

JOSÉ LUIZ RUFINO

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
CONTROLE DE QUALIDADE DE FÁRMACOS, UTILIZANDO-SE
TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS (NIR E MID) E PROCESSOS DE
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA (PLS)

Dissertação apresentada como
requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre em Química, Programa de Pós-
Graduação em Química, Setor de
Ciências Exatas, Universidade Federal
do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Orliney Maciel Guimarães
Co-Orientador: Prof. Dr. Patricio Guillermo Peralta-
Zamora

CURITIBA

2004

TERMO DE APROVAÇÃO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA CONTROLE
DE QUALIDADE DE FÁRMACOS, UTILIZANDO-SE TÉCNICAS
ESPECTROSCÓPICAS (NIR E MID) E PROCESSOS DE CALIBRAÇÃO
MULTIVARIADA (PLS)**

por

JOSE LUIZ RUFINO

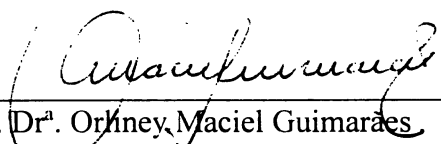
Dissertação aprovada como requisito

parcial para obtenção do grau de

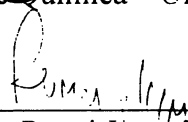
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química.

pela Comissão Examinadora composta por:

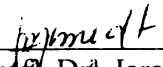
Orientador:



Prof.^a. Dr.^a. Orliney Maciel Guimarães
Dept^o de Química – UFPR



Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi
Instituto de Química - UNICAMP



Prof.^a. Dr.^a. Iara Messerschmidt
Dept^o de Química – UFPR

Curitiba, 17 de dezembro de 2004.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família,
principalmente aos meus pais,
Waldemiro e Ilma.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por ter me concedido saúde e força ao longo desta caminhada.

À Prof^a. Dr^a. Orliney Maciel Guimarães pela orientação, dedicação e pela imensa colaboração prestada.

Ao Prof. Dr. Patricio G. Peralta-Zamora pela co-orientação, sugestões e pelos ensinamentos profissionais.

À Prof^a. Dr^a. Iara Messerschmidt que contribuiu com sugestões e críticas de grande valia para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao Prof. Dr. Lauro Camargo Dias Júnior pelas sugestões e colaboração prestadas.

Aos professores João Batista e Carlos Cunha pela amizade.

À Jackeline e Janaína do Laboratório de Medicamentos do Instituto Tecnológico do Paraná - Tecpar pelas análises cromatográficas realizadas.

Ao Maurício da Maniderma - Farmácia de Manipulação pelos princípios ativos doados.

Aos amigos Fernando Sodré e Davi pelo apoio, mas principalmente pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq pelos recursos financeiros através dos quais foi possível a realização deste trabalho.

A todas as pessoas que de uma forma geral contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Novas metodologias visando a identificação, quantificação e controle de qualidade dos produtos farmacêuticos tem sido empregado pelo crescente desenvolvimento da quimiometria e da espectroscopia no infravermelho. Neste trabalho foi utilizada a espectroscopia no infravermelho próximo e médio, por reflectância difusa, com o objetivo de desenvolver metodologias analíticas simples, rápidas e não destrutivas para a identificação e quantificação simultânea de princípios ativos do Buscopan Composto®: brometo de N-butilescolamina (BNBE) e dipirona sódica monohidratada, valendo-se das potencialidades da calibração multivariada para resolução de problemas de interferência espectral. A metodologia de análise das componentes principais (PCA) mostrou-se adequada para a identificação de amostras diferentes de medicamentos. Para a quantificação foram desenvolvidos modelos utilizando o método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) para correlacionar as concentrações dos componentes das amostras com os dados espectrais. Os modelos de calibração foram desenvolvidos no Programa Matlab, utilizando a validação cruzada com os dados centrados na média. O modelo desenvolvido na região do NIR que se mostrou mais adequado foi o desenvolvido utilizando a faixa espectral de 1634-1860 nm, com os dados alisados, aplicados a segunda derivada e processados com três componentes principais. A capacidade de previsão dos modelos foi avaliada determinando-se o erro padrão de calibração (SEC) e o erro padrão de previsão (SEP). A validação do método foi realizada determinando-se erro relativo (ER%) obtido na quantificação dos dois princípios ativos em amostras de Buscopan Composto® e comparando os resultados com o método de referência (Cromatografia de Alta Eficiência-CLAE). O modelo desenvolvido na região do NIR apresentou valores de SEC e SEP iguais a 0,63 e 1,34 mg/g na determinação de BNBE e iguais a 3,61 e 13,93 mg/g na determinação de dipirona, respectivamente. Os erros relativos obtidos na região do NIR foram 0,58% para BNBE e de 3,31% para a dipirona. O modelo desenvolvido na região do MID que se mostrou mais adequado foi desenvolvido utilizando toda faixa espectral excluindo-se a região entre 1800-2700 cm^{-1} com os dados alisados, aplicados o MSC, segunda derivada e processados com três componentes principais. Os valores de SEC e SEP obtidos foram iguais a 0,21 e 0,41 mg/g para o BNBE e 0,85 e 4,92 mg/g para a dipirona, respectivamente. Os erros relativos obtidos foram de 3,02% para determinação de BNBE e 0,76% para determinação de dipirona. O modelo desenvolvido na região do NIR se mostrou mais adequado para determinação simultânea de dipirona e brometo de n-butilescolamina em amostras reais em relação ao desenvolvido na região do MID. O modelo construído na região do NIR tem vantagens sobre a técnica de referência (CLAE), pois não requer pré-tratamento de amostras e possibilita adaptar modelos de calibração para análises em tempo real, uma vez que as determinações foram rápidas, em menos de um minuto.

ABSTRACT

New methodologies aiming at identification, quantification and quality control of the pharmaceutical products have been used in the increasing development of the chemometrics and infrared spectroscopy. In this work we have used NIR and MID infrared spectroscopy, for diffuse reflectance, aiming to develop methodologies at the same time simple, fast and no destructive for simultaneous identification and quantification of the active principles of Buscopan Composto®: bromide of *N*-butylscopolamine (BNBE) and dipirone, using potentialities of multivariate calibration for resolution of spectral interferences problems. Principal Component Analysis (PCA) proved adequate for identification of adulterated and/or counterfeited medicines. Models have been developed using partial least squares regression (PLS) to correlate concentration of the components with spectral data. The calibration models have been developed within the Matlab Program with PLS-toolbox functions, using cross-validation with the data centered in media and the leave one out mode. The most adequate model was the one developed using the spectral band of 1634-1860 nm, with the smoothed data, applied the second-order differentiation and three principal components. The prediction ability of the model was evaluated determining the squared error calibration (SEC) and the squared error prediction (SEP). The validation of the models was carried through determining relative error (ER%) gotten in quantification of the two active principles in samples of Buscopan Composto® and comparing the results with reference method (HPLC). The model developed in NIR presented values of SEC = 0.63 mg.g⁻¹ and SEP = 1.34 mg.g⁻¹ for BNBE and SEC = 3.61 mg.g⁻¹ and SEP = 13.93 mg.g⁻¹ for the determination of dipirone. The relative errors obtained in NIR were 0.58% for BNBE determination and 3.31% for dipirone determination. The model developed in MID proved more adequate was developed using all spectral band abstaining wavelength region 1800-2700 cm⁻¹ (CO₂) with the data smoothed, applied the MSC, first-order differentiation and three principal components. The model developed in MID presented values of SEC = 0.21 mg.g⁻¹ and SEP = 0.41 mg.g⁻¹ for BNBE and SEC = 0.85 mg.g⁻¹ and SEP = 4.92 mg.g⁻¹ for the determination of dipirone. The relative errors obtained in MID proved been 3.02% for determination BNBE and 0.76% for determination dipirone. The model developed in NIR proved more adequate for simultaneous determination of dipirone and bromide of *N*-butylscopolamine in real samples when compared with MID. The HPLC analysis takes about 2 h, including sampling, sample preparation, run-time HPLC and integration of the chromatogram. NIR spectroscopy is a fast method that needs no sampling. With fibre optics, this instrumentation makes it possible to perform on-line analysis in less of one minute.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comprimentos de onda referentes a absorção na região do infravermelho próximo de de grupos funcionais.....	29
Tabela 2. Concentrações de BNBE e dipirona sódica presente nas amostras sintéticas utilizadas na calibração e validação dos modelos.....	47
Tabela 3. Porcentagem de variância capturada pelo modelo PLS na região do NIR utilizando a primeira derivada.....	59
Tabela 4. Porcentagem de variância capturada pelo modelo PLS na região do NIR utilizando a segunda derivada.....	59
Tabela 5. Valores reais e valores previstos de Dipirona e erro relativo obtidos pelos modelos de calibração construídos utilizando primeira derivada na região do NIR.....	64
Tabela 6. Valores reais e valores previstos de Dipirona e erro relativo obtidos pelos modelos de calibração construídos utilizando segunda derivada na região do NIR.....	65
Tabela 7. Valores reais e valores previstos de BNBE e erro relativo obtidos pelos modelos de calibração construídos utilizando primeira derivada na região do NIR.....	66
Tabela 8. Valores reais e valores previstos de BNBE e erro relativo obtidos pelos modelos de calibração construídos utilizando segunda derivada na região do NIR.....	67

Tabela 9. Estatísticas de otimização dos modelos PLS utilizando os espectros na região do NIR (1634-1860 nm).....	69
Tabela 10. Valores previstos pelos modelos desenvolvidos na região do infravermelho próximo para BNBE	70
Tabela 11. Valores previstos pelos modelos desenvolvidos na região do infravermelho próximo para Dipirona sódica.....	71
Tabela 12. Médias dos valores de CLAE, NIR e erro relativo entre as duas técnicas.....	72
Tabela 13. Valores das médias, dos desvios padrão, diferenças entre as médias as diferenças entre os desvios padrão por CLAE e NIR com 2ª derivada e 3 componentes principais.....	74
Tabela 14. Atribuição das principais bandas de absorção dos espectros da dipirona e BNBE na região do infravermelho médio.....	76
Tabela 15. Porcentagem de variância capturada pelo modelo PLS na região do infravermelho médio utilizando a primeira derivada.....	80
Tabela 16. Porcentagem de variância capturada pelo modelo PLS na região do infravermelho médio utilizando a segunda derivada.....	80
Tabela 17. Valores reais e valores previstos de dipirona sódica para a calibração utilizando primeira e segunda derivada na região do MID.....	83
Tabela 18. Valores reais e valores previstos de BNBE para a calibração utilizando primeira e segunda derivada na região do MID.....	84

Tabela 19. Estatísticas de otimização do modelo PLS (MID) usando os dados aplicando-se a 1ª e 2ª derivada e 3 componentes principais.....86

Tabela 20. Valores previstos pelos modelos construídos na região do MID para BNBE e dipirona sódica e dados estatísticos.....87

Tabela 21. Resumo dos resultados obtidos pelos modelos construídos nas regiões do NIR e MID com 2ª derivada e 3 cp, para determinação simultânea de BNBE e dipirona.....88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de reflectância difusa em uma amostra sólida.....	25
Figura 2. Composição do espectro da luz na região do infravermelho.....	28
Figura 3. Organização dos dados para calibração multivariada.....	33
Figura 4. Gráfico de um conjunto de dados bidimensionais (λ_1 e λ_2), mostrando os eixos das componentes principais (PC1, PC2).....	34
Figura 5. Fluxograma do desenvolvimento experimental utilizado	44
Figura 6. Estrutura do N-butilescolamina.....	49
Figura 7. Estrutura da dipirona sódica monohidratada.....	49
Figura 8. Espectro dos padrões puros de BNBE e dipirona sódica na região do infravermelho médio (MID).....	49
Figura 9. Espectro dos padrões puros de BNBE e dipirona sódica na região do infravermelho próximo (NIR).....	50

Figura 10. Espectros alisados dos padrões sintéticos de Buscopan Composto® na região do infravermelho médio (MID).....	51
Figura 11. Espectros alisados dos padrões sintéticos de Buscopan Composto® na região do infravermelho médio (MID) com MSC.....	51
Figura 12. Espectros alisados dos padrões sintéticos de Buscopan Composto® na região do infravermelho próximo (NIR).....	52
Figura 13. Espectros alisados dos padrões sintéticos de Buscopan Composto na região do infravermelho próximo (NIR) com MSC.....	52
Figura 14. Espectros alisados dos padrões sintéticos de Buscopan Composto na região do infravermelho próximo (1634-2500 nm) com MSC.....	53
Figura 15. Gráfico dos escores de PC2 x PC3 na região do infravermelho próximo.....	54
Figura 16. Gráfico dos escores de PC2 x PC3 na região do infravermelho médio	54
Figura 17. Espectros na região do infravermelho próximo de duas amostras sintéticas de Buscopan Composto®, por reflectância difusa após alisamento.....	56

Figura 18. Gráfico do PRESS em função do número de componentes principais utilizando os espectros na região do infravermelho próximo aplicado a primeira derivada.....57

Figura 19. Gráfico de PRESS em função do número de componentes principais utilizando os espectros na região do infravermelho próximo aplicado a segunda derivada.....58

Figura 20. Gráfico do coeficiente de regressão x o número de variáveis utilizando a primeira derivada e três componentes principais na região do NIR.....60

Figura 21. Gráfico do coeficiente de regressão x o número de variáveis utilizando a segunda derivada e três componentes principais na região do NIR61

Figura 22. Resíduos de Students versus "leverage" para o modelo processado utilizando a primeira derivada e 3 componentes principais na região do infravermelho próximo.....62

Figura 23. Resíduos de Students versus "leverage" para o modelo processado utilizando a segunda derivada e três componentes principais na região do NIR.....63

Figura 24. Espectros dos padrões puros de Dipirona sódica monohidratada e BNBE na região do infravermelho médio76

Figura 25. Espectros de uma mistura de dipirona e BNBE na região do MID77

Figura 26. Gráfico do PRESS versus número de componentes principais para o modelo utilizando a primeira derivada utilizando os espectros na região do infravermelho médio79

Figura 27. Gráfico do PRESS versus o número de componentes principais para o modelo utilizando a segunda derivada na região do infravermelho médio.....79

Figura 28. Gráfico dos resíduos de Students versus "leverage" para o modelo utilizando a primeira derivada e 3 cp na região do infravermelho médio82

Figura 29. Gráfico dos resíduos de Students versus "leverage" para o modelo utilizando a segunda derivada e 3 cp na região do infravermelho médio.....82

ABREVIATURAS

BNBE- Brometo de N-butilescopolamina

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

cp – Componentes Principais

d – Diferença entre as médias

DIGEMID – Dirección Geral de Medicamentos Insumos e Drogas da Argentina

%ERRO - Erro Relativo Percentual

MID – Infravermelho Médio

MSC - Correção do Sinal Multiplicativo

MLR - Regressão Linear Múltipla

NIR – Infravermelho Próximo

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCA – Análises das Componentes Principais

PC2- Segunda Componente Principal

PC3 – Terceira Componente Principal

PCR - Regressão por Componentes Principais

Pd – Padrões

PLS – Regressão por mínimos quadrados parciais

PRESS – Soma dos quadrados dos erros de previsão

SEC – Erro Padrão de Calibração

S_d – Diferença entre os desvios padrão

SD – Desvio Padrão

SD_N – Desvio Padrão obtido na região do NIR

SD_C – Desvio Padrão obtido por CLAE

SEP – Erro Padrão de Previsão

X_N – Valor médio obtido por NIR

X_C – Valor médio obtido por CLAE

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Aspectos gerais.....	17
1.2. Técnicas Analíticas Utilizadas Para Controle De Qualidade De Fármacos	20
1.2.1. Técnicas Espectroscópicas de Reflectância difusa	23
1.3. Espectro Na Região Do Infravermelho.....	27
1.4. Absorção Da Radiação Na Região Do Infravermelho	29
1.5. Métodos Quimiométricos.....	31
1.6. Análise das Componentes Principais (PCA)	33
1.7. Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS).....	35
1.7.1. Determinação do Número de Componentes Principais	36
1.7.2. Validação do Modelo	38
1.8. Tratamento dos Dados.....	39
1.8.1. Centrar na média	40
1.8.2. Alisamento.....	40
1.8.3. Correção do Fator Multiplicativo do Sinal (MSC).....	41
2. OBJETIVOS.....	43
3- PARTE EXPERIMENTAL	44
3.1. Estratégia para o Desenvolvimento dos Modelos	44
3.2. Reagentes.....	44
3.3. Planejamento Analítico.....	45
3.4. Preparação das Amostras Padrão de Calibração e Validação	46

3.5. Obtenção dos Espectros na Região do Infravermelho Próximo e Médio por Reflectância Difusa	48
3.6. Pré Tratamento dos Dados Espectroscópicos	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Análise das Componentes Principais (PCA)	53
4.2. Construção do modelo de calibração na região do infravermelho próximo	55
4.3. Determinação do número de componentes principais para construção do modelo na região do infravermelho próximo	56
4.4. Identificação de Amostras Anômalas no modelo construído na região do NIR	61
4.5. Validação do Modelo PLS na região do NIR	68
4.6. Construção do modelo de calibração via PLS na região do MID	75
4.7. Determinação do número de componentes principais na região do infravermelho médio.....	78
4.8. Identificação de amostras anômalas no MID.	81
4.9. Validação do modelo na região do MID.	85
4.10. Comparação entre os modelos construídos na região do NIR e MID utilizando segunda derivada e 3 componentes principais	75
5. CONCLUSÃO	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	92
APÊNDICE A.....	99
APÊNDICE B.....	101

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais

A autenticidade dos produtos farmacêuticos tornou-se um problema global e por isso, se torna cada vez mais importante detectar a introdução no mercado de produtos fraudulentamente rotulados e de qualidade inferiores, quer por razões econômicas, quer por razões de saúde.

As adulterações em produtos farmacêuticos são relativamente freqüentes e diversificadas, incluindo a substituição do medicamento por placebos ou por adulteração da quantidade do princípio ativo, o que reduz ou anula a ação do medicamento¹.

A falsificação de remédios atinge praticamente todas as classes e formas de medicamentos e não poupa nenhuma região do mundo². Ela afeta desproporcionalmente as nações em desenvolvimento por causa da fragilidade de seus sistemas de regulamentação e monitoramento da produção, importação, distribuição, estocagem e venda de produtos farmacêuticos.

Um levantamento feito pelas oito seções regionais da Organização Mundial de Saúde³ (OMS) constatou um alto índice de casos de falsificação de medicamentos registrados por entidades oficiais de controle sanitário nos últimos anos, a América Latina, o Caribe, a África e os países em desenvolvimento da Ásia e Pacífico representaram mais de 70%. Em contraste, Estados Unidos, Canadá, Europa e os países avançados da Ásia e do Pacífico, os quais representam a maior parcela em valores, dos US\$ 300 bilhões do mercado mundial de produtos farmacêuticos, tiveram menos de 20% dos casos de drogas falsificadas sendo que os produtos hormonais são os alvos mais freqüentes de falsificação nas sociedades avançadas.

Em função da metodologia deste estudo ter sido baseada em informações fornecidas por agências sanitárias de 45 países membros da OMS, e da debilidade das legislações nacionais e dos órgãos reguladores nos países em desenvolvimento, os responsáveis pelo levantamento ressaltaram que ele é necessariamente incompleto e mostra apenas uma parte de um dos grandes problemas de saúde pública, principalmente na região mais pobre do planeta.

O tema da falsificação de drogas saltou para o topo da agenda do governo brasileiro após a descoberta de anticoncepcionais e de outros medicamentos fraudados encontrados nas farmácias.

Estima-se que 15% dos medicamentos que circulam no mercado nacional argentino, geralmente comercializados de maneira informal, poderiam ser adulterados ou falsificados. Segundo a Associação dos Laboratórios Farmacêuticos dos Países Europeus, isto representaria aproximadamente 50 milhões de dólares.

Entre os produtos falsificados ou adulterados com maior frequência, encontra-se: água oxigenada, vinagre, azeite de resina, antibióticos, analgésicos, medicamentos destinados a curar males respiratórios e gotas oftalmológicas. Apesar das normas fornecidas pela Direção Geral de Medicamentos, Insumos e Drogas (DIGEMID), a venda de medicamentos em postos e negócios ambulatoriais tem aumentado nos últimos tempos a oferta de medicamentos de contrabando e de procedência duvidosa⁴.

Em abril de 1999, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recebeu 771 denúncias de casos de medicamentos adulterados ou falsificados, 77% foram detectados em países em desenvolvimento e 23% em países desenvolvidos.

A magnitude atual do problema de medicamentos falsificados aumenta o estudo pormenorizado de todas suas características, a respeito devemos levar em conta as seguintes definições³, por suas diferentes conotações técnicas que podem diretamente influenciar as características próprias dos medicamentos:

Medicamentos falsificados: são resultado de uma reprodução intencional e calculada de um medicamento original, sem o cumprimento de normas vigentes, difícil de distinguir por sua aparência similar ao medicamento original que está sendo imitado com graves riscos para a saúde do paciente.

Medicamentos adulterados: é a alteração do conteúdo da natureza de um medicamento original, anulando a qualidade deste produto farmacêutico, aumentando as impurezas sobre os limites estabelecidos, resultando em um produto cuja identidade não é genuína.

Medicamentos alterados: São os medicamentos que sofrem um processo de modificação em sua forma farmacêutica, apresentação, concentração e mudanças de suas características inicialmente declaradas.

Assim, por razões éticas e econômicas, torna-se imperativo o desenvolvimento de métodos rápidos e sensíveis para a detecção desses produtos.

A necessidade de determinar o princípio ativo em formulações farmacêuticas, tem grande importância, não só para garantir a genuinidade dos produtos com denominação de origem, mas também na determinação dos teores dos princípios ativos.

1.2. Técnicas Analíticas Utilizadas para Controle de Qualidade de Fármacos

A química analítica é uma área que centraliza a responsabilidade pelo desenvolvimento de novas metodologias de análise aplicáveis nos mais variados campos da pesquisa científica. Esta contínua procura pelo estabelecimento de metodologias adequadas para os diversos tipos de necessidades tem propiciado um significativo desenvolvimento da área, assim como tem sido fundamental para o progresso científico de outras. Dentro deste contexto é bastante significativo o aporte que a Química Analítica tem dado a indústria, principalmente no que diz respeito ao estabelecimento de ferramentas capazes de serem aplicadas em rotinas nos laboratórios de controle de qualidade e de processos de produção⁵.

A análise química de muitas substâncias de interesse corresponde a um processo bastante complexo, basicamente devido a três fatores limitantes:

- i) Necessidade de determinar quantidades cada vez menores, muitas vezes abaixo do limite de quantificação oferecida pelas técnicas disponíveis;
- ii) Interferências que derivam do caráter complexo de grande parte das matrizes de interesse, e
- iii) Necessidade de diferenciar e quantificar diversas espécies químicas associadas a um mesmo produto⁵.

Com o objetivo de contornar alguns destes fatores limitantes, a Química Analítica tem investido no desenvolvimento e aprimoramento de técnicas instrumentais de análise, muitas das quais têm-se transformado em

ferramentas de primeira importância, principalmente em função de características como alta sensibilidade, seletividade, rapidez e versatilidade⁵.

As técnicas analíticas modernas incorporam uma série de metodologias, sendo aquelas baseadas na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a mais empregada para se determinar a composição de fármacos⁶ e esta técnica é a mais amplamente utilizada pela indústria no controle de qualidade destes produtos. No entanto, é demorada e requer operações de pré-tratamento da amostra para poder ser aplicada com bons resultados.

A espectroscopia no infravermelho próximo tem sido, freqüentemente, aplicada como um método analítico que fornece resultados suficientes na determinação de moléculas orgânicas (como por exemplo: proteína, gordura) e parâmetros qualitativos de produtos da agricultura e de alimentos.

Recentes aplicações têm sido realizadas nas indústrias de petróleo, têxtil, carvão, cosméticos, polímeros, química, tintas, farmacêuticas, sendo aplicada também na restauração de imagens decorativas de pinturas históricas⁷. Sua aplicação está sendo recentemente bastante explorada, devido a rapidez das análises, porém, sua utilização deve ser acompanhada da aplicação de métodos quimiométricos⁸⁻⁹ que permitem a resolução de problemas de seletividade e interferências e com possibilidade de realizar análises não destrutivas e sem pré-tratamento das amostras.

Embora esta técnica tenha se tornado nos últimos dez anos, uma ferramenta potencial para ser empregada na monitoração e controle de qualidade de produtos de forma rápida e sem pré-tratamento, são poucas as indústrias que a tem utilizado em análises de rotina.

A espectroscopia no infravermelho médio (MID), mesmo tendo um número pequeno de aplicações em análises quantitativas o seu sucesso em recentes estudos dá margem a maiores investigações. Até recentemente, as técnicas quantitativas no infravermelho eram pouco utilizadas devido as seguintes desvantagens: bandas sobrepostas, desvio da lei de Beer sob uma larga faixa de concentração, não reprodutibilidade da linha de base, ruídos instrumentais elevados e baixa sensibilidade.

Com o advento do algoritmo da transformada rápida de Fourier e sua aplicação à espectroscopia no infravermelho, algumas dessas desvantagens foram vencidas. Assim, a espectroscopia no infravermelho em sinergia com técnicas quimiométricas recentemente desenvolvidas fornecem um meio efetivo de se fazer análise em misturas complexas sem a necessidade de qualquer separação prévia de seus componentes^{10,11}.

