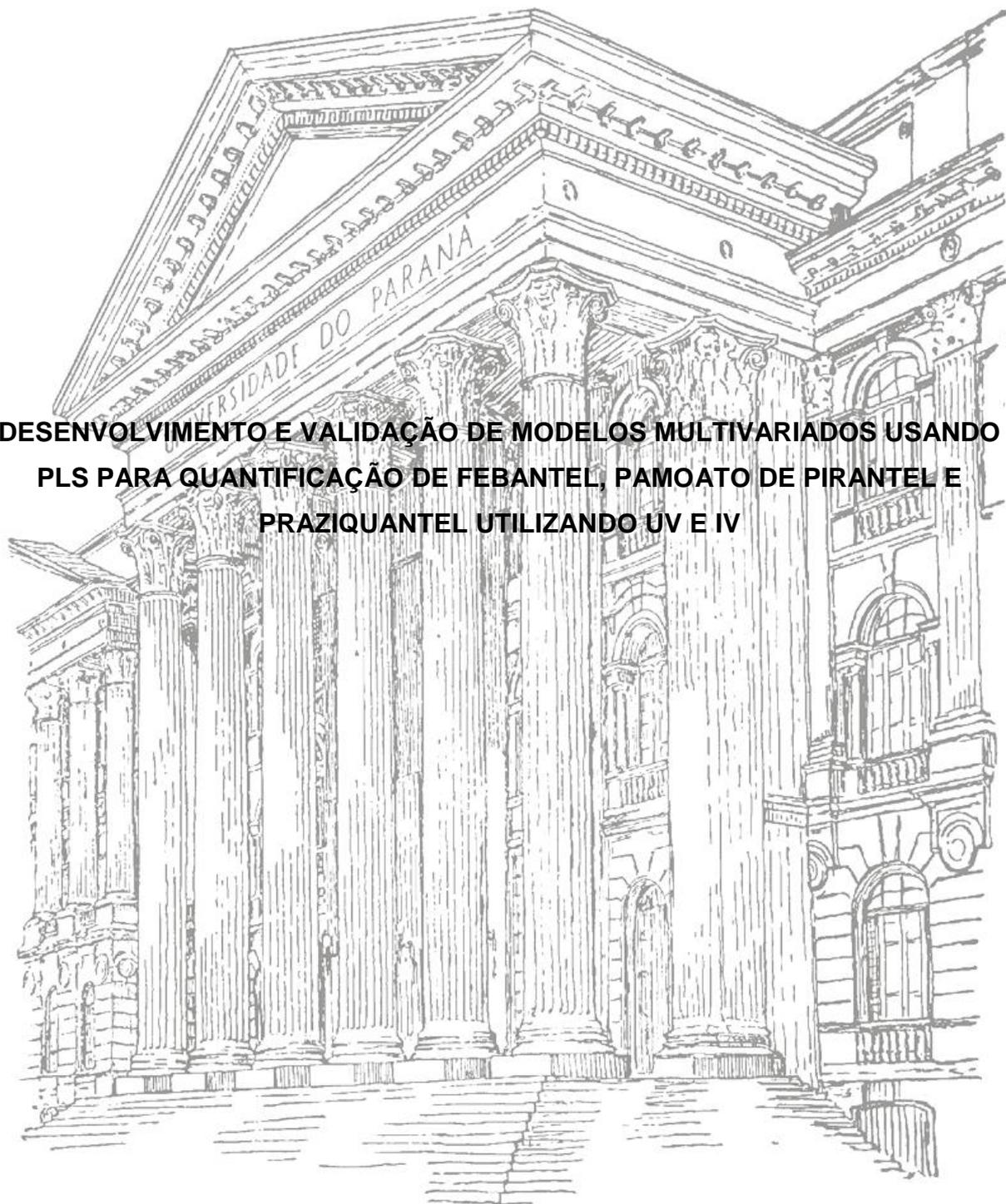


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MÁRIO SÉRGIO PIANTAVINI

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MODELOS MULTIVARIADOS USANDO
PLS PARA QUANTIFICAÇÃO DE FEBANTEL, PAMOATO DE PIRANTEL E
PRAZICUANTEL UTILIZANDO UV E IV**



**CURITIBA
2014**

MÁRIO SÉRGIO PIANTAVINI

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MODELOS MULTIVARIADOS USANDO
PLS PARA QUANTIFICAÇÃO DE FEBANTEL, PAMOATO DE PIRANTEL E
PRAZQUANTEL UTILIZANDO UV E IV**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo (UFPR)
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo M. de Sena (UFMG)

**CURITIBA
2014**

Dedico este trabalho

À Deus e Aos meus pais Sérgio e Maria Aparecida

Às minhas avós (*in memoriam*) e todos os familiares pela educação, formação e amor que sempre me deram em todas as fases da vida

E amigos que de muitas formas me incentivaram e ajudaram para que fosse possível a concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Algumas aves migram ou se deslocam regularmente de uma região para outra de acordo com a mudança das estações em busca de alimento e abrigo. Na antiguidade os gregos conheciam esse procedimento das aves em busca de clima favorável para sua sobrevivência, tanto que as tinham como símbolo da amizade e da fidelidade porque elas voltavam anualmente para ocupar o mesmo ninho. Inspirado por elas o filósofo grego Aristóteles (384-322 a.C.) cunhou a frase “uma andorinha só não faz primavera”, ou “não faz verão”. Dentre as possíveis interpretações pode-se entender que as ações praticadas por um único indivíduo podem não ser suficientes para solucionar todos os problemas ou o problema de todos. Entretanto na coletividade encontramos pontos como a pluralidade de pensamentos, a complementaridade, a reciprocidade e outros valores que um dia estiveram no âmago de todos os nossos pais e que hoje correm em nosso sangue e nos tornam muito mais fortes e resistentes. É justamente esse senso de coletividade que nos dá o sentido de equipe, valorização do grupo, de sacrifício para o bem de todos e uma solidariedade sem fim. Pequenas e livres expressões de fraternidade que servem de alicerce para construir Reinos inteiros de harmonia e prosperidade. A força que existe em cada um não se soma, mas se multiplica e, por que não, se potencializa até onde o Homem acha que existe vida.

Na própria natureza encontramos exemplos disso como na revoada dos gansos, no trabalho das formigas e abelhas ou na resistência ao frio dos pinguins. A todos que participaram ativamente dessa jornada deixo meus mais sinceros agradecimentos e em especial aos que de fato fizeram valer o ideal da amizade e coletividade.

Em primeiro lugar a Deus por dar as condições para poder lutar por todos os nossos desejos. Aos meus pais e minha família o meu muitíssimo obrigado pelas lições que ainda me dão, pela confiança, pelo carinho e amor que necessito para continuar em frente. Exemplos de lealdade, justiça e honestidade quando estão próximos assim facilitam a vida e são muito mais termodinamicamente favoráveis. À minha eterna namorada Elaine, com a luz e calor de um sol, com o brilho de uma estrela pra iluminar o meu caminho, com um carinho da imensidão do mar e com a beleza exuberante que fascina como a lua.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Farmácia da UFPR que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho, em especial ao Centro de Estudos em Biofarmácia em nome do Prof. Pontarolo.

Há professores que lutam um dia; e por isso são bons; Há professores que lutam muitos dias; e por isso são muito bons; Há professores que lutam anos; e são melhores ainda; Porém há professores como o Prof. Pontarolo que lutam toda a vida; por isso ele faz parte do seleto grupo dos imprescindíveis. Não poderia deixar de citar nesse jogo o prof. Marcelo M. Sena que antes de começar o segundo tempo mexeu no time, arrumou a zaga, deu mais liberdade pros meias e o time foi pro ataque, virou o jogo e saiu aplaudido pela torcida. Ele que mesmo estando sempre passos a frente da humanidade foi humilde de voltar alguns para trás e nos ajudar com um olhar sincero, honesto e edificador. Também ao prof. Dr. Federico Marini que junto aos seus orientados (Riccardo, Marta, Silvia e Alessandra) me acolheram tão bem em seu laboratório em Roma. Aos professores Jez Willian Batista Braga (UnB), Patrícia Valderrama (UTFPR), Patricio Guillermo Peralta Zamora (UFPR), Tania Mari Bellé Bresolin (UNIVALI), Dile Pontarolo Stremel (UFPR) e Márcia Miguel Castro Ferreira (UNICAMP) por colaborarem com a correção desta Tese.

