é escolhido com base no conhecimento prévio da amostra, ou seja, é igual ao número de espécies presentes. Assim, dois fatores foram utilizados na

modelagem dos dados com o método PARAFAC utilizando a restrição de não negatividade e por isso se obtém dois perfis de excitação e emissão na Figura 27.

No método BLLS, as informações do analito são utilizadas na inicialização do algoritmo, por isso, como se trata da calibração em função da fração molar do enantiômero (S)-IBU apenas um perfil espectral de excitação e emissão é recuperado, como ilustrado na Figura 28. Neste caso, o modelo BLLS não utiliza a vantagem de segunda ordem, ou seja, não há interferentes não calibrados.

As estimativas realizadas confirmaram que os perfis estimados com os métodos de segunda ordem são condizentes com os perfis experimentais, como pode ser observado nos mapas de contorno de fluorescência para o enantiômero puro do (S)-IBU, obtido experimentalmente e reconstruídos a partir do método BLLS mostrados na Figura 30.



**Figura 30.** Mapas de contorno de fluorescência para o enantiômero (S)-IBU. **(A)** superfície experimental, **(B)** superfície reconstruída pelo método BLLS.

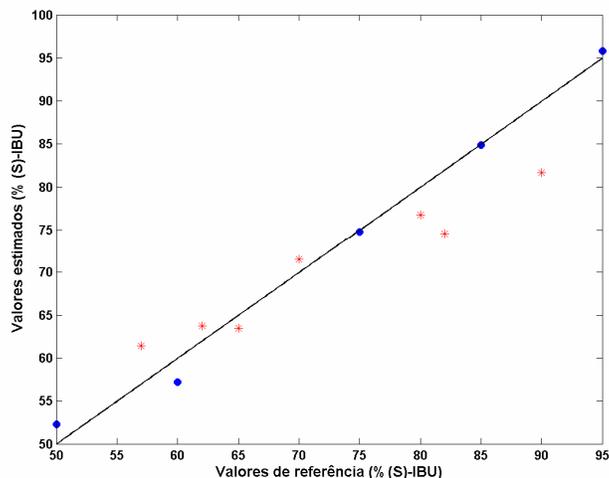
Como é possível observar a superfície reconstruída pelo método de segunda ordem apresenta boa concordância com a superfície obtida através de ensaios experimentais e os resultados obtidos através do método BLLS foi validado através do cálculo das figuras de mérito cujos resultados são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Figuras de mérito para os modelos BLLS na quantificação do (S)-IBU.

Figuras de Mérito		Modelo BLLS
Exatidão <sup>a</sup>	RMSEC	4,80
	RMSEP	2,15
Precisão <sup>a</sup>		3,27
Sensibilidade <sup>b</sup>		5,79
Sensibilidade Analítica <sup>-1 a</sup>		0,03
Ajuste	Inclinação	0,63 ± 0,06
	Intercepto <sup>a</sup>	25,00 ± 4,81
	Coef. Corr. (R)	0,9484
Limite Detecção <sup>a</sup>		0,10
Limite Quantificação <sup>a</sup>		0,32

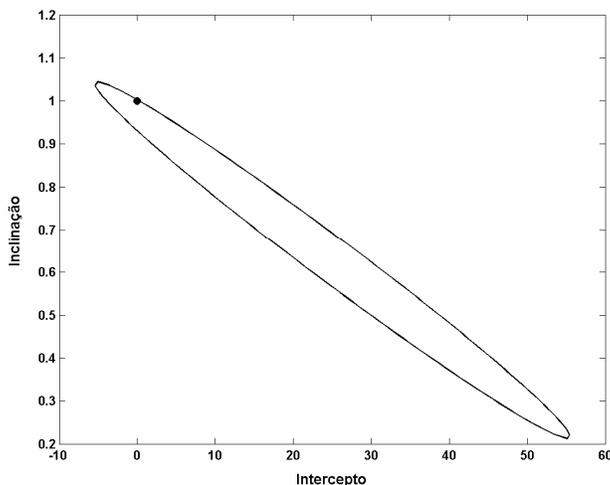
<sup>a</sup> % (S)-IBU; <sup>b</sup> % (S)-IBU<sup>-1</sup>

O modelo BLLS apresentou boa exatidão de acordo com os valores de RMSEC e RMSEP alcançados. Isto significa que os valores estimados pelo modelo apresentam boa concordância com os valores esperados para a fração molar de (S)-IBU. Tendo em vista que os erros de calibração e previsão incorporam erros sistemáticos e aleatórios, a exatidão pode ser melhor representada pela regressão entre os valores de referência e os valores estimados pelo modelo e os valores da inclinação e do intercepto, apresentados na Figura 31 e na Tabela 9, respectivamente.



**Figura 31.** Ajuste do modelo BLS para quantificação do enantiômero (S)-IBU. Amostras de calibração (•) e validação (\*).

A análise da elipse de confiança é também um indicador de exatidão do modelo multivariado. A Figura 32 ilustra essa consideração, de onde se pode observar que a região da elipse de confiança contém o ponto ideal (1,0), para a inclinação e o intercepto, respectivamente. Isto mostra que os valores de fração molar esperada para o (S)-IBU na mistura e seus valores previstos pelo modelo BLS não apresentam diferença significativa com 99% de confiança.



**Figura 32.** Região da elipse de confiança para o intercepto e a inclinação da regressão entre as frações molares previstas pelo modelo BLLS e as frações molares teóricas para o enantiômero (S)-IBU na mistura. (•) ponto onde o intercepto é igual a zero e a inclinação igual a um.

A precisão foi estimada no nível de repetibilidade através da análise em triplicata de amostras em três níveis de fração molar de (S)-IBU, cobrindo a faixa do modelo BLLS e todas as determinações foram realizadas no mesmo dia. O resultado obtido apresenta uma repetibilidade de 3,27% para o enantiômero (S)-IBU no modelo multivariado desenvolvido.

Os resultados para sensibilidade e sensibilidade analítica são satisfatórios. O valor do inverso da sensibilidade analítica apresentado na Tabela 9 mostra que o modelo é capaz de distinguir entre amostras com diferença mínima de fração molar de 0,03% de (S)-IBU, considerando-se um perfeito ajuste para o modelo. Assim, este resultado representa uma estimativa otimista considerando o ruído espectral como a maior fonte de erros e levando em consideração um modelo perfeitamente ajustado.

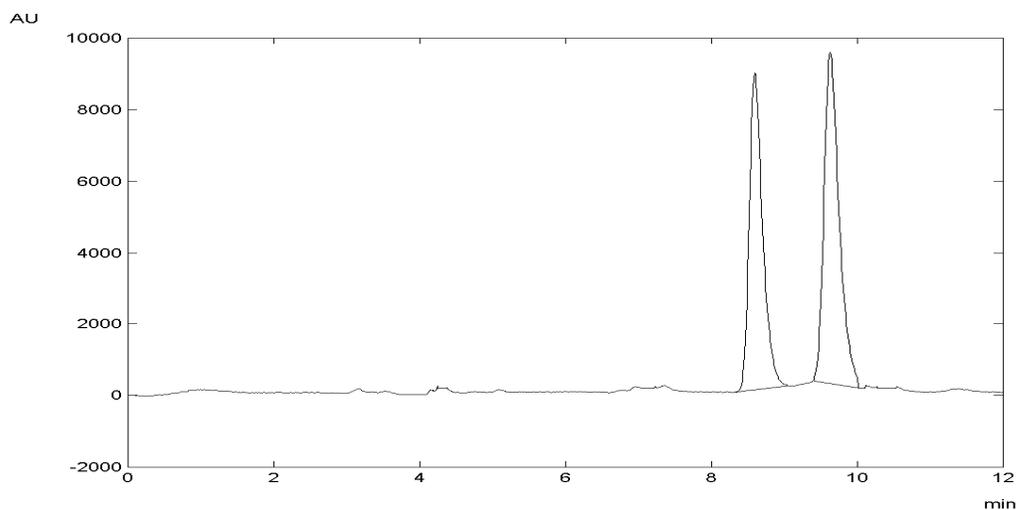
Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo foi realizada uma análise de variância de onde se verifica que a razão das médias quadráticas segue uma distribuição F com 95% de confiança. O valor de F calculado foi de 11,19 e o valor de F tabelado para 95% de confiança é de 6,61. Este resultado mostra que os valores estimados pelo modelo apresentam relação com os valores esperados, ou em outras palavras, o valor médio para os resultados obtidos não se diferem significativamente do valor médio tido como verdadeiro.

O cálculo da seletividade em modelos BLLS ainda não está muito bem estabelecido. Neste caso, a seletividade relata o quanto se perde em termos de sensibilidade devido à presença de outros componentes na amostra. Para o modelo BLLS desenvolvido o valor para a sensibilidade foi igual à unidade indicando que a presença de interferentes na amostra não causou nenhuma perda de sensibilidade.

Os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação são coerentes com as quantidades medidas e o modelo BLLS é considerado apropriado para a quantificação de enantiômeros do ibuprofeno.

Além do cálculo das figuras de mérito, o modelo BLLS foi também validado por comparação com os resultados obtidos através da técnica de HPLC.

Foi realizada uma análise univariada com a razão entre as áreas do pico referente ao enantiômero (S)-IBU, como mostra a Figura 33, no tempo de retenção de 9,7 minutos, e a área total referente aos dois enantiômeros.



**Figura 33.** Cromatograma do ibuprofeno racêmico.

Na Tabela 10 estão dispostas as figuras de mérito calculadas para o modelo univariado.

**Tabela 10.** Figuras de mérito para a técnica HPLC na quantificação do (S)-IBU.

Figuras de Mérito		Técnica HPLC
Exatidão		1,77
Precisão <sup>a</sup>		$2,48 \times 10^{-3}$
Sensibilidade <sup>b</sup>		0,93
Sensibilidade Analítica <sup>-1 a</sup>		2,26
Seletividade		1,00
Ajuste	Inclinação	$0,929 \pm 0,051$
	Intercepto <sup>a</sup>	$0,063 \pm 0,038$
	Coef. Corr. (R)	0,9911
Limite Detecção <sup>a</sup>		6,77
Limite Quantificação <sup>a</sup>		22,57

<sup>a</sup> %(S)-IBU; <sup>b</sup> %(S)-IBU<sup>-1</sup>

Os limites de detecção e de quantificação mostram que o método proposto é mais sensível em relação à técnica de HPLC. Além disso, o modelo BLLS consegue fazer a distinção entre amostras com diferenças de fração molares bem

menores do que o modelo univariado, mesmo em amostras com menores concentrações, é um método mais rápido e sem geração de resíduos.

Os resultados obtidos com o método proposto e os resultados obtidos através da análise por HPLC foram contrastados através de um teste t-pareado para avaliar a significância entre os métodos.

A Tabela 11 apresenta os valores esperados para as frações molares de (S)-IBU, tidos como verdadeiros, os resultados obtidos pelo método multivariado e os resultados obtidos através da técnica de HPLC. O teste t-pareado forneceu um valor de t calculado de 0,06 contra um valor de t tabelado de 2,45 para 95% de confiança. Assim, não existem diferenças significativas entre a técnica de HPLC e o método proposto baseado em fluorescência molecular e calibração de segunda ordem na quantificação de enantiômeros do ibuprofeno.

**Tabela 11.** Resultados para a quantificação do (S)-IBU.

Amostra	Valor esperado *	Valor obtido por HPLC	Valor obtido pelo modelo BLLS*
1	57,00	55,00	61,4
2	62,00	59,92	63,71
3	65,00	60,57	63,47
4	70,00	68,48	71,54
5	80,00	78,11	76,78
6	82,00	84,61	74,57
7	90,00	90,10	81,71

\* % (S)-IBU

No método BLLS são quantificadas as frações molares dos enantiômeros do ibuprofeno com concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L. Com a técnica de HPLC foram quantificadas as frações molares dos enantiômeros com concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L. Mesmo assim, o teste-t mostra que não existem diferenças significativas entre os dois métodos para 95% de confiança. Isto implica que o método BLLS é

capaz de quantificar enantiômeros do ibuprofeno presentes em amostras com concentrações mais diluídas nas quais a técnica HPLC não é capaz de avaliar.

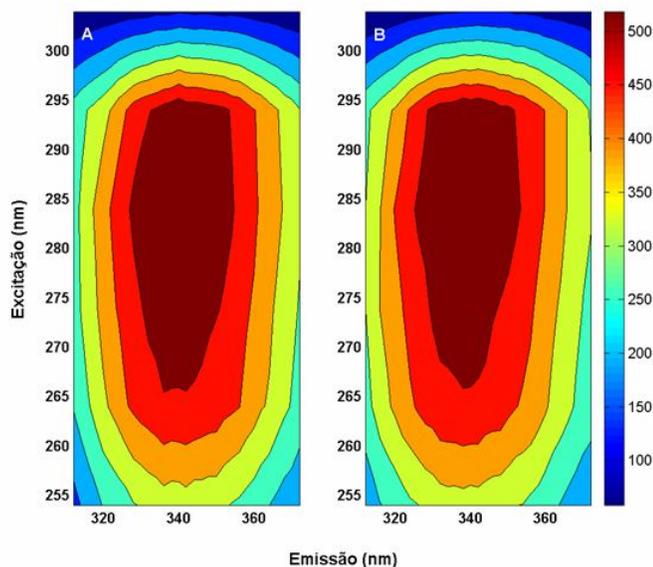
### **5.5.2. Resultados e discussão para a quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma e urina**

Os dados experimentais para a análise dos enantiômeros do IBU em plasma sanguíneo e urina humana por espectrofluorimetria foram processados utilizando o programa MatLab 6.5 com aplicação das ferramentas de PLS toolbox 4.2.

Neste caso, assim como na sessão 5.5.1. obtém-se uma matriz de respostas instrumentais para cada amostra e modelos de calibração multivariada de segunda ordem são desenvolvidos através do método PARAFAC empregando as ferramentas N-way toolbox, disponibilizadas por Rasmus Bro em <http://www.models.kvl.dk/source>.

As técnicas empregadas para analisar enantiômeros em fluidos biológicos normalmente requerem um tempo grande de trabalho e algumas ou muitas etapas iniciais de preparo de amostra. A espectroscopia de fluorescência molecular aplicada a esse tipo de amostra não permite a interpretação direta dos espectros devida à superposição espectral que pode ocorrer entre o analito e os componentes dessas matrizes. Porém, o emprego de espectroscopia de fluorescência molecular aliada a quimiometria tem um importante papel em estudo com esse tipo de matrizes já que os métodos quimiométricos promovem a separação dos sinais não sendo necessário a separação física entre os interferentes e o analito.

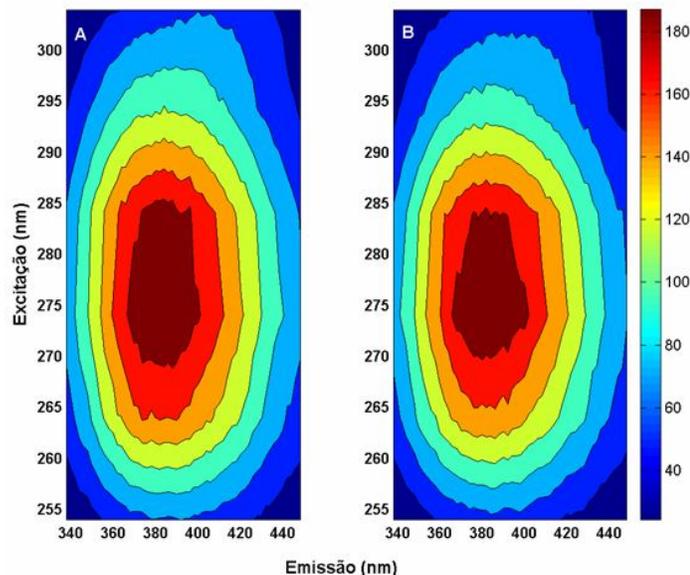
A Figura 34 apresenta os mapas de contorno para uma amostra de plasma puro e uma amostra de plasma na presença de ibuprofeno racêmico,  $\beta$ -ciclodextrina e 1-Butanol.



**Figura 34.** Mapas de contorno para uma amostra de plasma. **(A)** amostra de plasma puro. **(B)** amostra de plasma na presença de ibuprofeno racêmico na concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L.

É possível observar que o ibuprofeno apresenta fluorescência molecular na mesma região que o plasma puro.

O mesmo comportamento acontece com a urina, como é possível verificar na Figura 35 que mostra os mapas de contorno para a urina pura e a urina na presença de ibuprofeno racêmico,  $\beta$ -ciclodextrina e 1-Butanol. O ibuprofeno apresenta a mesma região de fluorescência molecular que a urina pura. Estes sinais sobrepostos, tanto para o plasma quanto para a urina, podem ser utilizados na quantificação dos enantiômeros nessas matrizes empregando métodos quimiométricos de segunda ordem.

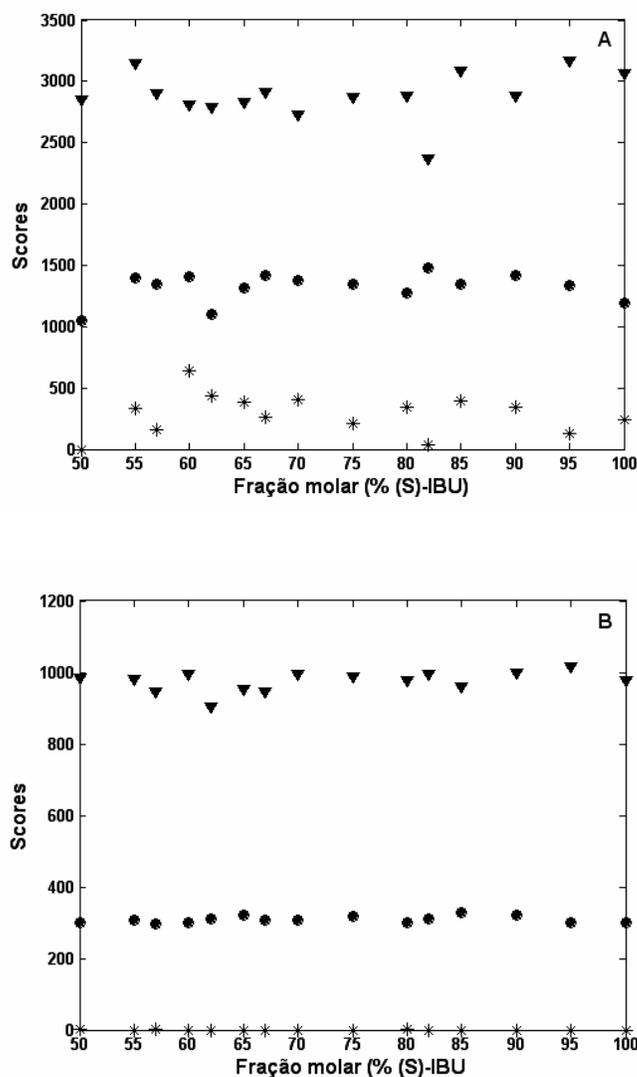


**Figura 35.** Mapas de contorno para uma amostra de urina. **(A)** amostra de urina pura. **(B)** amostra de urina na presença de ibuprofeno racêmico na concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L.