A espectroscopia no infravermelho por transmissão é um método tradicional em análise quantitativa¹⁴, para a qual existem várias técnicas de amostragens. Uma metodologia bastante utilizada para materiais poliméricos é a dissolução da amostra em um solvente apropriado e sua disposição sobre janela de KBr. Este método, contudo, requer tempo e nem sempre todos os componentes da amostra são solúveis em solventes comuns. Quando a amostra se encontra na forma de pó ou granulada, a obtenção dos espectros é feita, mais comumente, através da preparação de uma pastilha de KBr. Porém, essa técnica envolve o uso de altas pressões e pode afetar a amostra com a produção de interferências químicas¹⁵.

Alternativamente, técnicas de reflectância difusa podem ser aplicadas eliminando várias etapas de preparação das amostras que podem consumir longo período de tempo e uso de solventes tóxicos^{16,17}.

1.2.1. Técnicas Espectroscópicas de Reflectância Difusa

Inicialmente o uso da reflectância difusa foi restrito às regiões do ultravioleta, visível e infravermelho próximo¹⁸. Com o aperfeiçoamento dos equipamentos que proporcionou melhor qualidade das medidas, tais como: maior razão sinal ruído, aumento na sensibilidade dos detectores, maior sensibilidade e estabilidade da fonte e acessórios com habilidade de capturar o máximo de reflexão difusa, esta técnica tem sido usada como prática de rotina na região do infravermelho médio, oferecendo inúmeras vantagens¹⁹.

A espectroscopia no infravermelho por reflectância difusa surgiu devido ao fornecimento dos espectros de pós, sólidos e espécies adsorvidas em sólidos. Além de reduzir o tempo de preparação da amostra obtém-se informação de materiais na forma mais próxima da original²⁰.

A aplicação da técnica requer um entendimento de suas limitações para obtenção de espectros de boa qualidade. Resultados quantitativos podem ser obtidos se for feita uma preparação adequada da amostra¹⁹.

Vários acessórios comerciais são empregados para obter os espectros onde a radiação espalhada é coletada em montagem óptica própria e dirigida para o detector^{20,21}. O espectro de referência é obtido a partir de um material não absorvente (KBr, KCl).

A radiação refletida de uma superfície opaca depende mais diretamente da natureza das partículas do meio sob consideração. A radiação refletida de tal meio é usualmente considerada como consistindo de duas partes distintas:

A primeira é a reflexão especular governada pelas equações de Fresnel²², caracterizado pela radiação que é refletida da superfície da amostra com o mesmo ângulo de incidência. A segunda é a reflexão difusa e faz-se através da penetração de uma porção do fluxo incidente no interior da amostra. Essa radiação retorna à superfície da amostra, após absorção parcial de múltiplos espalhamentos nas interfaces de partículas individuais das quais a amostra é composta.

A radiação não interage da mesma forma com a amostra, apresenta diferentes caminhos através da mesma: diferentes profundidades de penetração, diferentes números de choques e um diferente número de espalhamento nas interfaces.

Na ausência de absorção, com espessura infinita e com múltiplos espalhamentos, um máximo de radiação retorna à superfície. Quando ocorre absorção a radiação é transmitida e espalhada nas interfaces e no interior da amostra antes de retornar a superfície. A figura 1 mostra a representação da interação da radiação com um material particulado.

O tamanho, a forma das partículas, o espaço livre entre elas e o grau de compactação afetam a quantidade (concentração) do material através do qual a radiação é transmitida. Alguns desses fatores também afetam o caminho entre as interfaces individuais. A morfologia da superfície da amostra é uma consideração importante na magnitude da componente especular²³.

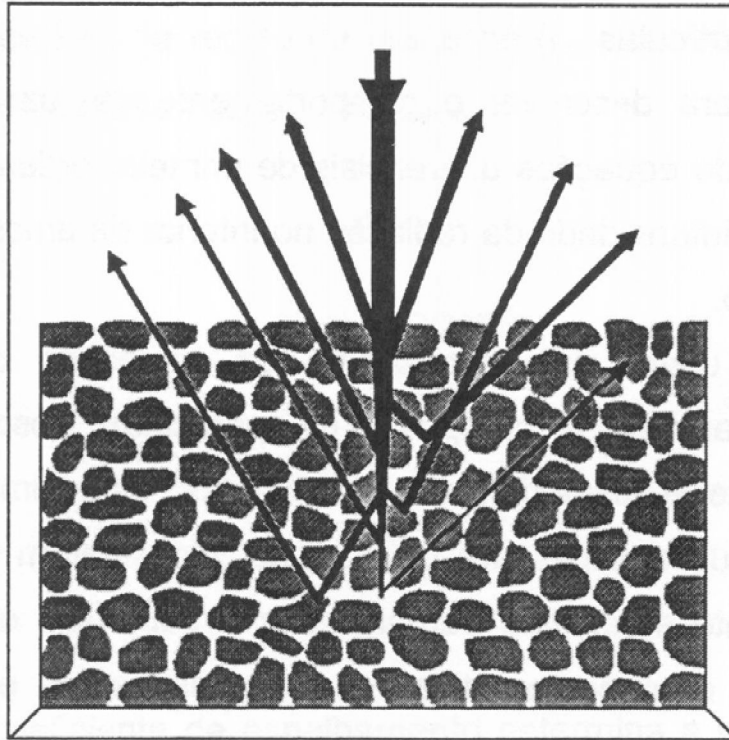


Figura 1. Representação de reflectância difusa em uma amostra sólida ²³.

A atenuação da parte da reflectância difusa pela absorção no meio é dada pela lei Lambert-Bourguer:

$$I = I_0 \exp(-\epsilon \bar{d}) \quad (1)$$

I = intensidade da radiação

I_0 = intensidade da radiação incidente

ϵ = coeficiente de extinção molar da amostra

\bar{d} = espessura média da camada

A profundidade de penetração da radiação (\bar{d}), em um meio absorvente depende de vários fatores. Para uma dada matriz e concentração do analito, o tamanho da partícula do analito e da matriz diluente governam a profundidade de penetração^{24,25}.

Griffiths e colaboradores²⁵ relataram que Chalmers e Masckenzu chamam a atenção que a razão entre as intensidades das bandas não permanece constante com a alteração do tamanho das partículas.

Uma aproximação para descrever o comportamento da luz num meio difuso, é dada pela solução de equações diferenciais de primeira ordem, as quais descrevem a diminuição da intensidade da radiação no interior da amostra devido ao espalhamento e absorção.

Kubelka e Munk usam este formalismo de equações diferenciais considerando que uma camada é composta de partículas absorventes e espalhadoras uniformemente e aleatoriamente distribuídas, cuja dimensão das partículas é muito menor que a espessura da camada. Consideram somente a direção da radiação incidente e refletida perpendicular à superfície da camada, assumindo que a radiação é monocromática e que a espessura é infinita (o aumento da espessura não resulta em diferença na reflectância)²⁶.

Através de manipulações algébricas, obtém-se a equação de Kubelka-Munk na forma mais conhecida:

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

Onde R_{∞} é a reflectância da amostra para profundidade ∞ ; k é o coeficiente de absorção da amostra (proporcional à concentração); s é o coeficiente de espalhamento da amostra.

A função da equação é comumente referida como função de Kubelka-Munk e freqüentemente indicada por $f(R_{\infty})$.

Na prática as medidas são usualmente feitas relativas a um padrão, o qual assume que $k=0$ na região de interesse (r_{∞} do padrão = 1). Nessa condição é determinada a razão $R_{\infty \text{ amostra}} / R_{\infty \text{ padrão}}$.

$$r_{\infty} = R_{\infty \text{ amostra}} / R_{\infty \text{ padrão}} \quad (3)$$

$$f(r_{\infty}) = (1 - r_{\infty})^2 / 2 r_{\infty} = k / s \quad (4)$$

O coeficiente de espalhamento determina a extensão da interação da luz incidente com a amostra antes da radiação retornar à superfície. Para uma certa extensão, s , controla a profundidade na qual a luz penetra na amostra. Quanto menor o valor de “ s ” maior é o valor $f(r_{\infty})$. No entanto, há um limite para este comportamento, uma vez que ele somente é válido para partículas que espalham a radiação incidente^{26,27}.

Embora esta equação esteja contida na maioria dos “softwares” comerciais tem se observado que ela funciona em condições muito restritas²³.

1.3. Espectro na Região do Infravermelho

Na faixa de radiações do infravermelho (fig. 2) distinguem-se três regiões: infravermelho próximo, médio e distante. A subdivisão, não muito precisa, baseia-se na facilidade em produzir e observar essas três modalidades na região do infravermelho, o que depende de seu comprimento de onda. Todavia pode-se estabelecer que a região do infravermelho próximo abrange de 700 a 2500 nm; a região do infravermelho médio, de 2500 a 10000 nm; e o infravermelho distante, de 10000 a 100000nm²⁴.

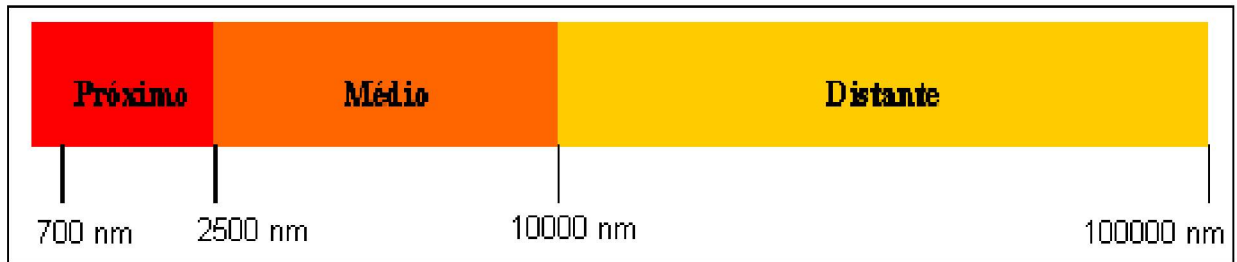


Figura 2. Composição do espectro da luz na região do infravermelho

A radiação na região do infravermelho próximo possui as mesmas propriedades da radiação da luz visível, com a diferença de que não é percebido pela visão humana. Pode ser produzido por qualquer fonte luminosa e ser estudado com os mesmos detectores (arranjos de diodos, PbS, DTGS, etc). Já o espectro na região do infravermelho médio requer, para ser produzido, técnicas mais refinadas. Finalmente, o espectro na região do infravermelho distante necessita de instrumentos especiais.

A região do infravermelho próximo é a região espectral compreendida no intervalo de 700 a 2500 nm, nela aparecem as bandas de absorção que são harmônicas ou combinações das bandas fundamentais de vibração por estiramento, sendo que, as ligações envolvidas como C-H, O-H, N-H, possuem comprimento de onda de absorção característicos mostrados na tabela 1.

Estas absorções não são muito fortes, e muitas vezes são sobrepostas, havendo assim a necessidade da aplicação de métodos de calibração multivariada (quimiometria) para determinações quantitativas²⁴.

Tabela 1. Comprimentos de onda referentes a absorção na região do infravermelho próximo de grupos funcionais

Grupo Funcional	Comprimento de Onda (nm)
C-H _{alifático}	1212, 1414, 1725, 1760 e 2308
C-H _{aromático}	1077, 1111 e 1615 a 1665
O-H _{água}	1440 e 1940
O-H _{fenóis}	1500 a 1800 e 2000 a 2200
N-H _{aminas}	1534, 2000 e 2100
N-H _{amidas}	1980, 2050 e 2180

Além dessas absorções características na região do infravermelho próximo, alguns minerais apresentam distintas absorções nesta região²⁴, como aqueles que contém os grupos OH, SO₄ e CO₃.

1.4. Absorção da Radiação na Região do Infravermelho

Quando as macromoléculas de um composto absorvem radiações na região do infravermelho, esta energia é suficiente apenas para excitar seus estados rotacionais e vibracionais, e a relaxação desta energia se dá na forma de calor que é transferido para a vizinhança. Enquanto que na absorção de radiações de menor comprimento de onda e maior energia, como o ultravioleta solar, ocorre transições eletrônicas com a criação dos estados excitados. A absorção da radiação na região do infravermelho é quantizada, ocorrendo para comprimentos de onda bem definidos de acordo com os tipos de átomos e ligações presentes nas moléculas, isto é, depende das massas relativas dos

átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos. Tal fato permite a identificação das moléculas ou pelo menos dos agrupamentos químicos presentes.

A radiação no infravermelho com comprimento de onda maior do que 100 μm , quando absorvida por uma molécula orgânica, transforma-se em energia de rotação molecular. Como o processo é quantizado, forma-se uma série de linhas.

A radiação no infravermelho com comprimento de onda entre 1 μm e 100 μm quando absorvida transforma-se em energia de vibração molecular. O processo é também quantizado, mas o espectro vibracional aparece freqüentemente como uma série de bandas ao invés de linhas porque a cada mudança de energia vibracional corresponde uma série de mudanças de energia rotacional. As linhas se sobrepõem dando lugar às bandas observadas. São estas bandas de vibração-rotação que formam os espectros de absorção no infravermelho.

O número de modos vibracionais normais ou fundamentais de uma molécula depende do seu número de átomos e se a molécula é ou não linear. Entretanto, alguns destes modos vibracionais poderão ser vibrações inativas na espectroscopia no infravermelho convencional ²⁴.

A excitação ótica de vibrações moleculares no infravermelho convencional somente ocorre se, durante a vibração, o momento dipolar elétrico mudar como resultado da alteração na distribuição de carga. Isto é, somente um dipolo oscilante deverá interagir com o campo eletromagnético provocando a absorção de energia radiante. Por esta razão, os modos vibracionais normais totalmente simétricos são inativos no infravermelho, e as moléculas centro-

simétricas não têm bandas de absorção no infravermelho. As moléculas de H₂, N₂, e O₂, isoladas no estado gasoso são exemplos desse comportamento. Por outro lado, grupos ou moléculas altamente polares, com vibrações associadas que causam grandes mudanças no momento dipolar, produzem bandas de absorção particularmente intensas, como exemplos podem ser citadas as carbonilas e as hidroxilas.

Respeitadas as interações específicas, incluindo fundamentalmente as interações intermoleculares, outra característica que reforça a importância do infravermelho como uma importante técnica de caracterização dos compostos é que um determinado grupo funcional dentro de uma molécula, de um composto complexo, absorve em uma frequência próxima a que absorve este mesmo grupo funcional quando pertence a uma molécula mais simples. Já um mesmo grupo funcional absorve em frequências próximas para macromoléculas de diferentes compostos.

Os desvios de um modelo ideal de absorção dos modos vibracionais fundamentais, espectroscopicamente ativos, aparecem nos espectros de infravermelho como deslocamentos e alargamentos de bandas²⁷.

1.5. Métodos Quimiométricos

A aplicação da calibração multivariada em química analítica teve um avanço significativo tornando-a tão popular atualmente, com a utilização do método dos mínimos quadrados parciais²⁸, ou PLS como é conhecido.

Com a utilização deste método, muitos problemas de cálculos puderam ser superados e um grande número de aplicações analíticas começaram aparecer .

Mais recentemente, com a utilização da técnica de inteligência artificial no tratamento de dados químicos, como redes neurais e algoritmos genéticos, certos problemas que ainda não eram resolvidos com a utilização do PLS, como a modelagem de sistemas não lineares, puderam ser contornados²⁹.

Métodos de calibração multivariada^{28,30,31} têm sido empregados de forma bastante efetiva, justamente nos casos onde existem problemas de superposição de sinais analíticos, quando os componentes presentes numa mistura necessitam ser determinados simultaneamente, mas a informação analítica disponível não apresenta seletividade. Isto é, quando em uma mistura não é possível identificar os componentes individuais, a partir da resposta instrumental.

A base da calibração multivariada é estabelecer uma relação entre duas matrizes (ou blocos) de dados químicos, quando houver uma dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas.

A calibração multivariada pode ser mais facilmente ilustrada, recorrendo-se à análise de dados espectroquímicos. O processo consiste basicamente de duas fases: a calibração e a validação. Na fase de calibração, “n” espectros para um conjunto de amostras com composição conhecida são obtidos em “p” valores de energia diferentes, formando uma matriz X, com “n” linhas e “p” colunas. Também uma matriz Y com os valores de concentração pode ser formada contendo “n” linhas, correspondendo às diferentes amostras, e “q” colunas, indicando o número de diferentes componentes presentes nas amostras.

O próximo passo é desenvolver um modelo matemático apropriado que melhor possa reproduzir Y a partir dos dados da matriz X. Esse modelo é

utilizado na fase de previsão para estimar as concentrações dos constituintes de novas amostras, a partir de seus espectros. Os dados utilizados nesta fase formam o conjunto de teste.

Os dados para a calibração multivariada podem ser organizados conforme apresentado na Figura 3. Os valores de reflectância dos espectros, a cada valor de frequência (ou comprimento de onda), são as variáveis independentes, e as concentrações das espécies de interesse nas amostras, as variáveis dependentes.

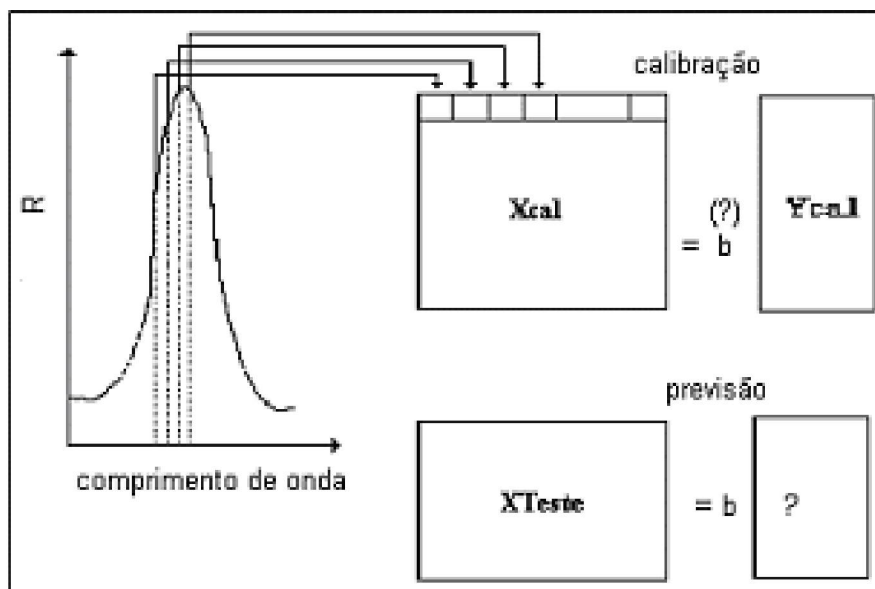


Figura 3. Organização dos dados para Calibração Multivariada⁵

1.6. Análise das Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais é um método estatístico multivariado, que é aplicado para a compressão de dados sem perda de informações relevantes. A transformação é feita de modo que o conjunto de dados possa ser representado por um número reduzido de novas variáveis chamadas de fatores ou componentes principais que são combinações lineares das variáveis originais²⁸. A PCA decompõe a matriz de dados originais em uma soma de

matrizes, produtos de vetores chamados de escores e pesos, que podem ser calculados por mínimos quadrados. A figura 4 mostra um gráfico bidimensional de um conjunto de 30 amostras ($n = 30$). A matriz de dados consiste, neste caso, de duas colunas ($m = 2$) representando as medidas de intensidades registradas para dois comprimentos de onda λ_1 e λ_2 nas 30 amostras.

A primeira componente principal (PC1) é definida na direção de máxima variância do conjunto de dados. A segunda componente principal (PC2) é definida na direção que descreve a máxima variância no espaço da PC1, de forma que cada componente principal (PC1, PC2, PC3, etc...) é responsável pela fração sucessiva de variância de dados, consistindo em um sistema de coordenadas ortogonais entre si e, portanto, não correlacionadas. Normalmente as primeiras PCs, explicam a maior parte da variância total contida nos dados e podem ser usadas para representá-las.

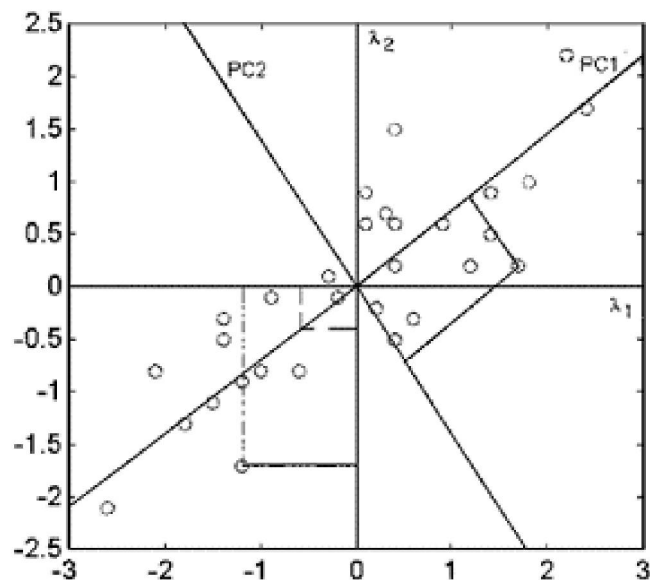


Figura 4. Gráfico de um conjunto de dados bidimensionais (λ_1 e λ_2), mostrando os eixos das componentes principais (PC1, PC2).²⁸

Na análise exploratória são examinadas as relações entre as amostras e as variáveis, através de gráficos de escores e pesos respectivamente, os quais permitem também avaliar a influência de cada variável em cada amostra, encontrando similaridade ou diferenças nos dados ²⁸.

1.7. Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

A base do método dos mínimos quadrados parciais (PLS) está na decomposição de uma matriz de dados X , em termos da soma de várias matrizes M_i , que não podem mais ser expandidas, mais uma matriz de erros (que corresponde a parte não modelada de X). As matrizes M_i constituem os chamados componentes principais, e são formadas pelo produto de dois vetores, t (os escores) e p (os pesos) :

$$X = M_1 + M_2 + \dots + M_a + E \quad \text{ou} \quad (5)$$

$$X = t_1p_1 + t_2p_2 + \dots + t_ap_a + E \quad \text{ou} \quad (6)$$

$$X = TP' + E \quad (7)$$

A dimensionalidade do espaço original é igual ao número de colunas em X , ou seja, o número de variáveis originais. No novo modelo, a dimensionalidade é descrita pelo número de matrizes M_i necessárias para descrever X . Assim, se for possível descrever uma matriz X que tenha muitas variáveis, por um número pequeno dessas matrizes M_i , haverá um decréscimo na dimensionalidade, sem perda de informação.

No PLS, tanto a matriz das variáveis independentes X como a das variáveis dependentes Y , são representadas pelos *scores* e *loadings* :

$$X = TP' + E \quad (8)$$

$$Y = UQ' + F \quad (9)$$

Uma relação entre as duas matrizes de dados X e Y pode ser construída, correlacionando-se os scores de cada bloco, utilizando um modelo linear:

$$u_a = b_a t_a \text{ ou,} \quad (10)$$

$$U = bT \quad (11)$$

1.7.1. Determinação do Número de Componentes Principais

Para a determinação do número de componentes principais empregadas na modelagem, o ideal seria a utilização de um conjunto-teste de dados. Entretanto, na maioria das vezes isto não é possível, pois pode ser um processo demorado e caro. O método de validação cruzada é uma alternativa prática que apresenta excelentes resultados.

A validação cruzada é uma metodologia utilizada para a determinação do número de componentes principais baseada na avaliação da magnitude dos erros de previsão de um dado modelo de calibração. Esta avaliação é feita pela comparação das previsões das concentrações previamente conhecidas ($y_i, i = 1:n$).

Este método consiste em:

- a) Remover uma amostra i do conjunto de calibração, (*leave one out.*) constrói-se o modelo;
- b) Usa-se o novo modelo para prever os dados removidos (\hat{y}),

- c) Calcula-se o erro de previsão ($y - \hat{y}$)
- d) Calcula-se a soma dos quadrados dos erros de previsão que é definido por:

$$\text{PRESS} = \sum (y - \hat{y})^2 \quad (12)$$

Onde, y é o valor conhecido e \hat{y} é o valor calculado.

O número mais adequado de componentes principais é correspondente ao menor PRESS.

Ainda que o PRESS seja uma medida razoável para avaliar a habilidade do modelo, ele é baseado em um número finito de amostras e, portanto, está sujeito a erros. O número de componentes principais com PRESS mínimo pode levar a um superajustamento do modelo. Um critério para selecionar melhor o número ótimo de componentes envolve a comparação do PRESS com poucas componentes, selecionando o número de componentes em que a adição de outra não o diminui significativamente²⁸.

A inspeção visual dos vetores “loadings” espectrais representa um critério complementar para a determinação do número significativo de componentes principais. A interpretação se dá da seguinte forma: os “loadings” maiores que zero são positivamente correlacionados com a concentração e os “loadings” menores que zero são negativamente correlacionados. A amplitude dos “loadings” mostra a covariância com o vetor de concentração. Componentes significativos têm picos em comum com os espectros e estes podem ser positivamente ou negativamente correlacionados. Componentes principais com alta correlação em área onde os espectros não possuem picos estão modelando ruídos²³.