Quando tudo parece estar perdido é nessa hora que você vê quem é parceiro, quem é bom amigo quem tá contigo quem é de correr. Na hora que a gente menos espera, no fim do túnel aparece uma luz. A luz de uma amizade sincera para ajudar carregar nossa cruz. Foi Deus quem colocou vocês no meu caminho, na hora certa pra me socorrer, eu não teria chegado sozinho a lugar nenhum se não fossem vocês. A todos os amigos mais antigos, os do mestrado e do doutorado e em especial aos do laboratório (Caroline P. Uber, Flávia 'flavonóide' L.D. Pontes, Astrid Wiens, Suzane Virtuoso, Cleverson 'guerrão' A. Martins, Andréia C. C. Sanches, Helena H. Borba, Sirley S. Hayashi, Suelem T. S. Penteado, Brígida D. Fernandes, Raquel O. Vilhena, Breno M. Marson, Luna A. Gonçalves, Camilla R. S. Madeira) pelas palavras e sinceras atitudes de ajuda em todos os momentos dentro e fora do laboratório. Cada um com sua parcela, cada um com seu conhecimento fez a parte que lhe coube nesse "latifúndio" de trabalho. Por isso não é possível agradecer pontualmente cada um, uma vez que a gratidão e o respeito por vocês não pode ser mensurado nem predito com mais de quatro casas depois da vírgula. Sabemos que não somos pessoas perfeitas, mas nos encontramos como pessoas que se aceitam em nossas imperfeições numa corrida que não tem linha de chegada, tem apenas o espírito do "que bom que você conseguiu!".

A todos digo que não consigo expressar tudo o que desejo, pois há sentimentos que a linguagem não expressa e emoções que as palavras não sabem traduzir.

"Não sabendo que era impossível, foi lá e fez"

(Jean Cocteau)

"They did not know it was impossible, so they did it"

(Mark Twain)

"A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos"

(Charles Chaplin)

RESUMO

O Pamoato de Pirantel, Febantel e o Praziquantel são fármacos antiparasitários utilizados para o tratamento de helmintíases. Estas são doenças que podem ser transmitidas dos animais para os seres humanos, por isso o interesse e importância na saúde pública. Em geral, associações medicamentosas de dois ou mais fármacos com mecanismos de ação distintos são muito utilizados nesses tratamentos por serem mais eficientes e terem menos efeitos colaterais por necessitar de doses mais baixas. Na literatura há métodos analíticos para a determinação desses fármacos na forma isolada e associação por HPLC, mas até o momento não há nenhum descrito que os quantifique simultaneamente utilizando técnicas de calibração multivariada (PLS) e espectrofotometria no Ultravioleta e Infravermelho. Para o presente trabalho foram utilizados planejamentos experimentais para desenvolver e validar os métodos espectrofotométricos na região do UV e IV, com ferramentas matemáticas, para a quantificação simultânea dos fármacos em comprimidos, cápsulas e solução oral. Os modelos foram desenvolvidos através da combinação entre os espectros de absorção no ultravioleta e infravermelho médio (DRIFT) com o método PLS2 com seleção de variáveis por PLS em intervalos (iPLS). Os modelos por UV foram validados com 2 Variáveis Latentes, centrados na média e mais de 99% da variância explicada para os blocos X e Y. Os modelos por IV foram validados com 5 VL, utilizando 1ª Derivada com MSC, SNV ou centrado na média e com variância explicada maior que 95% para o bloco X e Y. Os métodos desenvolvidos apresentaram resultados satisfatórios nos parâmetros da validação multivariadas e univariadas, como linearidade, sensibilidade e seletividade, precisão intra e inter-dias, robustez e exatidão. Por serem métodos simples, rápidos e econômicos, são uma opção viável para laboratórios analíticos para a quantificação simultânea desses fármacos em preparações farmacêuticas.

Palavras-chave: *pamoato de pirantel, febantel, praziquantel, espectrofotometria no UV e IV, validação de método analítico, calibração multivariada, PLS.*

ABSTRACT

Pyrantel Pamoate, Febantel and Praziquantel are antiparasitic drugs used for the treatment of helminthiases. These diseases can be transmitted to humans, hence the importance to public health. Usually, the combinations of two or more drugs with different mechanisms of action are required to increase the spectrum of action and fewer side effects because it requires lower dose. In the literature there are analytical methods for the determination of these drugs by HPLC, but none of them have performed simultaneous determination by using UV or IR spectrophotometry and multivariate calibration with PLS. In this work, multivariate UV and IR methods for the simultaneous quantification of these drugs in veterinary pharmaceutical formulations were developed and validated, using experimental design. The models were developed through the combination of UV and MIR (DRIFT) absorption spectra with PLS2 method and interval PLS (iPLS) variable selection. The UV models were validated using 2 LV, mean centered, and more than 99% of total variance explained in the X and Y block. The IR models were validated using 5 LV, 1st Derivative with MSC, SNV or mean center and explained variance greater 95% for X and Y block. The developed methods had a satisfactory performance in the multivariate and univariate validation parameters, such as linearity, sensitivity and selectivity, precision, accuracy and robustness. The spectrophotometric UV and IR methods coupled to PLS are suitable for the simultaneous quantification of pyrantel pamoate, praziquantel and febantel. Additionally the method is fast and takes advantage of simple and accessible reagents and equipment, while having a low operating cost.

Keywords: *pamoate de pirantel, febantel, praziquantel, spectrophotometry UV and IR, validation of analytical method, multivariate calibration, PLS*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – Fórmula estrutural do praziquantel.....	21
FIGURA 02 – Fórmula estrutural do pamoato de pirantel.....	22
FIGURA 03 – Fórmula estrutural do febantel.....	23
FIGURA 04 – Regiões do espectro eletromagnético.....	27
FIGURA 05 – Esquema da construção de um modelo PLS.....	32
FIGURA 06 – Aquisição da matriz X e correlação com Y	32
FIGURA 07 – Relação entre as matrizes X e Y em função de B	33
FIGURA 08 – Planejamento de um experimento do tipo delineamento composto central rotacional.....	37
FIGURA 09 – Validação cruzada pelo método <i>leave-one-out</i>	39
FIGURA 10 – Tipos de planejamento experimental para dois analitos.....	58
FIGURA 11 – Planejamento experimental DCCR para PP, PZ e FB (mg/0,1g)	59
FIGURA 12 – Conjunto de calibração (losango preto) e validação (losango branco) para o modelo por UV de quantificação de FB e PP (A) e conjunto de calibração (círculo preto) e validação (triângulo branco) para PP-PZ (B)..	60
FIGURA 13 – Conjunto de calibração (losango preto) e validação (losango branco) para o modelo por IV de quantificação de FB e PP (A) e conjunto de calibração (círculo preto) e validação (losango branco) para PP-PZ (B)...	61
FIGURA 14 – Representação esquemática mostrando o planejamento DCCR para a variação de concentração de FB, PP E PZ. Conjunto de calibração (círculos) e conjunto de validação (triângulos).....	62
FIGURA 15 – Espectros de UV das soluções de acetonitrila:metanol (50:50 v/v).....	72
FIGURA 16 – Espectros isolados de UV das soluções de pamoato de pirantel (8,64 µg/mL), praziquantel (3 µg/mL) e febantel (9 µg/mL) em acetonitrila:metanol (50:50 v/v).....	73
FIGURA 17 – Espectros de IV do branco (cela sem analitos).....	73
FIGURA 18 – Espectros de IV das amostras padrão de praziquantel, febantel e pirantel no intervalo de 400 a 4000 cm ⁻¹	74
FIGURA 19 – Espectros de absorção no UV dos padrões de (A) PP (8,64 µg.mL ⁻¹) e PZ (3,00 µg.mL ⁻¹); (B) PP (8,64 µg.mL ⁻¹) e FB (9,00 µg.mL ⁻¹); as misturas de cada associação em metanol-acetonitrila (50:50, v/v).....	75
FIGURA 20 – Espectros de absorção no UV das misturas de FB e PP (A) e PP-PZ (B) do conjunto de calibração (___) e validação (___) em metanol-acetonitrila (50:50, v/v).....	76
FIGURA 21 – Escolha do número de variáveis latentes para o modelo FB-PP (A) e PP-PZ (B) por UV.....	77
FIGURA 22 – Avaliação de <i>outliers</i> no modelo FB-PP (A) e PP-PZ (B) por UV através dos resíduos de student <i>x leverage</i>	78
FIGURA 23 – Avaliação de <i>outliers</i> no modelo FB-PP (A) e PP-PZ (B) por UV através dos resíduos Q X HOTELLING T ²	78
FIGURA 24 – Comparação dos espectros de absorção no UV do FB (A) e PP (B) com os dados de loadings no modelo FB-PP por UV.....	79
FIGURA 25 – Comparação dos espectros de absorção no UV do PP (A) e PZ (B) com os dados de vip scores no modelo PZ-PP por UV.....	79
FIGURA 26 – Espectros de absorção no IV das misturas de FB-PP (A) e PP-PZ (B) do conjunto de calibração (___) e validação (___).....	82
FIGURA 27 – Espectros de absorção no IV das misturas de PZ, FB e PP do conjunto de calibração (___) e validação (___).....	82
FIGURA 28 – Resultado do sPLS2. A média espectral das 36 amostras de calibração e a média dos valores de RMSECV para cada intervalo. Os números na porção inferior de cada barra indicam o número de VL para cada intervalo e a linha pontilhada indica o valor de RMSECV para o modelo	