Nesta etapa do trabalho buscou-se a quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma sanguíneo humano e em urina humana. Como as pesquisas acerca dos enantiômeros do ibuprofeno revelam que seu metabolismo é estereoseletivo e o enantiômero (R)-IBU parece sofrer biotransformação, essa parte do trabalho pode contribuir para estudos de farmacocinética e farmacodinâmica *in vivo*.

A proposta inicial para esta etapa tinha por objetivo o desenvolvimento de um modelo de calibração global para quantificação dos enantiômeros do IBU a partir de amostras de três doadores distintos de urina e de plasma. Esse procedimento facilitaria a previsão de uma amostra a partir de um doador que não tivesse participado da etapa de desenvolvimento do modelo. Entretanto, com o desenvolvimento do modelo de segunda ordem observou-se um comportamento não usual para a quantificação empregando o método PARAFAC.

A Figura 36 apresenta o resultado para os *scores* do modelo PARAFAC contra a fração molar do (S)-IBU. Pode-se verificar que os *scores* não apresentaram um comportamento linear em função da fração molar do enantiômero. As amostras de plasma e urina para cada doador em particular são separadas e isso indica um efeito individual da matriz sugerindo que seja realizada uma calibração para cada doador, ou, demandando o emprego do método de adição de padrão.



**Figura 36.** Scores do modelo PARAFAC para três amostras diferentes na quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno. (A) plasma dos três doadores, (B) urina dos três doadores.

A construção de modelos individuais para as amostras de cada doador não teria serventia de ordem prática. O indivíduo teria que fornecer as amostras para a calibração antes de fazer uso do medicamento e posteriormente fornecer amostras para a validação após o tratamento.

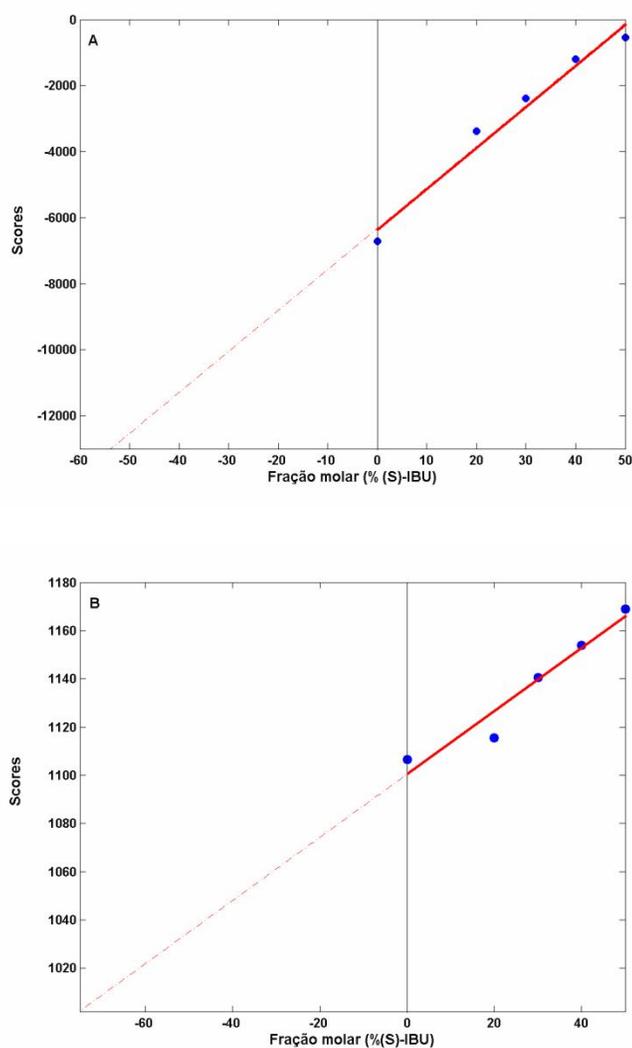
Neste sentido, o método de adição padrão de segunda ordem é um método mais rápido e prático e foi aplicado às amostras de cada doador individual. Em cada caso, foi construído um modelo de calibração para cada cinco amostras, em triplicata, de cada doador de plasma e de urina.

O número de fatores empregado na calibração foi escolhido com base no conhecimento químico do sistema e no melhor ajuste para o método SOSAM. O uso de restrições, como não negatividade, pode melhorar a qualidade do ajuste do modelo PARAFAC, porém, em muitos casos o modelo pode ser melhor ajustado sem o emprego de restrições. O melhor modelo PARAFAC para a urina foi obtido com 3 fatores e não negatividade enquanto para o plasma 5 fatores foram necessários. A Tabela 12 apresenta os resultados da quantificação do (S)-IBU a partir do método SOSAM, o valor estimado corresponde ao valor médio obtido da triplicata de cada amostra.

**Tabela 12.** Resultados SOSAM para quantificação do (S)-IBU.

Amostras	Valor esperado (% (S)-IBU)	Valor estimado (% (S)-IBU)	Erro Absoluto (% (S)-IBU)	Número de Fatores	Restrições
Plasma a	80,0	78,2	1,8	5	Não negatividade
Plasma b	70,0	72,0	- 2,0	5	Não negatividade
Plasma c	50,0	48,4	1,6	5	Sem restrições
Urina a	80,0	82,9	- 2,9	3	Não negatividade
Urina b	70,0	74,9	- 4,9	3	Não negatividade
Urina c	50,0	46,9	3,1	3	Não negatividade

Para estimar o valor da fração molar de (S)-IBU pelo método SOSAM, cada curva de calibração por adição padrão de segunda ordem foi construída através de uma regressão linear entre os *scores* do modelo PARAFAC com a fração molar de (S)-IBU. A Figura 37 mostra uma curva de calibração típica obtida pela aplicação do método SOSAM para o plasma e a urina de um doador.



**Figura 37.** Curva de adição padrão de segunda ordem para os enantiômeros do ibuprofeno. **(A)** plasma de um doador, **(B)** urina de um doador.

A partir da Figura 37 é possível observar os resultados de 54,0% e 74,0% de (S)-IBU para o plasma e para a urina de uma amostra, respectivamente.

Os resultados alcançados pelo método SOSAM mostraram boa concordância com os valores esperados. Os erros encontrados foram menores que 2% para a quantificação dos enantiômeros no plasma e inferiores a 5% para a quantificação na urina.

## 5.6. Conclusões do capítulo

O desenvolvimento desta aplicação permite quantificar enantiômeros do ibuprofeno a partir de fluorescência molecular e métodos quimiométricos de segunda ordem.

Para a quantificação dos enantiômeros o método de calibração BLLS mostrou melhores resultados que o método PARAFAC e a metodologia proposta foi validada através do cálculo de figuras de mérito. O modelo construído pelo método BLLS se mostrou linear conforme os resultados da análise de variância sugerem. Além disso, um teste de significância foi aplicado aos resultados obtidos pelo método desenvolvido e os resultados obtidos por HPLC mostrando que no nível de confiança de 95% os métodos não apresentam diferença significativa. Os resultados sugerem ainda que o método BLLS é capaz de quantificar frações molares dos enantiômeros do ibuprofeno em amostras com concentrações mais diluídas nas quais a técnica de HPLC não seria capaz de realizar a quantificação.

O resultado para as figuras de mérito permite concluir que o modelo BLLS é mais sensível do que a técnica de HPLC na quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno.

A quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma sanguíneo humano e urina humana não foram possíveis a partir de um modelo global com amostras provenientes de diferentes doadores. A calibração individual apresenta dificuldades práticas para a execução enquanto o método de adição padrão de segunda ordem é muito mais rápido e de maior praticidade apresentando erros satisfatórios.

## ***Capítulo VI***

## Quantificação de enantiômeros do propranolol

### 6.1. Objetivos

O primeiro objetivo desta última aplicação foi o desenvolvimento e a validação de uma metodologia para a quantificação dos enantiômeros do propranolol a partir de espectroscopia na região do ultravioleta, infravermelho próximo e médio e fluorescência molecular empregando calibração multivariada de primeira ordem.

O segundo objetivo consistiu em utilizar fluorescência molecular para a quantificação dos enantiômeros do propranolol empregando calibração multivariada de segunda ordem.

Em ambos os casos buscou-se a quantificação do fármaco em sua forma pura e em formulação farmacêutica.

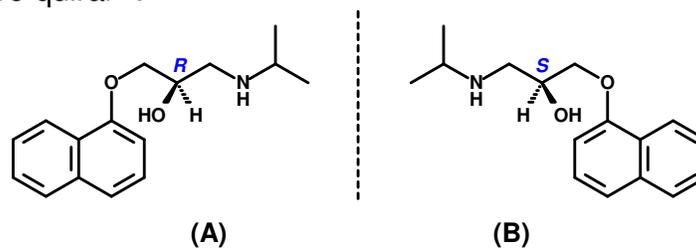
O terceiro, e último, objetivo deste capítulo foi o desenvolvimento de uma metodologia para a quantificação dos enantiômeros do propranolol em fluidos biológicos a partir de espectroscopia de fluorescência molecular com aplicação de método de adição padrão de segunda ordem.

### 6.2. Propranolol

O propranolol (PRO), 1-isopropilamino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol, é um agente bloqueador de receptores beta-adrenérgicos, não seletivo, não possuindo qualquer outra atividade sobre o sistema nervoso autônomo<sup>196</sup>. Este fármaco é

utilizado em tratamentos da hipertensão, angina pectoris, arritmias cardíacas, estenose sub-aórtica hipertrófica<sup>196,197</sup>, agente de doping<sup>197</sup> no esporte e infarto do miocárdio. Nesse último caso é indicado para reduzir a mortalidade cardiovascular em pacientes que sobreviveram à fase aguda do infarto do miocárdio e estejam clinicamente estáveis<sup>196</sup>.

A Figura 38 mostra a estrutura para os isômeros do propranolol. Pode-se observar que esse fármaco é uma alquilamina aril-substituída, contendo um naftaleno que constitui-se em um fluoróforo da molécula e um grupo alquil onde se encontra o centro quiral<sup>33</sup>.



**Figura 38.** Estrutura do propranolol. **(A)** isômero (R)-PRO. **(B)** isômero (S)-PRO.

A administração do propranolol é realizada como mistura racêmica, entretanto, é conhecido que o perfil farmacodinâmico e farmacocinético das formas (R)- e (S)- apresentam diferenças significativas. O enantiômero (S)- é cerca de cem vezes mais ativo no bloqueio de beta-receptores em relação ao (R)-PRO<sup>198,199</sup>.

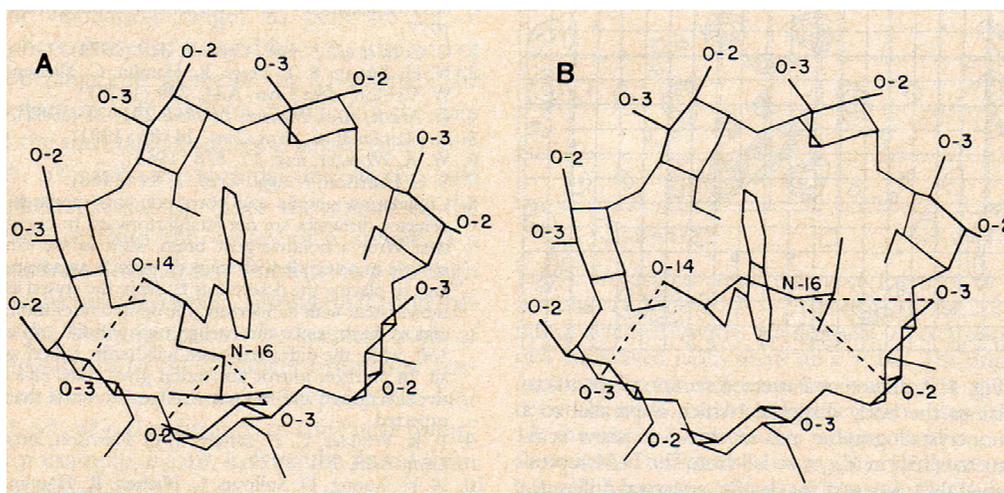
Armstrong et al.<sup>200</sup> mencionam em seu trabalho sobre projeção computacional para mostrar a separação de enantiômeros por formação de complexos de inclusão com a  $\beta$ -CD, que a forma (S)-PRO é aproximadamente quarenta vezes mais potente em relação à forma (R)-PRO apresentando efeito imediato no caso de arritmias e na atividade anti-hipertensiva quando se procede

a administração da mistura racêmica do propranolol. Porém, somente a forma (R)-PRO apresenta benefícios no tratamento da angina pectoris.

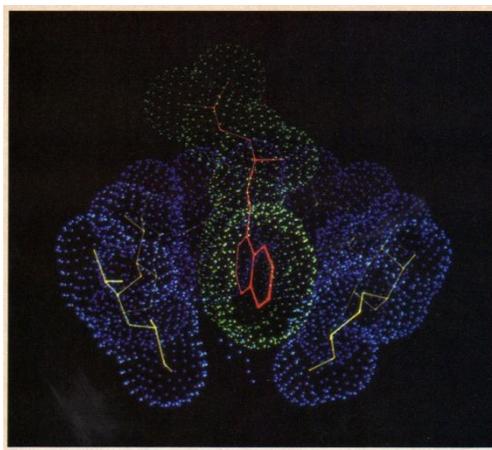
### 6.3. Análise de enantiômeros do propranolol

Estudos acerca dos enantiômeros do propranolol têm sido realizados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência<sup>198</sup>, eletroforese capilar<sup>199</sup> e fluorescência molecular<sup>201,202</sup>. Nos trabalhos encontrados a separação enantioselectiva é realizada através de formação de complexo de inclusão com ciclodextrinas ou algum de seus derivados.

Armstrong et al.<sup>200</sup> estudaram a formação do complexo de inclusão dos enantiômeros do propranolol com a  $\beta$ -CD através de cálculos computacionais. Segundo os autores as formas (R)-PRO e (S)-PRO interagem em locais específicos na formação do complexo de inclusão. As Figuras 39 e 40 ilustram as diferenças na complexação.



**Figura 39.** Projeção computacional do complexo de inclusão do propranolol com a  $\beta$ -CD. (A) (S)-PRO. (B) (R)-PRO<sup>200</sup>.



**Figura 40.** Imagem gráfico-computacional do complexo de inclusão do (R)-PRO com a  $\beta$ -CD<sup>200</sup>.

O trabalho de Glenn et. al.<sup>33</sup> avalia a eficiência do complexo de inclusão do propranolol com  $\beta$ -CD por fluorescência molecular quando 1 e 2-butanol estão presentes. Seus resultados mostram que a presença do álcool 1-butanol no sistema contendo os enantiômeros do propranolol com  $\beta$ -CD promove uma melhor enantioseparação. Isso ocorre devido à posição do grupo hidroxila com relação ao grupo alquil do álcool, formando um complexo ternário, que pode ser crucial para a ótima organização no interior da cavidade da ciclodextrina.

A separação de enantiômeros do propranolol em plasma vem sendo realizada através de HPLC com detecção por fluorescência molecular<sup>201,202</sup>. Estudos farmacocinéticos dos enantiômeros do propranolol em plasma sanguíneo e urina humana utilizando HPLC mostram níveis mais elevados de (S)-PRO tanto no plasma sanguíneo quanto na urina humana em relação ao enantiômero (R)-PRO<sup>203</sup>. A maior concentração do enantiômero (S)-PRO no plasma sanguíneo pode ser atribuído a uma maior absorção por via oral, a um volume menor de distribuição ou a um metabolismo hepático estereosseletivo<sup>198</sup>.

Tran et. all.<sup>195</sup> determinam a composição enantiomérica de propranolol e através de espectroscopia no infravermelho próximo. Seus resultados encorajaram a tentativa de quantificar os enantiômeros do propranolol empregando calibrações de primeira ordem a partir da espectroscopia não só na região do infravermelho próximo, mas também na região do infravermelho médio, ultravioleta e a partir do espectro de emissão de fluorescência molecular obtido em um comprimento de onda de excitação fixo. Além disso, resultados mais satisfatórios poderiam ser obtidos utilizando mais informações para a calibração e por isso, uma calibração de segunda ordem utilizando os espectros de excitação e emissão de fluorescência consiste no segundo objetivo deste capítulo.

## 6.4. Descrição experimental

### 6.4.1. Reagentes

Nesta aplicação foram utilizados os seguintes reagentes:

- (R)-propranolol (Sigma-Aldrich);
- (S)-propranolol (Sigma-Aldrich);
- $\beta$ -ciclodextrina (Sigma-Aldrich);
- 1-butanol (VETEC);
- Celulose microcristalina (PharmaSpecial)
- Lactose (Pharma Nostra);
- Dióxido de silício coloidal (Viafarma);
- Ácido esteárico vegetal (PharmaSpecial);

- Estearato de magnésio (Sintética);
- Fosfato de sódio bibásico anidro (Synth);
- Fosfato de potássio monobásico (Merck);
- Amiloride (Pharma Nostra);
- Dipyridamol (Pharma Nostra);
- n-Hexano 85% (TEDIA);
- isopropanol (TEDIA);
- Dietilamina (ACROS);
- Metanol (J.T. Baker)

#### 6.4.2. Preparo das amostras para medidas espectroscópicas

*Ultravioleta, infravermelho próximo e médio do fármaco e da preparação farmacêutica*

Para as medidas na região do ultravioleta, infravermelho próximo (NIR – do inglês, Near Infrared) e médio (MIR – do inglês, Middle Infrared), partiu-se de soluções estoque de:  $\beta$ -ciclodextrina  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L (1,1350g/100mL), (R)-propranolol  $8,0 \times 10^{-2}$  mol/L (2,7387g/100mL) e (S)-propranolol  $8,0 \times 10^{-2}$  mol/L (2,7387g/100mL), preparou-se soluções com concentração de  $\beta$ -ciclodextrina de  $2,0 \times 10^{-3}$  mol/L e propranolol com concentração fixa de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L para 59 amostras variando-se a composição dos enantiômeros em intervalos de 5%. O álcool 1-butanol, na concentração de 0,05 mol/L, foi adicionado em todas as amostras para auxiliar na complexação enantioselectiva. As amostras foram todas

preparadas em água Mili-Q, passaram por um processo de 10 minutos em banho de ultra-som e foram utilizadas no dia seguinte.

Para as medidas na preparação farmacêutica a concentração dos excipientes foi fornecida por uma empresa farmacêutica a qual os direitos são resguardados. Cada excipiente foi mantido conforme a razão na qual é encontrado em um comprimido contendo 80mg do princípio ativo propranolol. Seguiu-se o mesmo procedimento descrito acima, porém com a adição dos excipientes: celulose, lactose, dióxido de silício, ácido esteárico e estearato de magnésio, na ordem de mmol/L.

As medidas na região do ultravioleta e do infravermelho próximo foram registradas em um espectrômetro de duplo feixe Cary 5G, na região de 200 a 2500 nm, resolução de 1nm, utilizando cubeta de quartzo de 1mm.

Os espectros de infravermelho médio foram registrados na faixa de número de onda 650 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , resolução de  $4\text{cm}^{-1}$  e uma média de 32 varreduras, utilizando um espectrômetro Bomem e acessório de reflectância total atenuada com cristal de ZnSe.