Métodos de calibração multivariada têm sido utilizados com bastante frequência e sucesso na resolução de problemas de interferência espectral, principalmente associadas a outras técnicas analíticas⁵.

1.7.2. Validação do modelo

Para validar o modelo é usada uma série de amostras de referência, de composição que não estejam contidas na etapa da calibração (validação externa).

Para obter uma boa estimativa da habilidade de previsão, a série de amostras de validação deve ser representativa, ou seja, suas concentrações devem estar dentro do intervalo da concentração de calibração e das concentrações de amostras futuras. Também, não se pode esperar uma boa previsão pela extrapolação da faixa do modelo de calibração, a menos que a resposta linear seja precisa²⁸.

Se o modelo de calibração apresentar uma estimativa ruim dos dados, o modelo de calibração não fornecerá resultados precisos.

A determinação do erro padrão de calibração (SEC) e do erro padrão de previsão (SEP) pode dar uma boa medida do desempenho do modelo e, é definido como:

$$SEC = \left[\sum_{i=1}^n (y - \hat{y})^2 / n-p - 1 \right]^{1/2} \quad (13)$$

onde, y é o valor conhecido e \hat{y} o valor calculado, n o número de amostras utilizadas para a calibração e p é o número de componentes principais utilizadas. O valor de SEP é obtido do conjunto amostras de validação (equação 13 com $p=0$).

Bons modelos são aqueles que apresentam valores de SEC e SEP mínimos e ambos próximos.

A habilidade de previsão de um método analítico pode ser descrito em termos do erro relativo. Esse erro pode ser usado para comparação dos resultados entre diferentes métodos e determina a exatidão que pode ser esperada para amostras de composição desconhecida²³, e é definido como:

$$ER \% = [|(y - \hat{y})| / y] \times 100 \quad (14)$$

onde, y é o valor conhecido e \hat{y} o valor calculado.

Precisão é uma medida da reprodutibilidade de um resultado quando medido várias vezes e os valores forem muito próximos uns dos outros, e a exatidão se refere a quão próximo o valor de uma medida está do valor “verdadeiro”⁷⁸.

Os índices de precisão para comparar repetibilidade é o desvio padrão (SD), definido por:

$$SD = [\sum (y' - y_m)^2 / n]^{1/2} \quad (15)$$

Onde, y_m é o valor médio das concentrações previstas, e y' é o valor das concentrações previstas e n o número de medidas independentes.

1.8. Tratamento dos dados

Com o intuito de melhorar a eficiência dos modelos multivariados construídos, geralmente aplicam-se metodologias de transformação e/ou pré-processamento para ajustar o conjunto de dados a ser estudado.

O tratamento de dados é aplicado antes da calibração para melhorar a eficiência do modelo ⁷⁸.

Inúmeros pré-tratamentos da resposta (sinal medido) são encontrados na literatura ^{32,33,34} como, por exemplo: log 10, que enfatiza sinais com baixa intensidade, correção do fator multiplicativo do sinal (MSC), correção da linha base, normalização que diminui o efeito das diferenças amostrais, cálculo da derivada, alisamento e centrar na média.

1.8.1. Centrar na média

A transformação mais comum é centrar os dados na média. Esta operação foi feita na matriz de dados das medidas espectrais (X) e na matriz de dados da concentração (Y). Isto corresponde a subtrair o valor de cada elemento da coluna pelo valor médio dos elementos dessa coluna, resultando numa matriz, onde todas as colunas têm média zero. Esta operação geralmente reduz a dimensão do modelo³⁵.

1.8.2. Alisamento

O procedimento de alisamento é dado por uma média móvel. Neste procedimento é empregado um número de pontos fixos, onde os dados são ordenados em grupos. O primeiro grupo é formado com esse número de pontos, que corresponde aos primeiros valores. Obtém-se a média para o ponto central desse grupo usando a série de valores à esquerda e à direita do ponto central, onde cada número do bloco é multiplicado pelo valor correspondente tabelado. O próximo grupo é formado movendo-se um ponto acima do primeiro valor, obtendo-se da mesma forma a média para o ponto

central desse grupo, assim sucessivamente são formados os grupos seguintes e obtidos os valores médios para cada grupo. O ajuste dos pontos é feito pelo critério dos mínimos quadrados.

A característica do procedimento é que os ruídos são reduzidos aproximadamente pela raiz quadrada do número de pontos usados na convolução. O cálculo da derivada foi usado para reduzir as diferentes variações entre os espectros e o alisamento para reduzir os efeitos de ruídos³².

1.8.3. Correção do Fator Multiplicativo do Sinal (MSC)

Esta correção pode ser generalizada como correção do sinal multiplicativo e foi originalmente desenvolvida para corrigir as variações do espalhamento da luz para as medidas de reflectância difusa no infravermelho próximo (NIR)⁷⁹. Esta variação tem um forte componente multiplicativo, por isto foi chamada de correção do espalhamento multiplicativo.

O espalhamento para cada amostra é estimado em relação ao de uma amostra de referência. Cada espectro da amostra é corrigido de forma que todas as amostras tenham o mesmo nível de espalhamento da amostra de referência.

Essa correção assume que o coeficiente de espalhamento é o mesmo para todos os comprimentos de onda. A variação do espalhamento devido às variações químicas é ignorada. A versão MSC é baseada num simples modelo linear.

$$x = a + b x' \quad (16)$$

onde:

x simboliza o espectro da amostra, x' simboliza o espectro da amostra de referência (o espectro médio), “a” idealmente representa as informações químicas em x e “b” são os resíduos. Para cada amostra a e b são estimados pela regressão dos mínimos quadrados. O espectro corrigido x_c para cada comprimento de onda é calculado²³.

$$x_c = (x - a)/b \quad (17)$$

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é o de avaliar a utilização da espectroscopia na região do infravermelho próximo e médio, com reflectância difusa, utilizando processos de calibração multivariada (PLS) no desenvolvimento de metodologias simples, rápidas e não destrutivas para determinação simultânea de princípios ativos em produtos farmacêuticos e a utilização da Análise por Componentes Principais (PCA) para identificar diferenças entre as amostras de medicamentos.

Dentro deste objetivo principal procurou-se ainda, otimizar os modelos de regressão multivariada, fazendo uso de ferramentas de pré-processamento de dados espectroscópicos, afim de se obter os menores valores de erro possíveis.

Desta maneira, busca-se uma metodologia, empregando-se calibração multivariada, que permita a obtenção de modelos de regressão robustos que possam ser facilmente utilizados no setor de medicamentos.

3- PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Estratégia para o Desenvolvimento dos Modelos

O esquema abaixo mostra a estratégia utilizada para o desenvolvimento dos modelos de calibração multivariada (PLS) para determinação simultânea dos princípios ativos do Buscopan Composto®.

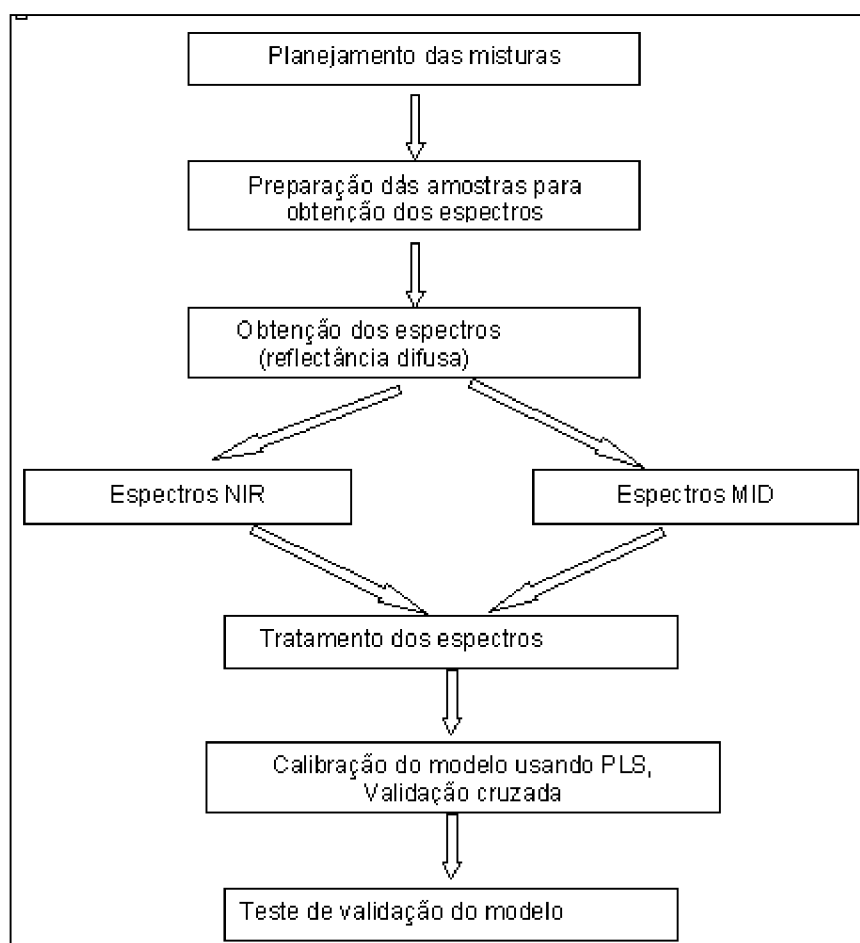


Figura 5. Fluxograma do desenvolvimento experimental utilizado

3.2. Reagentes

Brometo de *N*-butilescopolamina grau farmacêutico foi gentilmente doado pela Sintofarma Laboratórios S/A e Dipirona sódica monohidratada grau

farmacêutico foi doado pela Maniderma Farmácia de Manipulação e Homeopatia.

Comprimidos de Buscopan®, Novalgina® e Buscopan Composto® foram adquiridos em farmácias.

Comprimidos de Buscopan Composto® são rotulados contendo 10 mg de BNBE e 250 mg de dipirona sódica, comprimidos de Buscopan® contendo 10 mg de BNBE e Novalgina® contendo 500mg de dipirona sódica.

3.3. Planejamento Analítico

A série de calibração foi definida a partir de informações da composição do Buscopan Composto® encontrado comercialmente.

Primeiramente dez comprimidos de Buscopan Composto® foram pesados em balança analítica e determinada a massa média de um comprimido:

$$\text{Massa média} = (m_1 + m_2 + m_3 + \dots + m_{10}) / 10 = 0,433 \text{ g}$$

Levando-se em consideração que cada comprimido contém teoricamente 10 mg de BNBE e 250 mg de Dipirona, foi determinada a massa média teórica (m/m) dos princípios ativos em um comprimido.

$$\text{BNBE} = 10 \text{ mg} / 0,433 \text{ g} = 23,09 \text{ mg/g}$$

$$\text{Dipirona} = 250 \text{ mg} / 0,433 \text{ g} = 577,37 \text{ mg/g}$$

Para confirmação dos teores de BNBE e dipirona neste medicamento foi utilizada a técnica de cromatografia de alta eficiência (CLAE), cujas análises foram feitas pelo Laboratório de Medicamentos do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

O resultado obtido (média de três determinações) para os teores de cada um dos princípios ativos presentes no Buscopan Composto® foi de 24,18 mg/g de BNBE e 513,39 mg/g de dipirona.

Baseado nestes valores as séries de amostras padrão de calibração e validação foram preparadas de forma a cobrir as variações admitidas pelos órgãos de fiscalização (+/- 10%) e outras possíveis variações (Tabela 2).

3.4. Preparação Das Amostras de Calibração e Validação

Os padrões de calibração e validação foram preparados utilizando-se comprimidos de Buscopan® encontrados comercialmente e que contém apenas BNBE e excipientes e comprimidos de Novalgina® que contém apenas dipirona sódica e excipientes.

Dez comprimidos de cada um desses medicamentos foram pesados em balança analítica e determinada a massa média:

Massa média Buscopan® $= (m_1 + m_2 + m_3 + \dots + m_{10}) / 10 = 0,15$ g cada comprimido

Massa média Novalgina® $= (m_1 + m_2 + m_3 + \dots + m_{10}) / 10 = 0,525$ g cada comprimido

Em seguida foram triturados em almofariz e analisados por CLAE no Laboratório de Medicamentos do TECPAR e determinadas as quantidades de cada um dos princípios ativos existentes em cada um dos medicamentos, obtendo-se os seguintes resultados (média de três determinações):

Buscopan® = 10,47 mg de BNBE por comprimido e

Novalgina® = 426,06 mg de Dipirona por comprimido

A partir destes resultados foram calculadas as concentrações de cada princípio ativo em mg/g.

Considerando-se esses valores de concentrações encontrados por CLAE, quantidades precisas de cada um desses medicamentos foram pesadas em proporções adequadas conforme mostrado na tabela 2.

Após homogeneização de cada amostra, os espectros de reflectância difusa foram registrados.

Tabela 2. Concentração de brometo de *N*-butilscopolamina e dipirona sódica presente nas amostras usadas na calibração e validação do modelo.

padrão	BNBE (mg/g)	Dipirona (mg/g)
1	23,14	569,50
2	22,00	552,90
3	22,51	546,90
4	23,05	540,61
5	23,61	534,02
6	23,65	533,50
7	24,30	526,00
8	24,70	521,30
9	26,34	502,00
10	26,98	494,46
11	27,24	491,47
12	28,37	478,23
13	29,11	469,48
14	29,63	463,38
15	30,73	450,51
16	22,42	547,92
17	21,83	554,84
18	23,57	534,47
19	24,12	528,04
20	24,97	518,08
21	25,30	514,24
22	25,73	509,18
23	25,93	506,82
24	27,66	486,55
25	28,03	482,17

3.5. Obtenção dos Espectros na região do infravermelho próximo e médio por reflectância difusa

Os espectros de reflectância dos padrões sintéticos e das amostras foram obtidos no espectrofotômetro Excalibur (modelo FTS-4000 Bio-Rad), equipado com “beamsplitter” de KBr, detector de sulfeto de triglicerina deuterada (DTGS), fonte de radiação de carbeto de silício e acessório de reflectância difusa.

Os espectros de NIR foram obtidos na faixa de $7500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ($1330 - 2500 \text{ nm}$) com resolução de 4 cm^{-1} e média de 64 varreduras.

Os espectros de MID foram obtidos na faixa entre 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e média de 64 varreduras.

Tanto na região do NIR como na região do MID foi utilizado KBr como branco.

3.6. Pré-Tratamento dos dados espectroscópicos

Os espectros na região do infravermelho próximo e médio foram convertidos em $\log(1/R)$, alisados, aplicados MSC e calculadas a primeira e segunda derivada de cada um deles.

Os dados foram processados utilizando os programas Origin 6.1 e Matlab versão 4.0 com rotinas do Matlab.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As figuras 6 e 7 mostram as estruturas do BNBE e da dipirona sódica, os princípios ativos presentes no medicamento Buscopan Composto® utilizados neste estudo e as figuras 8 e 9 mostram os espectros na região do infravermelho médio e próximo de seus padrões puros.

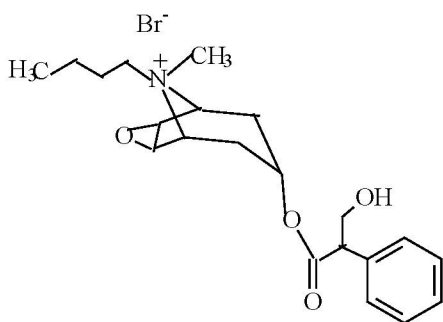


Fig.6. Brometo de N-Butilescopolamina

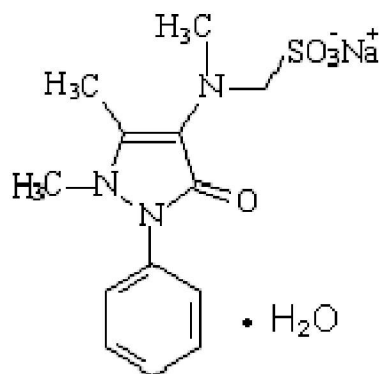


Fig.7. Dipirona Sódica monohidratada

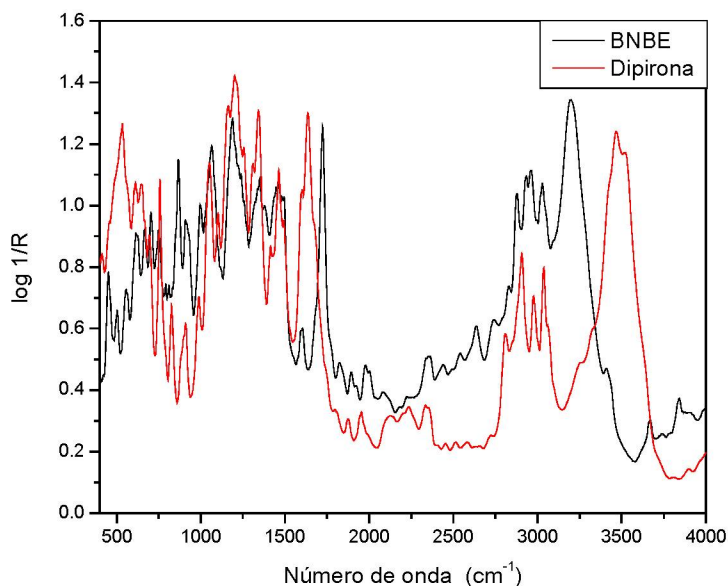


Figura 8. Espectros dos padrões puros de Dipirona e BNBE na região do infravermelho médio (MID).

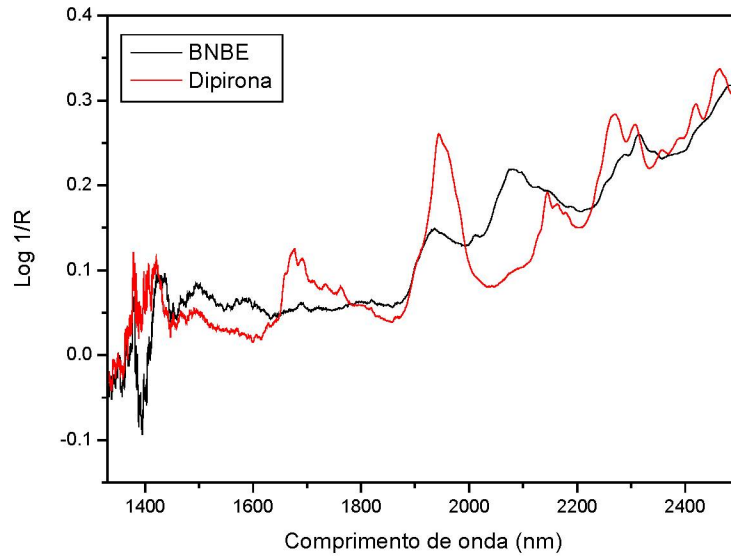


Figura 9. Espectros dos padrões puros de Dipirona e BNBE na região do infravermelho próximo (NIR).

Como podemos observar nas figuras 10 e 12, os espectros de reflectância são caracterizados por amplas variações de linhas de base resultante dos altos efeitos de espalhamento.

Na condição de minimizar essas variações, foi aplicada a correção do sinal multiplicativo (MSC), as figuras 11, 13 e 14 mostram os espectros obtidos após esta correção.

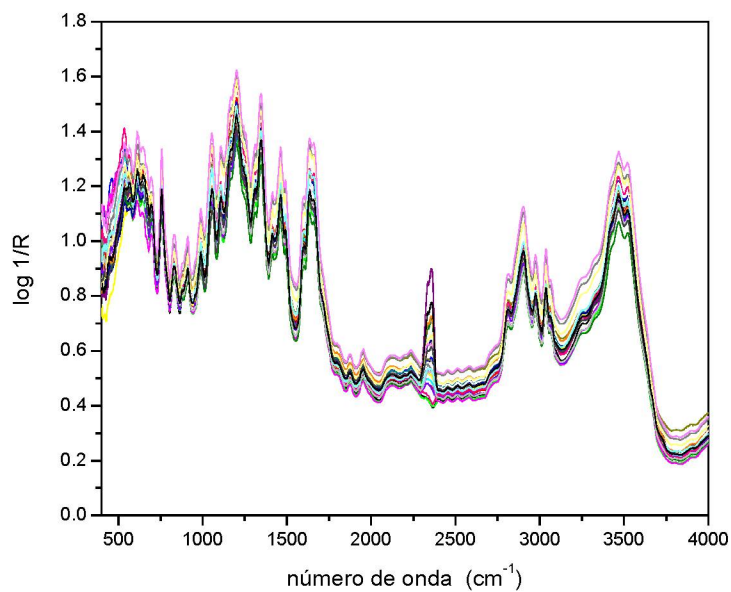


Figura 10. Espectros alisados dos padrões sintéticos de Buscopan Composto® na região do infravermelho médio (MID).

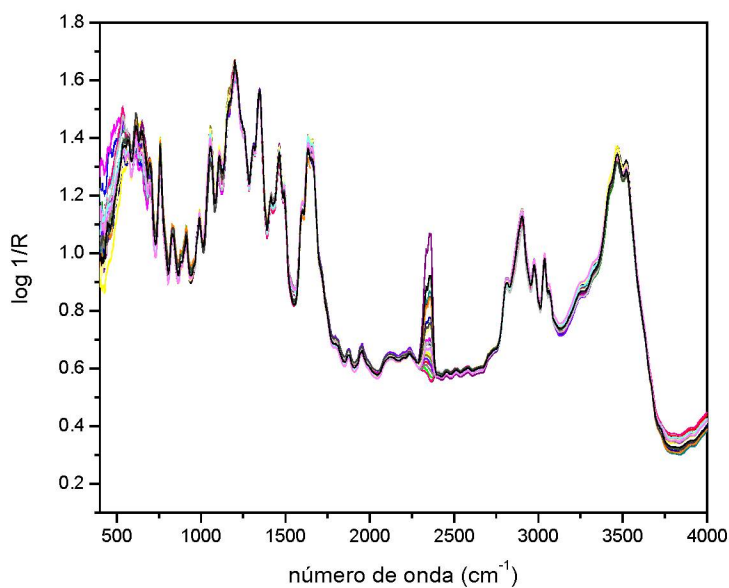


Figura 11. Espectros alisados dos padrões sintéticos de Buscopan Composto® na região do infravermelho médio (MID) com MSC.

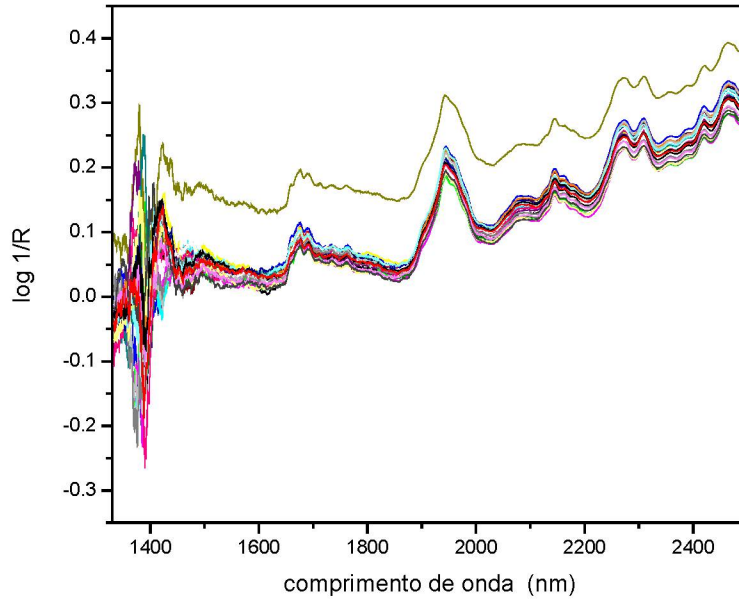


Figura 12. Espectros alisados dos padrões sintéticos de Buscopan Composto® na região do infravermelho próximo (NIR).

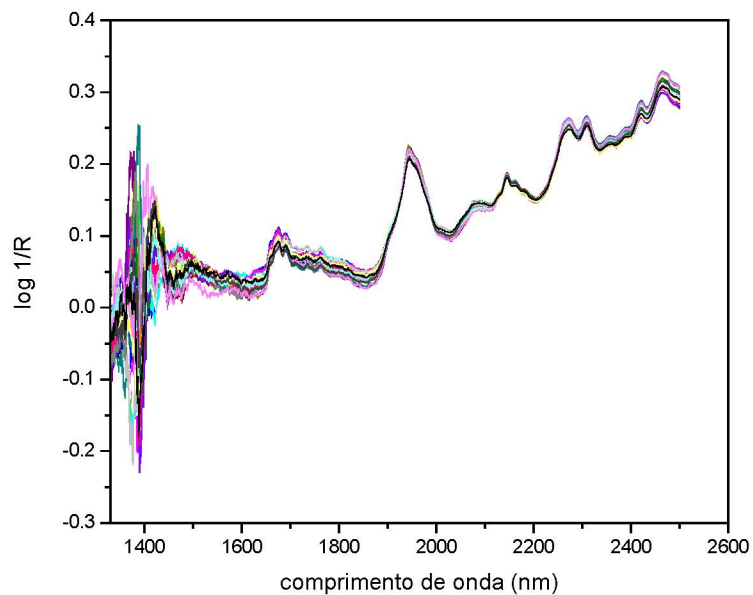


Figura 13. Espectros alisados dos padrões sintéticos de Buscopan Composto® na região do infravermelho próximo (NIR) com MSC.