	com espectro completo. As regiões selecionadas estão em cinza claro...	84
FIGURA 29	– Escolha do número de variáveis latentes para o modelo FB-PP (A), PP-PZ (B) e FB-PP-PZ (C) por IV.....	85
FIGURA 30	– Avaliação de <i>outliers</i> no modelo FB-PP (A), PP-PZ (B) e FB-PP-PZ (C) por IR através dos resíduos de student x leverage.....	86
FIGURA 31	– Avaliação de <i>outliers</i> no modelo FB-PP (A), PP-PZ (B) e FB-PP-PZ (C) por IR através dos resíduos Q X HOTELLING T^2	86
FIGURA 32	– Comparação dos espectros de absorção no IV com os dados de vipscores no modelo FB-PP (A e B), PP-PZ (C e D) por IV.....	87
FIGURA 33	– Comparação dos espectros de absorção no IV com os dados de vipscores no modelo FB-PZ-PP (PIRANTEL – A; FEBANTEL – B; PRAZQUANTEL - C) por IV.....	88
FIGURA 34	– Avaliação da linearidade pela relação entre valores de referência vs. valores preditos e distribuição dos resíduos no modelo FB-PP (A) e PP-PZ (B) no UV.....	95
FIGURA 35	– Avaliação da linearidade pela relação entre valores de referência vs. valores preditos e distribuição dos resíduos no modelo FB-PP (A), PP-PZ (B) E FB-PP-PZ (C) no IV.....	96

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01	– Métodos analíticos aplicados aos fármacos PP, PZ e FB, em matéria-prima e produto acabado.....	25
QUADRO 02	– Regiões do UV e IR do espectro eletromagnético.....	27
QUADRO 03	– Classificação dos métodos analíticos de acordo com a finalidade.....	43
QUADRO 04	– Ensaio necessários para a validação de métodos analíticos de acordo com a sua finalidade.....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 01	– Faixas de concentração utilizadas nos métodos de UV e IR para avaliação da Linearidade.....	62
TABELA 02	– Composição das misturas para avaliação do ensaio de robustez.....	67
TABELA 03	– Resumo dos parâmetros analisados para o melhor modelo desenvolvido para UV das associações FB/PP e PZ/PP.....	80
TABELA 04	– Variância explicada e erro de predição para o melhor modelo desenvolvido para UV das associações FB/PP e PZ/PP.....	80
TABELA 05	– Variância explicada e erro de predição para o melhor modelo desenvolvido para IR das associações FB/PP, PZ/PP e FB/PP/PZ.....	89
TABELA 06	– Resumo dos parâmetros analisados para o melhor modelo desenvolvido para IV das associações FB/PP, PZ/PP e FB/PP/PZ.....	89
TABELA 07	– Figuras de mérito multivariadas para os métodos por UV das associações PP-PZ e FB-PP.....	92
TABELA 08	– Figuras de mérito multivariadas para os métodos por IV das associações PP-PZ e FB-PP.....	92
TABELA 09	– Avaliação da linearidade nos métodos por UV.....	94
TABELA 10	– Avaliação da linearidade nos métodos por IR.....	95
TABELA 11	– Resultados da precisão (repetitividade) para a associação PP-PZ por UV e IR.....	98
TABELA 12	– Resultados da precisão (repetitividade) para a associação FB-PP por UV e IR.....	98
TABELA 13	– Resultados da precisão (repetitividade) para a associação FB-PP-PZ por IR.....	98
TABELA 14	– Resultados da precisão intermediária para a associação FB-PP por UV e IR.....	99

TABELA 15 – Resultados da precisão intermediária para a associação PP-PZ por UV e IV.....	99
TABELA 16 – Resultados da precisão intermediária para a associação PP-PZ por UV e IV.....	100
TABELA 17 – Resultados do teste de exatidão da associação PP-PZ pela adição de padrão, por UV e IV.....	101
TABELA 18 – Resultados do teste de exatidão da associação FB-PP pela adição de padrão, por UV.....	101
TABELA 19 – Resultados do teste de exatidão da associação FB-PP pela adição de padrão, por IV.....	101
TABELA 20 – Resultados do teste de exatidão da associação FB-PP-PZ pela adição de padrão, por IV.....	101
TABELA 21 – Resultado do ensaio de robustez para a associação FP-PP-PZ por IV	103
TABELA 22 – Teste de homogeneidade de variâncias da associação FB-PP-PZ.....	103
TABELA 23 – Teste de robustez por ANOVA do modelo por IV para FB-PP-PZ.....	104
TABELA 24 – Comparação dos resultados entre os métodos por PLS e CLAE da associação PP-PZ em cápsulas e comprimidos.....	105
TABELA 25 – Comparação dos resultados entre os métodos por PLS e CLAE da associação FB-PP em cápsulas e suspensão oral.....	106
TABELA 26 – Comparação dos resultados entre o método proposto por IV-PLS (n=6) e as técnicas padrão CLAE-DAD (n=3), CLAE/MS-MS (n=3) da associação FB-PP-PZ em comprimidos.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATR - Reflectância total atenuada (*attenuated total reflectance*)

ASTM - *American Society for Testing and Materials*

BCS - Sistema de Classificação Biofarmacêutico (*Biopharmaceutics Classification System*)

CCD - Planejamento composto central (*central composite design*)

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Pressão ou Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*) – DAD (detector por arranjo de diodo) ou EM/EM (espectrometria de massas)

CP - Componente principal

CV - Coeficiente de variação

DCCR - Delineamento composto central rotacional

DP - Desvio padrão

DPR - Desvio padrão relativo (sinônimo de coeficiente de variação)

DRIFT - Espectroscopia por refletância difusa no Infravermelho com transformada de Fourier (*Diffuse Reflection Infrared Fourier Transform Spectroscopy*)

FB - Febantel

- FDA - Food and drug administration
- FOM - Figuras de mérito (*figures of merit*)
- ICH - *International Conference on Harmonisation*
- IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- iPLS - Regressão de mínimos quadrados parciais por intervalo (*interval partial least squares regression*)
- IV - Espectroscopia na região do infravermelho
- MID - Região do infravermelho médio (*Mid-wave infrared*)
- MSC - Correção multiplicativa do espalhamento da luz (*Multiplicative Scatter Correction*)
- NAS - Sinal analítico líquido (*Net Analyte Signal*)
- NIR - Região do infravermelho próximo (*Near infrared*)
- PCA - Análise de componentes principais (*Principal Components Analysis*)
- pH - Potencial hidrogeniônico
- PLS - Mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares*)
- PP - Pamoato de Pirantel
- PZ - Praziquantel
- R² - Coeficiente de determinação
- r - Coeficiente de correlação
- RMSEC - Raiz quadrada do erro médio de calibração (*Root Mean Standard Error of Calibration*)
- RMSECV - Raiz quadrada do erro médio de calibração por validação cruzada (*Root Mean Standard Error of Calibration with Cross Validation*)
- RMSEP - Raiz quadrada do erro médio de predição (*Root Mean Standard Error of Prediction*)
- RPD - *Ratio performance deviation*
- SG - Savitzky-Golay
- siPLS - Regressão de mínimos quadrados parciais por sinergia de intervalo (*synergy interval PLS*)
- USP - *United States Pharmacopeia*
- UV - Espectroscopia na região do ultravioleta
- UV-Vis - Espectroscopia na região do ultravioleta e visível
- VIP - *Variable influence on projection*
- VL - Variável latente