#### *Fluorescência molecular do fármaco e da preparação farmacêutica*

O procedimento descrito acima foi seguido também na preparação das amostras para medidas de fluorescência molecular. Entretanto, a concentração final para a  $\beta$ -CD e para os enantiômeros do propranolol foram de  $2,0 \times 10^{-6}$  mol/L e  $1,0 \times 10^{-6}$  mol/L, respectivamente, partindo de soluções estoque de:  $\beta$ -ciclodextrina  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L (1,1350g/100mL), (R)-propranolol  $1,0 \times 10^{-5}$  mol/L (0,0026g/100mL) e

(S)-propranolol  $1,0 \times 10^{-5}$  mol/L (0,0026g/100mL). Também neste caso, na preparação farmacêutica, cada excipiente foi mantido conforme a razão na qual é encontrado em um comprimido com 80mg de propranolol só que na concentração da ordem de  $\mu\text{mol/L}$ . A água Mili-Q foi utilizada em todas as preparações.

Os espectros de fluorescência molecular foram registrados na faixa de excitação de 200 a 350 nm, resolução de 10nm, e emissão de 300 a 500 nm, resolução de 0,5nm, utilizando um espectrômetro Perkin Elmer LS 55, cubeta de quartzo com caminho óptico de 10mm e fendas de excitação e emissão de 5 nm.

#### *Fluorescência molecular do fármaco em plasma sanguíneo e urina*

Na quantificação dos enantiômeros do propranolol em plasma sanguíneo humano e urina humana foi empregada a técnica de fluorescência molecular. Para que esta etapa do trabalho pudesse ser desenvolvida foi submetido e aprovado um projeto no comitê de ética da UNICAMP, processo número 727/2007.

A preparação das amostras para esta etapa foi idêntica ao preparo para as medidas do fármaco e da preparação farmacêutica por fluorescência molecular. Foram preparadas 12 amostras com a concentração de (R)-PRO e (S)-PRO fixa em  $1,0 \times 10^{-6}$  mol/L, variando as frações molares de 30 a 70% em intervalos de 5%, contendo  $2,0 \times 10^{-6}$  mol/L de  $\beta$ -CD e 0,05 mol/L de 1-butanol. A cada amostra foram adicionados mais dois fármacos, a amilorida e o dipiridamol, na concentração de  $1,0 \times 10^{-6}$  mol/L para cada fármaco, juntamente com 2 mL do tampão  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,02 mol/L pH 7,00 e 100 $\mu\text{L}$  de urina proveniente de doadores do sexo masculino com idade entre 20 e 30 anos e que não estavam fazendo uso de nenhum medicamento. Este procedimento foi realizado com urina de três

indivíduos diferentes. Todas as amostras e soluções foram preparadas em água Mili-Q.

Para a quantificação dos enantiômeros no plasma sanguíneo humano seguiu-se o mesmo procedimento utilizado na preparação das amostras para a quantificação na urina substituindo-se os 100 $\mu$ L de urina por 100 $\mu$ L de plasma. O procedimento foi realizado para três bolsas de plasma sanguíneo provenientes de doadores diferentes e concedidas pelo hemocentro da UNICAMP.

Estas amostras foram preparadas visando uma calibração global, ou seja, empregando amostras de indivíduos diferentes em uma mesma calibração.

Para a quantificação através do método SOSAM foram preparadas cinco amostras como descrito acima, em triplicata, para três doadores diferentes. As concentrações de  $\beta$ -CD, dos enantiômeros, do 1-butanol, amilorida, dipiridamol e o volume de tampão, plasma e urina foram mantidos como na descrição acima. Partiu-se de uma amostra com concentração inicial de 50% de (R)-PRO e 50% de (S)-PRO para a urina de um indivíduo, 70% de (R)-PRO e 30% de (S)-PRO para a urina do outro indivíduo e 40% de (R)-PRO e 60% de (S)-PRO para a urina do último indivíduo. A essas amostras iniciais foram adicionadas 20%, 30%, 40% e 50% de (R)-PRO. As amostras passaram por um processo de 10 minutos em banho de ultra-som. As mesmas frações molares foram utilizadas na quantificação dos enantiômeros do PRO no plasma sanguíneo humano.

As medidas de fluorescência molecular foram registradas em um espectrômetro de fluorescência molecular marca Varian modelo Cary Eclipse utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10mm. As fendas de excitação e emissão foram de 5 nm cada. Os espectros de excitação foram

registrados 280 a 330 nm, com resolução de 10nm, e de emissão de 310 a 400 nm para o plasma e de 318 a 458 nm para a urina, com resolução de 0,5nm

#### 6.4.3. Preparo das amostras para análise por HPLC

A partir de soluções estoque de (R)-PRO  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L (12,97mg/5mL) e (S)-PRO  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L (12,97mg/5mL) solubilizados em n-hexano:metanol:dietilamina (97:3:0,5, v,v,v), foram preparadas soluções por diluição, com os mesmos solventes, de modo a se obter a concentração dos enantiômeros do PRO de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L com as mesmas frações molares empregadas na análise espectroscópica de fluorescência molecular para o fármaco e para a preparação farmacêutica.

No caso da preparação farmacêutica a solução estoque foi preparada juntamente com os excipientes e filtrada em papel de filtro qualitativo para remover os excipientes que não solubilizaram.

O sistema cromatográfico foi constituído de uma coluna com fase estacionária quiral a base de amilose tris(3,5-dimetilfenil carbamato) revestida sobre 10 $\mu$ m sílica-gel, Chiralpak AD, (Daicel Chemical Industries LTD), (250 mm x 4.6 mm, 10  $\mu$ m). A fase móvel foi composta por n-hexano:isopropanol:dietilamina (95:5:0,5, v/v/v). O volume de amostra injetada foi de 20  $\mu$ L. A vazão utilizada foi de 1,0 mL/min com detecção espectrofotométrica em 292 nm.

Sob estas condições o pico referente ao isômero (R)-PRO aparece no menor tempo de retenção.

O equipamento utilizado foi um Shimadzu LC-20AT equipado com bomba modelo LC-20AT, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, módulo de comunicação CBM-20A, degasser DGU-20A5 e interface compatível com micro-computador através do software LC solution.

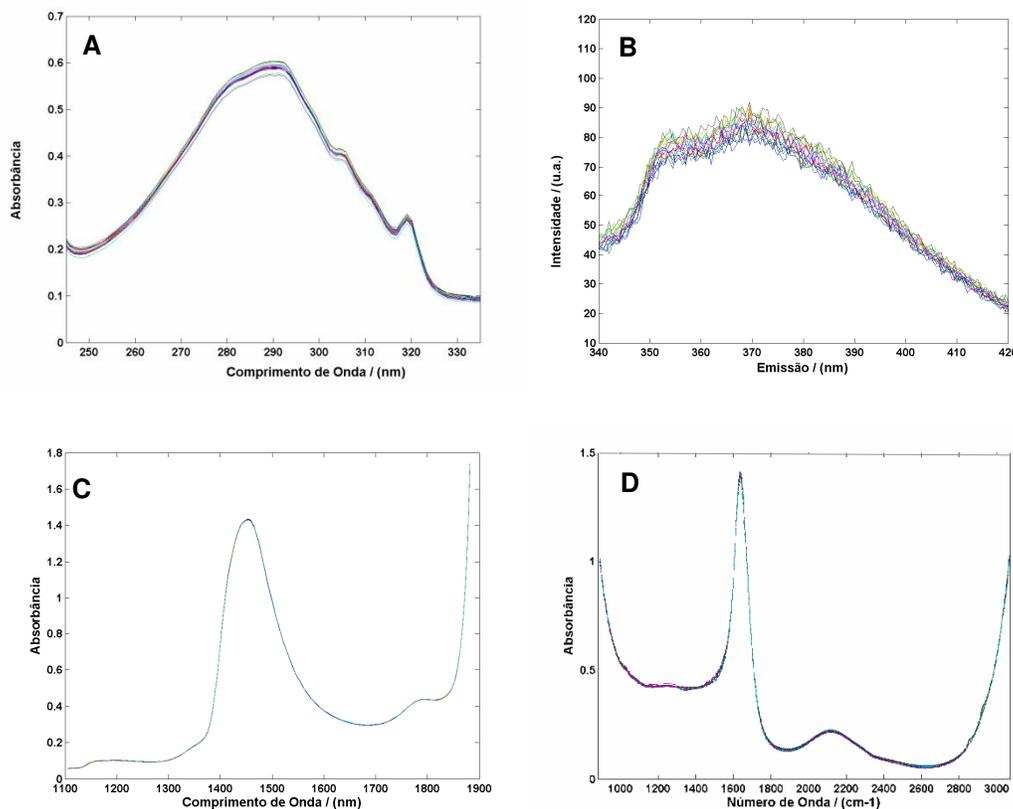
## **6.5. Resultados e discussão**

### **6.5.1. Resultados e discussão para a quantificação dos enantiômeros do propranolol com calibração de primeira ordem**

Os dados experimentais para a análise dos enantiômeros do PRO por espectroscopia na região do ultravioleta, infravermelho próximo, infravermelho médio e fluorescência molecular foram processados utilizando o programa MatLab 6.5 com aplicação das ferramentas de PLS toolbox 4.2.

Em todos os casos obtém-se um vetor de respostas instrumentais para cada amostra analisada e, portanto modelos de calibração multivariada de primeira ordem através de mínimos quadrados parciais (PLS) são empregados.

A Figura 41 mostra os espectros para os enantiômeros do PRO em fármaco obtidos na região do UV de 245 a 335 nm, emissão de fluorescência molecular de 340 a 420 nm, no comprimento de onda de excitação de 290 nm, região NIR de 1100 a 1900 nm e MID de 880 a 3070  $\text{cm}^{-1}$ . As mesmas regiões foram empregadas para a aquisição de espectros dos enantiômeros do PRO em preparação farmacêutica. Estes espectros foram utilizados para a construção dos modelos PLS.



**Figura 41.** Espectros dos enantiômeros do propranolol. **(A)** região UV. **(B)** Emissão de fluorescência molecular. **(C)** região NIR. **(D)** região MIR.

Os espectros obtidos em cada região foram separados entre conjuntos de calibração e validação através do algoritmo de Kennard-Stone<sup>166</sup> conforme as discussões da sessão 4.5 do capítulo 4. Cada conjunto de calibração foi inicialmente composto por 30 amostras enquanto os conjuntos de validação foram compostos por 29 amostras cada um.

Os modelos foram construídos com 10 variáveis latentes. Exceto o modelo para quantificar os enantiômeros do propranolol na preparação farmacêutica empregando a região do infravermelho médio que empregou 8 variáveis latentes. Os espectros obtidos na região do ultravioleta foram utilizados na forma de sua primeira derivada para a construção dos modelos. Com a fluorescência molecular

os espectros passaram por um processo de alisamento através do algoritmo de Savitzky-Golay antes da construção dos modelos.

O próximo passo consistiu na análise para identificação de amostras anômalas dos conjuntos de calibração. Foram realizados os testes para a identificação de amostras anômalas com base no *leverage*, no resíduo espectral e no resíduo na variável dependente. As amostras anômalas do conjunto de validação foram avaliadas com base no *leverage* e no resíduo espectral. O número de amostras anômalas eliminadas pode ser visualizado na Tabela 13.

**Tabela 13.** Número de amostras anômalas excluídas para a validação dos modelos PLS na quantificação dos enantiômeros do PRO.

Modelo PLS	Nº. amostras anômalas excluídas UV	Nº. amostras anômalas excluídas Fluorescência	Nº. amostras anômalas excluídas NIR	Nº. amostras anômalas excluídas MID
Fármaco	21	21	18	16
Preparação farmacêutica	14	23	16	20

O teste para identificação de amostras anômalas foi aplicado apenas ao primeiro modelo de calibração e não acusou a presença de nenhum outlier. Os resultados apresentados na Tabela 13 são referentes às amostras anômalas encontradas nos conjuntos de validação.

A partir dos conjuntos otimizados chegou-se a modelos mais eficientes e precisos e com melhores capacidades de previsão. Isto pode ser comprovado a partir dos resultados da Tabela 14 que mostra os erros da calibração e da previsão representados pelos valores de RMSEC e RMSEP, respectivamente. Os

resultados para o coeficiente de correlação de cada modelo são também apresentados.

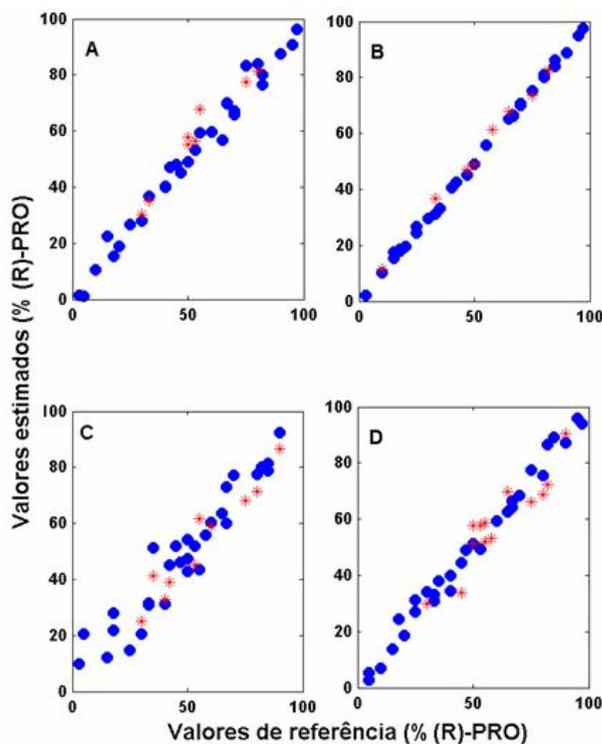
**Tabela 14.** Resultados para os modelos PLS na quantificação do (R)-PRO.

Modelo	RMSEC (% R-Pro)	RMSEP (% R-Pro)	R <sup>*</sup>
Fármaco - UV	4,53	5,90	0,9811
Fármaco - fluorescência	1,27	2,23	0,9987
Fármaco - NIR	7,02	9,54	0,9150
Fármaco - MID	3,71	6,66	0,9877
Preparação farmacêutica - UV	8,81	11,82	0,9204
Preparação farmacêutica - fluorescência	4,33	7,47	0,9808
Preparação farmacêutica - NIR	8,26	6,87	0,9542
Preparação farmacêutica - MID	2,59	4,39	0,9947

R<sup>\*</sup> Coeficiente de correlação da reta entre os valores esperados e os previstos pelo modelo.

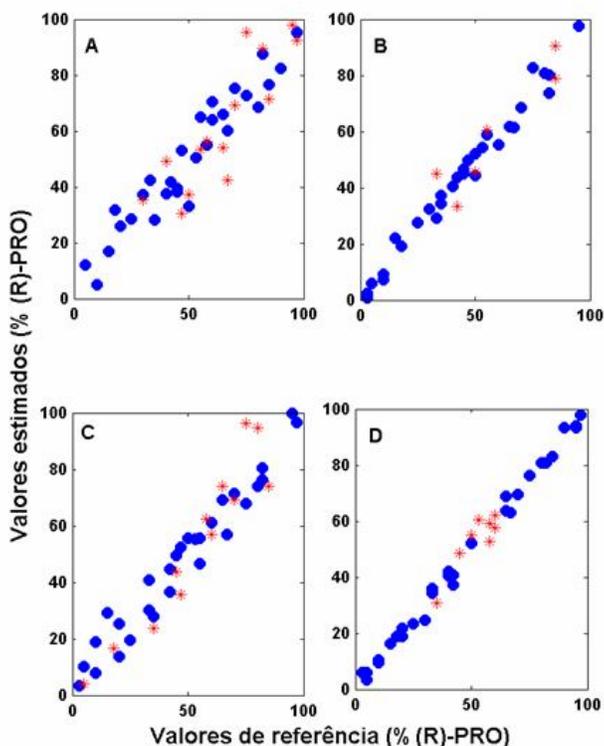
O ajuste para os modelos desenvolvidos são apresentados nas Figuras 41 e 42.

Na Figura 42 verifica-se que para a quantificação dos enantiômeros do propranolol no fármaco a fluorescência molecular fornece um melhor ajuste. As regiões do UV e do MIR mostram um ajuste similar, enquanto a região do NIR apresenta um ajuste inferior.



**Figura 42.** Ajuste do modelo PLS para quantificação dos enantiômeros do propranolol no fármaco. **(A)** UV. **(B)** Fluorescência molecular. **(C)** NIR. **(D)** MIR. (•) amostra de calibração. (\*) amostra de validação.

Na quantificação dos enantiômeros do propranolol na preparação farmacêutica é possível comprovar, através da Figura 43 e da Tabela 14, que os modelos PLS para a fluorescência molecular e a região do MIR apresentam melhor ajuste e eliminam uma quantidade maior de anomalias em relação às regiões do UV e NIR. Os modelos para as regiões do UV e NIR, Figura 42(A) e 42(C), apresentam ajuste inferior e maiores erros de previsão como se pode verificar através da Tabela 14.



**Figura 43.** Ajuste do modelo PLS para quantificação dos enantiômeros do propranolol na preparação farmacêutica. **(A)** UV. **(B)** Fluorescência molecular. **(C)** NIR. **(D)** MIR. (•) amostra de calibração. (\*) amostra de validação.

Os modelos de calibração construídos a partir de espectros obtidos nas regiões do ultravioleta e infravermelho, próximo e médio, bem como os espectros obtidos por fluorescência molecular, mostraram que é possível a quantificação de enantiômeros do propranolol tanto no fármaco quanto na preparação farmacêutica a partir de dados de primeira ordem.

A identificação e eliminação das amostras anômalas permitiu a otimização dos modelos de calibração e validação promovendo melhores resultados de previsão com menores erros. Porém foi necessária a eliminação de um número relativamente grande de amostras, provavelmente devido à pequena diferença espectral entre os enantiômeros onde pequenos desvios ou ruídos causam grandes problemas nos modelos de calibração. Além disso, foram necessárias

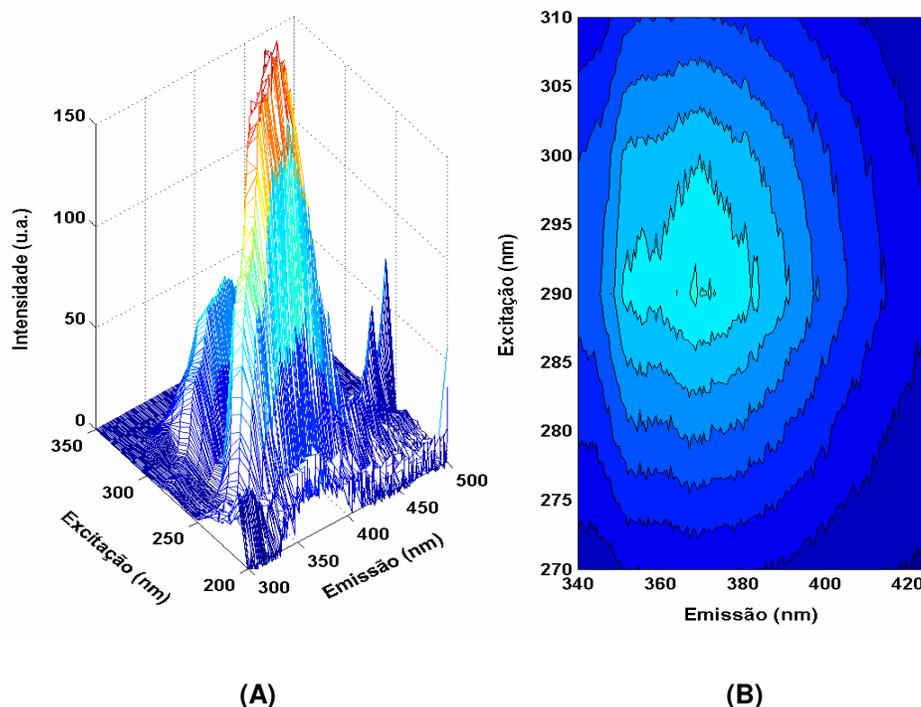
muitas variáveis latentes para a construção dos modelos de calibração. Isto pode estar acarretando um sobre-ajuste aos modelos e por isso muitas amostras anômalas são identificadas nos conjuntos de validação. Portanto, essa etapa do trabalho mostrou a possibilidade de desenvolver modelos de calibração de primeira ordem para quantificar os enantiômeros do PRO. Porém com o intuito de construir um modelo de calibração que apresentasse menores erros para a calibração e previsão na quantificação desses enantiômeros procedeu-se uma calibração que utiliza mais informações espectrais, a calibração de segunda ordem, discutido na próxima sessão deste capítulo.