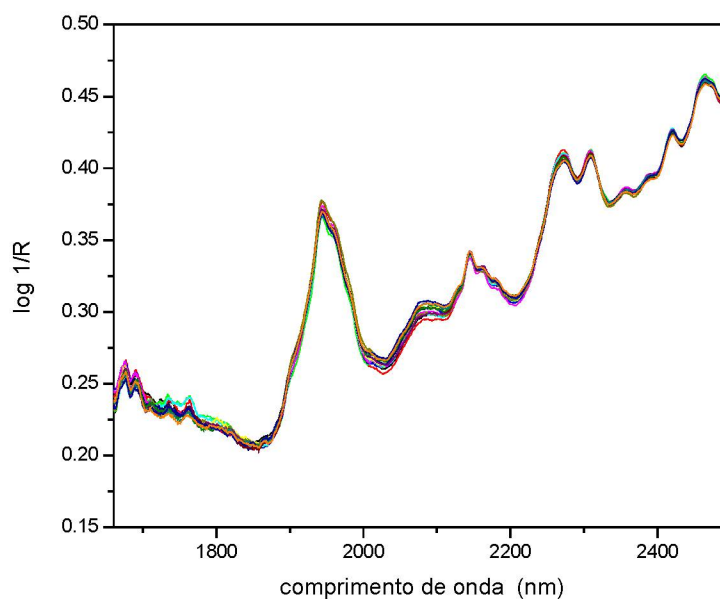


Figura 14. Espectros alisados dos padrões sintéticos de Buscopan Composto® na região do infravermelho próximo (1634-2500nm) com MSC.

4.1. Análise das Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais é uma maneira eficiente de mostrar variações nos dados multivariados. Ela foi utilizada para diferenciar as amostras e correlacionar as variações espectrais com os diferentes excipientes.

As amostras de 1 a 25 da tabela 2 são as amostras sintéticas que apresentam excipientes diferentes das amostras de 26 a 32 que são amostras genuínas de Buscopan Composto® encontradas comercialmente.

A análise representada pelos escores em duas dimensões, utilizando toda a faixa espectral do MID (figura 11) e a região espectral de 1634-2500nm do NIR (figura 14), foi executada com o objetivo de identificar semelhanças e diferenças entre as amostras, uma vez que essas amostras apresentam composições diferentes.

As figuras 15 e 16 mostram os gráficos dos escores obtidos na análise dos componentes principais das amostras utilizadas aplicando-se a segunda e terceira componente principal para diferenciar os grupos.

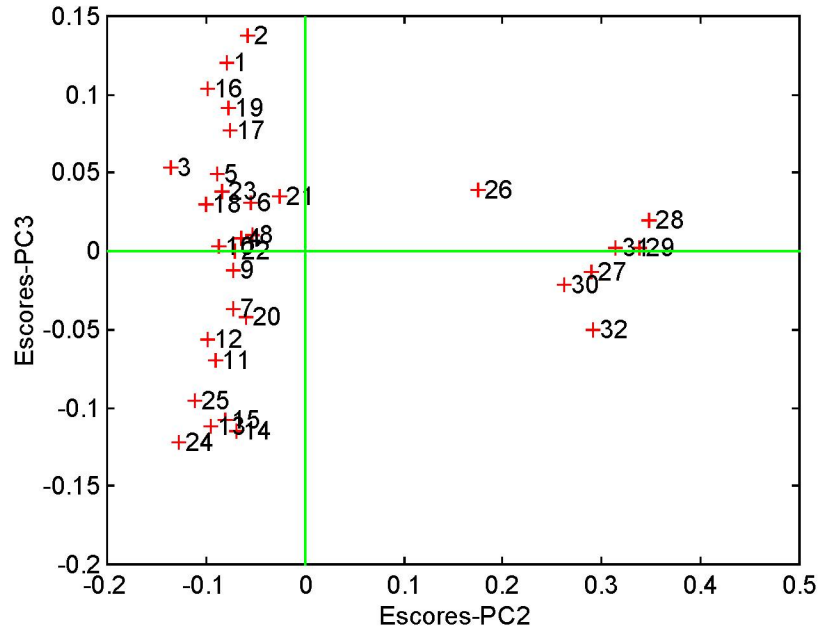


Figura 15. Gráfico dos escores de PC2 x PC3 na região do NIR

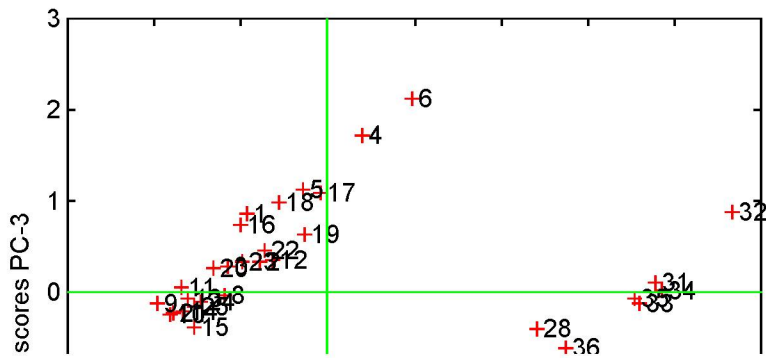


Figura 16. Gráfico dos escores de PC2 x PC3 na região do MID

As classificações dos dados multivariados são expressas em termos de similaridade das amostras. A segunda componente principal é a responsável pela discriminação de dois grupos de amostras: um grupo formado pelas amostras sintéticas (1-25) e outro grupo formado pelas amostras genuínas (26-32) na região do infravermelho próximo e na região do infravermelho médio (26-36), sendo que dentro de um mesmo grupo ocorre uma dispersão das amostras, o que é devido a variação na concentração das mesmas. Desta forma conclui-se que através da análise de PCA é possível identificar amostras diferentes deste medicamento. A diferença entre os dois grupos é devida a presença dos excipientes.

4.2. Construção do Modelo de Calibração na Região do Infravermelho Próximo

Para extração relevante das informações obtidas nos espectros dos padrões foi utilizada a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). O PLS é uma boa alternativa para construção de modelos, como os métodos de regressão linear múltipla (MLR) e regressão por componentes principais²³ (PCR), por serem métodos muito robustos, pois permitem que as variáveis relevantes sejam automaticamente determinadas, e somente essas variáveis são incluídas no modelo.

O modelo de calibração foi desenvolvido utilizando quinze misturas sintéticas selecionadas que correspondem aos padrões de 1 a 15 da tabela 2.

Para a construção dos modelos, foi analisado o intervalo de 1333-1860 nm que apresentam informações relevantes relacionadas aos componentes das misturas (figura 17), pois nesse intervalo dos espectros encontram-se os

primeiros “sobretens” das vibrações C-H de CH₃, C-H de CH₂ e de O-H, característicos dos compostos em estudo. O fato de a dipirona ser monohidratada aparece uma banda de reflectância em 1940 nm relativa ao grupo OH da molécula de água.

Por outro lado, podemos observar na figura 17, que existem problemas relacionados com a baixa razão sinal/ruído no intervalo de 1330-1633 nm, em função deste problema esta região espectral foi excluída e os modelos foram construídos utilizando o intervalo de 1634-1860 nm.

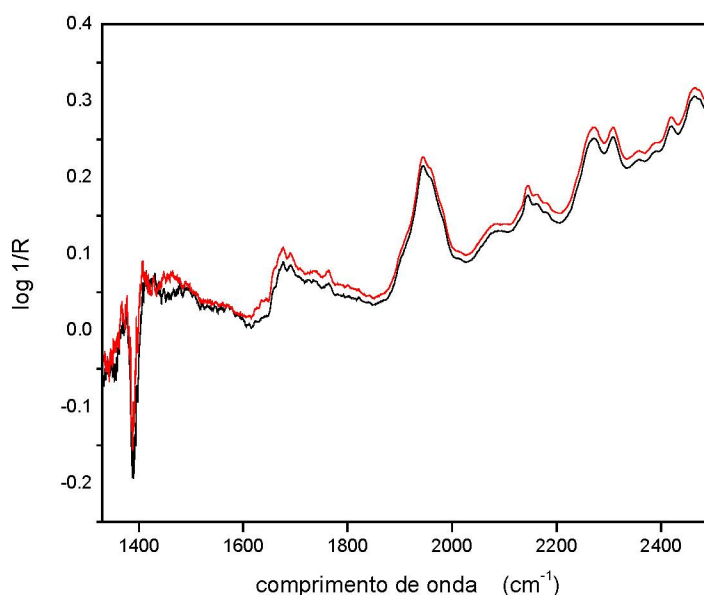


Figura 17. Espectros na região do infravermelho próximo de duas amostras de Buscopan Composto® por reflectância difusa após alisamento

4.3. Determinação do número de componentes principais para a construção do modelo na região do infravermelho próximo

O número de componentes principais (cp) foi otimizado a partir de uma rotina de validação cruzada utilizando-se o processo que deixa uma amostra de

fora, onde de uma série de amostras n , $n-1$ amostras são usadas na calibração e é feita a previsão da concentração da amostra que não foi utilizada.

Os resultados deste estudo são apresentados nas figuras 18 e 19 e mostram que o menor erro de previsão (PRESS) utilizando a primeira e segunda derivada, respectivamente, é conseguido empregando-se 8 componentes principais.

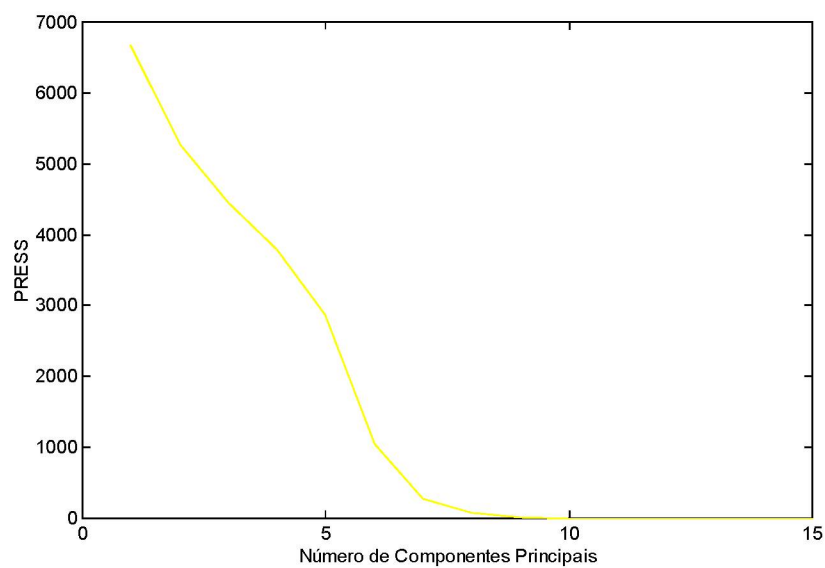


Figura 18. Gráfico do PRESS em função do número de componentes principais utilizando os espectros na região do infravermelho próximo aplicada a primeira derivada.

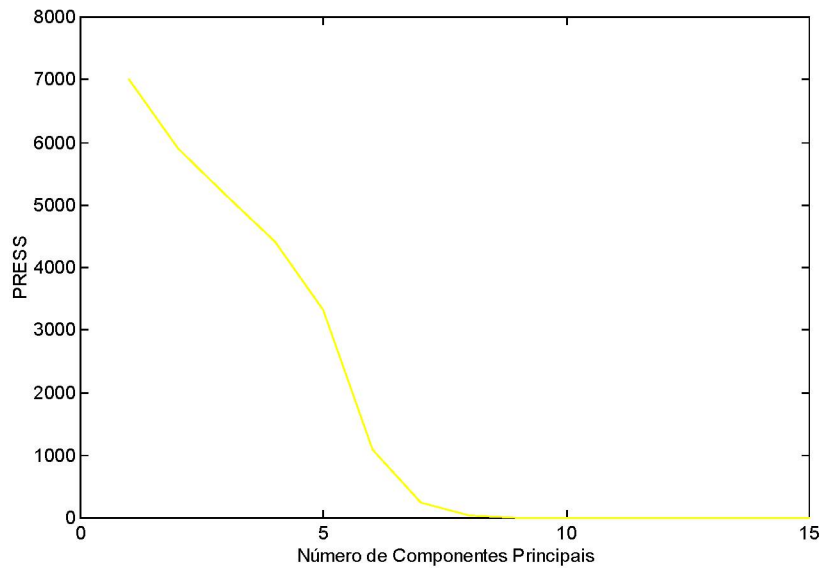


Figura 19. Gráfico do PRESS em função do número de componentes principais utilizando os espectros na região do infravermelho próximo aplicada a segunda derivada.

Entretanto, observando-se a percentagem de variância capturada pelo modelo (tabelas 3 e 4) verifica-se que as quatro primeiras componentes principais explicam grande parte da variância dos dados da concentração (mais de 99%). A captura de 100% da variância dos dados de concentração utilizando uma grande parcela da variância dos dados espectrais pode implicar em um super ajuste do modelo²⁸, incluindo sinais referentes, por exemplo, ao ruído instrumental. Desta maneira modelos com 8, 4 e 3 componentes principais foram desenvolvidos utilizando os dados alisados e aplicados a primeira e segunda derivada.

Tabela 3. Porcentagem de variância capturada pelo modelo PLS na região do NIR utilizando a primeira derivada.

cp	Bloco X (espectros)		Bloco Y (concentração)	
	Esta cp	Total	Esta cp	Total
1	34,12	34,12	78,43	78,43
2	18,82	47,94	14,79	93,22
3	12,26	60,20	5,41	98,63
4	4,99	65,19	0,72	99,35
5	4,48	69,67	0,14	99,49
6	1,55	71,22	0,40	99,88
7	3,12	74,34	0,09	99,98
8	3,68	78,02	0,02	100,00

Tabela 4. Porcentagem de variância capturada pelo modelo PLS na região do NIR utilizando a segunda derivada.

cp	Bloco X (espectros)		Bloco Y (concentração)	
	Esta cp	Total	Esta cp	Total
1	35,83	35,83	76,77	76,77
2	12,70	48,53	15,28	92,05
3	11,83	60,36	6,28	98,33
4	5,08	65,43	0,93	99,26
5	4,03	69,46	0,17	99,43
6	2,57	72,03	0,03	99,73
7	2,70	74,73	0,23	99,96
8	3,53	78,26	0,03	99,99

Os coeficientes de regressão obtidos para os modelos utilizando primeira e segunda derivada com 3 componentes principais são apresentados nas

figuras 20 e 21, respectivamente. As variáveis 0 à 780 correspondem ao intervalo espectral de 1860-1634 nm.

Com base nesta figura é possível verificar que toda a faixa espectral processada é importante para a modelagem, pois os coeficientes de regressão são significativos para ambos componentes da mistura.

Uma correlação mais intensa com a dipirona é observada, o que era esperado, uma vez que a sua concentração é significativamente maior nas misturas utilizadas.

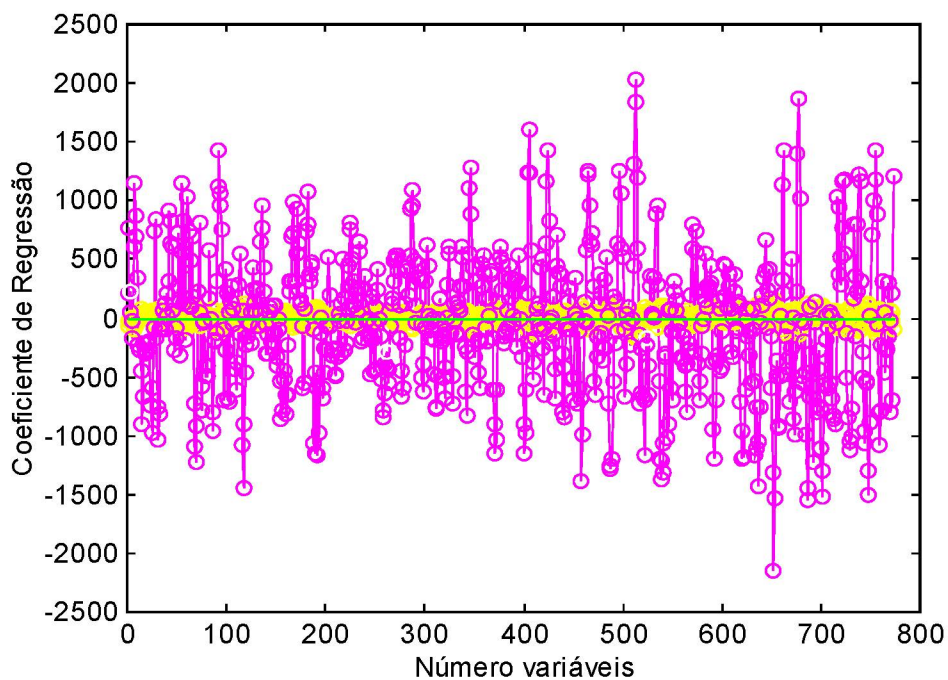


Figura 20. Gráfico do Coeficiente de regressão x número de variáveis utilizando a primeira derivada e 3 cp na região do NIR:

● Dipirona ● BNBE

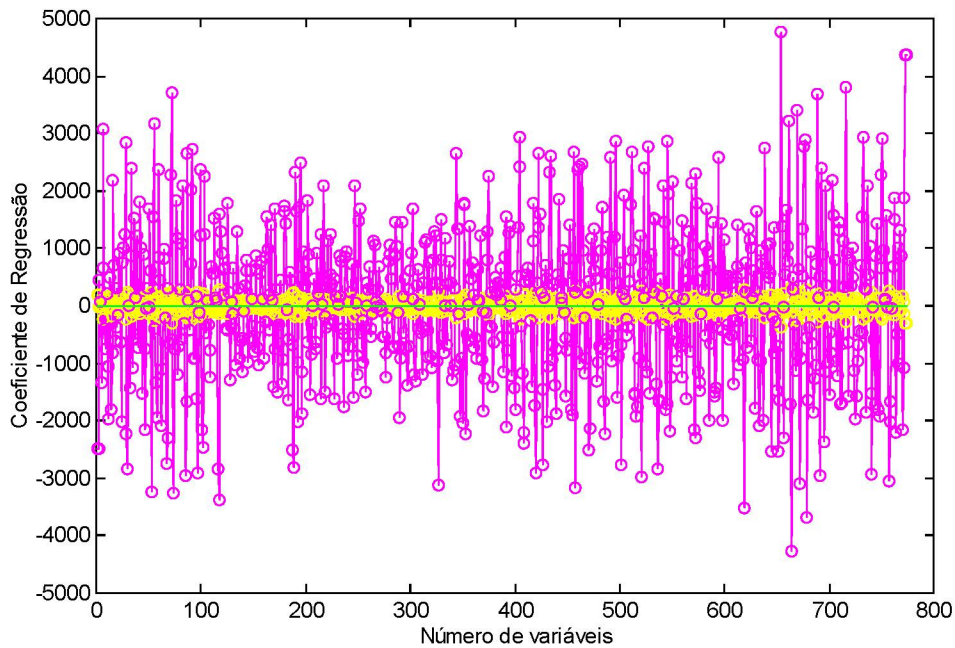


Figura 21. Gráfico do Coeficiente de regressão x número de variáveis utilizando a segunda derivada e 3 cp na região do NIR:

● Dipirona ● BNBE.

4.4. Identificação de Amostras Anômalas no modelo construído na região do NIR

Além do desenvolvimento de modelos multivariados de calibração, a rotina computacional utilizada permite a identificação de amostras anômalas (outliers), a partir de dois critérios relevantes: o “leverage” e resíduos de “Students”.

O primeiro “leverage”, pode ser considerado como um parâmetro de influência, associado à distância existente entre os espectros e o centróide definido para o conjunto de espectros.

Este parâmetro apresenta um valor limite definido pela expressão $3p/n$, onde p representa o número de componentes principais utilizadas no desenvolvimento do modelo e n o número de padrões de calibração. Para o

modelo, onde foram utilizadas 3 componentes principais o valor limite corresponde a 0,6 (3x3/15).

Observando-se as figuras 22 e 23 nota-se a inexistência de anomalias associadas a este parâmetro, uma vez que o maior valor observado para o “leverage” foi um pouco acima de 0,5 para o modelo processado com a primeira derivada e inferior a 0,5 para o modelo processado com segunda derivada.

O segundo critério estatístico utilizado é representado pelo valor dos resíduos de Students. Considerando-se uma distribuição normal dos resíduos, dentro de um limite de confiança de 95%, o valor máximo estabelecido para este parâmetro corresponde a +/- 2,5.

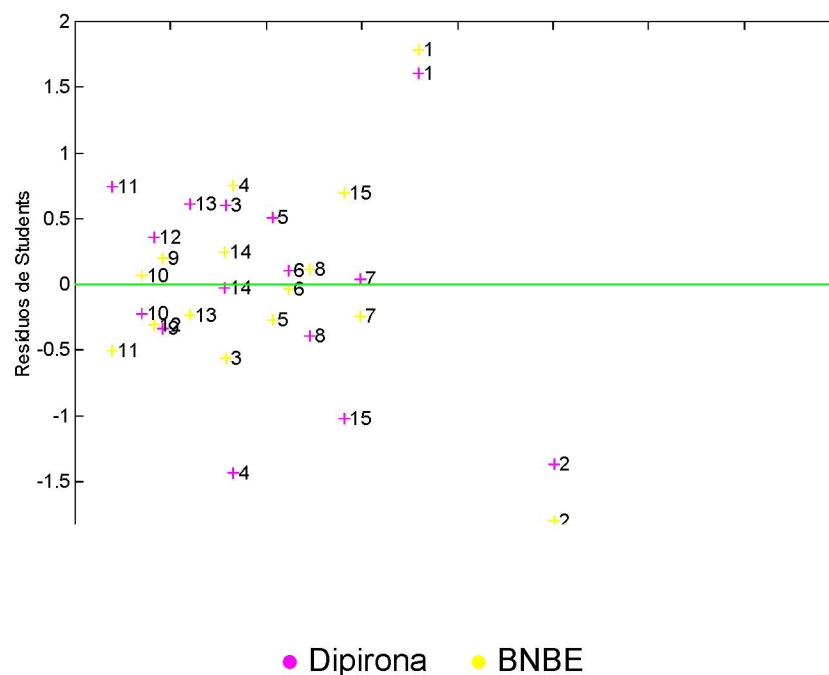


Figura 22. Resíduos Students versus “leverage” para o modelo processado utilizando a primeira derivada e 3 componentes principais na região do NIR.

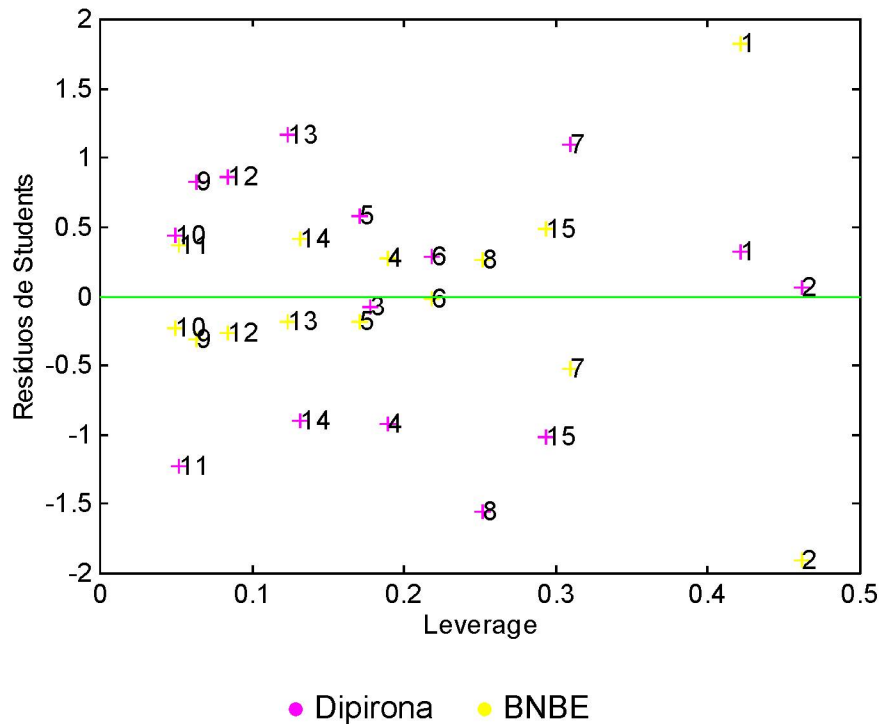


Figura 23. Resíduos Students versus “leverage” para o modelo processado utilizando a segunda derivada 3 componentes principais na região do NIR.

Os valores observados tanto para o modelo processado utilizando a primeira e segunda derivada não ultrapassaram o valor de +/- 2,0 (Figuras 22 e 23), portanto existência de anomalias no conjunto de calibração foi desta maneira descartada.

Para avaliar a qualidade dos modelo de calibração na região do NIR foi determinado o erro relativo entre os dos valores de concentrações reais com os valores de concentrações previstos, que podem ser observados nas tabelas 5 à 8.