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE QUADROS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. IMPORTÂNCIA DOS ANIMAIS DE COMPANHIA NA SOCIEDADE.....	19
2.2. Mercado Veterinário.....	19
2.3. PARASITOSSES E ZOONOSES.....	20
2.3.1. Tratamento.....	20
2.3.1.1. Fármacos.....	21
2.3.1.1.1. Praziquantel.....	21
2.3.1.1.2. Pamoato de Pirantel.....	22
2.3.1.1.3. Febantel.....	22
2.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PAMOATO DE PIRANTEL, FEBANTEL E PRAZIQUANTEL.....	23
2.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	25
2.4.2. Espectroscopia eletrônica.....	26
2.4.3. Espectroscopia no infravermelho.....	28
2.5. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.....	31
2.5.1. Matrizes.....	32
2.5.2. PLS e <i>i</i> PLS.....	34
2.5.3. Planejamento experimental.....	36
2.5.4. Pré-processamento.....	38
2.5.5. Validação cruzada.....	39
2.5.6. Seleção do número de variáveis latentes.....	40
2.5.7. Detecção de amostras anômalas.....	40
2.6. VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	42
2.6.1. Seletividade.....	45
2.6.2. Linearidade.....	46
2.6.3. Exatidão.....	46
2.6.4. Precisão.....	47
2.6.4.1. Repetitividade.....	48
2.6.4.2. Precisão intermediária.....	48
2.6.5. Robustez.....	48
2.6.6. Sensibilidade.....	48
2.6.7. Sensibilidade analítica.....	49
2.6.8. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	49
2.6.9. RPD.....	50
3. OBJETIVOS.....	52
3.1. OBJETIVO GERAL.....	52
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
4.1. DESENHO EXPERIMENTAL.....	54
4.2. MATERIAL.....	55
4.2.1. Material e reagentes.....	55
4.2.2. Equipamentos.....	55
4.2.3. <i>Softwares</i>	56
4.2.4. Aquisição dos dados.....	56
4.3. MÉTODOS.....	57
4.3.1. Seleção de excipientes.....	57
4.3.2. Desenvolvimento de métodos multivariados.....	58
4.3.2.1. Desenvolvimento de métodos por UV.....	59

4.3.2.1.1	Associação FB-PP.....	59
4.3.2.1.2	Associação PP-PZ.....	60
4.3.2.2.	Desenvolvimento de métodos por IV.....	60
4.3.2.2.1	Associação FB-PP.....	60
4.3.2.2.2	Associação PP-PZ.....	61
4.3.2.2.3	Associação FB-PP-PZ.....	61
4.4.	VALIDAÇÃO.....	62
4.4.1.	Linearidade.....	62
4.4.2.	Precisão.....	63
4.4.2.1.	Associação FB-PP/UV.....	63
4.4.2.2.	Associação PP-PZ/UV.....	63
4.4.2.3.	Associação FB-PP/IV.....	63
4.4.2.4.	Associação PP-PZ/IV.....	64
4.4.2.5.	Associação FB-PP-PZ/IV.....	64
4.4.3.	Exatidão.....	64
4.4.3.1.	Associação FB-PP/UV.....	64
4.4.3.2.	Associação PP-PZ/UV.....	65
4.4.3.3.	Associação FB-PP/IV.....	65
4.4.3.4.	Associação PP-PZ/IV.....	65
4.4.3.5.	Associação FB-PP-PZ/IV.....	65
4.4.4.	Robustez.....	66
4.4.4.1.	Associação FB-PP/UV.....	66
4.4.4.2.	Associação FB-PP-PZ/IV.....	66
4.5.	Análise e preparação de amostras comerciais.....	67
4.5.1.	Associação FB-PP/UV.....	67
4.5.2.	Associação PP-PZ/UV.....	68
4.5.3.	Associação FB-PP/IV.....	68
4.5.4.	Associação PP-PZ/IV.....	68
4.5.5.	Associação FB-PP-PZ/IV.....	68
4.5.6.	Análise pela técnica padrão: CLAE-DAD e CLAE-EM/EM.....	68
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
5.1.	CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS.....	71
5.2.	DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS.....	71
5.2.1.	Escolha do solvente.....	71
5.2.2.	Análises dos espectros de absorção eletrônica.....	72
5.3.	AVALIAÇÃO DOS MODELOS MULTIVARIADOS PARA UV.....	76
5.4.	AVALIAÇÃO DOS MODELOS MULTIVARIADOS PARA IV.....	81
5.5.	VALIDAÇÃO DOS MODELOS MULTIVARIADOS.....	90
5.5.1.	Linearidade.....	93
5.5.2.	Precisão.....	97
5.5.2.1.	Repetitividade e precisão intermediária.....	97
5.5.3.	Exatidão.....	100
5.5.4.	Robustez.....	102
5.6.	APLICAÇÃO EM AMOSTRAS COMERCIAIS.....	105
6.	CONCLUSÃO.....	110
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Há relatos de que o homem convive com os cães há mais de 30 mil anos, desde o período Paleolítico. Talvez por isso exista uma relação tão forte dos homens com esses animais. Eles não representam somente a guarda da casa, mas em grande parte dos casos uma valiosa companhia, principalmente, para crianças, deficientes visuais e idosos. Com o crescente número de adoções de animais de companhia ou domésticos como cães e gatos, que agora coabitam o domicílio dos seres humanos, também cresce o número de doenças parasitárias nos animais e em seus donos. Para o tratamento desse tipo de doença (zoonose) são disponibilizados pelas indústrias farmacêuticas um grande número de medicamentos antiparasitários. Com o crescimento da demanda, por esses medicamentos, há a necessidade de se verificar a qualidade tanto das matérias-primas quanto dos produtos, principalmente em relação ao teor de cada um dos fármacos. E com isso, são constantes os desafios da tecnologia analítica que precisa disponibilizar métodos confiáveis, de baixo custo, simples e acessíveis. Em geral, associações medicamentosas de dois ou mais fármacos com mecanismos de ação distintos, são muito utilizados nesses tratamentos por serem mais eficientes e terem menos efeitos colaterais, já que necessitam de doses mais baixas. Apesar do grande número de medicamentos veterinários contendo dois ou três fármacos em associação (Pirantel, Praziquantel e Febantel), não foram encontrados na literatura métodos que utilizem a espectrofotometria no Ultravioleta ou Infravermelho associados a métodos de calibração multivariada como o método de mínimos quadrados parciais (PLS). Assim, é importante ter métodos analíticos que quantifiquem simultaneamente esses três antiparasitários nas formas farmacêuticas disponíveis no mercado.

No presente trabalho, com auxílio de planejamentos experimentais, foram desenvolvidos e validados métodos por espectroscopia no UV e IV associados a ferramentas matemáticas da calibração multivariada (PLS) para a quantificação dos fármacos (Pirantel, Praziquantel e Febantel) em especialidades farmacêuticas (cápsulas, comprimidos e suspensão oral). A presente pesquisa é uma contribuição analítica pela disponibilização de métodos para quantificar simultaneamente pamoato de pirantel, febantel e praziquantel na rotina do controle de qualidade, métodos estes que minimizem os custos e o tempo da análise.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. IMPORTÂNCIA DOS ANIMAIS DE COMPANHIA NA SOCIEDADE

Os cães e os humanos dividem o mesmo nicho ecológico há pelo menos 14.000 anos (CLUTTON-BROCK, 1995) e possivelmente até cerca de 135.000 anos (VILÀ *et al.*, 1997). Desde a antiguidade, há evidências em pinturas, artefatos e textos que revelam que as pessoas, em todos os níveis da sociedade, mantinham os cães como animais de companhia e membros da família (DOTSON; HYATT, 2008). Eles já fizeram parte de várias culturas como, por exemplo, no Império Romano, em que já foram encontradas placas com os dizeres em latim “*Cave Canem*”, que significa “cuidado com o cão” (BELOTTO, 2012). Esses animais, nos dias contemporâneos, exercem as mesmas funções da antiguidade, como proteger a casa, auxiliar nas caçadas e também em novas atividades como detecção de drogas, acompanhamento de pessoas com deficiências visuais e até mesmo como melhor ou único amigo para muitas pessoas. Os seres humanos dependem dos animais para sua nutrição, companhia, desenvolvimento tecnológico, socioeconômico e científico (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

Historicamente na relação de humanos com animais, os cães são os que têm mais funções na sociedade, porém outros animais, como gatos, pequenos roedores, pássaros e vários outros também exercem esse papel. É notório e consenso entre as pessoas que todos eles são bons acompanhantes, principalmente para idosos e crianças, até mesmo promovendo uma melhora na saúde mental e física.

2.2. MERCADO VETERINÁRIO

O Brasil possui cerca de 28 milhões de cães domesticados e somente o mercado de ‘*pet shops*’ movimentava hoje cerca de R\$ 5 bilhões, crescendo a uma taxa de 20% ao ano (JUNQUEIRA; QUEIRÓS; SANTOS, 2012). Ele é um dos cinco maiores mercados veterinários do mundo (CAPANEMA *et al.*, 2012).

O faturamento do setor veterinário aqui no país em 2011 foi próximo de 3,5 bilhões de reais. Desse valor, cerca de 12% foram gastos com cães e gatos, e do total gasto estima-se que aproximadamente 850 milhões foram despesas com

antiparasitários (SINDAN, 2012). Há uma previsão de que o crescimento do mercado global de saúde animal seja de 4,5% ao ano (CAPANEMA *et al.*, 2012).