#### **6.5.2. Resultados e discussão para a quantificação dos enantiômeros do propranolol com calibração de segunda ordem**

Para a calibração de segunda ordem empregou-se toda a superfície de fluorescência molecular. Os dados experimentais foram processados utilizando o programa MatLab 6.5 com aplicação das ferramentas de PLS toolbox 4.2.

Os modelos de calibração multivariada de segunda ordem foram desenvolvidos empregando os métodos quimiométricos PARAFAC e BLLS. Para a aplicação do método PARAFAC empregou-se as ferramentas N-way toolbox, disponibilizadas por Rasmus Bro em <http://www.models.kvl.dk/source>. O método BLLS foi empregado através de um programa desenvolvido no laboratório. As ferramentas para o cálculo das figuras de mérito também foram desenvolvidas no laboratório em ambiente MatLab.

A Figura 44 mostra uma superfície de fluorescência obtida para uma amostra de fármaco racêmico e a respectiva região utilizada para a calibração através do mapa de contorno.



**Figura 44.** Superfície de fluorescência **(A)** e mapa de contorno **(B)** para uma amostra de fármaco.

Através da superfície da Figura 44 é possível observar dois picos de fluorescência para o PRO, enquanto o mapa de contorno mostra apenas a região do pico de menor intensidade de fluorescência, a qual foi utilizada para a calibração. Isto porque esta região apresentou melhores resultados para a previsão com menores valores de erro. O erro médio relativo para a previsão, utilizando toda a região de fluorescência molecular, é de 31,61% e 15,54%, para o fármaco e a preparação farmacêutica, respectivamente, empregando o método BLLS. Com o método PARAFAC os erros são de 6,64% e 151,21%, para o fármaco e a preparação farmacêutica, respectivamente.

Para confirmar que a região de menor intensidade de fluorescência seria realmente a melhor região a ser empregada para a calibração de segunda ordem aplicou-se o método de seleção de variáveis iPLS. Para tanto, as matrizes organizadas no formato de um cubo ou tensor de dados, como pede a calibração de segunda ordem, foram organizadas lado a lado, prática conhecida como desdobramento (*unfold*), e a partir de então o método iPLS foi empregado.

A Figura 45 mostra o resultado para a seleção de variáveis através do iPLS. Nessa figura, os gráficos de barra indicam o erro (RMSECV) para cada intervalo e a linha horizontal pontilhada o RMSECV do modelo global, ou seja, com toda a superfície de fluorescência molecular. Verifica-se que os intervalos de número 27 ao 45 são os que apresentam menores valores de RMSECV, sendo assim, os intervalos indicados para a construção do modelo. Este resultado sugere que a região que deve ser utilizada para a calibração de segunda ordem para a quantificação dos enantiômeros do PRO é condizente com a região apresentada no mapa de contorno da Figura 44(B).

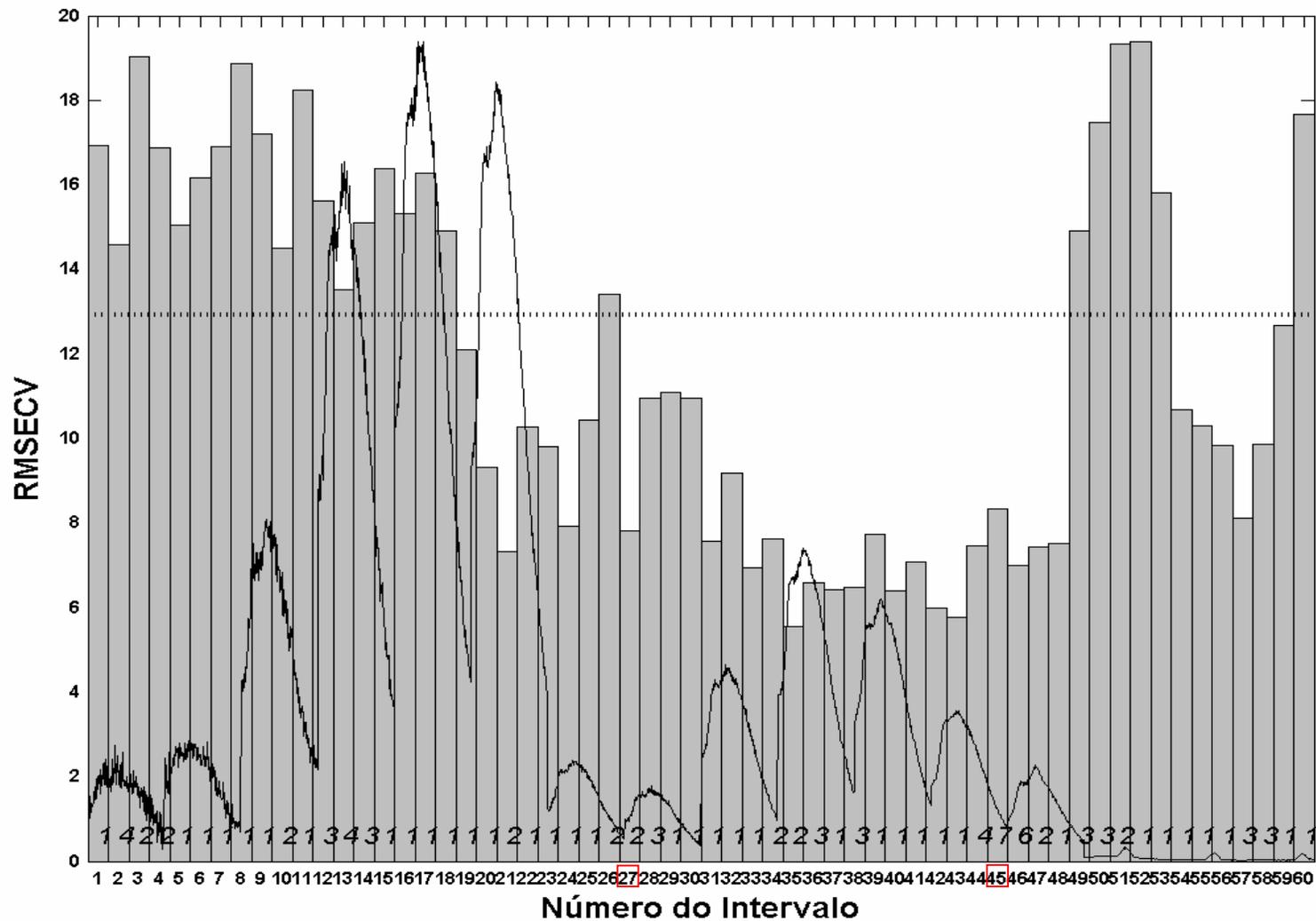
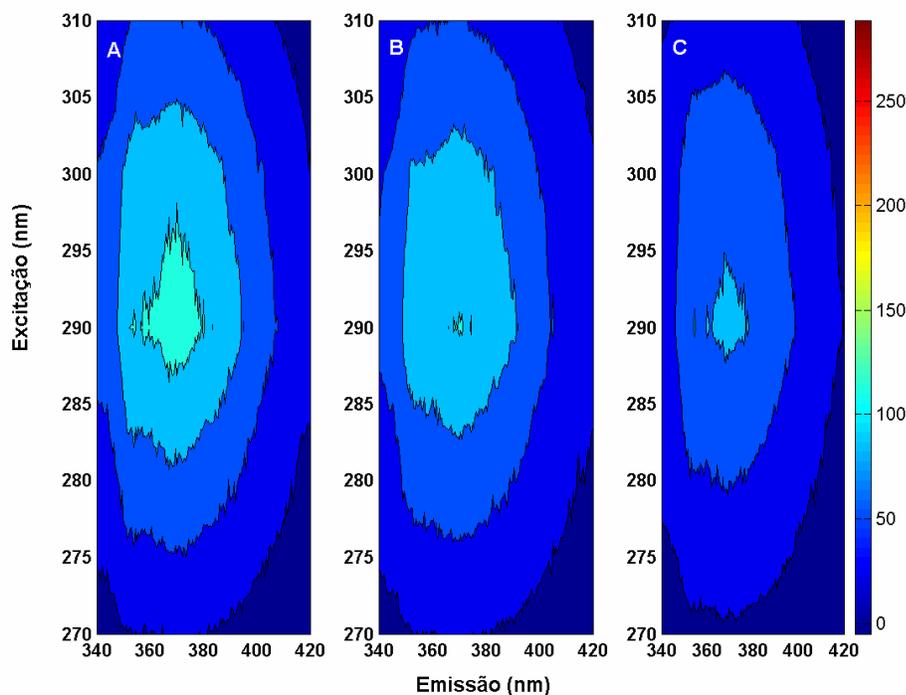


Figura 45. Seleção de variáveis pelo iPLS para os enantiômeros do propranolol.

Como discutido na sessão 6.5.1 deste capítulo, as diferenças espectrais para os enantiômeros do propranolol podem ser muito sutis e por isso a calibração de primeira ordem não forneceu resultados muito satisfatórios e apontou muitas amostras como sendo anômalas. Os mapas de contorno podem dar uma idéia mais clara a respeito dessas diferenças. A Figura 46 mostra os mapas de contorno de fluorescência molecular para uma amostra de propranolol contendo apenas o enantiômero (S)-PRO, Figura 46(A), uma amostra de propranolol racêmica, Figura 46(B), e uma amostra de propranolol contendo apenas o enantiômero (R)-PRO, Figura 46(C). Em todos os casos as amostras dos enantiômeros estão complexados com  $\beta$ -CD na presença de 1-butanol e exibem a região de excitação e emissão utilizadas para a calibração de segunda ordem.



**Figura 46.** Mapas de contorno de fluorescência molecular do propranolol complexado com  $\beta$ -CD na presença de 1-butanol. **(A)** (S)-PRO. **(B)** propranolol racêmico. **(C)** (R)-PRO.

O número de fatores utilizados na decomposição dos dados com o método PARAFAC foi escolhido com base no conhecimento prévio da amostra e é igual ao número de espécies presentes, ou seja, dois fatores foram empregados na calibração empregando a restrição de não negatividade. No caso do modelo BLLS não foi utilizada a vantagem de segunda ordem, isto implica que não há interferentes não calibrados. Os resultados para os modelos são mostrados na Tabela 15.

**Tabela 15.** Resultados dos modelos de segunda ordem na quantificação do (R)-PRO.

Modelo	RMSEC (% R-Pro)	RMSEP (% R-Pro)	R <sup>*</sup>	Erro médio relativo
Parafac fármaco	2,88	2,22	0,9601	3,94
BLLS fármaco	3,70	2,39	0,9604	3,62
Parafac preparação farmacêutica	2,78	1,00	0,9950	5,46
BLLS preparação farmacêutica	1,11	2,34	0,9963	3,35

R<sup>\*</sup> Coeficiente de correlação da reta entre os valores esperados e os previstos pelo modelo.

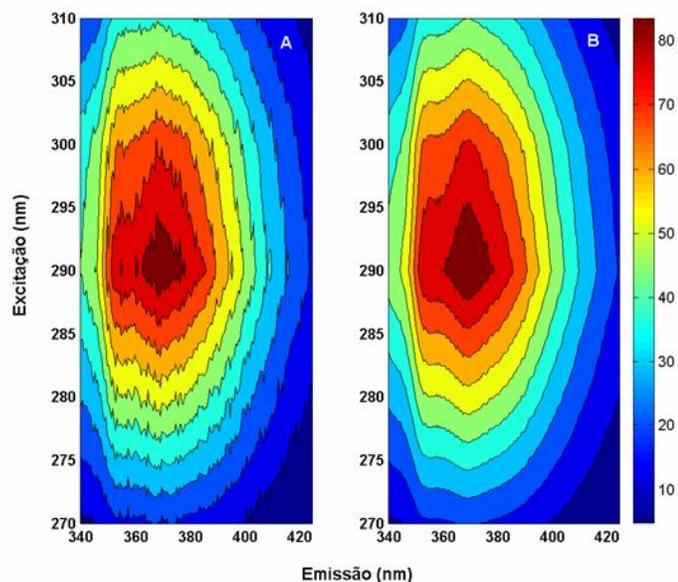
Os modelos PARAFAC e BLLS apresentaram resultados semelhantes, entretanto, o método BLLS mostrou menores valores para o erro médio relativo na previsão de novas amostras, como pode ser observado através dos resultados mostrados na Tabela 15.

Os resultados obtidos através dos métodos BLLS e PARAFAC foram também avaliados através de um teste t-pareado para verificar se as diferenças são realmente significativas. O valor de t calculado foi de 0,67 e 2,41 para o fármaco e a preparação farmacêutica, respectivamente, contra um valor de t

tabelado de 2,31 para 95% de confiança. Estes resultados mostram que não existem diferenças significativas entre os métodos BLLS e PARAFAC na quantificação dos enantiômeros do PRO no fármaco. Por outro lado, o resultado do teste t pareado para a preparação farmacêutica mostra que a diferença entre os resultados obtidos pelos métodos BLLS e PARAFAC são significativas.

Desta forma, os modelos BLLS para o fármaco e a preparação farmacêutica, por apresentarem menores erros relativos de previsão do que o método BLLS, foram validados através do cálculo das figuras de mérito.

Além disso, é sabido que com aplicação de métodos de calibração de segunda ordem, é possível obter-se uma estimativa dos perfis espectrais de excitação e emissão em casos que empregam matrizes de fluorescência molecular para a calibração. Assim, estimou-se os perfis espectrais de excitação e emissão recuperados pelo método BLLS para o enantiômero (R)-PRO. Esta estimativa foi realizada com o objetivo de confirmar que os perfis estimados com o método eram condizentes com os perfis experimentais. A Figura 47 mostra os mapas de contorno de fluorescência para o enantiômero (R)-PRO obtido experimentalmente e reconstruídos a partir do método BLLS.



**Figura 47.** Mapas de contorno de fluorescência para o enantiômero (R)-PRO. **(A)** superfície experimental, **(B)** superfície reconstruída pelo método BLLS.

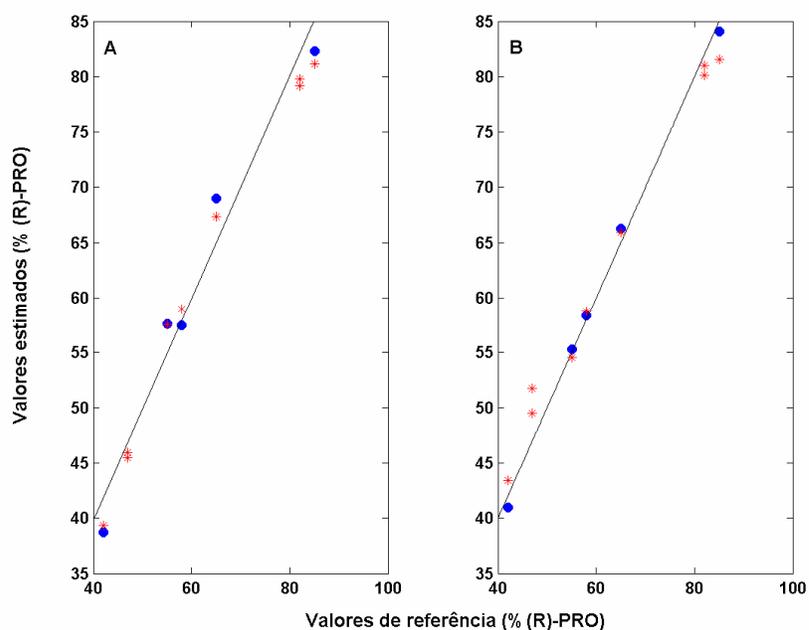
Como é possível observar a superfície reconstruída pelo método de segunda ordem apresenta boa concordância com a superfície obtida através de ensaios experimentais e os resultados para as figuras de mérito para os modelos BLLS são apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16.** Figuras de mérito para os modelos BLLS na quantificação do (R)-PRO.

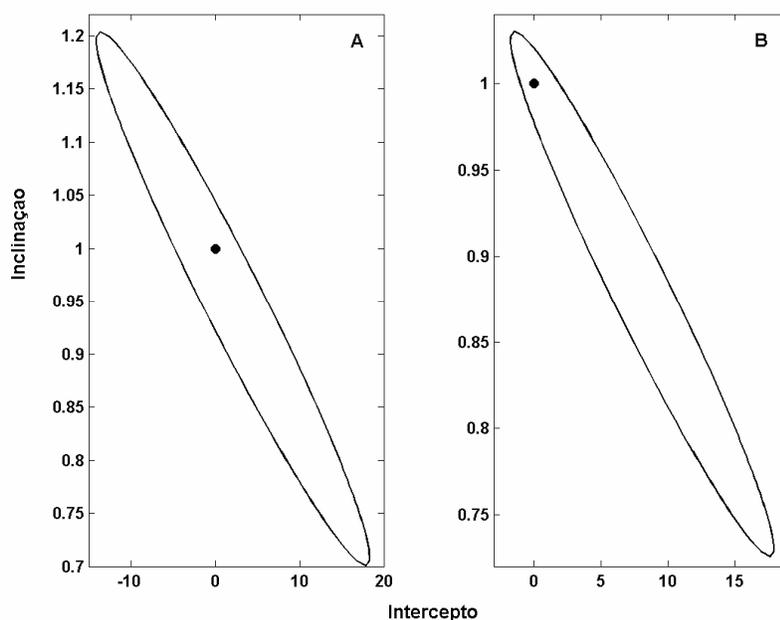
Figuras de Mérito		Fármaco	Preparação farmacêutica
Exatidão <sup>a</sup>	RMSEC	3,70	1,11
	RMSEP	2,39	2,34
Precisão <sup>a</sup>		0,48	0,75
Sensibilidade <sup>b</sup>		2,61	2,19
Sensibilidade Analítica <sup>-1 a</sup>		0,07	0,08
Ajuste	Inclinação	0,95 ± 0,05	0,88 ± 0,03
	Intercepto <sup>a</sup>	2 ± 3	8 ± 2
	Coef. Corr. (R)	0,9604	0,9963
Limite Detecção <sup>a</sup>		0,23	0,28
Limite Quantificação <sup>a</sup>		0,70	0,84

<sup>a</sup> % (R)-PRO; <sup>b</sup> % (R)-PRO<sup>-1</sup>

A exatidão, representada pelos valores de RMSEP e RMSEC na Tabela 16, mostram que os valores estimados pelo método BLLS concordam com os valores esperados de fração molar para os enantiômeros (R)-PRO. Este resultado é confirmado pela regressão entre os valores de referência e os valores estimados pelo modelo, como ilustrado na Figura 48, e os valores da inclinação e do intercepto apresentados na Tabela 16, incluindo a consideração da região da elipse de confiança da Figura 49.