Podemos observar que os menores erros encontrados para determinação de dipirona e BNBE foram os relativos aos modelos processados com oito componentes principais, tanto para 1ª e 2ª derivadas. O que significa que uma

melhor correlação foi obtida para este modelo quando comparado com os modelos processados com 3 e 4 componentes.

Já para o BNBE os modelos de calibração processados utilizando 3 e 4 componentes principais, tanto para 1ª. e 2ª. derivadas, não apresentaram diferenças significativas (tabelas 7 e 8).

Tabela 5. Valores reais e valores previstos de Dipirona e erro relativo obtidos pelos modelos de calibração construídos utilizando primeira derivada na região do NIR.

Pd	(mg/g)	Previstos 1ª derivada (mg/g)					
	Reais	8cp	%Erro	4cp	%Erro	3cp	%Erro
1	569,46	569,48	0,00	569,17	0,05	562,66	1,20
2	552,90	552,90	0,00	553,11	0,04	558,01	0,93
3	546,90	546,93	0,01	547,60	0,13	543,98	0,53
4	540,61	540,62	0,00	540,35	0,05	547,55	1,28
5	534,02	534,00	0,00	534,24	0,04	531,63	0,45
6	533,50	533,48	0,00	532,99	0,09	533,02	0,09
7	526,00	526,10	0,02	526,11	0,02	525,85	0,03
8	521,30	521,25	0,01	519,89	0,27	523,12	0,35
9	502,00	501,97	0,00	504,15	0,43	503,69	0,34
10	494,50	494,41	0,01	495,20	0,15	495,63	0,24
11	491,50	491,45	0,00	490,27	0,24	487,62	0,78
12	478,23	478,21	0,00	478,25	0,00	476,41	0,38
13	469,50	469,51	0,01	468,09	0,30	466,47	0,64
14	463,38	463,38	0,00	463,82	0,09	463,51	0,03
15	450,51	450,54	0,01	450,99	0,11	455,09	1,01

Tabela 6. Valores reais e valores previstos de Dipirona e erro relativo obtidos pelos modelos de calibração construídos utilizando a segunda derivada na região do NIR.

Pd	(mg/g)	Previstos 2ª derivada (mg/g)					
	Reais	8cp	%Erro	4cp	%Erro	3cp	%Erro
1	569,46	569,48	0,00	569,36	0,02	568,54	0,17
2	552,90	552,89	0,00	553,03	0,02	552,70	0,03
3	546,90	546,88	0,00	546,80	0,02	547,14	0,04
4	540,61	540,57	0,01	540,83	0,04	543,79	0,59
5	534,02	534,07	0,01	532,94	0,20	532,00	0,38
6	533,50	533,52	0,00	534,37	0,16	532,53	0,18
7	526,00	525,95	0,01	525,79	0,04	522,53	0,66
8	521,30	521,33	0,01	520,52	0,15	526,46	0,99
9	502,00	502,05	0,01	502,74	0,15	498,96	0,61
10	494,50	494,49	0,00	494,14	0,07	492,84	0,33
11	491,50	491,46	0,00	493,03	0,32	496,03	0,93
12	478,23	478,25	0,00	478,38	0,03	475,06	0,66
13	469,50	469,42	0,01	468,65	0,18	465,31	0,89
14	463,38	463,36	0,00	463,28	0,02	466,57	0,69
15	450,51	450,52	0,00	450,39	0,02	453,78	0,73

Tabela 7. Valores reais e valores previstos de BNBE e erro relativo obtidos pelos modelos de calibração construídos utilizando primeira derivada na região do NIR.

Pd	(mg/g)	Previstos 1ª derivada (mg/g)					
	Reais	8cp	%Erro	4cp	%Erro	3cp	%Erro
1	23,14	23,14	0,01	22,26	3,83	22,18	4,17
2	21,83	21,84	0,01	22,64	3,67	22,70	3,95
3	22,51	22,53	0,07	22,90	1,75	22,86	1,55
4	23,05	23,04	0,05	22,49	2,40	22,58	2,02
5	23,61	23,61	0,02	23,81	0,84	23,77	0,70
6	23,66	23,65	0,01	23,67	0,08	23,67	0,08
7	24,29	24,34	0,18	24,43	0,58	24,43	0,57
8	24,69	24,67	0,09	24,59	0,42	24,63	0,26
9	26,34	26,32	0,09	26,22	0,47	26,21	0,49
10	26,98	27,00	0,06	26,93	0,18	26,94	0,16
11	27,24	27,20	0,13	27,61	1,36	27,57	1,24
12	28,37	28,34	0,09	28,59	0,78	28,56	0,70
13	29,11	29,15	0,12	29,28	0,57	29,26	0,51
14	29,63	29,61	0,06	29,48	0,50	29,48	0,52
15	30,73	30,75	0,08	30,28	1,45	30,33	1,29

Tabela 8. Valores reais e valores previstos de BNBE e erro relativo obtidos pelos modelos de calibração construídos utilizando a segunda derivada na região do NIR.

Pd	(mg/g)	Previstos 2ª derivada (mg/g)					
	Reais	8cp	%Erro	4cp	%Erro	3cp	%Erro
1	23,14	23,12	0,10	21,78	5,89	21,83	5,64
2	21,83	21,86	0,13	23,13	5,93	23,15	6,03
3	22,51	22,53	0,10	22,60	0,39	22,57	0,28
4	23,05	22,98	0,31	23,02	0,12	22,81	1,01
5	23,61	23,60	0,03	23,70	0,38	23,76	0,65
6	23,66	23,70	0,20	23,54	0,47	23,67	0,07
7	24,29	24,30	0,04	24,47	0,74	2,70	1,67
8	24,69	24,76	0,26	24,89	0,81	2,48	0,86
9	26,34	26,42	0,31	26,36	0,08	2,62	1,08
10	26,98	26,86	0,45	27,10	0,43	2,19	0,77
11	27,24	27,21	0,08	27,10	0,50	2,89	1,26
12	28,37	28,30	0,22	28,37	0,01	2,60	0,83
13	29,11	29,15	0,13	29,04	0,25	2,27	0,54
14	29,63	29,3	0,33	29,50	0,45	2,27	1,22
15	30,73	30,5	0,38	30,58	0,49	30,34	1,26

Para uma melhor visualização destes dados podemos observar os gráficos da correlação de calibração e validação no Apêndice B.

4.5. Validação do Modelo PLS na região do NIR

A próxima etapa na construção do modelo PLS é a validação, que consiste em prever a concentração dos dois princípios ativos em um grupo de misturas sintéticas que não foram utilizadas na construção do modelo de calibração. Com esta finalidade foi utilizado um segundo grupo de 10 misturas sintéticas que correspondem aos padrões 16 –25 da tabela 2.

A qualidade do modelo de calibração foi avaliada comparando-se o erro padrão de calibração SEC (eq.13) com o erro padrão de previsão SEP (eq.13 com $p = 0$), obtidos diante do conjunto de validação na região do NIR.

Os valores do SEC, SEP e coeficiente de correlação de calibração e validação obtidos na construção dos modelos processados na região do NIR estão apresentados na tabela 9.

Podemos observar que os coeficientes de correlação de calibração obtidos utilizando a primeira, bem como, a 2a. derivada, não apresentaram variações significativas para a determinação de ambos componentes nas misturas. Entretanto analisando os coeficientes de correlação de validação, observa-se que os modelos desenvolvidos utilizando a 2a. derivada, apresentam melhores correlações e não apresentam variações significativas em virtude da variação do número de componentes principais.

Comparando-se os valores de SEC e SEP observamos que não há diferença significativa entre os valores utilizando primeira e segunda derivadas e que esses valores são mais próximos para o BNBE do que para a dipirona, por outro lado os coeficientes de correlação obtidos para a dipirona são melhores do que aqueles obtidos para o BNBE, provavelmente pelo fato da

dipirona ser o componente em maior quantidade nas misturas. A partir destes parâmetros podemos confirmar uma boa habilidade de previsão dos modelos.

Tabela 9. Estatísticas de otimização dos modelos PLS utilizando os espectros na região do NIR (1634-1860nm).

Componentes	derivada	Nº de cp	SEC (mg/g)	SEP (mg/g)	R Calibração	R Validação
BNBE	1 ^a	8	0,04	1,23	0,9999	0,8292
	1 ^a	4	0,49	1,27	0,9894	0,8398
	1 ^a	3	0,47	1,26	0,9893	0,8406
	2 ^a	8	0,09	1,41	0,9997	0,8294
	2 ^a	4	0,61	1,31	0,9836	0,8512
	2 ^a	3	0,63	1,34	0,9808	0,8455
Dipirona	1 ^a	8	0,06	12,75	1,0000	0,8853
	1 ^a	4	1,10	12,89	0,9997	0,8820
	1 ^a	3	4,17	13,06	0,9947	0,8799
	2 ^a	8	0,05	13,61	1,0000	0,8869
	2 ^a	4	0,81	13,61	0,9998	0,8861
	2 ^a	3	3,51	13,93	0,9963	0,8818

Finalmente, a capacidade preditiva dos modelos construídos foi testada frente a amostras reais (medicamentos comercialmente disponíveis) contendo a mistura estudada (Buscopan Composto®).

As Tabelas 10 e 11 mostram os resultados obtidos na determinação simultânea de BNBE e dipirona em comprimidos de Buscopan Composto® utilizando os modelos propostos.

Os resultados previstos pelos modelos para determinação de dipirona são inferiores, em todos os casos (1ª. e 2ª. derivada,) aos valores nominais (577,44 mg/g) e superiores para a determinação de BNBE (23,09 mg/g).

Comparando-se estes valores com os previstos pelo método de referência, observa-se que os valores obtidos pelos modelos são superiores, sendo que os valores obtidos para a dipirona são mais próximos do valor nominal.

Tabela 10. Valores previstos pelos modelos desenvolvidos na região do infravermelho próximo para BNBE.

Amostra	BNBE (mg/g)					
	1ª derivada			2ª derivada		
	8cp	4cp	3cp	8cp	4cp	3cp
1	24,72	25,03	25,02	24,34	24,26	24,39
2	25,90	25,92	25,89	24,51	24,34	24,41
3	25,26	25,38	25,35	24,73	24,57	24,62
4	25,08	25,24	25,21	24,35	24,29	24,44
5	24,63	24,64	24,59	24,23	23,94	24,00
6	25,56	25,78	25,75	24,05	24,06	24,08
7	25,09	25,35	25,31	24,42	24,32	24,32
Média	25,18	25,33	25,30	24,38	24,25	24,32
SD	0,45	0,43	0,44	0,21	0,20	0,22

Tabela 11. Valores previstos pelos modelos desenvolvidos na região do infravermelho próximo para dipirona sódica

Amostra	Dipirona (mg/g)					
	1ª derivada			2ª derivada		
	8cp	4cp	3cp	8cp	4cp	3cp
1	522,99	523,01	521,55	530,93	531,18	529,27
2	513,33	513,11	510,58	530,74	530,64	529,62
3	519,27	518,95	516,44	527,24	526,95	526,21
4	520,75	520,57	518,06	531,52	531,13	528,88
5	529,78	529,98	525,43	535,89	535,56	534,77
6	514,18	514,32	511,69	533,90	533,72	533,48
7	519,90	519,76	516,83	531,01	530,67	530,64
Média	520,03	519,96	517,22	531,60	531,41	530,41
SD	5,54	5,62	5,20	2,71	2,70	2,89

Também foi determinada a habilidade de previsão do método em termos da média da exatidão, que é a comparação dos resultados entre o método padrão (CLAE) e o método desenvolvido (NIR) e determina a exatidão que pode ser esperada para amostras de concentração desconhecida.

A exatidão é um procedimento que expressa a proximidade de concordância entre o valor de referência e o valor encontrado pelo método proposto.

Uma boa coerência pode ser observada na tabela 12, entre as médias dos valores determinados pela técnica cromatográfica e dos valores obtidos pelos modelos desenvolvidos. Foram obtidos erros abaixo de 1% para determinação de BNBE e abaixo de 3,6% para determinação de dipirona utilizando segunda derivada.

Tabela 12. Comparação entre os valores médios e erros relativos obtidos pelas técnicas CLAE e NIR.

Componentes		CLAE	NIR 1ª derivada			NIR 2ª derivada		
			8cp	4cp	3cp	8cp	4cp	3cp
Dipirona	Média	513,41	520,03	519,96	517,22	531,60	531,41	530,41
	%Erro		1,29	1,28	0,74	3,54	3,51	3,31
BNBE	Média	24,18	25,18	25,33	25,30	24,38	24,25	24,32
	%Erro		4,14	4,76	4,63	0,83	0,29	0,58

Desta maneira, podemos concluir que para determinação de BNBE o modelo processado com segunda derivada foi o que apresentou melhor capacidade preditiva, boa precisão e boa exatidão, enquanto que o modelo utilizando primeira derivada mostrou melhores resultados para determinação de Dipirona, quando comparados com o método padrão (CLAE).

No entanto, como o objetivo é desenvolver um único modelo para determinação simultânea dos dois componentes em misturas, considerou-se o modelo processado com 2ª. derivada e três componentes principais como o modelo mais simples e mais robusto para determinação simultânea de dipirona e BNBE em amostras de medicamentos utilizando espectroscopia no infravermelho próximo.

Em busca de resultados confiáveis, um estudo estatístico mais apurado foi realizado. Os resultados obtidos utilizando o método de referência (CLAE) e o método proposto foram comparados via teste F (Snedecor), que compara precisões entre o conjunto de referência (CLAE) e os demais conjuntos de resultados. Estas estimativas de variância são obtidas através da Eq. 18:

$$F = \frac{\text{Maior variância}}{\text{Menor variância}} \quad (18)$$

No caso da comparação entre as médias de dois conjuntos de dados, o teste t (Student) pode ser aplicado quando as precisões (teste F) não apresentarem diferença significativa. Esta estimativa é obtida pela Eq. 19:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_a (1/n_1 + 1/n_2)^{1/2}} \quad (19)$$

onde \bar{X}_1 representa a média do conjunto de referência, \bar{X}_2 a média do conjunto a ser comparado, n_1 e n_2 o número de medidas de cada um dos conjuntos e S_a a somatória das estimativas do desvio padrão (Eq. 20), dado por:

$$S_a = \frac{[(n_1 - 1) S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2]^{1/2}}{n_1 + n_2 - 2} \quad (20)$$

Sendo S_1 e S_2 a estimativa do desvio padrão do conjunto de referência e do conjunto a ser comparado, respectivamente.

Com o valor encontrado pelas equações 18 e 19 comparam-se o valor da distribuição F e t, respectivamente, com 95% de confiança.

A tabela 13 mostra os valores das médias, dos desvios padrão e as diferenças entre as médias e as diferenças entre os desvios padrão para as determinações de dipirona e BNBE obtidos por CLAE e pelo modelo processado utilizando 2ª derivada dos espectros e 3 componentes principais, na região do NIR.

Tabela 13: Valores das médias, dos desvios padrão, diferenças entre as médias e as diferenças entre os desvios padrão obtidos por CLAE e NIR.

	BNBE (NIR)	BNBE (CLAE)	$d = (x_N - x_C)$	Dipirona (NIR)	Dipirona (CLAE)	$s_d = SD_N - SD_C$
Média	24,32	24,18	0,14	530,41	513,41	17,00
SD	0,22	0,03	0,19	2,89	1,71	1,18

A detecção de diferenças sistemáticas entre os dois métodos foi determinada comparando a razão dos dois desvios padrão com o valor tabelado para a distribuição F, com graus de liberdade apropriados (tabela A.1, Apêndice).

O desvio padrão para o método NIR foi determinado utilizando-se 7 replicatas, logo temos 6 graus de liberdade, enquanto que por CLAE foram utilizadas 3 replicatas para BNBE e quatro replicatas para dipirona, temos então 2 e 3 graus de liberdade para BNBE e Dipirona, respectivamente.

Para determinação do BNBE, quando se compara o valor de F com o valor tabelado de $F_{6,2} = 19,33$ com 95% de confiança, observa-se que o valor de $F_{(calculado)}$ supera o valor tabelado, logo a diferença entre as duas precisões é muito significativa.

$$\text{BNBE : } F_{(calculado)} = [SD(\text{NIR}) / SD(\text{CLAE})]^2 = (0,22 / 0,03)^2 = 53,73$$

Já para a dipirona, quando se compara o valor de F com o valor tabelado $F_{6,2} = 8,94$ com 95% de confiança, observa-se que o valor de F calculado é inferior ao tabelado, logo pode-se dizer que não há significância na diferença entre as duas precisões ao nível de 5%.

$$\text{Dipirona : } F_{(\text{calculado})} = [\text{SD}(\text{NIR}) / \text{SD}(\text{CLAE})]^2 = (2,89 / 1,71)^2 = 2,86$$

Neste caso, quando as precisões (aplicação do teste F) não tem diferença significativa, pode-se utilizar o teste *t* para comparação das médias.

$$\text{Dipirona: } t_{\text{calculado}} = \frac{530,41 - 513,41}{S_a (1/7 + 1/4)^{1/2}} = 11,48$$

$$S_a = \frac{[(7 - 1) 2,89^2 + (4 - 1) 1,71^2]^{1/2}}{7 + 4 - 2} = 2,37$$

Comparando-se o valor de *t* calculado com o valor tabelado, $t_6 = 2,45$ com 95% de confiança, observa-se que para a determinação de dipirona, o valor calculado é superior ao valor tabelado, mostrando que neste nível de confiança há diferença significativa entre as médias.

4.6. Construção do modelo de calibração via PLS na região do MID

A figura 24 mostra os espectros dos padrões puros de dipirona sódica monohidratada e brometo de N-butilescolamina na região do infravermelho médio.

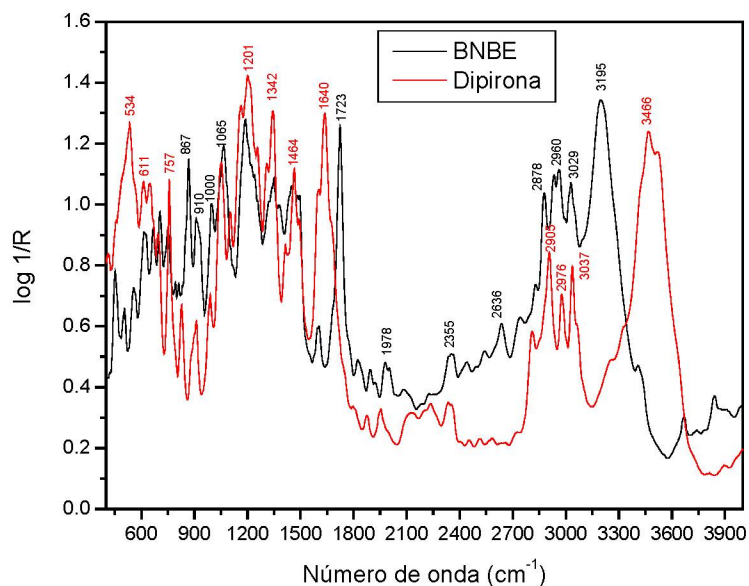


Figura 24. Espectros dos padrões puros de Dipirona Sódica monohidratada e BNBE na região do infravermelho médio.

A tabela 14 mostra a atribuição das principais bandas de absorção encontradas na figura 24 e seus respectivos números de onda.

Tabela 14. Atribuição das principais bandas de absorção dos espectros da Dipirona e BNBE na região do infravermelho médio (MID)

Grupo	Número de Onda (cm ⁻¹)
□ C = C (anel aromático), □ C = O (de anel)	1640 cm ⁻¹
□ C = O	1720 cm ⁻¹
□(C-H) de CH ₂	2878 e 2900 cm ⁻¹
□ (C-H) de CH ₃	2960, 2976, 3029 e 3037 cm ⁻¹
□(O-H)	3195 e 3466 cm ⁻¹

Na região do MID foram desenvolvidos modelos utilizando cinco faixas espectrais a saber: 1500-1800 cm^{-1} , 2700-3750 cm^{-1} , 1500-1800 cm^{-1} ; 2700-3750 cm^{-1} e toda a região espectral excluindo-se a região entre 1800-2700 cm^{-1} (Fig.25), por ser uma região que além de apresentar picos relacionado à presença de CO_2 , não apresenta sinais relevantes para os componentes estudados.

Os modelos mais adequados foram os desenvolvidos utilizando praticamente toda faixa espectral excluindo-se a região entre 1800-2700 cm^{-1} .

Os dados espectrais foram alisados, aplicados MSC, primeira e segunda derivada.

Para o desenvolvimento e validação dos modelos nesta região foram utilizados os mesmos critérios empregados no desenvolvimento do modelo na região do NIR.

Observa-se na figura 24 que há sobreposição de bandas em quase toda a faixa espectral.

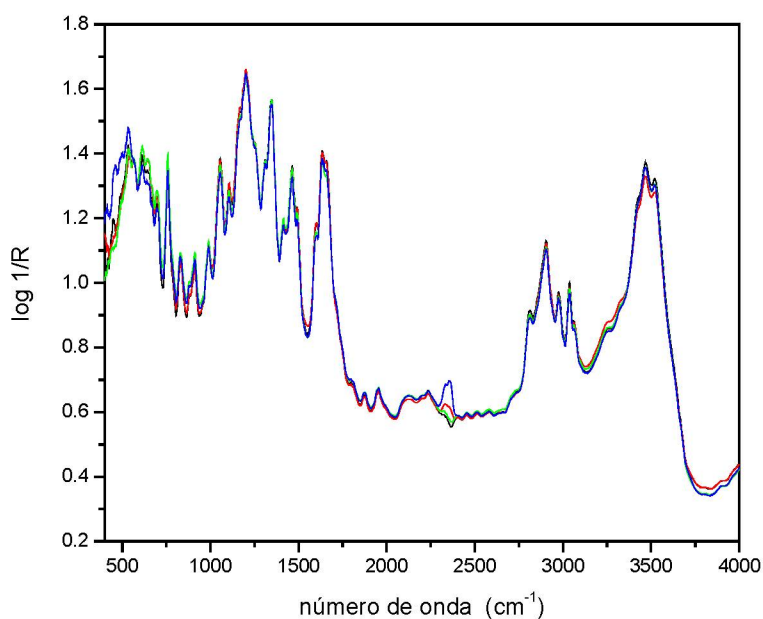


Figura 25. Espectros de uma mistura de BNBE e Dipirona na região do MID

4.7. Determinação do número de componentes principais na região do MID.

A determinação do número de componentes principais a serem incluídos no modelo de calibração foi feita de forma a selecionar um número de componentes com informações suficientes que permitisse modelar o sistema sem superajustamento. Quanto maior o número de componentes, melhor é o ajuste do modelo de calibração, mas também podem estar sendo incluídos os ruídos e, por outro lado um pequeno número de componentes pode deixar informações importantes sem serem modeladas.

O método da validação cruzada baseado no PRESS mínimo obtido para o modelo construído utilizando a primeira e a segunda derivada se encontram nas figuras 26 e 27, respectivamente. Observando-se as tabelas 15 e 16 verifica-se que a escolha do número de componentes principais utilizando apenas o critério de PRESS mínimo nos leva a um super ajustamento do modelo.

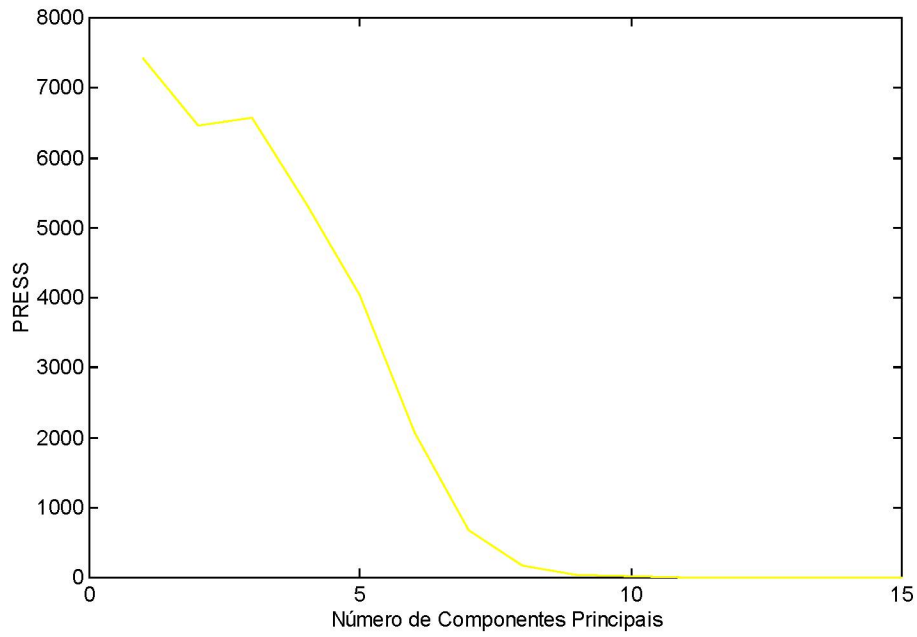


Figura 26. Gráfico do PRESS versus número de componentes principais para o modelo utilizando a primeira derivada na região do infravermelho médio.