2.3. PARASITOSE E ZOONOSES

Parasitose é uma agressão produzida por um parasita em um hospedeiro, e que pode ocorrer sob a forma ou de infecção ou de infestação (FERREIRA, 2010). As parasitoses mais comuns em animais domésticos são a ancilostomose, tricuriase, toxocaríase e difilariose.

Zoonoses são doenças ou infecções naturalmente transmissíveis entre os animais vertebrados e os seres humanos (VASCONCELLOS, 2001) e tanto podem ser transmitidas dos animais para os humanos, quanto dos humanos para os animais. Essa transmissão pode ser através do contato direto com secreções ou fezes e também a partir dos produtos de origem animal como leite, carne e derivados. Apesar dos avanços verificados no seu controle, a incidência de zoonoses permanece alta em todos os países em desenvolvimento (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

Mais de 200 zoonoses são conhecidas, sendo causa de consideráveis morbidade e mortalidade em grupos demográficos vulneráveis, especialmente crianças, idosos e trabalhadores ligados às áreas da saúde pública e veterinária (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). As zoonoses de maior interesse são: a larva *migrans* cutânea (bicho geográfico), causada principalmente pela larva *Ancylostoma caninum* e *A. brasiliense*, que é depositada pelas fezes dos cães na forma de ovos que evoluem a larvas; e a larva *migrans* visceral, causada principalmente pelo gênero *Toxocara* através da ingestão de ovos.

2.3.1. Tratamento

O tratamento desse tipo de enfermidade se dá pela administração de medicamentos antiparasitários. Anti-helmínticos são usados em cachorros e gatos para a prevenção e tratamento de doenças potencialmente sérias clinicamente (KOPP *et al.*, 2008). Dentre os principais fármacos antihelmínticos destacam-se o praziquantel, o pamoato de pirantel e o febantel. A associação medicamentosa é, em geral, eficaz, segura e custo-efetiva. Isto acontece uma vez que no tratamento

combinado faz-se a associação de dois ou mais fármacos que tem diferentes mecanismos de ação, os quais atuam sinergicamente e podem ser administrados em doses menores, portanto com menor risco.

O controle helmíntico é importante não somente da perspectiva da saúde e bem-estar do animal, mas também para proteger a população humana de um número de importante doenças zoonóticas, particularmente aquelas associadas a ancilóstomos e ascaris (SCHAD, 1994).

2.3.1.1. Fármacos

2.3.1.1.1. Praziquantel

O Praziquantel (PZ) é um composto racêmico, contendo partes iguais dos isômeros “levo” R(-) e “dextro” S (+): 2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b,hexahidro-4H-pirazino [2,1- α]isoquinolina-4-ona. Somente o enantiomero “levo” possui atividade antiesquistossomal (CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003).

A matéria-prima apresenta-se na forma de um pó cristalino, de cor branca ou quase branca, muito pouco solúvel em água, livremente solúvel em álcool e em diclorometano. O ponto de fusão compreende a faixa de 136-138 °C, tem massa molecular de 312,4 g/mol e fórmula molecular C₁₉H₂₄N₂O₂ (BUDAVARI, 1996; 2007). A fórmula estrutural está representada na figura abaixo.

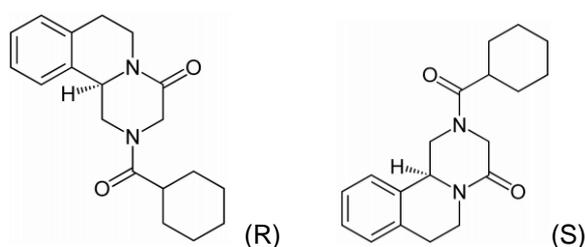


FIGURA 01 - Fórmula estrutural do praziquantel

FONTE: BUDAVARI (1996)

Este fármaco é um anti-helmíntico altamente ativo contra um amplo espectro de cestódeos e todas as espécies de Esquistossomo patogênico ao homem (DAVIS; WEGNER, 1979). A mais óbvia e imediata modificação que pode ser observada nos esquistossomos expostos a este fármaco, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, é uma paralisia espástica da musculatura do verme (CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003). O mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado, mas a melhor hipótese

é que ele se dá pela paralisação da musculatura do verme. Esta é acompanhada e provavelmente causada pelo rápido influxo de Ca^{2+} dentro do esquistossomo (PAX; BENNETT; FETTERER, 1978).

2.3.1.1.2. Pamoato de Pirantel

O Pirantel, 1-Metil-2-[(E)-2-(2-tienil)vinil]-5,6-dihidro-4H-pirimidina, é um imidazotiazol derivado e tem um amplo espectro de ação contra nematódeos gastrointestinais jovens e adultos que infectam animais domésticos (ADAMS, 2003). O Pamoato de Pirantel (PP) é um agonista colinérgico e age pela inibição das transmissões neuromusculares do parasita (ANDRADE, 2002). Ele é efetivo contra infestações por *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* em crianças e adultos (RAHMATOOLA *et al.*, 1972). O uso das combinações de anti-helmintos com diferentes mecanismos de ação tem sido efetivamente aplicado no tratamento veterinário de um largo espectro de atividade antiparasitária (MCKELLAR; JACKSON, 2004). Estes compostos são amplamente aplicados na prática veterinária, entretanto o praziquantel e o pamoato de pirantel tem aplicações na terapia para humanos (MOROVJAN *et al.*, 1998).

A matéria-prima apresenta-se como um pó de cor amarelo claro a amarelo, praticamente insolúvel em água e metanol e solúvel em dimetilsulfóxido (2007). Ele tem massa molecular de 594,68 g/mol e fórmula molecular $\text{C}_{34}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$. A fórmula estrutural está representada na figura abaixo.

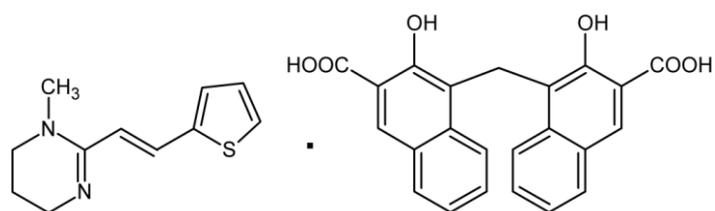


FIGURA 02 - Fórmula estrutural do pamoato de pirantel

FONTA: BUDAVARI (1996)

2.3.1.1.3. Febantel

O Febantel (FB), N-(2-[2,3-Bis-(metoxicarbonil)-guanidino]-5-(feniltio)-fenil)-2-metoxiacetamida (WOLLWEBER *et al.*, 1978), é uma pró-droga convertida a benzimidazoles ativos pelo processo metabólico no animal hospedeiro e aos

metabólitos (Fenbendazol ou Oxfendazol) ativos que são responsáveis pela ação (MARTIN, 1997; ANDRADE, 2002). Ele atua inibindo a síntese de microtúbulos do parasita e é ativo contra *Ancylostoma caninum*, *Toxocara canis*, *Toxocara cati* e *Taenia spp.* (ADAMS, 2003). A matéria-prima é um pó cristalino branco ou quase branco, praticamente insolúvel em água, solúvel em acetona e levemente solúvel em etanol anidro. O ponto de fusão compreende a faixa de 129 a 130 °C, massa molecular de 446,49 g/mol e fórmula molecular C₂₀H₂₂N₄O₆S (BUDAVARI, 1996; 2007). A fórmula estrutural está representada na figura abaixo.

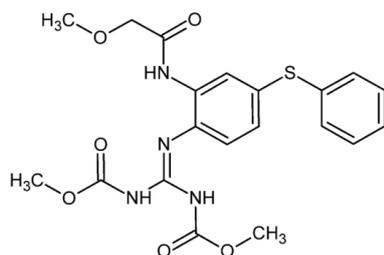


FIGURA 03 - Fórmula estrutural do febantel

FONTE: BUDAVARI (1996)

2.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PAMOATO DE PIRANTEL, FEBANTEL E PRAZIQUANTEL

As técnicas analíticas estão em constante evolução muito em virtude dos equipamentos cada vez mais sofisticados e do controle mais rigoroso dos fármacos. Isto vale ainda mais quando se trata de medicamentos que são usados pelos seres humanos para prevenir ou tratar doenças. Um medicamento, além de ser eficaz e seguro, também deve atender aos requisitos mínimos de qualidade, como o teor nominal descrito em rótulo, sendo essa a base para esse processo de prevenção ou cura. Atualmente, o controle analítico tem se notabilizado por gerar resultados quase imediatos após a produção dos medicamentos e somando a evolução da informática, as técnicas analíticas usadas no controle de qualidade de medicamentos pelas indústrias estão cada vez mais rápidas e eficientes.