**Figura 48.** Ajuste do modelo BLLS para quantificação do enantiômero (R)-PRO. **(A)** Fármaco. **(B)** Preparação farmacêutica. Amostras de calibração (•) e validação (\*).



**Figura 49.** Região da elipse de confiança para o intercepto e a inclinação da regressão entre as frações molares previstas pelo modelo BLLS e as frações molares teóricas para o enantiômero (R)-PRO. **(A)** Fármaco. **(B)** Preparação farmacêutica. (•) ponto onde o intercepto é igual a zero e a inclinação igual a um.

A região da elipse de confiança contém o ponto ideal (1,0), para a inclinação e o intercepto, respectivamente. Isto mostra que os valores da fração molar esperada para o (R)-PRO tanto no fármaco quanto na preparação farmacêutica e seus valores previstos pelo modelo BLLS não apresentam diferença significativa com 99% de confiança.

A precisão foi estimada no nível de repetibilidade através da análise em triplicata de amostras em três níveis de fração molar, cobrindo a faixa do modelo BLLS e todas as determinações foram realizadas no mesmo dia. O resultado encontrado apresenta uma repetibilidade de 0,48 e 0,75% para o enantiômero (R)-PRO para os modelos BLLS na quantificação dos enantiômeros no fármaco e na preparação farmacêutica, respectivamente.

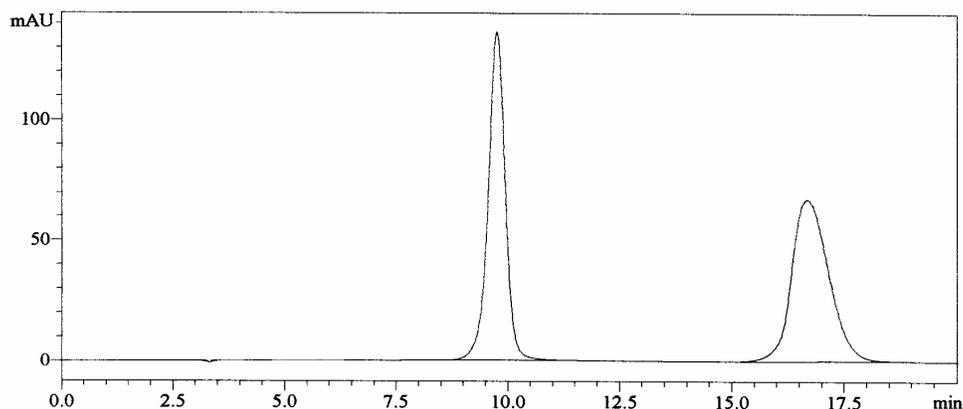
A sensibilidade e a sensibilidade analítica apresentaram bons resultados. O inverso da sensibilidade analítica estabelece a diferença mínima de fração molar que o modelo BLLS é capaz de distinguir, considerando um perfeito ajuste do modelo. Sendo assim, é possível fazer a distinção entre amostras com diferença de fração molar de 0,07% e 0,08% de (R)-PRO, no fármaco e na preparação farmacêutica, respectivamente. Este resultado representa uma estimativa otimista considerando o ruído espectral como a maior fonte de erros e não levando em consideração a falta de ajuste do modelo.

Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo foi realizada uma análise de variância. O resultado indica que a razão das médias quadráticas segue uma distribuição F com 95% de confiança. O valor de F calculado para o fármaco e a preparação farmacêutica foi de 281,70 e 248,08, respectivamente, e o valor de F tabelado para 95% de confiança é de 5,59. Este resultado mostra que os valores estimados pelo modelo apresentam relação com os valores teóricos, ou seja, o valor médio para os resultados obtidos não se diferem significativamente do valor médio tido como verdadeiro. Além disso, os valores de t calculados permitem observar que o ajuste foi melhor para o modelo do fármaco do que para o modelo da preparação farmacêutica.

Limites de detecção de 0,23% e 0,28% de (R)-PRO e quantificação de 0,70% e 0,84% de (R)-PRO foram alcançados para o fármaco e a preparação farmacêutica, respectivamente. Estes resultados mostram-se coerentes com as quantidades medidas em cada caso.

Os modelos BLLS desenvolvidos foram também validados por comparação com os resultados obtidos através da técnica de HPLC.

Foi realizada uma análise univariada com a razão entre as áreas do pico referente ao enantiômero (R)-PRO no tempo de retenção de 9,5 minutos, e a área total referente aos dois enantiômeros, como mostra a Figura 50.



**Figura 50.** Cromatograma do propranolol racêmico.

A Tabela 17 apresenta as figuras de mérito para os resultados alcançados com a técnica de HPLC.

**Tabela 17.** Figuras de mérito para a técnica HPLC na quantificação do (R)-PRO.

Figuras de Mérito		Técnica HPLC
Exatidão		1,11
Precisão <sup>a</sup>		$2,37 \times 10^{-4}$
Sensibilidade <sup>b</sup>		0,98
Sensibilidade Analítica <sup>-1 a</sup>		1,27
Seletividade		1,00
Ajuste	Inclinação	$0,982 \pm 0,045$
	Intercepto <sup>a</sup>	$0,008 \pm 0,028$
	Coef. Corr. (R)	0,9937
Limite Detecção <sup>a</sup>		3,82
Limite Quantificação <sup>a</sup>		12,72

<sup>a</sup> %(R)-PRO; <sup>b</sup> %(R)-PRO<sup>-1</sup>

Os limites de detecção e de quantificação mostram que o método proposto é mais sensível em relação à técnica de HPLC. Verifica-se que o modelo BLLS consegue fazer a distinção de amostras com menor diferença de fração molar do que com a técnica de HPLC. Além disso, o método proposto é mais rápido e não gera resíduo. Estas observações são válidas tanto para os enantiômeros do propranolol no fármaco quanto na preparação farmacêutica.

A Tabela 18 apresenta os valores esperados para as frações molares de (R)-PRO, tidos como verdadeiros, e os resultados obtidos pelo método multivariado e a técnica de HPLC. Os resultados dos dois métodos foram avaliados de acordo com um teste t-pareado, de onde se obteve um valor de t calculado de 1,24 para o fármaco e 0,23 para a preparação farmacêutica contra um valor de t tabelado de 2,31 para 95% de confiança. Estes resultados mostram que não existem diferenças significativas entre a técnica de HPLC e o método multivariado na quantificação de enantiômeros do propranolol no fármaco e na preparação farmacêutica.

No método BLLS são quantificadas as frações molares dos enantiômeros do propranolol com concentração de  $1,0 \times 10^{-6}$  mol/L. Já para a técnica de HPLC foram quantificadas as frações molares dos enantiômeros com concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L. Mesmo assim, o teste mostra que não existem diferenças significativas entre os dois métodos para 95% de confiança. Isto implica que o método BLLS é capaz de quantificar enantiômeros do propranolol presentes em amostras mais diluídas onde a técnica HPLC não é capaz de avaliar.

**Tabela 18.** Resultados para a quantificação do (R)-PRO.

Amostra	Valor esperado *	Valor obtido por HPLC para o fármaco e a preparação farmacêutica *	Valor obtido pelo modelo BLS para o fármaco *	Valor obtido pelo modelo BLS para a preparação farmacêutica *
1	47,00	48,79	45,94	51,78
2	82,00	81,02	79,13	80,11
3	42,00	44,01	39,31	43,45
4	47,00	46,99	45,50	49,52
5	55,00	54,25	57,56	54,55
6	58,00	57,96	58,99	58,78
7	65,00	64,97	67,38	65,95
8	82,00	81,78	79,81	80,98
9	85,00	85,55	81,15	81,58

\* % (R)-PRO

### 6.5.3. Resultados e discussão para a quantificação dos enantiômeros do propranolol em plasma e urina

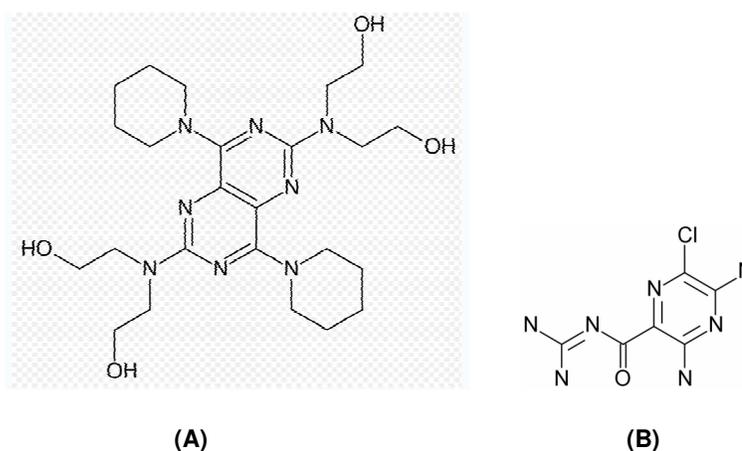
Os dados experimentais para a análise dos enantiômeros do PRO em plasma sanguíneo e urina humana por espectrofluorimetria foram processados utilizando o programa MatLab 6.5 com aplicação das ferramentas de PLS toolbox 4.2.

Para esta aplicação obtém-se uma matriz de respostas instrumentais para cada amostra e são desenvolvidos modelos de calibração multivariada de segunda ordem através do método PARAFAC empregando as ferramentas N-way toolbox, disponibilizadas por Rasmus Bro em <http://www.models.kvl.dk/source>.

O emprego de espectroscopia de fluorescência molecular combinada com quimiometria, especialmente pelo emprego do método PARAFAC, tem mostrado a possibilidade para determinação de propranolol em urina<sup>66</sup>. Esta combinação elimina possíveis etapas iniciais como, por exemplo, de pré-concentração e extrações para eliminação de interferentes, pois, como já discutido, não necessita

de separação física entre os interferentes e o analito uma vez que promove a separação quimiométrica dos seus sinais.

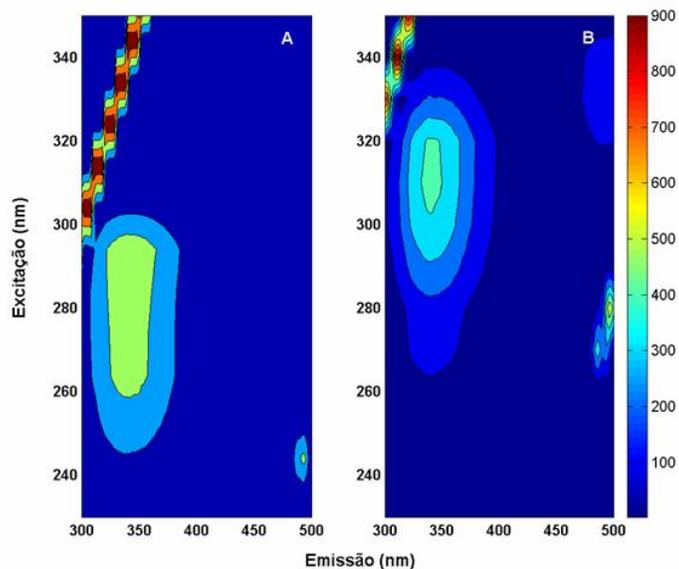
Pacientes que fazem uso do propranolol normalmente o utilizam associado a medicamentos diuréticos, como o dipiridamol (2-[[[3-[bis(2-hidroxietil)amino],5,10-bis(1-piperidil)-2,4,7,9-tetrazabicyclo[4.4.0]deca-2,4,7,9,11-penteno-8-y]-(2-hidroxietil)amino]etanol)<sup>204</sup> e a amilorida (3,5-diamino-6-cloro-N-(diaminometilideno)pirazina-2-carboxamida)<sup>205</sup> cujas estruturas são mostradas na Figura 51.



**Figura 51.** Estrutura do dipiridamol (A) e da amilorida (B).

Os fármacos, amilorida e dipiridamol, não apresentam fluorescência. Alguns testes foram realizados nas condições em que os enantiômeros do propranolol seriam determinados na urina e no plasma. Esses fármacos foram adicionados às amostras com o objetivo de simular uma situação real onde o paciente poderia ter ingerido algum diurético juntamente com o propranolol.

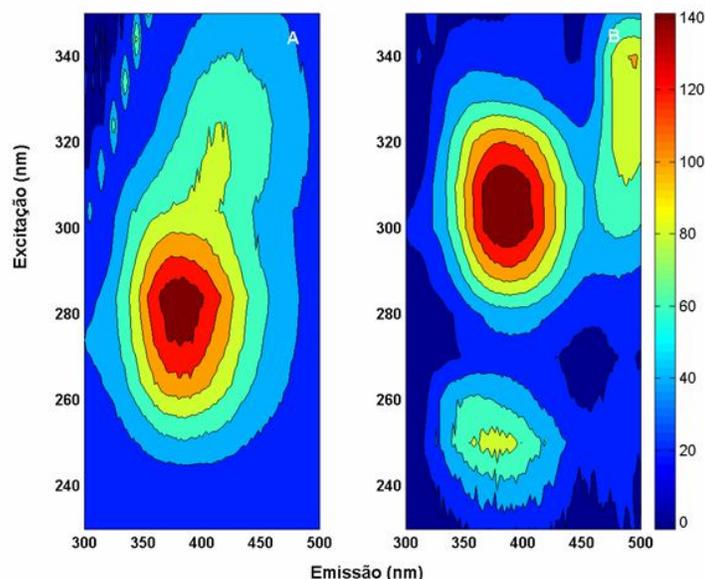
A Figura 52 apresenta os mapas de contorno para uma amostra de plasma puro e uma amostra de plasma na presença do propranolol racêmico, amilorida, dipiridamol,  $\beta$ -CD e 1-Butanol.



**Figura 52.** Mapas de contorno para uma amostra de plasma. **(A)** amostra de plasma puro. **(B)** amostra de plasma na presença de propranolol racêmico na concentração de  $1,0 \times 10^{-6}$  mol/L.

É possível observar que o propranolol apresenta fluorescência molecular em uma região que sobrepõe a fluorescência do plasma puro.

Na Figura 53, verifica-se o mesmo comportamento para a urina e os sinais sobrepostos, tanto para o plasma quanto para a urina, podem ser utilizados na quantificação dos enantiômeros nessas matrizes empregando métodos quimiométricos de segunda ordem.

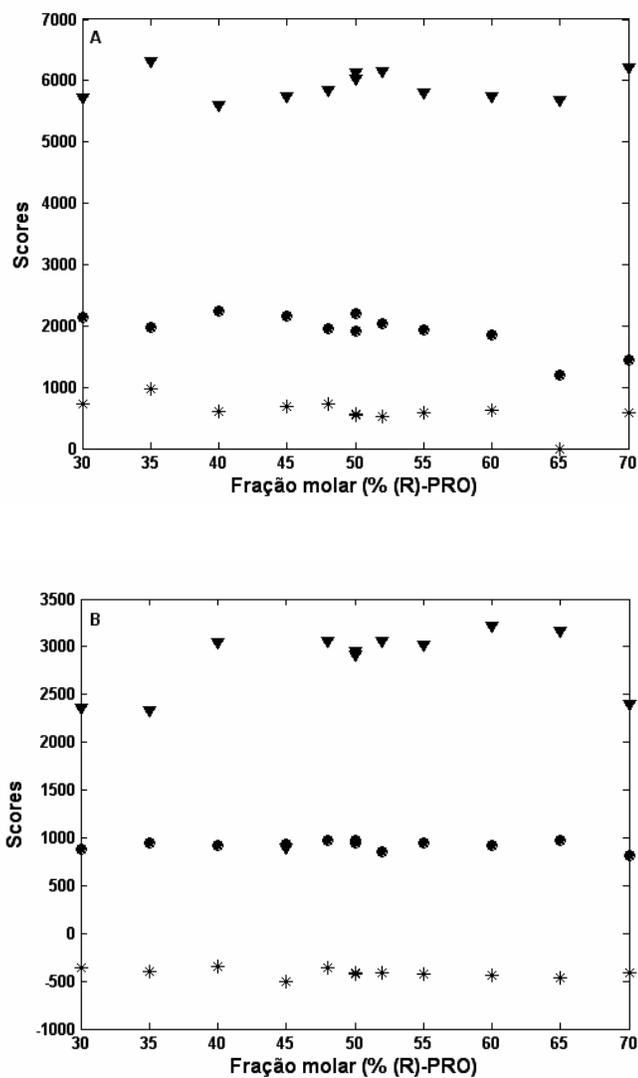


**Figura 53.** Mapas de contorno para uma amostra de urina. **(A)** amostra de urina pura. **(B)** amostra de urina na presença de propranolol racêmico na concentração de  $1,0 \times 10^{-6}$  mol/L.

O objetivo inicial da proposta para quantificar os enantiômeros do propranolol em plasma e urina era o desenvolvimento de um modelo de calibração global empregando as amostras de urina de três indivíduos diferentes para construir um modelo de calibração e as amostras de três plasmas provenientes de diferentes doadores para desenvolver uma outra calibração. Assim, a quantificação dos enantiômeros do propranolol na urina ou no plasma de um indivíduo que não tenha sido doador para esta etapa de calibração poderia ser realizada sem a necessidade de construção de um novo modelo. Porém, com o desenvolvimento do modelo de segunda ordem observou-se um comportamento não usual para a quantificação empregando o método PARAFAC.

A Figura 54 apresenta o resultado para os *scores* do modelo PARAFAC contra a fração molar do (R)-PRO. Pode-se verificar que os *scores* não apresentaram um comportamento linear em função da fração molar do

enantiômero. As amostras de plasma e urina para cada doador em particular são separadas e isso indica um efeito individual da matriz sugerindo que seja realizada uma calibração para cada doador, ou, demandando o emprego do método de adição de padrão.



**Figura 54.** Scores do modelo PARAFAC para três amostras diferentes na quantificação dos enantiômeros do propranolol. **(A)** plasma dos três doadores. **(B)** urina dos três doadores.

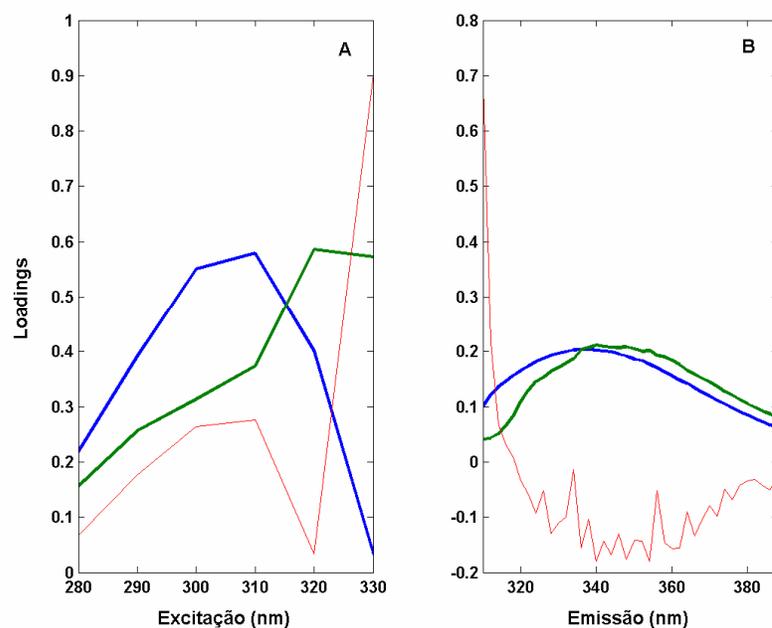
A construção de modelos individuais para cada um dos doadores seria muito trabalhosa e sem muita serventia de ordem prática. O indivíduo teria que

fornecer as amostras para a calibração antes de fazer uso do medicamento e posteriormente fornecer amostras para a validação após o tratamento.