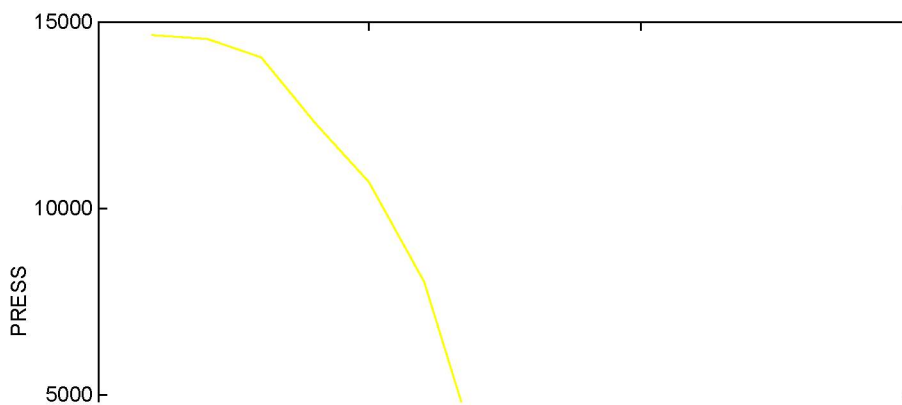


Figura 27. Gráfico do PRESS versus número de componentes principais para o modelo utilizando a segunda derivada na região do infravermelho médio.

Tendo em vista estes resultados o número de componentes foi determinado analisando as tabelas 15 e 16, baseando-se no número de componentes em que a adição de outra componente não influi significativamente na variância da concentração.

Tabela 15. Porcentagem de variância capturada pelo modelo PLS, na região do infravermelho médio utilizando a primeira derivada

cp	Bloco X (espectros)		Bloco Y (concentração)	
	Esta cp	Total	Esta cp	Total
1	20,73	20,73	86,94	86,94
2	14,24	34,97	9,53	96,48
3	6,92	41,89	2,27	98,74
4	5,99	47,88	0,54	99,28
5	6,67	54,55	0,11	99,40
6	4,58	59,14	0,21	99,61

Tabela 16. Porcentagem de variância capturada pelo modelo PLS na região do infravermelho médio utilizando a 2ª. derivada.

cp	Bloco X (espectros)		Bloco Y (concentração)	
	Esta cp	Total	Esta cp	Total
1	16,93	16,93	69,67	69,67
2	13,99	30,91	18,93	88,60
3	8,62	39,53	9,91	98,51
4	5,99	45,51	1,16	99,67
5	7,31	52,82	0,12	99,80
6	11,18	64,00	0,04	99,83

Adotando este critério foram utilizadas 3 componentes para o desenvolvimento dos modelos, uma vez que somente as três primeiras componentes principais explicam mais de 98 % da variância da concentração utilizando menos de 50% dos dados espectrais.

4.8. Identificação de amostras anômalas no modelo construído na região do MID

A identificação de amostras anômalas (outliers) para ambos os modelos construídos utilizando a 1ª e 2ª derivadas foi avaliada a partir do “leverage” e dos resíduos de Students.

Para três componentes principais o valor limite de “leverage” corresponde a 0,6 ($3 \times 3 / 15$) para ambos os modelos.

Observa-se a inexistência de anomalias associadas a este parâmetro, uma vez que os resultados mostram que o conjunto apresenta “leverage” máximo inferior a 0,5 (figuras 28 e 29) e o valor máximo o parâmetro de resíduos de “Student” corresponde a +/- 2,5.

Para o modelo construído utilizando-se a primeira derivada, observa-se na figura 28, que a amostra número 1 correspondente ao BNBE apresentou valor máximo admitido para este parâmetro, não sendo excluída do conjunto de calibração. Já o modelo utilizando a segunda derivada não apresentou nenhuma amostra anômala no conjunto de calibração .

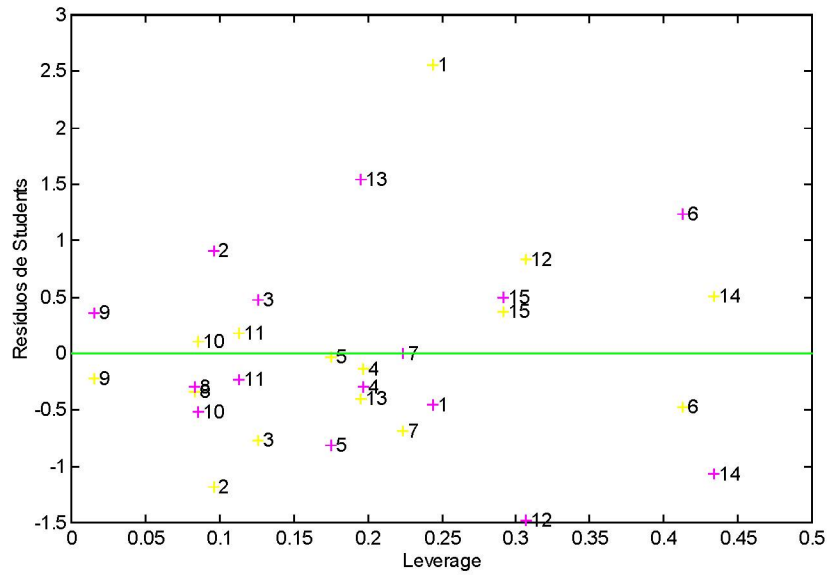


Figura 28. Gráfico dos Resíduos de “Students” versus “leverage” para o modelo utilizando primeira derivada e 3 cp, na região do infravermelho médio:

● BNBE e ● Dipirona

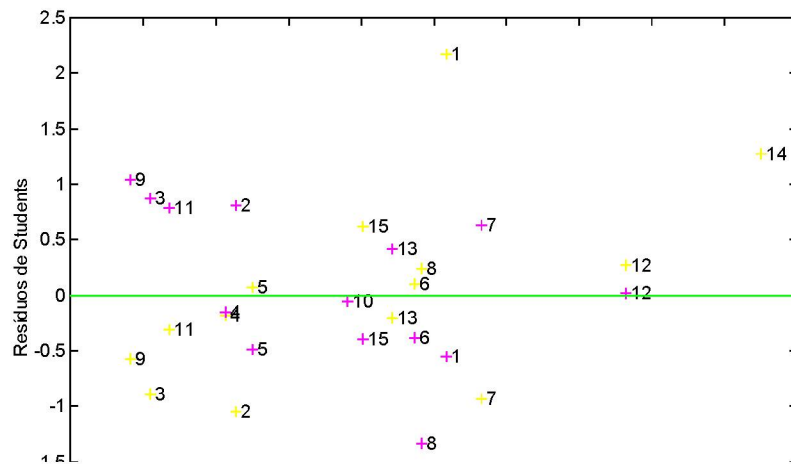


Figura 29. Resíduos de “Students” versus “leverage” para o modelo utilizando segunda derivada e 3 cp, na região do infravermelho médio:

● BNBE e ● Dipirona

As tabelas 17 e 18 mostram os valores reais , os valores previstos e o erro obtido para o modelo de calibração construído para determinação simultânea de da dipirona e do BNBE na região do MID.

Tabela 17. Valores reais e valores previstos de Dipirona sódica para calibração utilizando primeira e segunda derivadas na região do MID.

Pd	Reais (mg/g)	Previstos 1ª derivada (mg/g)		Previstos 2ª derivada (mg/g)	
		3cp	%Erro	3cp	%Erro
1	569,46	570,97	0,26	573,08	0,63
2	552,90	549,64	0,59	547,19	1,03
3	546,90	545,22	0,31	540,52	1,16
4	540,61	541,60	0,18	541,69	0,20
5	534,02	536,81	0,52	537,43	0,64
6	533,50	529,91	0,67	535,98	0,47
7	526,00	526,00	0,00	521,98	0,76
8	521,30	522,37	0,20	530,05	1,68
9	502,00	500,64	0,27	494,34	1,52
10	494,50	496,33	0,38	494,85	0,08
11	491,50	492,28	0,16	485,75	1,16
12	478,23	482,88	0,97	478,14	0,02
13	469,50	464,25	1,11	466,70	0,59
14	463,38	466,42	0,66	473,40	2,16
15	450,51	448,93	0,35	453,13	0,58

Tabela 18. Valores reais e valores previstos de BNBE para calibração utilizando primeira e segunda derivada na região do MID

Pd	Reais (mg/g)	Previstos 1ª derivada (mg/g)		Previstos 2ª derivada (mg/g)	
		3cp	%Erro	3cp	%Erro
1	23,14	21,22	8,32	21,08	8,91
2	21,83	22,81	4,47	22,93	5,01
3	22,51	23,13	2,75	23,47	4,27
4	23,05	23,15	0,47	23,24	0,84
5	23,61	23,63	0,10	23,53	0,32
6	23,66	23,97	1,34	23,56	0,40
7	24,29	24,82	2,16	25,17	3,60
8	24,69	24,98	1,15	24,46	0,93
9	26,34	26,53	0,72	26,96	2,36
10	26,98	26,89	0,32	27,04	0,20
11	27,24	27,09	0,53	27,57	1,22
12	28,37	27,76	2,12	28,13	0,83
13	29,11	29,43	1,08	29,31	0,67
14	29,63	29,30	1,11	28,61	3,45
15	30,73	30,46	0,87	30,12	1,99

Observa-se nessas tabelas que os modelos construídos utilizando a primeira derivada apresentam valores previstos bem próximos dos valores reais tanto para BNBE quanto para a dipirona, o que pode ser determinado pelo erro relativo.

Estes resultados mostram um bom coeficiente de correlação de calibração e validação para o modelo desenvolvido utilizando a primeira derivada e 3 componentes principais, tanto para a determinação da dipirona quanto para BNBE (tabela 19).

O que nos indica que este modelo é adequado para determinação simultânea destes princípios ativos em misturas, o que pode ser confirmado comparando-se os valores de SEC e SEP na tabela 19.

4.9. Validação do modelo na região do MID.

A qualidade do modelo de calibração construído na região do MID foi avaliada comparando-se o erro padrão de calibração (SEC) com o erro padrão de previsão (SEP).

Modelos considerados bons são aqueles que apresentam valores mínimos do SEP e do SEC, mas ambos próximos²³.

Os valores de SEC, SEP e coeficiente de correlação obtidos na construção do modelo na região do MID estão apresentados na tabela 19.

Observando-se os valores de SEC e SEP percebe-se que estes valores são menores e mais próximos para o modelo construído utilizando a primeira derivada, tanto para a dipirona quanto para o BNBE e que os coeficientes de correlação obtidos para a dipirona são melhores do que aqueles obtidos para o BNBE, o que era esperado uma vez que a dipirona é o componente presente em maior quantidade nas misturas.

A partir destes parâmetros podemos confirmar uma melhor habilidade de previsão do modelo na região do MID, utilizando-se 3 componentes principais e aplicando-se a 1^a. derivada para determinação simultânea do BNBE e Dipirona.

Tabela 19. Estatísticas de otimização do modelo PLS (MID) usando os dados aplicando-se a 1a. e 2a. derivadas e 3 componentes principais.

Componente	derivada	cp	SEC (mg/g)	SEP (mg/g)	R calibração	R validação
BNBE	1 ^a .	3	0,21	0,41	0,9724	0,7376
	2 ^a .	3	0,25	0,58	0,9586	0,3100
Dipirona	1 ^a .	3	0,85	4,92	0,9971	0,7238
	2 ^a .	3	1,67	6,90	0,9888	0,2862

A capacidade preditiva dos modelos foi testada frente a amostras reais de Buscopan Composto®, medicamento comercialmente disponível, contendo a mistura em estudo.

As concentrações prevista pelos modelos são inferiores para a dipirona e superiores para o BNBE, em todos os casos, em relação aos valores nominais.

Comparando-se esses valores com os valores previstos pelo método de referência (CLAE), observa-se que os valores obtidos pelo modelo proposto, utilizando primeira e segunda derivada, são bem próximos (tabela 20).

Uma boa coerência foi observada entre os valores determinados pela técnica cromatográfica e os valores obtidos pelos modelos propostos, com erro máximo de 3,0% para determinação de BNBE e abaixo de 2,0% para determinação de dipirona (tabela 20).

Tabela 20. Valores previstos pelos modelos construídos na região do MID para BNBE e dipirona sódica e dados estatísticos.

Amostra	BNBE (mg/g)		Dipirona (mg/g)	
	1 ^a derivada	2 ^a derivada	1 ^a derivada	2 ^a derivada
	3cp	3cp	3cp	3cp
1	25,92	27,16	511,28	495,77
2	25,43	26,05	514,91	508,28
3	24,67	24,83	521,52	521,82
4	25,07	26,47	519,70	503,09
5	25,68	25,08	511,09	521,30
6	22,64	23,19	549,44	543,46
7	24,74	21,87	520,25	560,82
8	26,55	26,69	497,93	498,59
9	23,94	24,26	532,26	531,25
10	24,40	23,90	525,00	534,08
11	27,17	24,72	490,83	526,44
M. MID	24,91	24,77	517,31	521,56
M. CLAE	24,18		513,39	
Nominal	23,09		577,44	
% Erro	3,02	2,44	0,76	1,59
SD	1,25	1,60	15,82	20,00

Comparando-se a média dos resultados obtidos pelos modelos na região do MID, a média dos valores obtidos pelo método de referência (CLAE) e os valores nominais de BNBE e dipirona sódica, observa-se que o modelo na região do MID aplicando-se a segunda derivada apresentou uma capacidade preditiva razoável, uma vez que os valores obtidos encontram-se mais próximos dos valores nominais.

A detecção de diferenças sistemáticas entre os dois métodos foi determinada utilizando-se o Teste F de comparação de precisão e o teste t de comparação entre as médias. Em ambos os casos, os valores de F e t obtidos foram muito superiores aos tabelados, tanto para BNBE como para a Dipirona. Isto significa que os resultados obtidos por CLAE e na região do MID não são comparáveis.

4.10. Comparação entre os modelos construídos na região do NIR e MID utilizando segunda derivada e 3 componentes principais.

A tabela 21 permite uma comparação dos modelos desenvolvidos para a determinação simultânea de BNBE e dipirona na região do infravermelho próximo e médio, utilizando três componentes principais e processados com a segunda derivada.

Tabela 21. Resumo dos resultados obtidos pelos modelos construídos nas regiões do NIR e MID com 2ª. derivada e utilizando 3 cp, para determinação simultânea de BNBE e Dipirona.

Região	Componente	SEC (mg/g)	SEP (mg/g)	SD	%ER	R (Cal)	R (Val)
NIR	BNBE	0,63	1,34	0,22	0,58	0,9808	0,8455
	Dipirona	3,51	13,93	2,89	3,31	0,9963	0,8818
MID	BNBE	0,25	0,58	1,60	2,44	0,9586	0,3100
	Dipirona	0,85	4,92	20,00	1,59	0,9888	0,2862

Podemos observar que o modelo desenvolvido na região do MID não apresenta boa correlação de validação, o desvio padrão para determinação da dipirona na região do MID é maior que o desvio padrão na região do NIR,

mostrando não haver um a boa reprodutibilidade na quantificação simultânea das espécies em estudo.

Uma possível explicação para este fato é que os padrões das misturas sintéticas utilizadas na construção dos modelos de calibração foram preparadas a partir de dois medicamentos contendo vários excipientes, e como o Buscopan Composto® possui alguns excipientes comuns ao medicamento Buscopan, estes tendo sido modelados e absorvendo radiação na região processada (MID) podem estar sendo quantificados. O que explicaria os erros para a determinação de BNBE.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no estudo da espectroscopia na região do infravermelho (NIR e MID) com reflectância difusa e calibração multivariada (PCA e PLS), na construção de modelos simples e robustos para serem utilizados no controle de qualidade de fármacos, nos permite algumas conclusões.

A aplicação do PCA se mostrou um excelente método na identificação de produtos farmacêuticos não genuínos.

Por ser uma técnica baseada na similaridade das amostras, qualquer adulteração tanto com relação aos princípios ativos quanto aos excipientes podem ser detectada.

Os modelos processados com os dados espectrais utilizando primeira e segunda derivadas mostrou que, para os modelos processados tanto na região do NIR quanto na região do MID, não há uma diferença muito significativa nos resultados de previsão de concentração em amostras reais, utilizando-se três componentes principais.

Os modelos desenvolvidos na região do NIR se mostraram mais adequados para a quantificação simultânea das espécies em estudo do que o construído na região do MID. O modelo na região do MID apresentou maiores desvios padrão tanto para BNBE quanto para Dipirona, o que pode estar relacionado com a metodologia utilizada para preparação das amostras.

A espectroscopia por reflectância difusa na região do infravermelho próximo mostrou-se um excelente método para quantificação simultânea de BNBE e Dipirona Sódica em formulações farmacêuticas de Buscopan

Composto®, utilizando padrões sintéticos preparados a partir de medicamentos.

O modelo na região do NIR desenvolvido via PLS, apresenta boa capacidade preditiva para os dois componentes, além de excelentes precisão e exatidão, quando comparado com o método de referência.

O procedimento NIR tem vantagens sobre a técnica de referência, pois não requer preparação das amostras e nem uso de reagentes. Isto também enfatiza a possibilidade de adaptar modelos de calibração NIR para análises em tempo real, uma vez que as determinações foram rápidas (menos de 1 minuto).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SCAFI, S. H; PASQUINI, C.; *The Analyst*, 126(12): 2218, 2001.
2. Boletín AIS – Peru nº 1 ano 3 – febrero 2002. Disponível em :<<http://www.ekeko2.rcp.net.pe/AIS-LAC/Boletines/ais%2520peru/PDF/feb-02.PDF+medicamentos+adulterados&hl=pt&ie=UTF-8>>acesso em 15 de set. 2002.
3. OMS – “Progress in Essential Drugs and Medicines Policy”, Boletim da Organização Mundial da Saúde, (1998-1999).
4. AIS – Accion Internacional para la Salud, Dirección General de Servicios de Salud, Unidad de Medicamentos, Laboratorios y Bancos de Sangue – Diario El Comercio, nº 2, Argentina, 2002.
5. NAGATA, N.; Uso de métodos de calibração multivariada na análise de amostras de interesse industrial e espécies de importância ambiental. Campinas, 2001. 175 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
6. PASQUINI, C. *J. Braz. Chem. Soc.* 14(2): 198, 2003.
7. ILARI, J. L.; MARTENS, H.; ISKSSON, T. *Appl. Spectrosc.*, 42:722 1988.
8. STORDRANGE, L.; LIBNAU, F. O.; MALTHE-SORENSEN, D.; KVALHEIM, O. M.; *J. Chemom.*, 16 (8-20):, 529 , 2002.
9. DOWNEY, G.; *Analyst*; 119: 2367; 1994.
10. GEMPERLINE, P. J.; WEBBER, L. D.; COX, F. O.; *Anal. Chem.*, 61:138 1989.
11. CLARKE, F. C.; JAMIESON, M. J.; CLARK, D. A.; HAMMOND, S. V.; JEE, R. D.; and MOFFAT, A.C. *Anal. Chem.* 73: 2213, 2001..

12. BLANCO, M.; COELHO, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S.; BERTRAN, E.; *Appl. Spectrosc.*, 49: 747, 1995.
13. MILLER, C. E.; *Appl. Spectrosc.*, 47: 222, 1993.
14. FAHRENFORT, J.; *Spectroc. Acta*, 17: 698, 1962.
15. KOENING, D. L.; *Spectroscopy of Polimers*, Washington, American Chemical Society, 1992.
16. COATES, J.; *Applied Spectrosc. Rev.* 33: 267, 1998.
17. CHALMERS, J. M.; MACKENZIE, M. W.; *Appl. Spectrosc.*, 39: 634, 1985.
18. FULLER, M. P.; GRIFFITHS, P. R.; *Appl. Spectrosc.*, 34: 533, 1980.
19. FULLER, M. P.; GRIFFITHS, P. R.; *Anal. Chem.*, 50: 1906, 1978.
20. COLEMAN, P. P.; *Practical sampling techniques for infrared analysis*, CRC Press, London, 1993.
21. MACKENZIE, M. W.; Chichester, John Wiley & Sons, 1988.
22. GRIFFITHS, P. R.; New York, John Wiley & Sons, 1975.
23. MESSERSCHMIDT, I.; *Análise quantitativa por espectroscopia no infravermelho médio empregando técnicas de reflectância e calibração multivariada*. Campinas, 1999. 138 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
24. TEVRUCHT, M. L. E.; GRIFFITHS, P. R.; *Appl. Spectrosc.*, 43: 1492, 1989.
25. WETZEL, D. L.; *Anal. Chem.*, 55: 1165, 1983.
26. TEVRUCHT, M. L. E.; GRIFFITHS, P. R.; *Talanta*, 38: 839, 1991.
27. KRIVACSY, Z.; HLAVAY, J.; *Journal of Molecular Structure*, 349: 289, 1995.

28. FERREIRA, M. M. C., ANTUNES, A. M., MELGO, M. S., VOLPE, P.L.O. *Química Nova*, 22 (5), 1999.
29. WENDLANT, W. W. M.; HECHT, H. G.; *Reflectance Spectroscopy*, New York, Interscience, 1996.
30. BOS, A.; BOS, M.; VAN DER LINDEN, W. E.; *Anal. Chim. Acta*, 256: 133, 1992.
31. MARTENS, H.; NAES, T.; *Multivariate Calibration*; John Wiley & Sons; Chichester, 1991.
32. BROAD, N. W.; JEE, R. D.; MOFFAT, A. C.; and SMITH, M. R. *Analyst* 126: 2207, 2001.
33. MOFFAT, A. C.; TRAFFORD, A. D.; JEE, R. D.; and GRAHAM, P. *Analyst*, 125: 1341, 2000.
34. KUDO, M.; WATT, R. A.; and MOFFAT, A. C.; *J. of Pharm. and*
35. *Pharmacology* 52: 1271, 2000.
36. YOON, W. L.; JEE, R. D.; and MOFFAT, A. C.; *Analyst* 125: 1817, 2000.
37. BROAD, N. W.; JEE, R. D.; MOFFAT, A. C.; EAVES, M. J.; MANN, W. C. and DZIKI *Analyst* 125: 2054, 2000.
38. YOON, W. L.; NORTH, N. C.; JEE, R. D.; and MOFFAT, A. C.; *Proceedings of the 9th International Conference*, Edited by A M C Davies and R Giangiaco, NIR Publications, Chichester, 2000.
39. WILSON, N. D.; WATT, R. A. and MOFFAT, A. C. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53: 95, 2000.
40. HAMMOND, J.; KELLAM, B.; MOFFAT, A. C.; and JEE, R. D.; *Anal. Commun.* 36: 127, 1999.

- 41.. O'NEIL, A. J.; JEE, R. D.; and MOFFAT, A. C.; *Analyst* 124, 33-36, 1999.
- 42.. TRAFFORD, A. D.; JEE, R. D.; MOFFAT, A. C. and GRAHAM, P. *Analyst* 124: 163, 1999.
43. BUCKTON, G.; YONEMOCHI, E.; YOON, W. L.; and MOFFAT, A. C. *International Journal of Pharmaceutics* 181: 41, 1999.
44. EUSTACHIO, A.; BLANCO, M.; JEE, R. D.; and MOFFAT, A. C. *Anal. Chim. Acta*, 383: 283, 1999.
- 45.. YOON, W. L.; JEE, R. D.; MOFFAT, A. C.; BLACKLER, P. D.; and YEUNG, K. *Analyst* 124: 1197, 1999.
- 46.. YONEMOCHI, E.; INOUE, Y.; BUCKTON, G.; MOFFAT, A. C.; OGUCHI, T.; and YAMAMOTO, K. *Pharm. Res.* 16: 835, 1999.
- 47.. WOON, W. L.; JEE, R. D.; and MOFFAT, A. C. *Analyst* 123: 1029, 1998.
48. BUCKTON, G.; YONEMOCHI, E.; HAMMOND, J.; and MOFFAT, A. C. *International Journal of Pharmaceutics* 168: 231, 1998.
49. O'NEIL, A. J.; JEE, R. D.; and MOFFAT, A. C. *Analyst* 123: 2297, 1998.
50. EUSTAQUIO, A.; GRAHAM, P.; JEE, R. D.; MOFFAT, A. C.; and TRAFFORD, A. D. *Analyst* 123: 2303, 1998.
51. MOFFAT, A. C. *European Pharm. Rev.* 3: 16, 1998.
52. LEWIS, E. N.; CARROL, J. E.; CLARKE, F. *NIR news*, 12: 3, 2001.
53. CIURCZAK, E. W. *NIR news*, 2: 3, 1991.

54. HAILEY, P. A.; OAKLEY, A. C. E.; DOBERTY, P.; PETTMAN, A. J.; SHARP, D. C. A.; BARNES, D. M. H. *NIR news*, 5:10, 1994.
55. BURGER, T.; FRICKE, J.; *J. Near Infrared Spectrosc.* 6: 33, 1998.
56. CINDY, T.; GARY, E. R.; LANE, G.; EMIL, W. C.; *J. Near Infrared Spectrosc.* 9: 165, 2001.
57. RYAN, J. A.; COMPTON, S. V.; BROOKS, M. A.; COMPTON, D. A. C.; *J.Pharm. Biomed. Anal.* 9:303, 1991.
58. KOHN, W. H.; JEGER, A. N.; *J.Forensic Sci.*, 37:35, 1992.
59. DRENNEN, J. K.; LODDER, R. A.; *J. Pham. Sci.*, 79:622, 1990.
60. SCHILLING, D.; *NIR news*, 4:3, 1993.
61. GUO, J. H.; SKINNER, G. W.; HARCUM, W. W.; MALONE, J. P.; WEYER, L. G.; *Drug Development and Industrial Pharmacy* 25(12):1267, 1999.
62. MORGANO, M. A.; CAMARGO. C.; PAGEL, A. P.; FERRÃO, M. F.; FERREIRA, M.M.C.; 24-27/09/2001: II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil [The 2nd Brazilian Symposium on Coffee Research], *Anais [Annals]*, 1502-1510, 2001.
63. SONDERMANN, N. and KOVAR, K. A.; *Forensic Science International*, 102 (2-3):, 133, 1999.
64. *European Pharmacopeia*, 3rd ed.; Council of Europe: Strasbourg, 1997.
65. *United States Pharmacopeia* ,USP-24-NF 19, United States Pharmacopeial Conventional: Rockville, 2000.
66. MARK, H. L.; *Anal .Chem.*, 58:379, 1986.
67. ESPINOSA-MANSILLA, A.; et. al.; *Anal. Chim. Acta*, 427:129, 2001.