Para se determinar o teor de um fármaco em um medicamento ou em uma matéria-prima deve-se recorrer a processos analíticos indiretos, já que o teor não é uma grandeza física observável. Para tanto deve-se correlacioná-lo com alguns parâmetros como, por exemplo, a absorção eletrônica para análises de UV ou absorção no infravermelho (IV). Para que a correlação entre o valor real e o sinal

obtido pelo equipamento possa ser feita de forma harmoniosa, é necessário dispor de aparelhos e métodos adequados, respeitando sempre o princípio teórico e as limitações de cada instrumento. Atualmente, são mais utilizados os instrumentos que conseguem mensurar simultaneamente diversos compostos dentro de uma mesma matriz, como cromatógrafos e espectrômetros. Para outros, como espectrofotômetros de absorção no UV e IV, quando há mais de um componente a ser mensurado pode ser bem complexa a forma de correlacionar o sinal analítico com a concentração real de cada analito. Neste caso recorre-se a outras ferramentas, como a utilização de modelagem por calibração multivariada e inferência estatística.

Especialidades farmacêuticas contendo doses combinadas destes três fármacos estão disponíveis no mercado e o controle de qualidade desses medicamentos se torna cada vez mais importante dado o aumento do uso dos mesmos. Na literatura há trabalhos que descrevem a determinação de PP, PZ e FB isolados ou em associação em matéria-prima e formulações farmacêuticas veterinárias. As determinações individuais ou simultâneas tem sido possíveis por espectrofotometria, titulação não-aquosa, voltametria, CLAE-DAD e CLAE-EM/EM, conforme pode ser visto no Quadro 1. Entretanto, nenhum desses métodos permite uma determinação simultânea dos três fármacos de modo rápido, fácil e de baixo custo. Além disso, a maior parte dos métodos são cromatográficos e frequentemente requerem um preparo de amostra que envolve uma série de etapas, como pré-tratamentos complexos incluindo a remoção de interferentes e/ou extração dos analitos, que às vezes consomem grandes quantidades de solventes orgânicos.

Os métodos que utilizam CLAE nem sempre estão disponíveis em pequenas empresas e farmácias de manipulação, devido ao valor do equipamento e alto custo de manutenção. Isto se constitui numa dificuldade para que estes estabelecimentos utilizem estas técnicas no controle de qualidade de seus produtos. Medicamentos que não estão conformes com o valor rotulado das concentrações dos fármacos podem gerar problemas para o consumidor final. Pode ocorrer uma ineficiência do tratamento, agravamento ou geração de um novo problema de saúde, caso as concentrações sejam maiores ou menores do que os valores declarados ou recomendados.

Métodos de análise que utilizam diferentes equipamentos, como espectrofotômetro UV-Vis, infravermelho e CLAE, possuem vantagens e limitações

que são inerentes aos próprios instrumentos. Por isso deve-se considerar todos os aspectos da análise ao se ponderar qual das técnicas será escolhida.

Fármaco	Tipo de amostra	Método utilizado	Referência
FB	Matéria-prima	CLAE-DAD	(EUROPEAN, 2007)
	Ração animal	CLAE-DAD	(DUSI; GAMBA; FAGGIONATO, 2005)
	Efluentes da indústria farmacêutica	CLAE-EM/EM	(BABIC <i>et al.</i> , 2010)
PZ	Matéria-prima	CLAE-DAD	(USP, 2008), (BRITISH, 2005) (EUROPEAN, 2007)
	Comprimidos	CLAE-DAD	(USP, 2008), (BONATO <i>et al.</i> , 2007)
	Comprimidos	CLAE-DAD e RMN	(LI <i>et al.</i> , 2007)
	Comprimidos	Voltametria de pulso diferencial	(GHONEIM; MABROUK; TAWFIK, 2002)
PP	Matéria-prima	Titulação em meio não aquoso	(EUROPEAN, 2007)
		CLAE-DAD	(USP, 2008)
	Suspensão oral	CLAE-DAD	(USP, 2008)
	Matéria-prima e comprimidos	CLAE-DAD	(ALLENDER, 1988; ARGEKAR; RAJ; KAPADIA, 1997)
	Matéria-prima e comprimidos	Voltametria	(JAIN; JADON; RADHAPYARI, 2006)
	Matéria-prima e comprimidos	Espectroscopia UV-Vis	FORCIER; MUSHINSKY; WAGNER (1971)
PP-FB	Cápsulas e suspensão oral	Espectroscopia UV-Vis	(PIANTAVINI <i>et al.</i> , 2014)
PP-FB-PZ	Comprimidos	CLAE-DAD	(BIALECKA; KULIK, 2010)
	Comprimidos	CLAE-EM/EM	(PONTES <i>et al.</i> , 2013)

QUADRO 1 – Métodos analíticos aplicados aos fármacos PP, PZ e FB, em matéria-prima e produto acabado.

FONTE: O autor (2014)

2.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O princípio da separação em cromatografia líquida é baseado tanto nas características físico-químicas dos analitos quanto nas interações entre a fase estacionária e a fase móvel. Durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária, os analitos são distribuídos nas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais. Dependendo das características da fase estacionária e do mecanismo

envolvido na separação, é possível classificar essa técnica em cromatografia de fase normal e cromatografia em fase reversa (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Uma das vantagens é que quase tudo que pode ser dissolvido pode ser separado em algum tipo de coluna de CLAE (MCMASTER, 2006).

Para uma adequada separação é fundamental o uso de colunas (fase estacionária) de acordo com algumas propriedades dos analitos, como a polaridade. Essas colunas cromatográficas são, em grande parte, feitas de aço inoxidável de 10-25 cm e preenchidas com partículas de rígido material poroso de tamanho entre 1 e 5 μm (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007). Após separar os analitos de interesse, o passo seguinte é quantificar os mesmos em função de alguma característica mensurável como, por exemplo, a absorção no UV. Isto é feito na última porção do equipamento em que diferentes detectores podem ser utilizados para essa quantificação do material que acabou de sair da coluna cromatográfica.

Com relação a este trabalho, a técnica tem algumas vantagens como alta resolução entre os picos dos fármacos, boa detectabilidade e automação do processo. Entretanto também possui algumas desvantagens o alto custo de manutenção do sistema completo, alto gasto com reagentes e tempo e análise que pode ser muito maior quando comparado à infravermelho associado a técnicas de calibração multivariada.

2.4.2 Espectroscopia eletrônica

A teoria da espectroscopia eletrônica é baseada na radiação numa faixa de comprimento de onda de 200-800 nm que é transmitida através de uma solução do composto. Os elétrons das ligações são excitados e ocupam um estado quântico superior, absorvendo um pouco da energia que passa pela solução (WATSON, 1999). A absorção dessa energia depende da estrutura eletrônica da molécula (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994) e do comprimento de onda da radiação (SOLOMONS, 1996). As transições dos elétrons podem ocorrer a partir de um dentre vários estados de vibração e de rotação de um nível de energia eletrônica para um dentre diversos estados de vibração ou de rotação do nível mais elevado (SOLOMONS, 1996). A transição de um elétron entre diferentes níveis energéticos é chamada de “transição eletrônica” e o processo de absorção é chamado “absorção eletrônica” (SKOOG *et al.*, 2000). O termo cromóforo é usado para descrever

qualquer estrutura característica que apresenta absorção na região do UV-Vis e inclui grupos nos quais as transições $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \sigma^*$ são possíveis (FURNISS *et al.*, 1989). As regiões do espectro eletromagnético podem ser vistas na figura 04 e, em especial, do ultravioleta e infravermelho no Quadro 02.