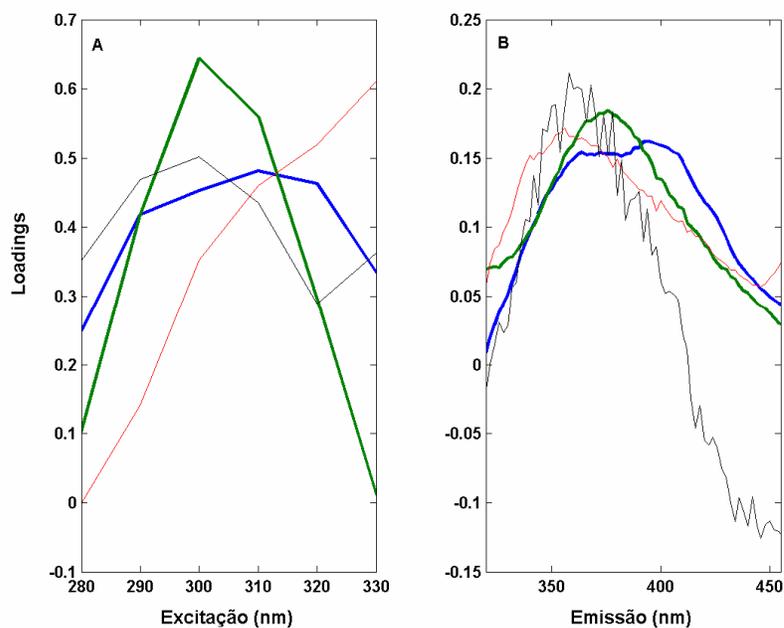
Neste sentido, o método de adição padrão de segunda ordem é um método mais rápido e prático e foi aplicado às amostras de cada doador individual. Em cada caso, foi construído um modelo de calibração para cada cinco amostras, em triplicata, de cada doador de plasma e de urina.

O número de fatores empregado na calibração foi escolhido com base no conhecimento químico do sistema e no melhor ajuste para o método SOSAM. O uso de restrições, como não negatividade, pode melhorar a qualidade do ajuste do modelo PARAFAC, desde que valores de absorbância negativo não fazem sentido. Porém em muitos casos o modelo pode ser melhor ajustado sem o emprego de restrições. O melhor modelo PARAFAC para a urina utiliza 4 ou 5 fatores enquanto para o plasma 3 ou 4 fatores foram empregados.

Os *loadings* do PARAFAC para o emprego do método SOSAM são mostrados na Figura 55 para o plasma e na Figura 56 para a urina.



**Figura 55.** Perfis espectrais do plasma recuperados pelo método PARAFAC. **(A)** Excitação. **(B)** Emissão. - (S)-PRO; - (R)-PRO; - interferente 1.



**Figura 56.** Perfis espectrais da urina recuperados pelo método PARAFAC. **(A)** Excitação. **(B)** Emissão. - (S)-PRO; - (R)-PRO; - interferente 1; - interferente 2.

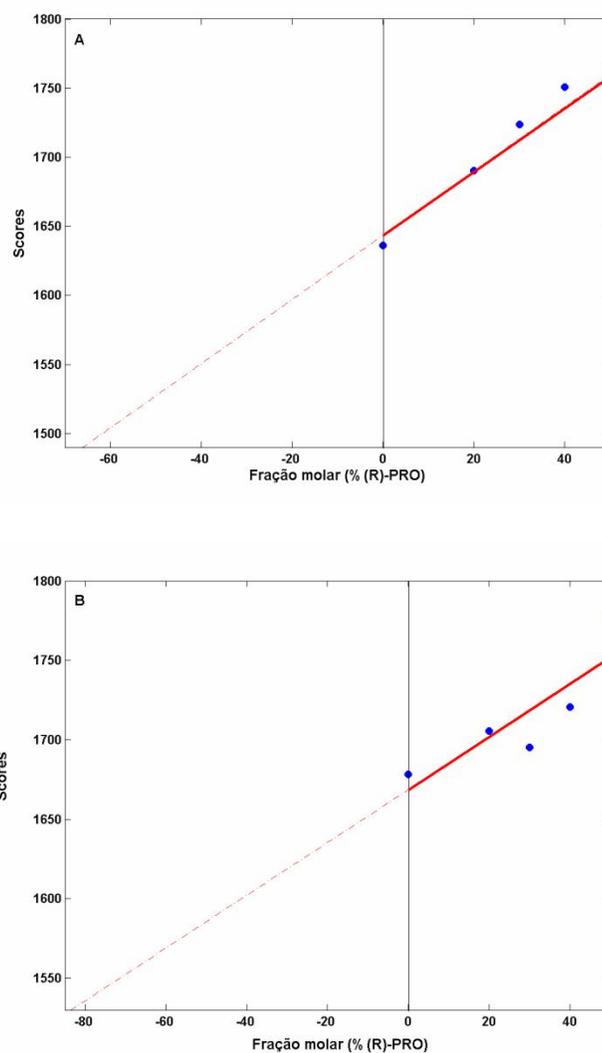
A recuperação dos perfis espectrais de emissão da urina mostra uma banda centrada em torno de 350 nm que corresponde ao (R)-PRO e pode ser observada pela linha verde da Figura 55(B). A linha azul, nesta mesma figura, corresponde ao enantiômero (S)-PRO. Estes resultados confirmam que a formação do complexo propranolol com  $\beta$ -CD deslocam a banda de emissão para maiores comprimentos de onda, isso porque o propranolol puro mostra emissão em torno de 420 nm<sup>26</sup>. Segundo Silva et al.<sup>66</sup> e Leiner et al.<sup>206</sup> o interferente 1 da urina, mostrado na Figura 56(B) como a linha vermelha, é o ácido 4-piridoxico, um metabólito da vitamina B6 enquanto o interferente 2, mostrado como a linha preta da Figura 56(B), é o indoxil-sulfato, uma toxina urêmica excretada na urina.

A Tabela 19 apresenta os resultados da quantificação do (R)-PRO a partir do método SOSAM, o valor estimado corresponde ao valor médio obtido da triplicata de cada amostra. Também são apresentados o número de fatores e o uso de restrições para o desenvolvimento dos modelos.

**Tabela 19.** Resultados SOSAM para quantificação do (R)-PRO.

Amostras	Valor esperado (% (R)-PRO)	Valor estimado (% (R)-PRO)	Erro Absoluto (% (R)-PRO)	Número de fatores	Restrições
Plasma a	80,0	83,6	- 3,6	4	Não negatividade
Plasma b	70,0	68,0	2,0	3	Sem restrições
Plasma c	50,0	49,3	0,7	4	Não negatividade
Urina a	80,0	78,0	2,0	5	Sem restrições
Urina b	70,0	63,6	6,4	5	Sem restrições
Urina c	50,0	47,0	3,0	4	Sem restrições

As curvas de calibração por adição padrão de segunda ordem foram construídas através de uma regressão linear entre os *scores* do modelo PARAFAC com os valores da fração molar de (R)-PRO. A Figura 57 mostra uma curva de calibração de segunda ordem para o plasma e a urina de um doador.



**Figura 57.** Curva de adição padrão de segunda ordem para os enantiômeros do propranolol. **(A)** plasma de um doador. **(B)** urina de um doador.

As curvas de adição de padrão apresentadas na Figura 23 mostram resultados de 63,6% e 83,6% de (R)-PRO no plasma e na urina, respectivamente. Estes resultados apresentam boa concordância com os valores esperados,

conforme a Tabela 14. Os erros absolutos mostraram valores inferiores a 4% para a quantificação dos enantiômeros no plasma e inferiores a 7% para a quantificação na urina.

## 6.6. Conclusões do capítulo

Este capítulo mostrou a possibilidade de quantificar enantiômeros do propranolol empregando espectroscopia e quimiometria.

A aplicação de calibração de primeira ordem apresentou resultados inferiores em relação à calibração de segunda ordem. Isto porque com a calibração de segunda ordem mais informações espectrais são utilizadas para a quantificação. Além disso, com o emprego da calibração de primeira ordem foi necessário a eliminação de muitas amostras anômalas para a otimização dos conjuntos de validação. Isto pode ter ocorrido justamente porque as diferenças espectrais são muito sutis.

Na quantificação dos enantiômeros através da calibração de segunda ordem o método BLLS mostrou melhores resultados que o método PARAFAC e a metodologia proposta foi validada através do cálculo de figuras de mérito. O modelo construído pelo método BLLS mostrou-se linear conforme os resultados da análise de variância. Um teste de significância foi aplicado aos resultados obtidos pelo método BLLS e os resultados obtidos por HPLC mostrando que no nível de confiança de 95% os métodos não apresentam diferença significativa. Além disso, o método BLLS é capaz de quantificar os enantiômeros do propranolol em amostras mais diluídas nas quais com a técnica HPLC não é possível a quantificação. Assim, o método proposto é uma alternativa mais rápida e sensível

que a técnica de HPLC na quantificação dos enantiômeros do propranolol no fármaco e na preparação farmacêutica.

A quantificação dos enantiômeros do propranolol em plasma sanguíneo humano e urina humana não foram possíveis a partir de um modelo global com amostras provenientes de diferentes doadores. A quantificação a partir do método de adição padrão de segunda ordem (SOSAM) foi uma alternativa rápida e prática e os erros encontrados foram satisfatórios.

## ***Capítulo VII***

## 7.1. Conclusões gerais

Pelos resultados apresentados nesta tese de doutorado foi possível verificar, em três estudos de caso, que é possível quantificar enantiômeros a partir de métodos espectroscópicos com aplicação de quimiometria.

Conclui-se que, para a quantificação dos enantiômeros do maleato de clorfeniramina, a partir de calibração de primeira ordem através do método PLS, a região do ultravioleta apresentou melhores resultados em relação à região do infravermelho próximo. A identificação de amostras anômalas permitiu otimizar os conjuntos de calibração e validação. A seleção de variáveis, através dos métodos iPLS e AG, produziu uma melhora nos resultados do modelo para a região do infravermelho próximo. Mesmo assim, os resultados foram inferiores em relação ao modelo desenvolvido na região do ultravioleta.

O método para quantificar os enantiômeros da clorfeniramina a partir de espectroscopia na região UV e calibração por PLS foi validado através do cálculo das figuras de mérito e avaliado por um teste de significância através de um teste t-pareado realizado entre os resultados obtidos pelo método proposto e os resultados obtidos a partir do método HPLC recomendado pela farmacopéia europeia. Concluiu-se que não existem diferenças significativas entre os dois métodos para 95% de confiança.

A calibração de primeira ordem para a quantificação dos enantiômeros do propranolol mostrou resultados muito inferiores em relação aos modelos de segunda ordem. Isto porque, o modelo de segunda ordem utiliza mais informações espectrais na calibração do que o modelo de primeira ordem. Além disso, os modelos de primeira ordem sofrem um sobreajuste na tentativa de explicar uma

maior variância no bloco das variáveis dependentes. Isto implica na eliminação de muitas amostras anômalas da validação, já que as diferenças espectrais são bastante sutis.

Em dois estudos de caso, para quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno e do propranolol na preparação farmacêutica, foi possível verificar que os modelos de calibração de segunda ordem BLLS fornecem melhores resultados na quantificação de enantiômeros do que os modelos PARAFAC.

Os modelos BLLS para a quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno e do propranolol foram validados através do cálculo das figuras de mérito e a análise de variância confirma a linearidade para os modelos desenvolvidos.

Um teste t-pareado avaliou os resultados para a quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno e do propranolol obtidos pelo o método proposto e os resultados obtidos por HPLC. No método BLLS foram quantificadas as frações molares dos enantiômeros do ibuprofeno e do propranolol em amostras com concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L e  $1,0 \times 10^{-6}$  mol/L, respectivamente. Com a técnica de HPLC foram quantificadas as frações molares dos enantiômeros em amostras com concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L. Mesmo assim, o teste mostra que não existem diferenças significativas entre os dois métodos para 95% de confiança. Isto implica que o método BLLS é capaz de quantificar enantiômeros do propranolol e do ibuprofeno presentes em amostras com concentrações mais diluídas nas qual a técnica HPLC não seria capaz de quantificar.

Conclui-se que os métodos propostos a partir de espectroscopia com aplicação de métodos quimiométricos são rápidos, precisos e sensíveis para quantificação dos enantiômeros da clorfeniramina, do ibuprofeno e do propranolol.

Além disso, não geram resíduos e não necessitam de derivatização do fármaco para a sua implementação. Sendo assim, estes métodos são uma alternativa às técnicas já existentes para quantificação de enantiômeros.

O método SOSAM mostrou resultados excelentes na quantificação dos enantiômeros do ibuprofeno e do propranolol no plasma sanguíneo humano e na urina humana. Estas matrizes demandaram o emprego do método de adição padrão de segunda ordem não sendo necessário a separação física entre os enantiômeros e os interferentes.

Por fim conclui-se que os resultados dos estudos de caso para os enantiômeros do ibuprofeno e do propranolol em fluidos biológicos ressaltam as vantagens da aplicação de métodos de calibração multivariada associado às técnicas espectroscópicas para a quantificação de enantiômeros, principalmente pela possibilidade de determinação dos enantiômeros em sistemas complexos na presença de interferentes desconhecidos.

A validação dos modelos multivariados é bem definida para calibrações de primeira ordem e vêm se desenvolvendo para calibrações de segunda ordem. Espera-se que os resultados e as discussões apresentadas possam contribuir para este desenvolvimento e ajude a difundir sua aplicação.

## ***Capítulo VIII***

## 8.1. Perspectivas futuras

O desenvolvimento de novas metodologias que envolvem a quimiometria e espectroscopia devem estar sempre sendo avaliadas no sentido de melhorar os resultados já obtidos e testar novos métodos quimiométricos que vem sendo propostos.

Recentemente, um novo método quimiométrico de segunda ordem chamado PARALIND<sup>207</sup> foi proposto na literatura para resolver problemas com dependência linear de fatores. Este tipo de problema ocorre, por exemplo, nos casos de adição padrão de segunda ordem e a aplicação do novo método pode superar os resultados encontrados pela aplicação do método PARAFAC.

Como perspectiva futura para as aplicações desenvolvidas nessa tese pretende-se empregar o método PARALIND para a quantificação dos enantiômeros do propranolol e do ibuprofeno em plasma sanguíneo humano e urina humana.

## ***Capítulo IX***

## 9.1. Referências

1. Bonato, P.S.; Jabor, V.A.P.; Gaitani, C.M.; Análise enantiosseletiva de fármacos: Contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. *Química Nova*, 28(4), 683-691, 2005.
2. Bermudez, J.A.Z.; Barragat, P.; Medicamentos Quirais: da dimensão química à discussão política. *Caderno de Saúde Pública*, 12(1), 47-51, 1996.
3. Oliveira, M.A.; Bermudez, J.A.Z.; Souza, A.C.M.; Talidomida no Brasil: Vigilância com responsabilidade compartilhada? *Caderno de Saúde Pública*, 15(1), 99-112, 1999.
4. <http://engineering.cua.edu/biomedical/faculty/kirtley/synergy/> acessada em 23/01/2009 às 15:10h.
5. <http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0506/talidomida/efeitos.htm> acessada em 23/01/2009 às 15:30h.
6. Perri III, A.J.; Hsu MD, S.; A review of thalidomide's history and current dermatological applications. *Dermatology Online Journal*, 9(3), 5, 2003. ou <http://dermatology-s10.cdlib.org/93/reviews/thalidomide/hsu.html> acessada em 23/01/2009 às 15:38h.
7. Lima, L.M.; Fraga, C.A.M.; Barreiro, E. J.; O renascimento de um fármaco: Talidomida. *Química Nova*, 24(5), 683-688, 2001.
8. Maier, N. M.; Franco, P.; Lindner, W.; Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *Journal of Chromatography A*, 906(1-2), 3-33, 2001.

9. Hadley M.R.; Camilleri, P.; Hutt, A.J.; Enantiospecific analysis by capillary electrophoresis: Applications in drug metabolism and pharmacokinetics. *Electrophoresis*, 21(10), 1953-1976, 2000.
10. Blaschke, G.; Chankvetadze, B.; Enantiomer separation of drugs by capillary electromigration techniques. *Journal of Chromatography A*, 875(1-2), 3-25, 2000.
11. Schurig, V.; Separation of enantiomers by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 906(1-2), 275-299, 2001.
12. Dignam, C.F.; Randall, L.A.; Blacken, R.D.; Cunningham, P.R.; Lester, S. G.; Brown, M.J.; French, S.C.; Aniagyei, S.E.; Wenzel, T.J.; Carboxymethylated cyclodextrin derivatives as chiral NMR discriminating agents. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17(8), 1199-1208, 2006.
13. The European Pharmacopoeia 6.0, 2008 (Nº 20241), Council of Europe, Strasbourg, France.
14. Gong, Q.L.; Qiao, J.L.; Du, L.M.; Dong, C.; Jin, W.J.; Recognition and simultaneous determination of ofloxacin enantiomers by synchronization – 1st derivative fluorescence spectroscopy. *Talanta*, 53(2), 359-365, 2000.
15. Agatonovic-Kustrin, A.; Alany, R.; Application of diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy combined with artificial neural networks in analysing enantiomeric purity of terbutaline sulphate bulk drug. *Analytica Chimica Acta*, 449(1-2), 157-165, 2001.
16. Busch, K.W.; Swamidoss, I.M.; Fakayode, S.O.; Busch, M.; Determination of the enantiomeric composition of guest molecules by chemometric analysis of the UV-Visible spectra of cyclodextrin guest-host complexes. *Journal of American Chemical Society*, 125(7), 1690-1691, 2003.

17. Busch, K.W.; Swamidoss, I.M.; Fakayode, S.; Busch, M.; Determining unknown enantiomeric composition of chiral compound in unknown samples for determining enantiomeric purity, involves performing partial-least-square regression of spectral data on wavelengths. Patente número: WO2005057191-A1; US2005192767-A1.
18. Busch, K. W.; Swamidoss, I. M.; Fakayode, S. O.; Busch, M. A.; Determination of the enantiomeric composition of some molecules of pharmaceutical interest by chemometric analysis of the UV spectra of cyclodextrin guest-host complexes. *Analytica Chimica Acta*, 525(1), 53-62, 2004.
19. Fakayode, S.O.; Swamidoss, I.M.; Busch, M.A.; Busch, K.W.; Determination of the composition of some molecules of pharmaceutical interest by chemometric analysis of the UV spectra of guest-host complexes formed with modified cyclodextrins. *Talanta*, 65(4), 838-845, 2005.
20. Fakayode, S.O.; Busch, M.A.; Bellert, D.J.; Busch, K.W.; Determination of the enantiomeric composition of phenylalanine samples by chemometric analysis of the fluorescence spectra of cyclodextrin guest-host complexes. *Analyst*, 130(2), 233-241, 2005.
21. Tran, C.D.; Grishko, V.I.; Oliveira, D.; Determination of enantiomeric composition of amino acids by near-infrared spectrometry through complexation with carbohydrate. *Analytical Chemistry*, 75(23), 6455-6462, 2003.
22. Tran, C. D.; Oliveira, D.; Grishko, V. I.; Determination of enantiomeric compositions of pharmaceutical products by near-infrared spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 325(2), 206-214, 2004.