68. BOERIS, M. S.; LUCO, J. M.; and OLSINA, R. A.; *J. Pharm. and Biom. Anal.* 24:259, 2000.
69. KUBOTA, L. T.; et. al.; *Anal. Chim. Acta*, 409:159, 2000.
70. MEDINA, A. R.; FERNANDEZ DE CÓRDOBA, M. L.; and MOLINA-DIAZ, A.; *J. Pharm. and biom. Anal.* 21:983, 1999.
71. CAPITÁN-VALLVEY, L. F.; et. al.; *Talanta*, 49:691, 1999.
72. FORINA, M.; et. al.; *J. Pharm. and Biom. Anal.*; 18:21, 1998.
73. CORTI, P.; SAVIANI, L.; DREASSI, E.; CERAMELLI, M. L.; LONARDI, S.; *Pharm. Acta Helv.* 67:57, 1992.
74. DARDENE, P.; SINNAEVE, G.; BAETEN, V.; *J. Near Infrared Spectroscopy* 8: 229, 2000.
75. OTTO, M.; *Chemometrics. Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*; Wiley-VCH; New York, 1998.
76. NAES, T.; ISAKSSON, T.; DAVIES, T.; *NIR Publications*: Chichester, 2002.
77. MARK, H.; *Anal. Chim. Acta* 223: 75; 1989.
78. SAVITZKY, A.; GOLLAY, M. J. E.; *Anal. Chem.*, 36: 1627, 1964.
79. HARRIS, D. C.; *Análise Química Quantitativa*, 5ª Edição, p. 51.
80. THOMAS, E. V.; *Anal. Chem.*, 66: 795, 1994.
81. GORRY, P.A.; *Anal. Chem.*, 44: 1906, 1972.
82. GORRY, P.A.; *Anal. Chem.*, 62: 570, 1990.
83. OLINGER, J. M.; GRIFFITHS, P. R.; *Appl. Spectrosc.*, 47: 687, 1993.
84. CHAFFIN, N, C.; GRIFFITHS, P. R.; *Appl. Spectrosc.*, 52: 218, 1998.
85. SENA, M. M.; FERNANDES, J. C. B.; ROVER, Jr.; POPPI, R. J.; KUBOTA, L. T.; *Anal. Chim. Acta* 409: 159, 2000.

86. BEEVE K R E, KOWALSKI B R, *Anal. Chem.*, 59(A):1007 (1987).
87. FAIRMAN, B.; HINDS, M.W.; NELMS, S.M.; PENNY, D.M.; GOODALL, P.; *J. Anal. Atom. Spectrom.* 15: 1606, 2000.
88. THOMAS, E. V.; *Anal. Chem.*, 66(A): 795, 1994.
89. ROBERT, M.; SILVERSTEIN, G.; BASSLER, C.; MORRILL, T. C.;
Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Editora Wiley
Wiley, ^a edição, pag. 102-131, 1991.
90. SKOOG, D. A.; Princípios de Análise Instrumental. Editora Bookman,
São Paulo; 5ª Edição, pág.342-363, 2002.
91. NETO, B. B.; Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na
ciência e na indústria. Editora da Unicamp, Campinas; 2ª Edição, 2002.

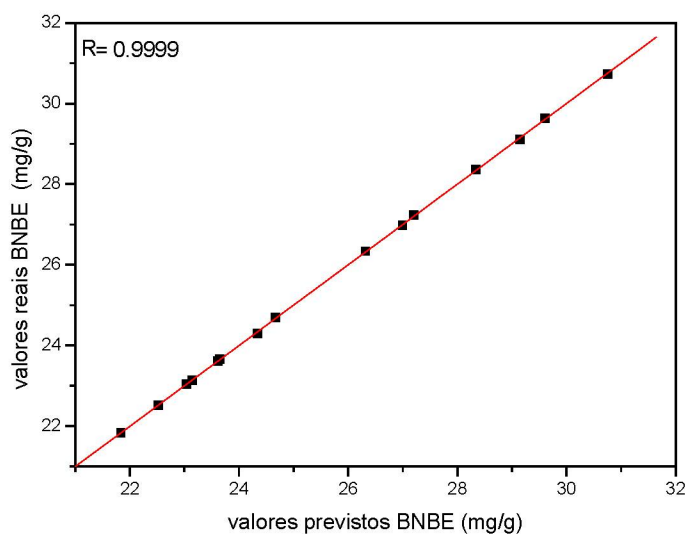
Tabela A.2. Pontos de probabilidade da distribuição t com v graus de liberdade.⁹⁰

v	Área de probabilidade									
	0,4	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001	0,0005
1	0,325	1,000	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	127,32	318,31	636,62
2	0,289	0,816	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	14,089	22,326	31,598
3	0,277	0,765	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	7,453	10,213	12,924
4	0,271	0,741	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	5,598	7,173	8,610
5	0,267	0,727	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	4,773	5,893	6,869
6	0,265	0,718	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	4,317	5,208	5,959
7	0,263	0,711	1,415	1,895	2,365	2,998	3,449	4,029	4,785	5,408
8	0,262	0,706	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	3,833	4,501	5,041
9	0,261	0,703	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	3,690	4,297	4,781
10	0,260	0,700	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	3,581	4,144	4,587
11	0,260	0,697	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	3,497	4,025	4,437
12	0,259	0,695	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,428	3,930	4,318
13	0,259	0,694	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,372	3,852	4,221
14	0,258	0,692	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,326	3,787	4,140
15	0,258	0,691	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,286	3,733	4,073
16	0,258	0,690	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,252	3,686	4,015
17	0,257	0,689	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,222	3,646	3,965
18	0,257	0,688	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,197	3,610	3,922
19	0,257	0,688	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,174	3,579	3,883
20	0,257	0,687	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,153	3,552	3,850
21	0,257	0,686	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,135	3,527	3,819
22	0,256	0,686	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,119	3,505	3,792
23	0,256	0,685	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,104	3,485	3,767
24	0,256	0,685	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,091	3,467	3,745
25	0,256	0,684	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,078	3,450	3,725
26	0,256	0,684	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,067	3,435	3,707
27	0,256	0,684	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,057	3,421	3,690
28	0,256	0,683	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,047	3,408	3,674
29	0,256	0,683	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,038	3,396	3,659
30	0,256	0,683	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,030	3,385	3,646
40	0,255	0,681	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	2,971	3,307	3,551
60	0,254	0,679	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	2,915	3,232	3,460
120	0,254	0,677	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	2,860	3,160	3,373
∞	0,253	0,674	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	2,807	3,090	3,291

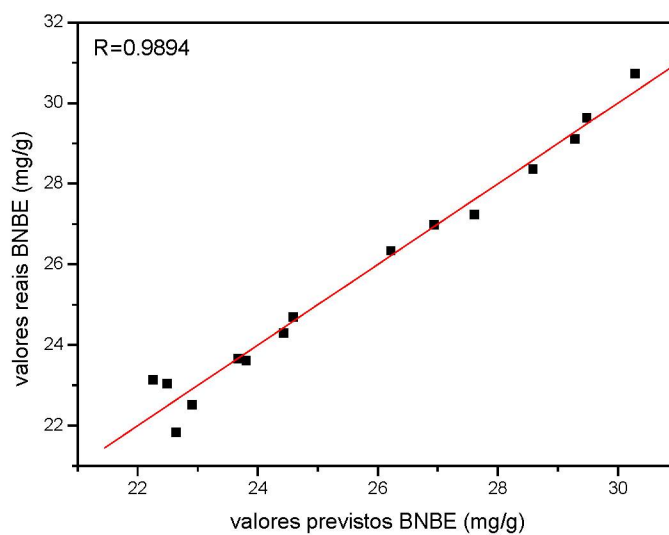
Fonte: Box, G. E. P.; Hunter, W. G., e Hunter, J. S., *Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building*. Nova York, Wiley, 1978. Pearson, E. S. e Hartley, H. O. (eds.), *Biometrika tables for statisticians*, vol. I, Cambridge University Press (1958). Fisher, R. A. e Yates, F., *Statistical tables for Biological, Agricultural and Medical Research*, Longman Group Ltd. (1974) - Tabela III. Reproduzida com autorização da John Wiley & Sons, Inc; Biometrika Trustees e Longman Group UK Ltd.

APÊNDICE B

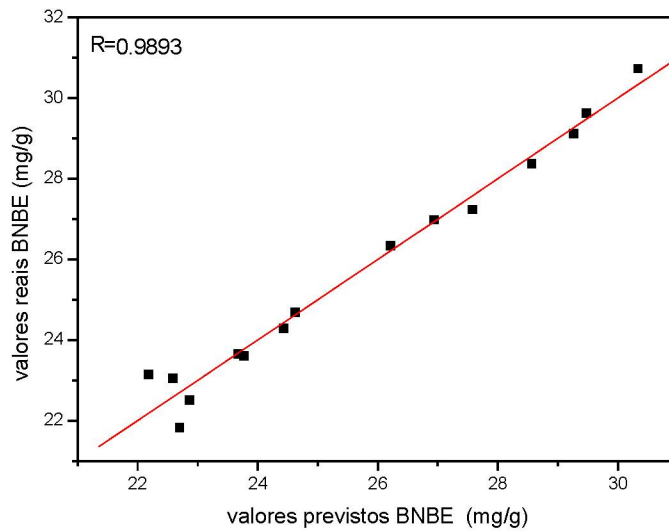
Gráficos de correlação entre os valores reais e previstos na região do NIR



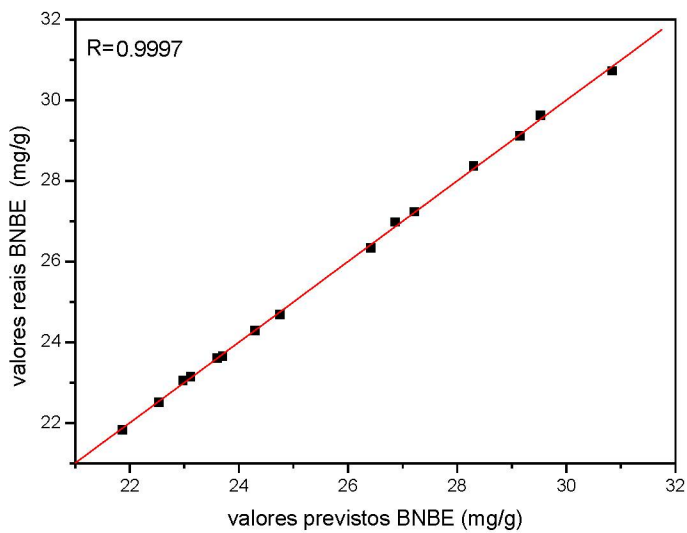
Correlação entre valores reais e valores previstos para BNBE utilizando o modelo de calibração processado com a 1ª derivada e 8 cp.



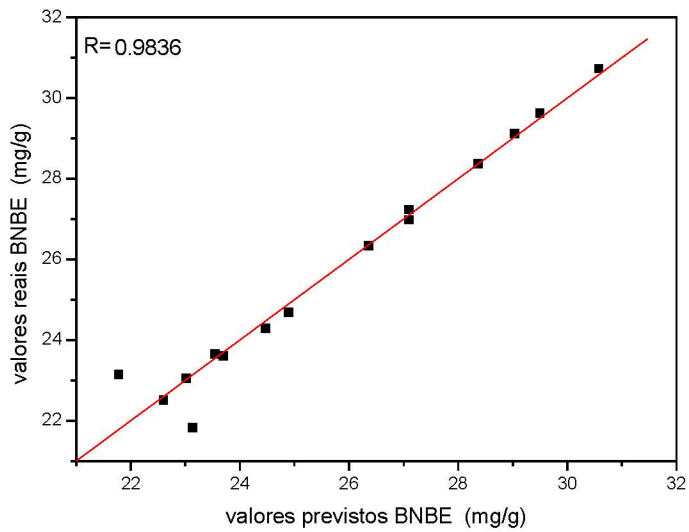
Correlação entre valores reais e valores previstos para BNBE utilizando o modelo de calibração processado com a 1ª derivada e 4 cp.



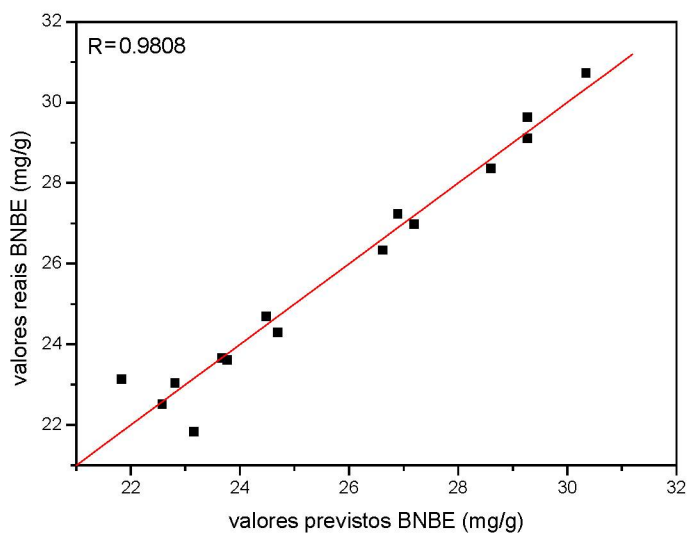
Correlação entre valores reais e valores previstos para BNBE utilizando o modelo de calibração processado com a 1ª derivada e 3 cp.



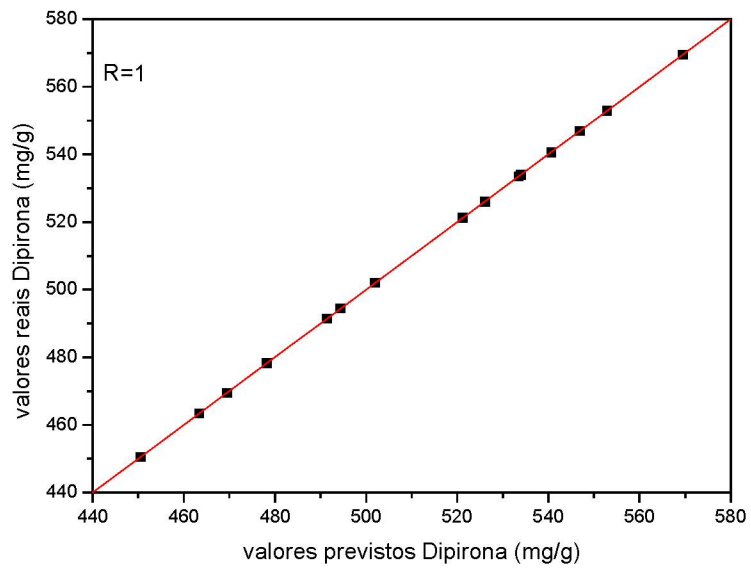
Correlação entre valores reais e valores previstos para BNBE utilizando o modelo de calibração processado com a 2ª derivada e 8 cp.



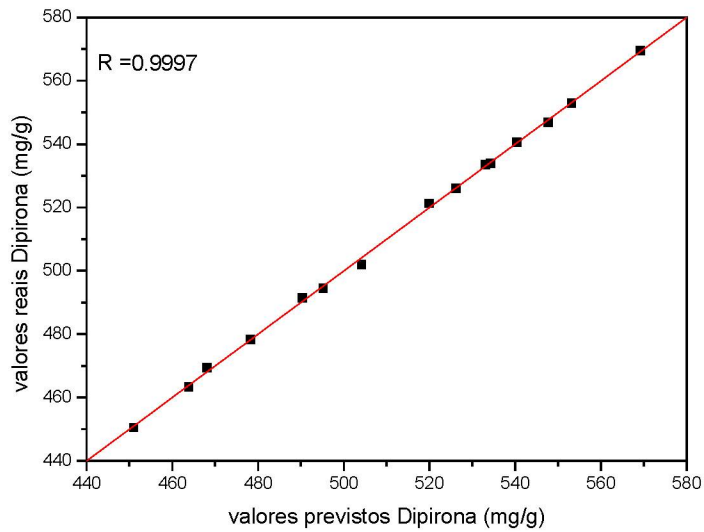
Correlação entre valores reais e valores previstos para BNBE utilizando o modelo de calibração processado com a 2ª derivada e 4 cp.



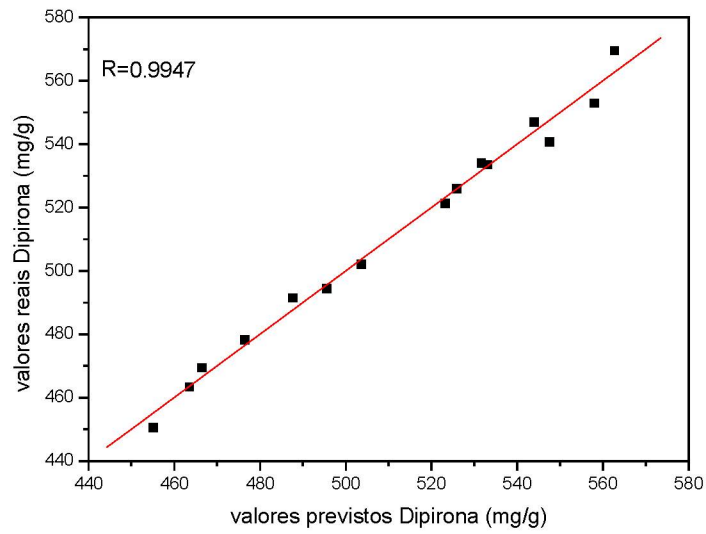
Correlação entre valores reais e valores previstos para BNBE utilizando o modelo de calibração processado com a 2ª derivada e 3 cp.



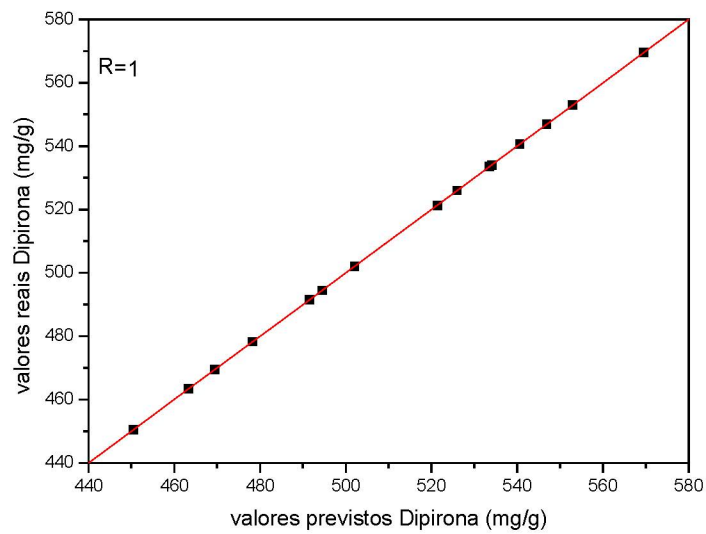
Correlação entre valores reais e valores previstos para Dipirona utilizando o modelo de calibração processado com a 1ª derivada e 8 cp.



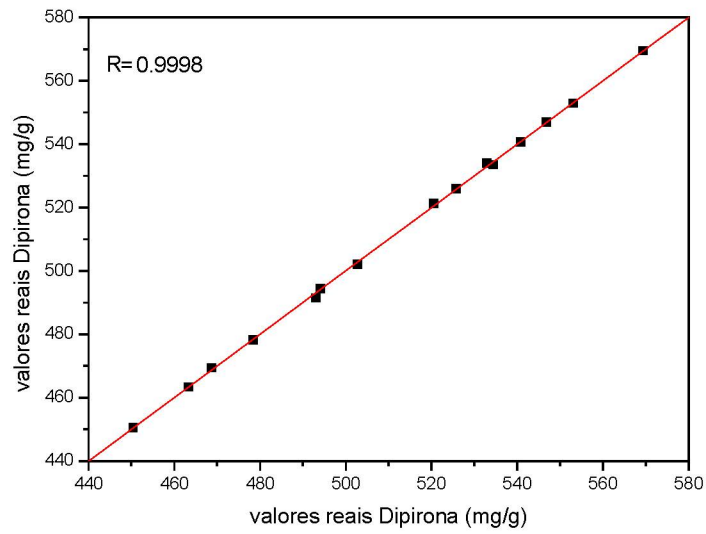
Correlação entre valores reais e valores previstos para Dipirona utilizando o modelo de calibração processado com a 1ª derivada e 4 cp.



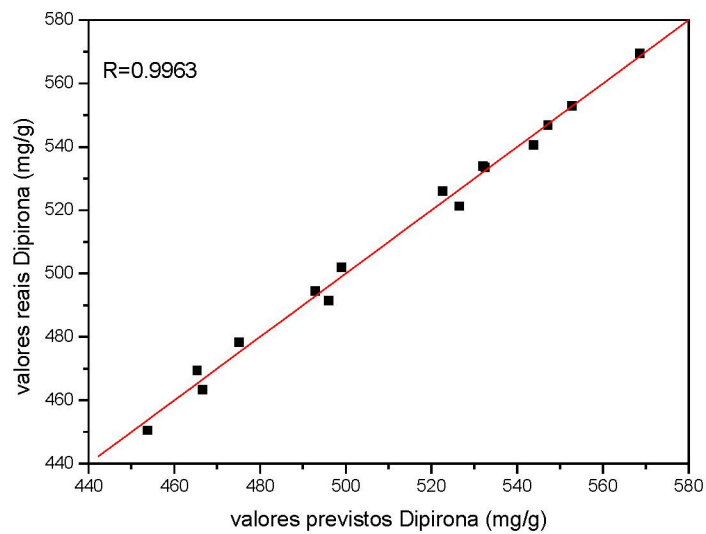
Correlação entre valores reais e valores previstos para Dipirona utilizando o modelo de calibração processado com a 1ª derivada e 3 cp.



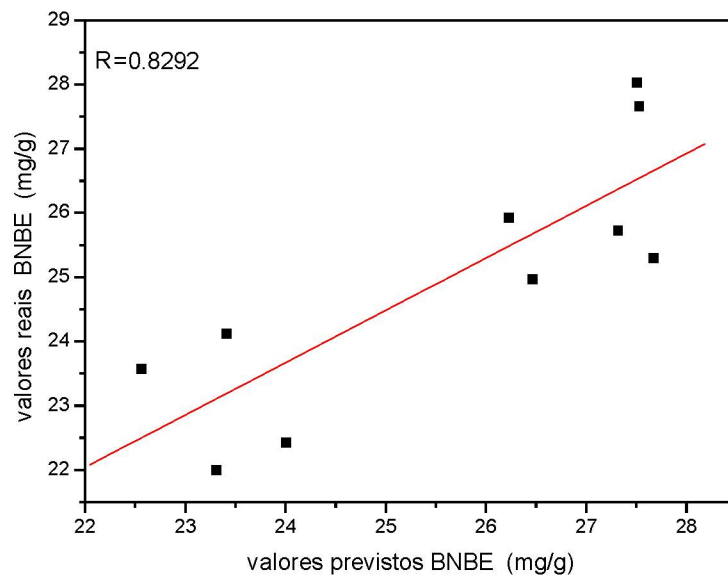
Correlação entre valores reais e valores previstos para Dipirona utilizando o modelo de calibração processado com a 2ª derivada e 8 cp.



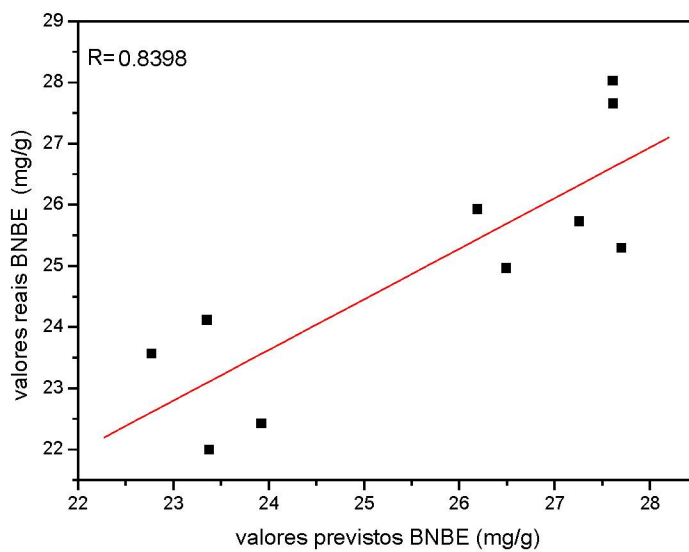
Correlação entre valores reais e valores previstos para Dipirona utilizando o modelo de calibração processado com a 2ª derivada e 4 cp.