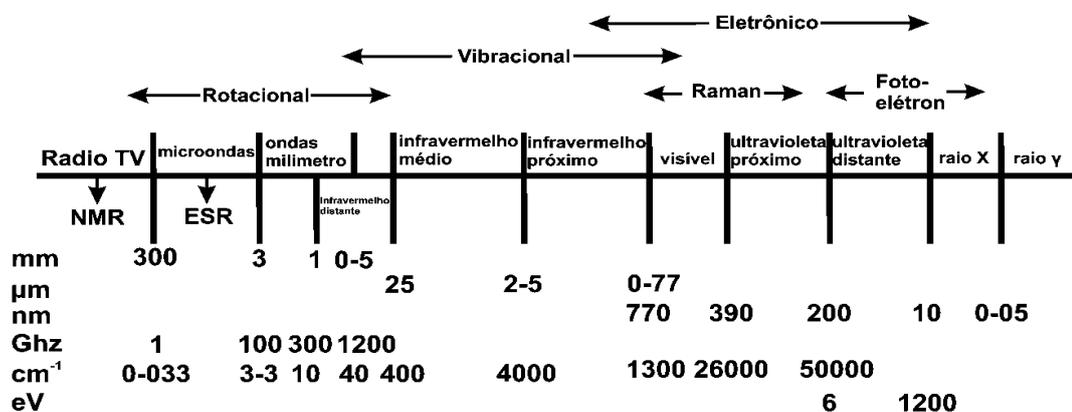


FIGURA 04 – Regiões do espectro eletromagnético
 FONTE: Adaptado de (HOLLAS, 2004)

REGIÃO ESPECTRAL	COMPRIMENTO DE ONDA	FREQÜÊNCIA EM NÚMERO DE ONDA (cm⁻¹)
Ultravioleta	200 – 400 nm	5000000 - 50000
Visível	400 – 800 nm	50000 – 25000
Infravermelho	0,75 – 2,5 μm	13333 - 400
Infravermelho distante	2,5 μm – 1 mm	400 – 10

QUADRO 02 – Regiões do ultravioleta e infravermelho do espectro eletromagnético
 FONTE: (SKOOG *et al.*, 2000)

Um dos grupos de maior interesse é o dos hidrocarbonetos insaturados. Há uma ligação π dos elétrons p do carbono perpendiculares ao plano das ligações σ . Neste caso, os elétrons π ligantes tem uma força de ligação menor e podem passar para níveis de energia superiores, orbitais π antiligantes, sem ocorrer uma completa ruptura da ligação. Assim, verifica-se a absorção da radiação na região do ultravioleta, atribuída a transições dos elétrons π de orbitais ligantes para antiligantes (transições $\pi \rightarrow \pi^*$). No estado π^* a ordem da ligação diminui e na molécula só existem ligações simples para se manter como um todo. Estas transições correspondem a absorções na região de 200-700 nm (GONÇALVES, 1990).

Como ponto forte, a espectroscopia no UV é fácil de ser utilizada, relativamente barata e oferece uma boa precisão para análises quantitativas (WATSON, 1999). Ela é uma das ferramentas mais poderosas e amplamente usada em análises quantitativas (SKOOG *et al.*, 2000). Como limitação, ela é

moderadamente seletiva, dependendo do cromóforo, e não muito aplicável para misturas de analitos (WATSON, 1999). Já com o auxílio da quimiometria e análise multivariada a quantificação de analitos/fármacos em misturas é possível em várias matrizes diversas como soluções orais, cápsulas e comprimidos. O mesmo ponto “negativo” pode ser visto no âmbito de que grupos característicos podem ser reconhecidos em moléculas bastante complexas (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994), facilitando a identificação da molécula.

A espectroscopia no UV também tem uma série de vantagens como uma boa sensibilidade e acurácia, além de ser simples e de fácil execução. No entanto tem como desvantagens a baixa seletividade e moderado gasto com reagentes.

2.4.3. Espectroscopia no infravermelho

A radiação infravermelha induz transições em estados vibracionais e rotacionais associados com o estado eletrônico fundamental das moléculas (SKOOG *et al.*, 2000). Os átomos, ou grupo de átomos, dos compostos orgânicos vibram com maior rapidez e com maior amplitude em torno das ligações covalentes que os unem. Estas vibrações são quantizadas e, quando ocorrem, os compostos absorvem energia IV em certas regiões do espectro (SOLOMONS, 1996). A intensidade das bandas de absorção depende da magnitude da carga na oscilação do momento dipolo da ligação durante a transição e também é diretamente proporcional ao número de ligações para aquela absorção particular (FURNISS *et al.*, 1989). O IV está inserido no espectro eletromagnético entre as regiões do visível e das micro-ondas e pode ser dividido em infravermelho próximo ($14290\text{ cm}^{-1} - 4000\text{ cm}^{-1}$), médio ($4000\text{ cm}^{-1} - 700\text{ cm}^{-1}$) e distante ($700\text{ cm}^{-1} - 200\text{ cm}^{-1}$) (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994). A região mais importante para a química orgânica é compreendida entre 4000 e 660 cm^{-1} (FURNISS *et al.*, 1989).

Na região do infravermelho, a absorção da radiação pode fornecer informações sobre a identidade dos compostos na presença ou ausência de grupos funcionais e estrutura das moléculas. Com exceção de moléculas diatômicas homonucleares, todas as outras absorvem radiação infravermelha. Por isso, esta é uma das técnicas espectroscópicas de mais ampla aplicação (SKOOG *et al.*, 2000). Ela é adequada para usos em linha, próxima de uma aplicação universal (PASQUINI, 2003). Há dois tipos principais de vibrações moleculares: estiramento

axial e deformação angular. Os estiramentos axiais podem ser simétricos ou assimétricos. Deformações angulares podem ser simétricas no plano (tesoura), assimétricas no plano (balança), simétricas fora do plano (torção) e assimétricas fora do plano (abano) (FURNISS *et al.*, 1989).

Uma interpretação completa de um espectro é, muitas vezes, difícil e complexa, pois a maioria dos compostos orgânicos tem um número muito grande de modos normais de vibração. Entretanto, não há a necessidade da elucidação completa do espectro, mas da identificação mínima de grupos funcionais característicos da molécula. Se por um lado essa complexidade é um ponto negativo, ela também tem um ponto positivo, pois quando dois espectros são quase que perfeitamente superponíveis a chance de eles terem sido gerados por amostras de uma mesma substância é muito grande.

O infravermelho tem sido amplamente usado em análises qualitativas e quantitativas, sendo importante para a avaliação de matérias-primas e produtos (STUART, 2004). Ele é uma técnica analítica que pode ser quantitativa, rápida, não destrutiva e não exige a utilização de reagentes e solventes. A faixa do infravermelho médio (principalmente pela técnica de espalhamento da luz - DRIFT) é a de maior número de pesquisas e aplicações, tendo em vista que esta região apresenta uma grande quantidade de informação que pode ser utilizada para a caracterização funcional de compostos orgânicos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Nos últimos anos o uso da espectroscopia no infravermelho no modo reflectância tem sido uma alternativa confiável para o controle de qualidade dos ingredientes farmacêuticos ativos (API), fornecendo métodos de relativo baixo custo, que demandam uma intervenção humana menor, e mais apropriados para o controle de qualidade moderno. Tanto a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) (FERREIRA; GOMES; SENA, 2009; XIANG; BERRY *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012) quanto no médio (MIR) (SILVA *et al.*, 2009; BUNACIU; ABOUL-ENEIN; FLESCHIN, 2010; MAZUREK; SZOSTAK, 2011; MÜLLER *et al.*, 2012) tem sido recentemente usadas para o desenvolvimento desses métodos.

Uma das técnicas mais utilizadas em medidas quantitativas no infravermelho, especialmente em aplicações com amostras sólidas (particuladas ou fragmentadas, pouco ou não reflexivas, na forma de pó), baseia-se em medidas de reflectância. Embora o modo de aquisição seja diferente e os espectros não sejam idênticos, são

semelhantes na aparência e carregam a mesma informação, podendo ser usados tanto para análises qualitativas como quantitativas. A técnica de espectrometria de reflectância ainda pode ser dividida em reflectância especular, total atenuada (ATR) e difusa (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Dentre essas três a que apresenta a maior aplicação é a reflectância difusa (DRIFT) para o infravermelho próximo e ATR para o médio.

A quantificação simultânea é um desafio no campo da química analítica e para os analistas, devido à sobreposição intensa que há em métodos tanto no UV quanto no IV. Essa presença de sobreposição espectral significativa entre o(s) analito(s) e os excipientes faz com que a determinação direta seja quase impossível. Uma das possibilidades para resolver esse problema é a utilização de formas de calibração convencional como a espectrofotometria derivativa. Outra requer o uso combinado de métodos de calibração multivariada, como o de mínimos quadrados parciais – PLS (HAALAND; THOMAS, 1988) - que têm sido amplamente utilizados na quantificação de misturas. A situação é ainda mais complexa no caso de determinações de vários analitos de interesse simultaneamente (situação de multiproduto). Artigos em que foram determinados três analitos simultaneamente ou mais não são situações comuns na literatura até o presente momento, tendo sido encontrado apenas o artigo de (BLANCO; ALCALÁ, 2006) nessa situação.

Apesar do crescimento do número de artigos publicados nos últimos anos que desenvolveram métodos para a determinação de ativos em formulações de medicamentos para uso humano usando a região do infravermelho próximo ou médio (NIR/MID), a quantificação em formulações veterinárias é também muito rara ou até mesmo inexistente. No mercado nacional uma particularidade das formulações veterinárias é que, diferente das destinadas a uso humano, na grande maioria das bulas não constam sequer os nomes dos excipientes utilizados, tornando quase impossível o desenvolvimento de métodos que necessitam de informações qualitativas. Em um cenário ideal, além da composição qualitativa, seria também necessária a quantitativa para o desenvolvimento de modelos que simulem com mais exatidão a formulação comercial.