23. Pirkle, W.H.; Pochapsky, T.C.; Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers. *Chemical Reviews*, 89(2), 347-362, 1989.
24. Martin Del Valle, E. M.; Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033-1046, 2004.
25. Matioli, G.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; *Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais*. 1<sup>a</sup> ed., Maringá-PR: Editora da UEM, 2000.
26. Szejtli, J.; *Cyclodextrin Technology*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1988.
27. Wedig, M.; Laug, S.; Christians, T.; Thunhorst, M.; Holzgrabe, U.; Do we know the mechanism of chiral recognition between cyclodextrin and analyte? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27(3-4), 531-540, 2002.
28. Evans, C.H.; Partyka, M.; Stam, J.V.; Naphthalene complexation by  $\beta$ -cyclodextrin: Influence of added short chain branched and linear alcohols. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 38(4), 381-396, 2000.
29. Muñoz de la Pena, A.; Ndou, T.T.; Zung, J.B.; Greene, K.L.; Live, D.H.; Warner, I.M.; Alcohol size as a factor in the ternary complexes formed with pyrene and  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of the American Chemical Society*, 113(5), 1572-1577, 1991.
30. Zung, J.B.; Muñoz de la Pena, A.; Ndou, T.T.; Warner, I.M.; Influence of alcohol addition on the  $\gamma$ -CD:pyrene complex. *Journal of Physical Chemistry*, 95(17), 6701-6706, 1991.

31. Schuette, J.M.; Will, A.Y.; Agbaria, R.A.; Warner, I.M.; Fluorescence characterization of the cyclodextrin/pyrene complex interaction with chiral alcohols and diols. *Applied Spectroscopy*, 48(5), 581-586, 1994.
32. Husain, N.; Anigbogu, V.C.; Cohen, M.R.; Warner, I.M.; Reversed-phase liquid chromatographic measurement of the influence of a co-modifier functional group on the retention behavior of the  $\beta$ -cyclodextrin-pyrene complex. *Journal of Chromatography A*, 635(2), 211-219, 1993.
33. Glenn, A.Y.; Fortier, C.A.; Jack, F.I.; Zhu, X.; Warner, I.M.; Chiral recognition of propranolol with  $\beta$ -cyclodextrin in the presence of 1- and 2-butanol. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 51(1-2), 87-91, 2005.
34. Martens, H.; Naes, T.; *Multivariate calibration*. New York: Wiley, 1996.
35. Beebe, K.R.; Kowalski, B.R.; An Introduction to multivariate calibration and analysis, *Analytical Chemistry*, 59(17), A1007-A1017, 1987.
36. Vandeginste, B.G.M.; Massart, D.L.; Buydens, L.M.C.; Jing, S.; Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J.; *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*. Amsterdam: Elsevier, 1998.
37. Beebe, K.R.; Pell, R.J.; Seasholtz, M.B.; *Chemometrics: A practical guide*. New York: Wiley, 1998.
38. Brereton, R.G.; Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry, *Analyst*. 125(11), 2125-2154, 2000.
39. Otto, M.; *Chemometrics*. Weinheim: Wiley, 1999.
40. Geladi, P.; Kowalski, B.R.; Partial least square regression: a tutorial, *Analytica Chimica Acta*. 185, 1-17, 1986.

41. Annual Book of ASTM Standards. Standards practices for infrared, multivariate, quantitative analysis, E1655, vol 03.06. ASTM International, West Conshohocken, Pennsylvania, USA, 2000.
42. Costa Filho, P.A.; Poppi, R.J.; Aplicação de algoritmos genéticos na seleção de variáveis em espectroscopia no infravermelho médio. Determinação simultânea de glicose, maltose e frutose. *Quimica Nova*, 25(1), 46-52, 2002.
43. Oliveira, F.C.; Souza, A.T.P.C.; Dias, J.A.; Dias, S.C.L.; Rubim, J.C.; A escolha da faixa espectral no uso combinado de métodos espectroscópicos e quimiométricos, *Química Nova*. 27(2), 218-225, 2004.
44. Osborne, S.D.; Jordan, R.B.; Künnemeyer, R. Method of wavelength selection for partial least square, *Analyst*. 122(12), 1531-1537, 1997.
45. Centner, V.; Massart, D.; Elimination of uninformative variables for multivariate calibration, *Analytical Chemistry*, 68(21), 3851-3858, 1996.
46. Norgaard, L.; Saudland, A.; Wagner, J.; Nielsen, J.P.; Munck, L; Engelsen, S. B.; Interval partial least-square regression (iPLS): A comparative chemometric study with an example from near-infrared spectroscopy, *Applied Spectroscopy*. 54(3), 413-419, 2000.
47. Cartwright, H.M.; Applications of artificial intelligence in chemistry. Oxford Science Publications: New York, 1995.
48. Costa Filho, P.A.; Poppi, R.J.; Algoritmo genético em química. *Quimica Nova*, 22(3), 405-411, 1999.
49. Wise, B.M.; Gallagher, D.A.; Bro, R.; Shaver, J.M.; Winding, W.; Koch, R.S.; PLS Toolbox Version 4.0 for use with MATLAB, Eigenvector Research Inc: Wenatchee, 2006.

50. Lucasius, C.B.; Kateman, G.; Understanding and using genetic algorithms. Part 1. Concepts, properties and context. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 19(1), 1-33, 1993.
51. Holland, J.H.; Genetic algorithms. *Scientific American*, 267(1), 66-72, 1992.
52. Li, T.H.; Lucasius, C.B.; Kateman, G.; Optimization of calibration data with the dynamic genetic algorithm. *Analytica Chimica Acta*, 268(1), 123-134, 1992.
53. Shukla, K.K.; Neuro-genetic prediction of software development effort. *Information and Software Technology*, 42(10), 701-713, 2000.
54. Silva, G.A.; Augusto, F.; Poppi, R.J.; Simultaneous optimization by neuro-genetic approach of a multiresidue method for determination of pesticides in *Passiflora alata* infuses using headspace solid phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1138(1-2), 251-261, 2007.
55. Booksh, K.S.; Kowalski, B.R.; Theory in analytical chemistry. *Analytical Chemistry*, 66(15), 782A-791A, 1994.
56. Bro, R.; Review on multiway analysis in chemistry – 2000 – 2005. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36(3-4), 279-293, 2006.
57. Bro, R.; PARAFAC: Tutorial and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 38(2), 149-171, 1997.
58. Linder, M.; Sundberg, R.; Second-order calibration: bilinear least squares regression and a simple alternative. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42(1-2), 159-178, 1998.

59. Smilde, A.K.; Doornbos, D.A.; 3-way methods for the calibration of chromatographic systems – comparing PARAFAC and 3-way PLS. *Journal of Chemometrics*, 5(4), 345-360, 1991.
60. Linder, M.; Sundberg, R.; Precision of prediction in second-order calibration, with focus on bilinear regression methods. *Journal of Chemometrics*, 16(1), 12-27, 2002.
61. Faber, N.K.M.; Ferré, J.; Boqué, R.; Kalivas, J.H.; Second-order bilinear calibration: the effects of vectorising the data matrices of the calibration set. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 63(2), 107-116, 2002.
62. Harris, D.C.; *Quantitative Chemical Analysis*, New York: WH Freeman and Company, 1999.
63. Saxberg, B.E.H.; Kowalski, B.R.; Generalized standard addition method, *Analytical Chemistry*, 51(7), 1031-1038, 1979.
64. Booksh, K.; Henshaw, J.M.; Burgess, L.W.; Kowalski, B.R.; A 2ND-Order standard addition method with application to calibration of a kinetics-spectroscopic sensor for quantitation of trichloroethylene. *Journal of Chemometrics*, 9(4), 263-282, 1995.
65. Sanchez, E.; Kowalski, B.R.; Tensorial resolution: A direct trilinear decomposition. *Journal of Chemometrics*, 4(1), 29-45, 1990.
66. Silva, L.C.; Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; Sena, M.M.; Direct determination of propranolol in urine by spectrofluorimetry with the aid of second order advantage. *Analytica Chimica Acta*, 595(1-2), 282-288, 2007.
67. Herrero, A.; Zamponi, S.; Marassi, R.; Conti, P.; Ortiz, M.C.; Sarabia, L.A.; Determination of the capability of detection of a hyphenated method:

- application to spectroelectrochemistry. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 61(1-2), 63-74, 2002.
68. Sinhá, A.E.; Fraga, C.G.; Prazen, B.J.; Synovec, R.E.; Trilinear chemometric analysis of two-dimensional comprehensive gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry data. *Journal of Chromatography A*, 1027(1-2), 269-277, 2004.
69. Arancibia, J.A.; Olivieri, A.C.; Escandar, G.M.; First- and second-order multivariate calibration applied to biological samples: determination of anti-inflammatories in serum and urine, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374(3), 451-459, 2002.
70. Muñoz de la Peña, A.; Mora Díez, N.; Bohovo Gil, D.; Olivieri, A.C.; Escandar, G.M.; Simultaneous determination of flufenamic and meclofenamic acids in human urine samples by second-order multivariate parallel factor analysis (PARAFAC) calibration of micellar-enhanced excitation-emission fluorescence data, *Analytica Chimica Acta*, 569(1-2), 250-259, 2006.
71. Miller, J.C.; Miller, J.N.; *Statistics for analytical chemistry*. 3rd edition, England: Ellis Horwood Limited, 1993.
72. Barros Neto, B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E.; *Como fazer experimentos*. 2<sup>a</sup> ed., Campinas-SP: Editora da UNICAMP, 2003.
73. Ribani, M.; Bottoli, C.B.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C.; *Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos*. *Química Nova*, 27(5), 771-780, 2004.
74. Eurachem/Citac – Work Group, *Guide of quality in analytical chemistry – An aid to accreditation*. 2 ed. 2002.

75. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº899, de 29/05/2003.
76. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DQO-CGRE-008, 2003.
77. United States Pharmacopeia Convention; US Pharmacopeia 24. Validation of compendial methods <1225>, Rockville, 1999.
78. International Conference on Harmonisation (ICH); Text on validation analytical procedures, Q2A. 1995.
79. International Conference on Harmonisation (ICH); Validation of analytical procedures: Methodology, Q2B. 1997.
80. International Standard Organization (ISO); General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. (ISO/IEC 17025), 1995.
81. Pharmaceutical Analytical Sciences Group (PASG). Guidelines for the development and validation of near infrared (NIR) spectroscopic methods. <http://www.pasg.org.uk>, acessada em outubro 2006.
82. Eurachem/Citac – Work Group. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2 ed. 2000.
83. Leite, F.; Validação em análise química. 4ª. Ed., Campinas-SP: Editora Átomo, 2002.
84. Danzer, K.; Otto, M.; Currie, L.; Guidelines for calibration in analytical chemistry part 2. Multispecies calibration – (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, 76(6) 1215-1225, 2004.

85. Barros Neto, B.; Pimentel, M.F.; Araújo, M.C.U.; Recomendações para calibração em química analítica – Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (Calibração univariada). *Química Nova*, 25(5), 856-865, 2002.
86. Currie, L.A.; Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities: (IUPAC Recommendations 1995). *Analytica Chimica Acta*, 391(2), 105-126, 1999.
87. Braga, J.W.B.; Poppi, R.J.; Figures of merit for the determination of the polymorphic purity of carbamazepine by infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(8), 2124-2134, 2004.
88. Braga, J.W.B.; Poppi, R.J.; Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina. *Química Nova*, 27(6), 1004-1011, 2004.
89. Valderrama, P.; Braga, J.W.B.; Poppi, R. J.; Validation of multivariate calibration models in the determination of sugar cane quality parameters by near infrared spectroscopy. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(2), 259-266, 2007.
90. Valderrama, P.; Braga, J.W.B.; Poppi, R. J.; Variable selection, outlier detection, and figures of merit in a partial least-squares regression multivariate calibration model. A case study for the determination of quality parameters in the alcohol industry by near-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8331-8338, 2007.
91. Saurina, J.; Leal, C.; Compañó, R., Granados, M.; Dolors Prat, M.; Tauler, R.; Estimation of figures of merit using univariate statistics for quantitative second-order multivariate curve resolution. *Analytica Chimica Acta*, 432(2), 241-251, 2001.

92. Rodríguez-Cuesta, M.J.; Boqué, R.; Rius, F.X.; Picón Zamora, D.; Martínez Galera, M.; Garrido Frenich, A.; Determination of carbendazim, fuberidazole and thiabendazole by three-dimensional excitation-emission matrix fluorescence and parallel factor analysis. *Analytica Chimica Acta*, 491(1), 47-56, 2003.
93. Rodríguez-Cuesta, M.J.; Boqué, R.; Rius, F.X.; Martínez Vidal, J.L.; Garrido Frenich, A.; Development and validation of a method for determining pesticides in groundwater from complex overlapped HPLC signals and multivariate curve resolution. *Chemometrics and Intelligent Laboratory systems*, 77(1-2), 251-260, 2005.
94. Haimovich, A.; Orselli, R.; Escandar, G.M.; Olivieri, A.C.; Spectroscopic bilinear least-squares methods exploiting the second-order advantage. Theoretical and experimental study concerning accuracy, sensitivity and prediction error. *Chemometrics and Intelligent Laboratory systems*, 80(1), 99-108, 2006.
95. Olivieri, A.C.; Faber, N.K.M.; Ferré, J.; Boqué, R.; Kalivas, J.H.; Mark, H.; Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration. *Pure and Applied Chemistry*, 78(3), 633-661, 2006.
96. Braga, J.W.B.; Bottoli, C.B.G.; Jardim, I.C.S.F.; Goicoechea, H.C.; Olivieri, A.C.; Poppi, R. J.; Determination of pesticides and metabolites in wine by high performance liquid chromatography and second-order calibration methods. *Journal of Chromatography A*, 1148(2), 200-210, 2007.
97. Carneiro, R.L.; Braga, J.W.B.; Bottoli, C.B.G.; Poppi, R.J.; Application of genetic algorithm for selection of variables for the BLLS method applied to determination of pesticides and metabolites in wine. *Analytica Chimica Acta*, 595(1-2), 51-58, 2007.

98. Escandar, G.M.; Faber, N.K.M.; Goicoechea, H.C.; Muñoz de la Pena, A.; Olivieri, A.C.; Poppi, R.J.; Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(7), 752-765, 2007.
99. Vessman, J.; Stefan, R.I.; Staden, J.F.V.; Danzer, K.; Lindner, W.; Burns, D.T.; Fajgelj, A.; Miller, H.; Selectivity in analytical chemistry – (IUPAC Recommendations 2001). *Pure and Applied Chemistry*, 73(8), 1381-1386, 2001.
100. Thompson, M.; Ellison, S.L.R.; Wood, R.; Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis – (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 835-855, 2002.
101. Currie, L.A.; Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure and Applied Chemistry*, 67(10), 1699-1723, 1995.
102. Lorber, A.; Error propagation and figures of merit for quantification by solving matrix equations. *Analytical Chemistry*, 58(6), 1167-1172, 1986.
103. Brown, C.D.; Discordance between net analyte signal theory and practical multivariate calibration. *Analytical Chemistry*, 76(15), 4364-4373, 2004.
104. Morgan, D.R.; Spectral absorption pattern detection and estimation. 1. *Analytical Techniques. Applied Spectroscopy*, 31(5), 404-415, 1977.
105. Lorber, A.; Faber, K.; Kowalski, B.R.; Net analyte signal calculation in multivariate calibration. *Analytical Chemistry*, 69(8), 1620-1626, 1997.

106. Xu, L.; Schechter, I.; A calibration method free of optimism factor number selection for automated multivariate analysis. Experimental and theoretical study. *Analytical Chemistry*, 69(18) 3722-3730, 1997.
107. Wentzell, P.D.; Andrews, D.T.; Kowalski, B.R.; Maximum likelihood multivariate calibration. *Analytical Chemistry*, 69(13), 2299-2311, 1997.
108. Faber, N.M.; Efficient computation of net analyte signal vector in inverse multivariate calibration models. *Analytical Chemistry*, 70(23), 5108-5110, 1998.
109. Ferré, J.; Brown, S.D.; Rius, X.; Improved calculation of the net analyte signal in inverse multivariate calibration. *Journal of Chemometrics*, 15(6), 537-553, 2001.
110. Bro, R.; Andersen, C.M.; Theory of net analyte signal vectors in inverse regression. *Journal of Chemometrics*, 17(12), 646-652, 2003.
111. Goicoechea, H.C.; Olivieri, A.C.; A comparison of orthogonal signal correction and net analyte preprocessing methods. Theoretical and experimental study. *Chemometrics and Intelligent laboratory Systems*, 56(2), 73-81, 2001.
112. Faber, N.M.; Exact presentation of multivariate calibration model as univariate calibration graph. *Chemometrics and Intelligent laboratory Systems*, 50(1), 107-114, 2000.
113. Faber, N.K.M.; Mean centering and computation of scalar net analyte signal in multivariate calibration. *Journal of Chemometrics*, 12(6), 405-409, 1998.
114. Ferré, J.; Faber, N.K.M.; Net analyte signal calculation for multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent laboratory Systems*, 69(1-2), 123-136, 2003.

115. Sena, M.M.; Chaudhry, Z.F.; Collins, C.H.; Poppi, R.J.; Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(4), 743-749, 2004.
116. Ho, C.N.; Christian, D.; Davidson, E.R.; Application of the method of rank annihilation to fluorescent multicomponent mixtures of polynuclear aromatic-hydrocarbons. *Analytical Chemistry*, 52(7), 1071-1079, 1980.
117. Wang, Y. Borgen, O.S.; Kowalski, B.R.; Advances in second-order calibration. *Journal of Chemometrics*, 7(2), 117-130, 1993.
118. Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; Determination of doxorubicin in human plasma by excitation-emission matrix fluorescence and multi-way analysis. *Analytica Chimica Acta*, 493(1), 69-81, 2003.
119. Bro, R.; Multiway calibration. Multilinear PLS. *Journal of Chemometrics*, 10(1), 47-61, 1996.
120. Messick, N.J.; Kalivas, J.H.; Lang, P.M.; Selectivity and related measures for nth order data. *Analytical Chemistry*, 68(9), 1572-1579, 1996.
121. Riu, J.; Rius, F.X.; Assessing the accuracy of analytical methods using linear regression with errors in both axes. *Analytical Chemistry*, 68(11), 1851-1857, 1996.
122. Faber, N.M.; Ferré, J.; Boqué, R.; Kalivas, J.H.; Second-order bilinear calibration: the effects of vectorising the data matrices of the calibration set. *Chemometrics and Intelligent laboratory Systems*, 63(2), 107-116, 2002.