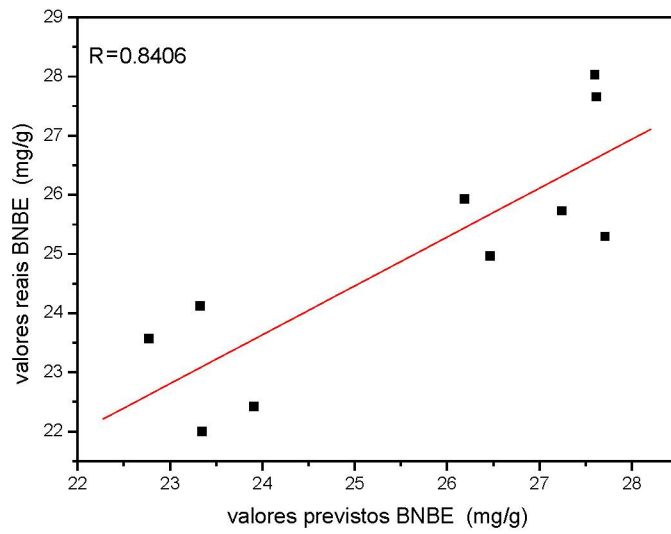
Correlação entre valores reais e valores previstos para Dipirona utilizando o modelo de calibração processado com a 2ª derivada e 3 cp.



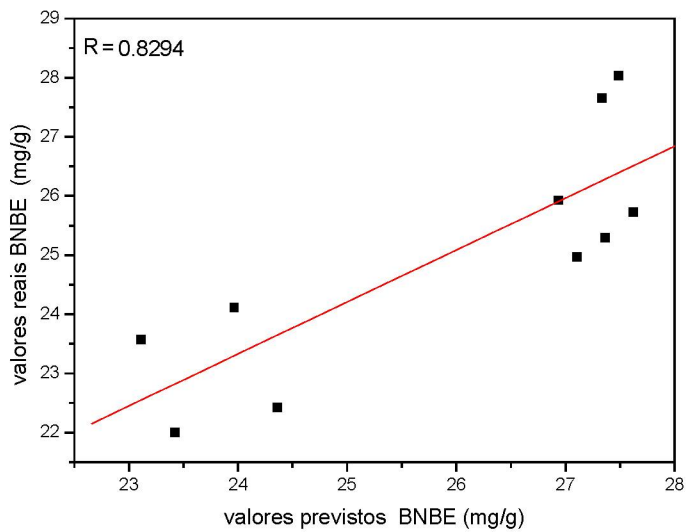
Correlação de validação para BNBE utilizando o modelo processado com 1ª derivada e 8 cp.



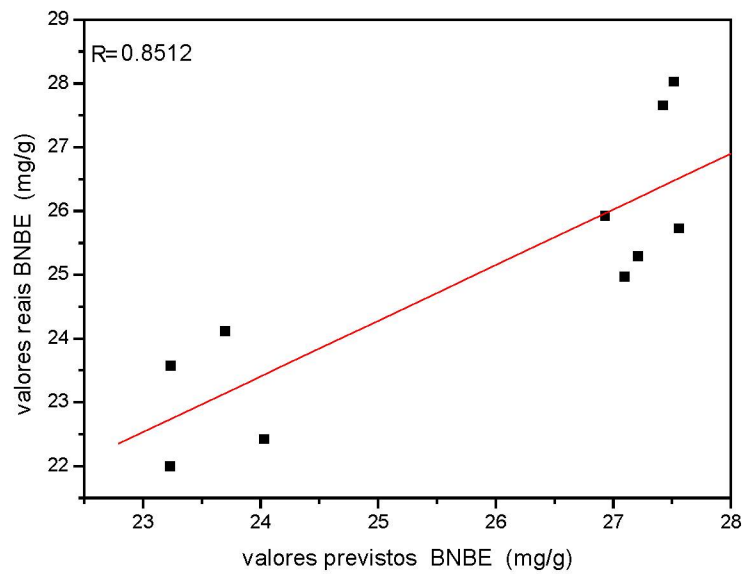
Correlação de validação para BNBE utilizando o modelo processado com 1ª derivada e 4 cp.



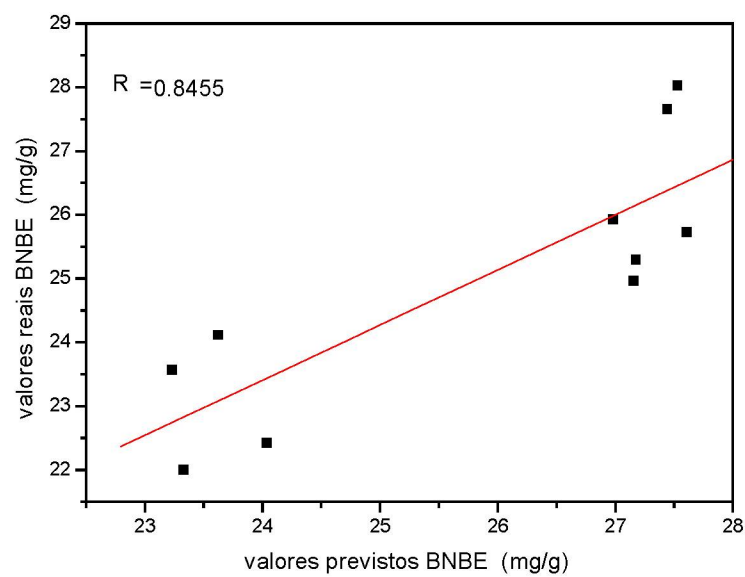
Correlação de validação para BNBE utilizando o modelo processado com 1^a derivada e 3 cp.



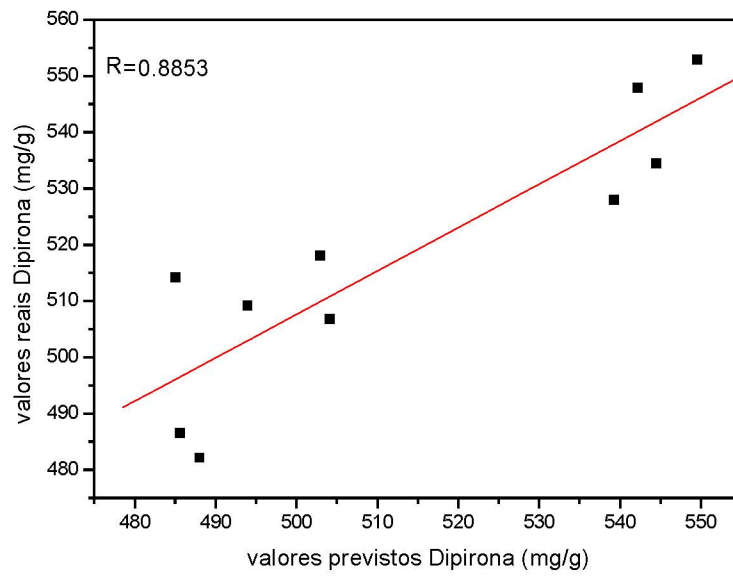
Correlação de validação para BNBE utilizando o modelo processado com 2^a derivada e 8 cp



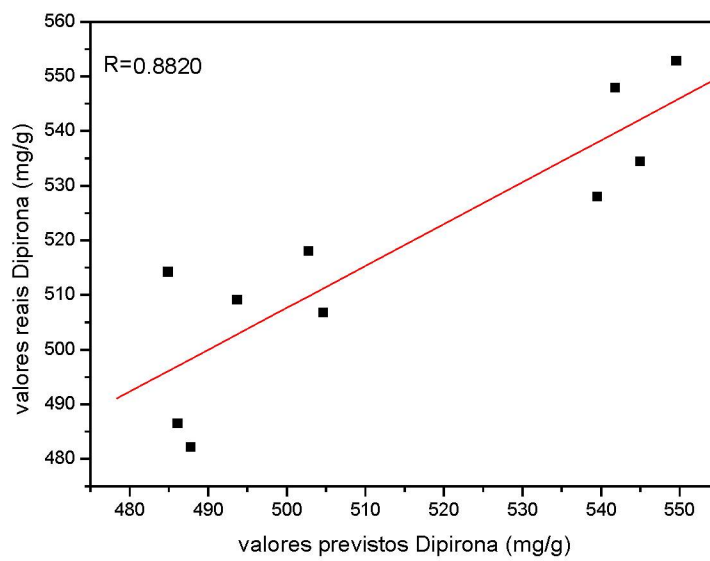
Correlação de validação para BNBE utilizando o modelo processado com 2ª derivada e 4 cp



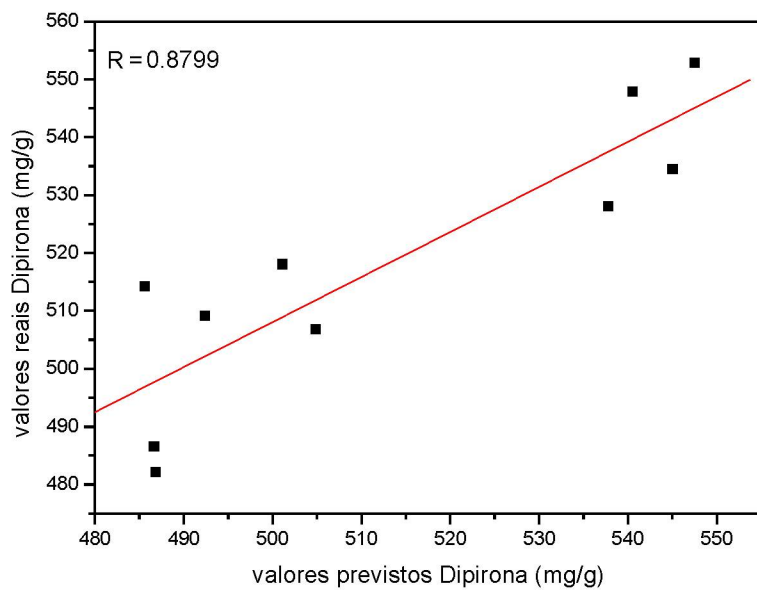
Correlação de validação para BNBE utilizando o modelo processado com 2ª derivada e 3 cp



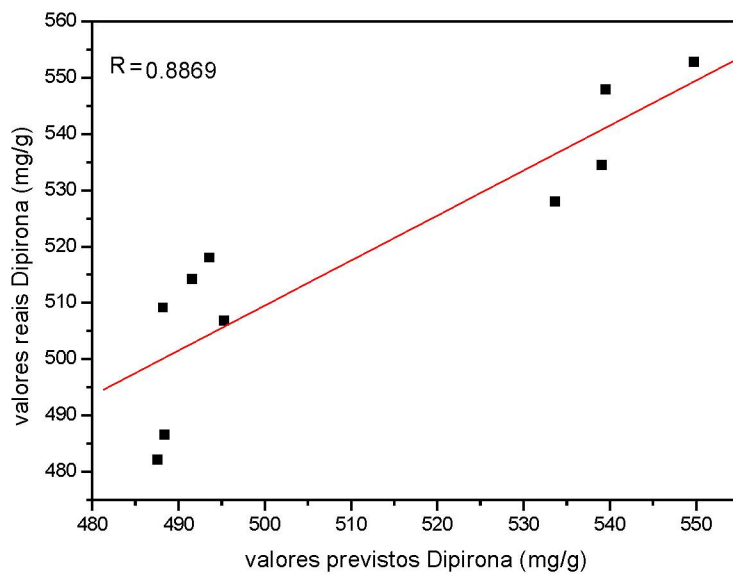
Correlação de validação para Dipirona utilizando o modelo processado com 1^a derivada e 8 cp



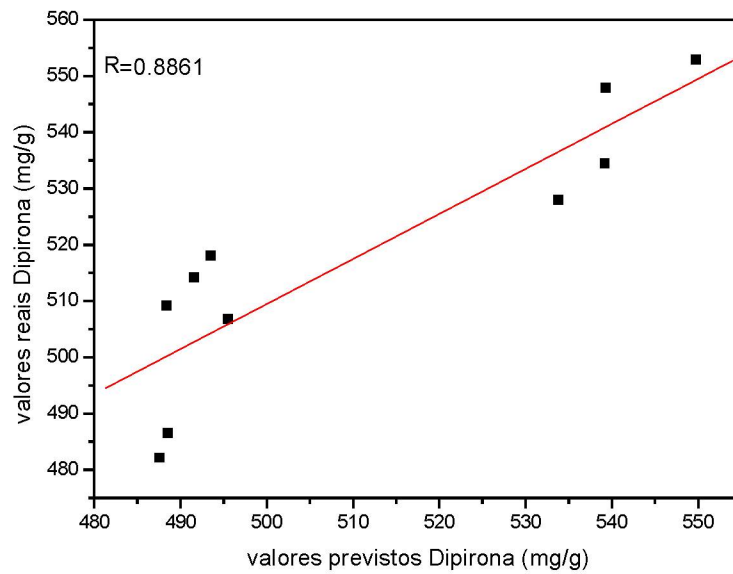
Correlação de validação para Dipirona utilizando o modelo processado com 1^a derivada e 4 cp



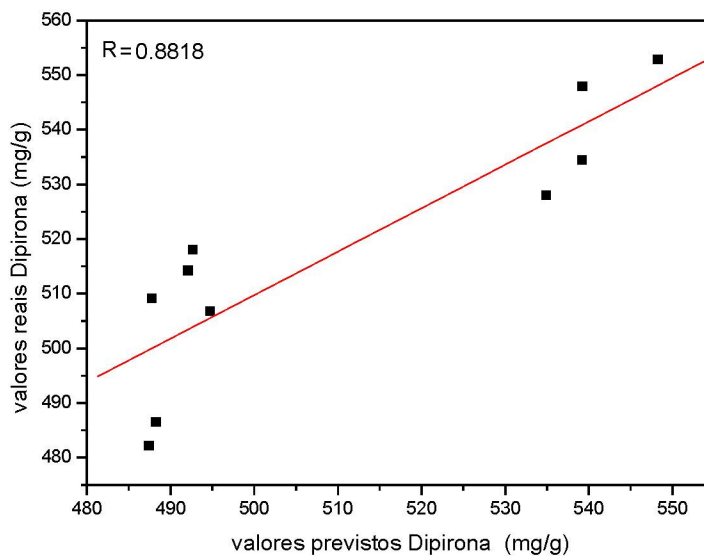
Correlação de validação para Dipirona utilizando o modelo processado com 1^a derivada e 3 cp



Correlação de validação para Dipirona utilizando o modelo processado com 2^a derivada e 8 cp

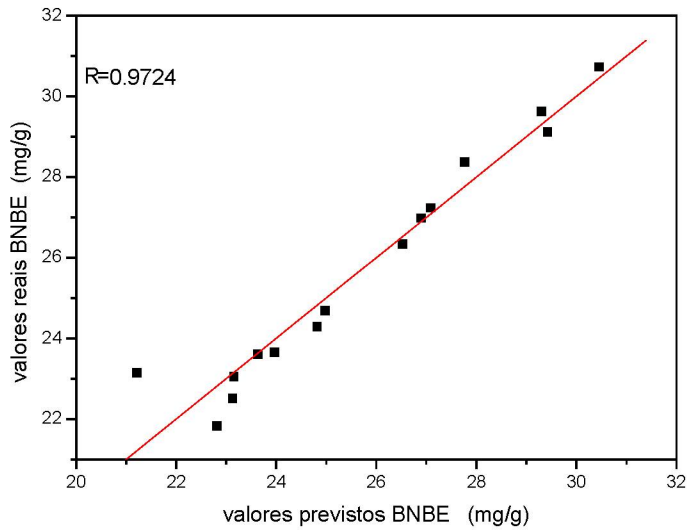


Correlação de validação para Dipirona utilizando o modelo processado com 2^a derivada e 4 cp

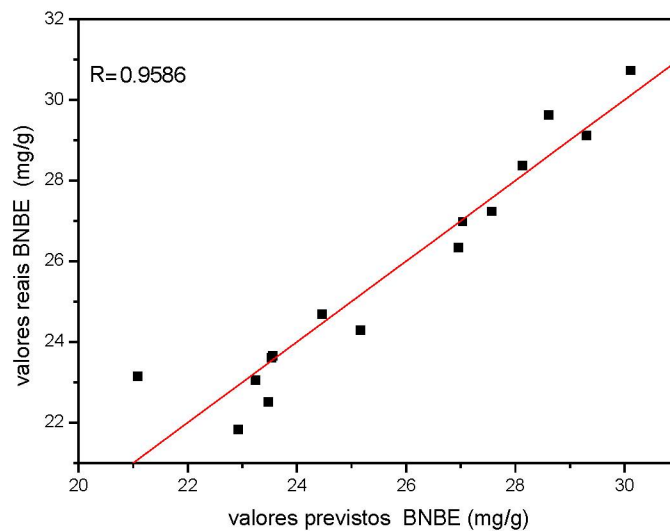


Correlação de validação para Dipirona utilizando o modelo processado com 2^a derivada e 3 cp

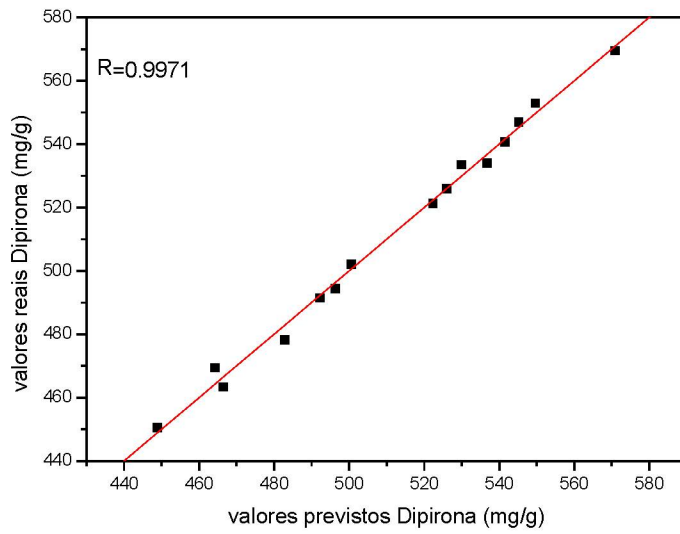
Gráficos de Correlação entre os valores reais e previstos para os modelos construídos na região do MID



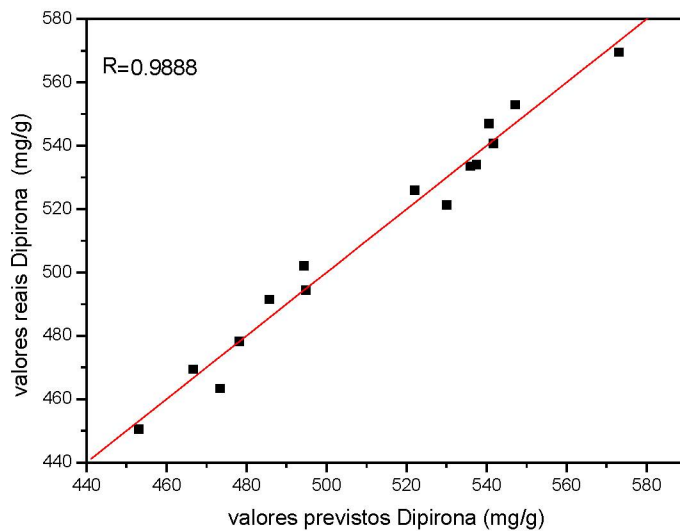
Correlação entre valores reais e valores previstos para BNBE utilizando o modelo de calibração processado com a 1ª derivada e 3 cp.



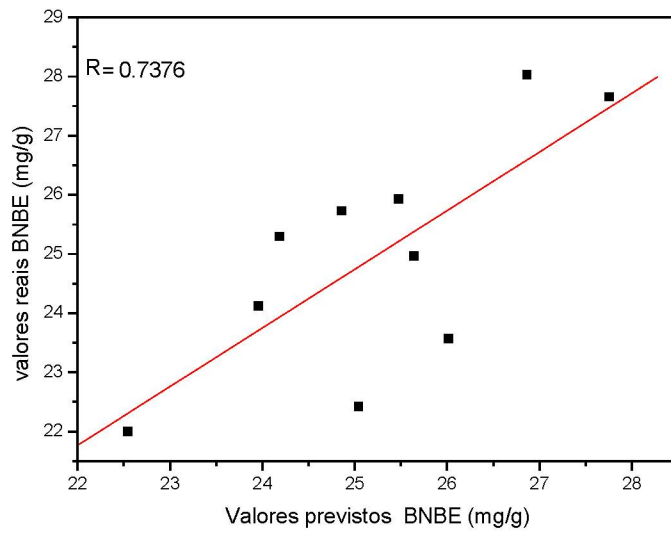
Correlação entre valores reais e valores previstos para BNBE utilizando o modelo de calibração processado com a 2ª derivada e 3 cp.



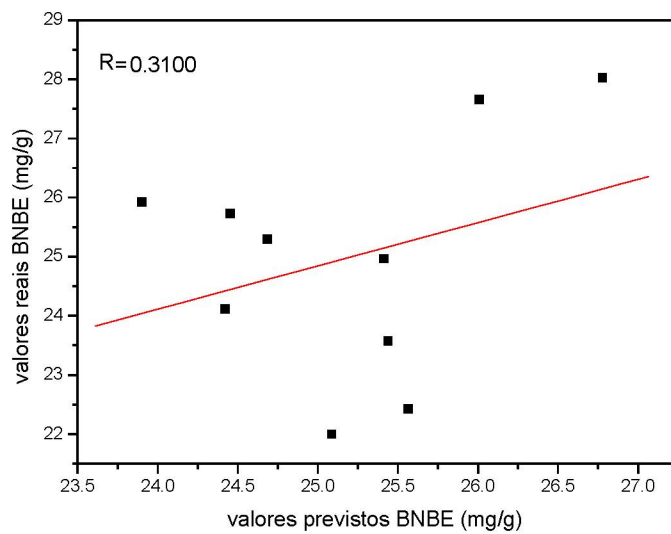
Correlação entre valores reais e valores previstos para Dipirona utilizando o modelo de calibração processado com a 1ª derivada e 3 cp.



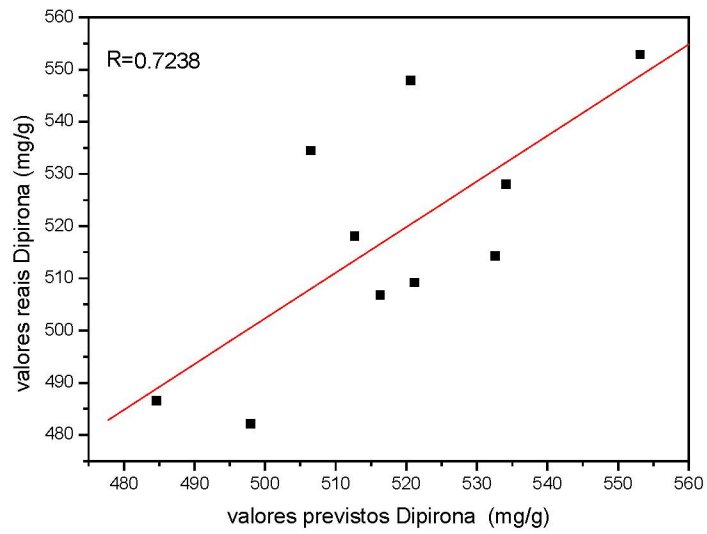
Correlação entre valores reais e valores previstos para Dipirona utilizando o modelo de calibração processado com a 2ª derivada e 3 cp.



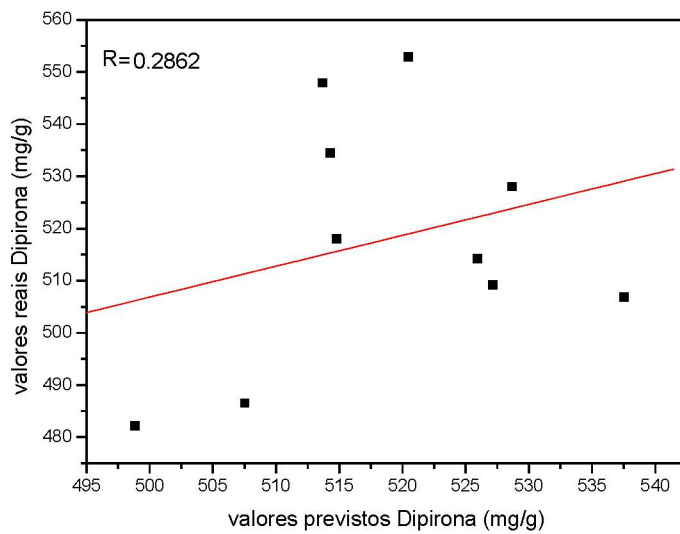
Correlação de validação para BNBE utilizando o modelo processado com 1^a derivada e 3 cp



Correlação de validação para BNBE utilizando o modelo processado com 2^a derivada e 3 cp



Correlação de validação para Dipirona utilizando o modelo processado com 1ª derivada e 3 cp



Correlação de validação para Dipirona utilizando o modelo processado com 2ª derivada e 3 cp.