123. Olivieri, A.C.; Faber, N.K.M.; A closed-form expression for computing the sensitivity in second-order bilinear calibration. *Journal of Chemometrics*, 19(11-12), 583-592, 2005.
124. Rodríguez, L.C.; Campanã, A.M.G.; Linares, C.J.; Ceba, M.R.; Estimation of performance-characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Analytical Letters*, 26(6), 1243-1258, 1993.
125. Goicoechea, H.C.; Olivieri, A.C.; Enhanced synchronous spectrofluorometric determination of tetracycline in blood serum by chemometric analysis. Comparison of partial least-squares and hybrid linear analysis calibrations. *Analytical Chemistry*, 71(19), 4361-4368, 1999.
126. Muñoz de la Peña, A.; Espinosa-Mansilla, A.; Acedo Valenzuela, M.I.; Goicoechea, H.C.; Olivieri, A.C.; Comparative study of net analyte signal-based methods and partial least squares for the simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid by stopped-flow kinetic analysis. *Analytica Chimica Acta*, 463(1), 75-88, 2002.
127. Muñoz de la Peña, A.; Espinosa Mansilla, A.; Gómez, D.G.; Olivieri, A.C.; Goicoechea, H.C.; Interference-free analysis using three-way fluorescence data and the parallel factor model. Determination of fluoroquinolone antibiotics in human serum. *Analytical Chemistry*, 75(11), 2640-2646, 2003.
128. Olivieri, A.C.; Computing sensitivity and selectivity in parallel factor analysis and related multiway techniques: The need for further developments in net analyte signal theory. *Analytical Chemistry*, 77(15), 4936-4946, 2005.
129. Laasonen, M.; Harmia-Pulkkinen, T.; Simard, C.; Rasanen, M.; Vuorela, H.; Development and validation of a near-infrared method for the quantification of caffeine in intact single tablets. *Analytical Chemistry*, 75(4), 754-760, 2003.

130. Moffat, A.C.; Trafford, A.D.; Jee, R.D.; Graham, P.; Meeting the International Conference on Harmonisation's guidelines on validation of analytical procedures: Quantification as exemplified by a near-infrared reflectance assay of paracetamol in intact tablets. *Analyst*, 125(7), 1341-1351, 2000.
131. Boqué, R.; Rius, F.X.; Multivariate detection limits estimators. *Chemometrics and Intelligent laboratory Systems*, 32(1), 11-23, 1996.
132. Fernandez, J.A.; Jin, L.; Wahl, F.; Faber, N.M.; Massart, D.L.; Estimation of partial least squares regression prediction uncertainty when the reference values carry a sizeable measurement error. *Chemometrics and Intelligent laboratory Systems*, 65(2), 281-291, 2003.
133. Hoy, M.; Steen, K.; Martens, H.; Review of partial least squares regression prediction error in Unscrambler. *Chemometrics and Intelligent laboratory Systems*, 44(1-2), 123-133, 1998.
134. De Vries, S.; Ter Braak, C.J.F.; Prediction error in partial least squares regression: A critique on the deviation used in The Unscrambler. *Chemometrics and Intelligent laboratory Systems*, 30(2), 239-245, 1995.
135. Faber, K.; Kowalski, B.R.; Prediction error in least squares regression: Further critique on the deviation used in The Unscrambler. *Chemometrics and Intelligent laboratory Systems*, 34(2), 283-292, 1996.
136. Faber, K.; Kowalski, B.R.; Propagation of measurement errors for the validation of predictions obtained by principal component regression and partial least squares. *Journal of Chemometrics*, 11(3), 181-238, 1997.
137. Faber, N.M.; Comparison of two recently proposed expressions for partial least squares regression prediction error. *Chemometrics and Intelligent laboratory Systems*, 52(2), 123-134, 2000.

138. Faber, N.M.; Bro, R.; Standard error of prediction for multiway PLS 1. Background and a simulation study. *Chemometrics and Intelligent laboratory Systems* 61(1-2), 113-149, 2002.
139. Van der Voet, H.; Pseudo-degrees of freedom for complex predictive models: the example of partial least squares. *Journal of Chemometrics*, 13(3-4), 195-208, 1999.
140. Jarque, C.M.; Bera, A.K.; A test for normality of observations and regression residuals. *International Statistical Review*, 55(2), 163-172, 1987.
141. Bonate, P.L.; Approximate confidence-intervals in calibration using the bootstrap. *Analytical Chemistry*, 65(10), 1367-1372, 1993.
142. Wehrens, R.; Putter, H.; Buydens, L.M.C.; The bootstrap: a tutorial. *Chemometrics and Intelligent laboratory Systems*, 54(1), 35-52, 2000.
143. Wehrens, R.; Van Der Linden, W.E.; Bootstrapping principal component regression models. *Journal of Chemometrics*, 11(2), 157-171, 1997.
144. Olivieri, A.C.; Faber, N.K.M.; Standard error of prediction in parallel factor analysis of three-way data. *Chemometrics and Intelligent laboratory Systems*, 70(1-2), 75-82, 2004.
145. Kiers, H.A.L.; Bootstrap confidence intervals for three-way methods. *Journal of Chemometrics*, 18(1), 22-36, 2004.
146. <http://bulario.bvs.br/index.php?action=search.2004032319332233060740000172&search=polaramine> acessada em 04/06/08 às 17:17h.
147. Najjar, T.A.; Al-Alsheikh, O.A.; Al-Dhawailie, A.A.; Shereif, A.; Bioequivalence and pharmacokinetics of chlorpheneramine in healthy human volunteers.

- International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 33(11), 619-621, 1995.
148. Hiep, B.T.; Fernandez, C.; Tod, M.; Banide, H.; Thuillier, A.; Lacour, B.; Farinotti, R.; Gimenez, F.; Intestinal absorption and metabolism of chlorpheniramine enantiomers in rat. *Chirality*, 13(4), 207-213, 2001.
149. Miyazaki, H.; Abuki, H.; Mass fragmentographic determination of d- and l-chlorpheniramine with aid of the stable isotope technique. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 24(10), 2572-2574, 1976.
150. Koch, K.M.; O'Connor-Semmes, L.; Davis, I.M.; Yin Yin.; Stereoselective pharmacokinetics of chlorpheniramine and the effect of ranitidine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(9), 1097-1100, 1998.
151. Hiep, B.T.; Fernandez, C.; Khanh, V.; Hung, N.K.; Thuillier, A.; Farinotti, R.; Arnaud, P.; Gimenez, F.; Stereospecific versus non stereospecific assessments for the bioequivalence of two formulations of chlorpheniramine. *Chirality*, 12(8), 599-605, 2000.
152. Fujiwara, K.; Iwamoto, K.; Kawai, S.; Sakamoto, T.; Behavior of chlorpheniramine in vivo after administration of d-chlorpheniramine and l-chlorpheniramine maleate. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 109(1), 59-64, 1989.
153. Sakurai, E.; Yamasaki, S.; Iisuka, Y.; Hikichi, N.; Niwa, H.; The optical resolution of racemic chlorpheniramine and its stereoselective pharmacokinetics in rat plasma. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 44(1), 44-47, 1992.
154. The European Pharmacopoeia III, Suppl. 2002 (Nº 1196), Council of Europe, Strasbourg, France.

155. Hiep, B.T.; Khanh, V.; Hung, N.K.; Thuillier, A.; Gimenez, F.; Determination of the enantiomers of chlorpheniramine and its main monodesmethylmetabolite in urine using achiral-chiral liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 707(1-2), 235-240, 1998.
156. Schuster, A.; Bernhardt, G.; Eibler, E.; Buschauer, A.; Hesselink, W.; Chiral separation of 3-phenyl-3-(2-pyridyl)propylamines, and analogous guanidines and guanidine-N-carboxylic acid esters with high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *Journal of chromatography A*, 793(1), 77-90, 1998.
157. Koppenhoefer, B.; Epperlein, U.; Christian, B.; Lin, B.; Ji, Y.; Chen, Y.; Separation of enantiomers of drugs by capillary electrophoresis III.  $\beta$ -cyclodextrin as chiral solvating agent. *Journal of Chromatography A*, 735(1-2), 333-343, 1996.
158. Wei, Y.; Li, J.; Zhu, C.; Hao, A.; Zhao, M.; 2-O-(2-Hydroxybutyl)- $\beta$ -cyclodextrin as a chiral selector for the capillary electrophoretic separation of chiral drugs. *Analytical Sciences*, 21(8), 959-962, 2005.
159. Van Eeckhaut, A.V.; Detaevernier, M.R.; Michotte, Y.; Development of a validated capillary electrophoresis method for enantiomeric purity testing of dexchlorpheniramine maleate. *Journal of Chromatography A*, 958(1-2), 291-297, 2002.
160. Casy, A.F.; Drake, A.F.; Ganellin, C.R.; Mercer, A.D.; Upton, C.; Stereochemical studies of chiral H-1 antagonists of histamine: The resolution, chiral analysis, and biological evaluation of four antipodal pairs. *Chirality*, 4(6), 356-366, 1992.
161. The European Pharmacopoeia 6.0,2008 (Nº 20241), Council of Europe, Strasbourg, France.

162. Bossu, E.; Cotichini, V.; Gostoli, G.; Farina, A.; Determination of optical purity by nonenantioselective LC using CD detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26(5-6), 837-848, 2001.
163. El-Gindy, A.; Emara, S.; Mesbah M.K.; Hadad, G.M.; Liquid chromatography and chemometric-assisted spectrophotometric methods for the analysis of two multicomponent mixtures containing cough suppressant drugs. *Journal of AOAC international*, 88(4), 1069-1080, 2005.
164. Hadad, G.M.; El-Gindy, A.; Mahmoud, M.M.; Development and validation of chemometrics-assisted spectrophotometry and liquid chromatography methods for the simultaneous determination of the active ingredients in two multicomponent mixtures containing chlorpheniramine maleate and phenylpropanolamine hydrochloride. *Journal of AOAC international*, 90(4), 957-970, 2007.
165. El-Gindy, A.; Emara, S.; Mesbah, M.K.; Hadad, G.M.; New validated methods for the simultaneous determination of two multicomponent mixtures containing guaiphenesin in syrup by HPLC and chemometrics-assisted UV-spectroscopy. *Analytical Letters*, 39(14), 2699-2723, 2006.
166. Kennard, R. W.; Stone, L. A.; Computer aided design of experiments, *Technometrics*. 11(1), 137-148, 1969.
167. Oliveira, A.R.M.; Cesarino, E.J.; Bonato, P.S.; Solid-phase microextraction and chiral HPLC analysis of ibuprofen in urine. *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 818(12), 285-291, 2005.
168. Augusti, D.V.; Augusti, R.; Determination of the enantiomeric composition of ibuprofen solutions via a rapid and sensitive mass spectrometry method. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16(10), 1881-1885, 2005.

169. Simó, C.; Gallardo, A.; Parejo, C.; San Román, J.; Narbas, C.; Cifuentes, A.; Monitoring ibuprofen enantiomers released from polymeric systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(1-2), 75-82, 2002.
170. Hutt, A.J.; Caldwell, J.; The metabolic chiral inversion of 2-arylpropionic acids – a novel route with pharmacological consequences. *Journal of Pharmaceutical and Pharmacology*, 35(11), 693-704, 1983.
171. Mills, R.F.N.; Adams, S.S.; Cliffe, E.E.; Dickinson, W.; Nicholson, J.S.; The metabolism of ibuprofen. *Xenobiotica*, 3(9), 589-598, 1973.
172. Agatonovic-Kustrin, S.; Beresford, R.; Razzak, M.; Determination of enantiomeric composition of ibuprofen in solid state mixtures of the two by DRIFT spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 417(1), 31-39, 2000.
173. Macià, A.; Borrull, F.; Calull, M.; Aguilar, C.; Capillary electrophoresis for the analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(2), 133-153, 2007.
174. Bhushan, R., Martens, J.; Resolution of enantiomers of ibuprofen by liquid chromatography: A review. *Biomedical Chromatography*, 12(6), 309-316, 1998.
175. Tian, Y.; Zhong, C.; Fu, E.; Zeng, Z.; Novel  $\beta$ -cyclodextrin derivative functionalized polymethacrylate-based monolithic columns for enantioselective separation of ibuprofen and naproxen enantiomers in capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216(6), 1000-1007, 2009.
176. Hergert, L.A.; Escandar, G.M.; Spectrofluorimetric study of the  $\beta$ -cyclodextrin-ibuprofen complex and determination of ibuprofen in pharmaceutical preparations and serum. *Talanta*, 60(2-3), 235-246, 2003.

177. Ahn, H.; Shiu, G.K.; Trafton, W.F.; Doyle, T.D.; Resolution of the enantiomers of ibuprofen; comparison study of diastereomeric method and chiral stationary phase method. *Journal of Chromatography B*, 653(2), 163-169, 1994.
178. Canaparo, R.; Muntoni, E.; Zara, G.P.; Pepa, C.D.; Berno, E.; Costa, M.; Eandi, M.; Determination of ibuprofen in human plasma by high-performance liquid chromatography: validation and application in pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 14(4), 219-226, 2000.
179. Ducret, A.; Trani, M.; Pepin, P.; Lortie, R.; Chiral high performance liquid chromatography resolution of ibuprofen esters. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16(7), 1225-1231, 1998.
180. Tan, S.C.; Jackson, S.H.D.; Swift, C.G.; Hutt, A.J.; Enantiospecific analysis of ibuprofen by high-performance liquid chromatography: determination of free and total drug enantiomer concentrations in serum and urine. *Chromatographia*, 46(1-2), 23-32, 1997.
181. Lau, Y.Y.; Determination of ibuprofen enantiomers in human plasma by derivatization and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of liquid chromatography & Related Technologies*, 19(13), 2143-2153, 1996.
182. Pehourcq, F.; Lagrange, F.; Labat, L.; Bannwarth, B.; Simultaneous measurement of flurbiprofen, ibuprofen, and ketoprofen enantiomer concentration in plasma using L-leucinamide as the chiral coupling component. *Journal of liquid chromatography & Related Technologies* 18(20), 3969-3979, 1995.
183. Van Overbeke, A.; Baeyens, W.; Van Den Bossche, W.; Dewaele, C.; Enantiomeric separation of amide derivatives of some 2-arylpropionic acids by

- HPLC on a cellulose-based chiral stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 12(7), 911-916, 1994.
184. Lemko, C.H.; Caille, G.; Foster, R.T.; Stereospecific high-performance liquid-chromatographic assay of ibuprofen – improved sensitivity and sample processing efficiency. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 619(2), 330-335, 1993.
185. Nicoll-Griffith, D.; Scartozzi, M.; Chiem, N.; Automated derivatization and high-performance liquid chromatographic analysis of ibuprofen enantiomers. *Journal of Chromatography A*, 653(2), 253-259, 1993.
186. Wright, M.R.; Satari, S.; Brocks, D.R.; Jamali, F.; Improved high-performance liquid-chromatographic assay-method for the enantiomers of ibuprofen. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 583(2), 259-265, 1992.
187. Rudy, A.C.; Anliker, K.S.; Hall, S.D.; High-performance liquid-chromatographic determination of the stereoisomeric metabolites of ibuprofen. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 528(2), 395-405, 1990.
188. Mehvar, R.; Jamali, F.; Pasutto, F.M.; Liquid-chromatographic assay of ibuprofen enantiomers in plasma. *Clinical Chemistry*, 34(3), 493-496, 1988.
189. Avgerinos, A.; Hutt, A.J.; Determination of the enantiomeric composition of ibuprofen in human-plasma by high-performance liquid-chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 415(1), 75-83, 1987.

190. Fournel, S.; Caldweel, J.; The metabolic chiral inversion of 2-phenylpropionic acid in rat, mouse and rabbit. *Biochemical Pharmacology*, 35(23), 4153-4159, 1986.
191. Lee, E.J.D.; Williams, K.M.; Graham, G.G.; Day, R.O.; Chamopion, G.D.; Liquid-chromatographic determination and plasma-concentration profile of optical isomers of ibuprofen in humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(11), 1542-1544, 1984.
192. Maître, J.M.; Boss, G.; Testa, B.; High-performance liquid-chromatographic separation of the enantiomers of anti-inflammatory 2-arylpropionates-suitability of the method for in vitro metabolic studies. *Journal of Chromatography A*, 299(2), 397-403, 1984.
193. Kaiser, D.G.; Vangiessen, G.J.; Reischer, R.J.; Wechter, W.J.; Isomeric inversion of ibuprofen (R)-enantiomer in humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(2), 269-273, 1976.
194. Oliveira, A.R.M.; Cesarino, E.J.; Bonato, P.S.; Solid-phase microextraction and chiral HPLC analysis of ibuprofen in urine. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 818(2), 285-291, 2005.
195. Tran C.D.; Oliveira, D.; Grishko, V.I.; Determination of enantiomeric compositions of pharmaceutical products by near-infrared spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 325(2), 206-214, 2004.
196. <http://bulario.bvs.br/index.php?action=search.2004032319332233060740000172&search=propranolol> acessada em 31/01/06 às 14:00h.

197. Ruiz, T.P.; Martinez-Lozano, C.; Tomás, V.; Carpena, J.; Simultaneous determination of propranolol and pindolol by synchronous spectrofluorimetry. *Talanta*, 45(5), 969-976, 1998.
198. Egginger, G.; Lindner, W.; Brunner, G.; Stoschitzky, K.; Direct enantioselective determination of (R)- and (S) propranolol in human plasma. Application to pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 12(12), 1537-1545, 1994.
199. Assi, K.A.; Clark, B.J.; Altria, K.D.; Enantiomeric purity determination of propranolol by capillary electrophoresis using dual cyclodextrins and a polyacrylamide-coated capillary. *Electrophoresis*, 20(13), 2723-2725, 1999.
200. Armstrong, D. W.; Ward, T. J.; Armstrong, R. D.; Beesley, T. E.; Separation of drug stereoisomers by the formation of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. *Science*, 232(4754), 1132-1135, 1986.
201. Shao, G.; Goto, J.; Nambara, T.; Separation and determination of propranolol enantiomers in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of liquid chromatography*, 14(4), 753-763, 1991.
202. Prakash, C.; Koshakji, R.P.; Wood, A.J.J.; Blair, I.A.; Simultaneous determination of propranolol enantiomers in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(9), 771-775, 1989.
203. Pharm-Huy, C.; Radenen, B.; Sahui-Gnassi, A.; Claude, J.; High-performance liquid chromatographic determination of (S)- and (R)-propranolol in human plasma and urine with a chiral  $\beta$ -cyclodextrin bonded phase. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 665(1), 125-132, 1995.

204. [www.medicalook.com/reviews/Persantine.html](http://www.medicalook.com/reviews/Persantine.html) acessada em 28/01/2008 às 14:00h.
205. <http://www.drugs.com/pro/amiloride.html> acessada em 27/02/2008 às 14:38h.
206. Leiner, M.J.P.; Hubmann, M.R.; Wolfbeis, O.S.; The total fluorescence of human urine, *Analytica Chimica Acta*, 198, 13-23, 1987.
207. Bahram, M.; Bro, R.; A novel strategy for solving matrix effect in three-way data using parallel profiles with linear dependencies. *Analytica Chimica Acta*, 584(2), 397-402, 2007.