2.5 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

O uso da calibração multivariada está diretamente ligado ao desenvolvimento de setores do conhecimento como a informática. Até meados da década de 70 não existia uma instrumentação analítica com tantos recursos e a consequência disto era a utilização de praticamente somente métodos univariados, baseados na variação de apenas uma única variável. Com o avanço da eletrônica nos computadores e de instrumentos analíticos, novas perspectivas foram sendo desenhadas. Nesse âmbito a calibração multivariada vem se mostrando uma ferramenta extremamente eficiente, já que com bons instrumentos, que geram respostas cada vez mais precisas e detalhadas, e com *softwares* que analisam grandes quantidades de dados, a tendência é conseguir a resolução de problemas de modo cada vez mais rápido e simples.

O conceito básico da calibração univariada é utilizar uma única variável (por exemplo, a absorbância em um determinado comprimento de onda no espectro de ultravioleta) para se obter a concentração de um analito.

Quando se tem essa situação praticamente o problema se restringe ao preparo adequado da amostra, entretanto nem sempre é assim que os problemas se apresentam. Muitas vezes, é necessário detectar e quantificar mais de um analito, como em aplicações no UV nos quais vários compostos podem apresentar bandas de absorção similares que se sobrepõem.

Com o advento da calibração multivariada é possível utilizar uma quantidade maior de variáveis para detectar não somente um, mas vários analitos de interesse simultaneamente. O que era um problema na calibração univariada (sobreposição de bandas), torna-se um fator que demanda o uso da calibração multivariada, uma vez que ela não se justifica quando existe uma variável seletiva, por exemplo, um comprimento de onda no qual apenas o analito apresenta sinal. Antes, era imprescindível uma prévia separação física ou química dos analitos, atualmente não é tão necessário um preparo de amostra muito laborioso, que em geral leva a contaminações ou perdas de amostra, pois é possível uma separação dos sinais analíticos dos interferentes utilizando técnicas de calibração multivariada.

O propósito da calibração multivariada é estabelecer uma relação entre variáveis dependentes e independentes, ou seja, correlacionar quantidades mensuráveis (como absorbância em diferentes comprimentos de onda no UV) com

propriedades do sistema, como a concentração de um analito de interesse na presença de outros analitos. O processo consiste basicamente de duas etapas: calibração e validação do método através da determinação da concentração de amostras que não foram utilizadas para a construção do modelo de calibração. Resumidamente, um modelo PLS pode ser construído de acordo com o esquema da Figura 05.

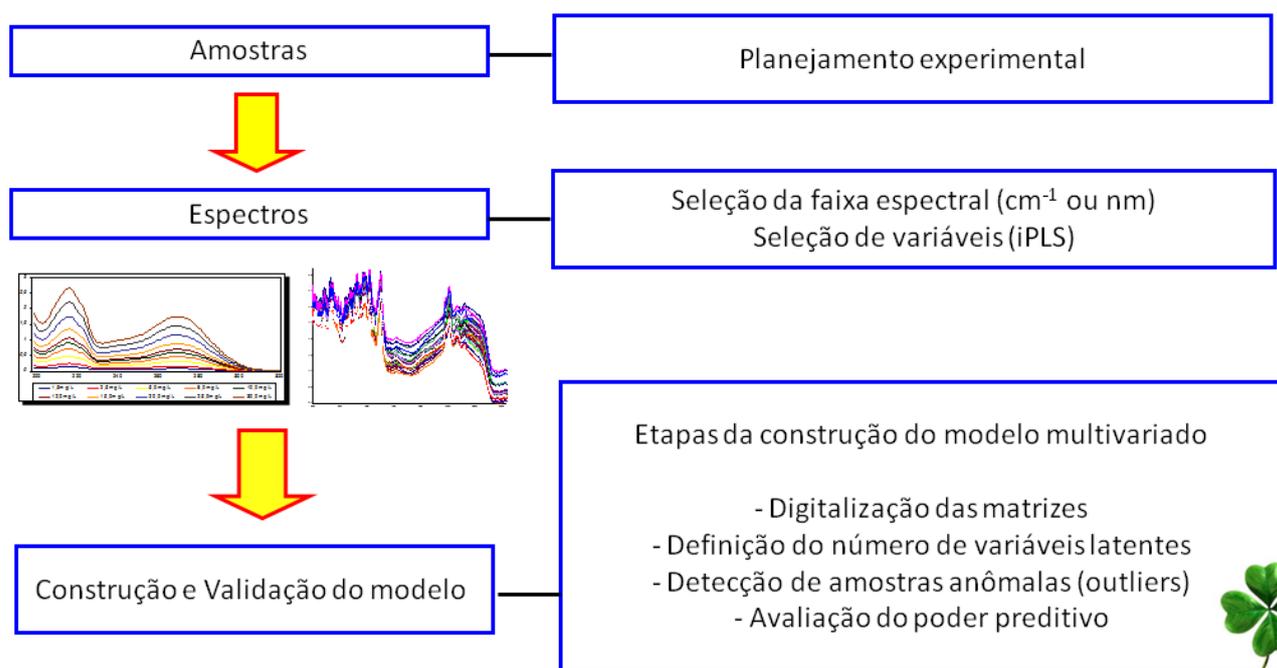


FIGURA 05 – Esquema da construção de um modelo PLS
 FONTE: O autor (2014)

2.5.1. Matrizes

Na construção de um modelo de calibração são necessárias duas matrizes, **X** e **Y**. Em um primeiro momento submete-se um grupo de amostras, com uma propriedade de interesse, que podem estar em diversas formas físicas, a um determinado instrumento que gere um vetor resposta, que é organizado no formato de uma matriz (matriz **X**), em função do objetivo da análise. Essa resposta é então submetida a tratamentos matemáticos a fim de encontrar uma relação entre as amostras, no caso de métodos como o PCA (análise de componentes principais), ou entre as amostras e suas respectivas concentrações (matriz **Y**), sejam de analitos em especial ou parâmetros físico-químicos, como pode ser verificado no esquema da figura abaixo.

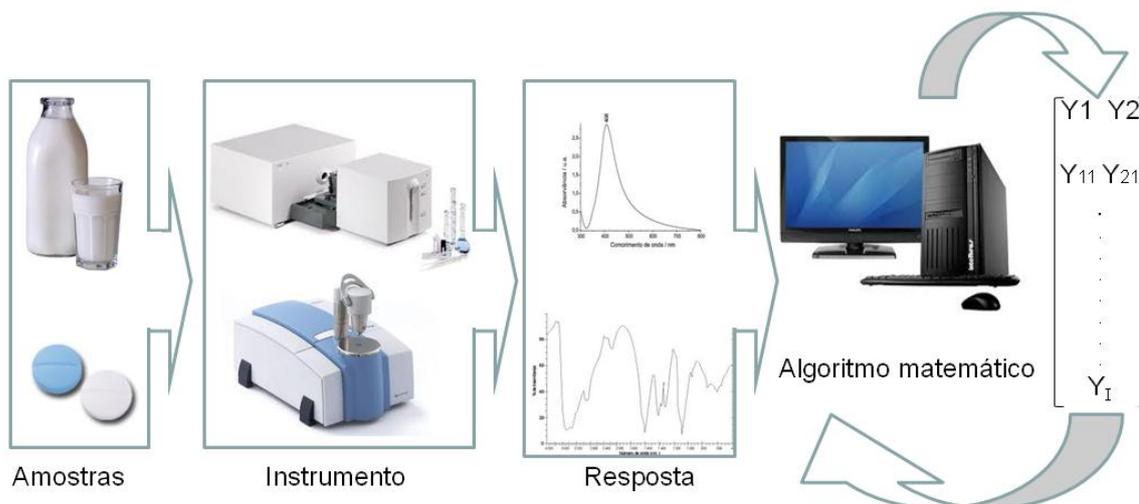


FIGURA 06 – Aquisição da matriz X e correlação com matriz Y
 FONTE: O autor (2014)

Os dados são arranjados em duas matrizes: uma matriz do tipo $X_{I \times J}$, no qual em I ficam os objetos (amostras, moléculas, indivíduos, etc), ou seja, nas linhas, e em J , nas colunas, ficam as variáveis (intensidade de absorção, sinal elétrico, tempo de retenção, propriedades físicas, etc); a outra matriz é chamada Y e conterà os dados referentes às concentrações dos analitos de interesse, correspondentes às amostras dispostas na matriz X . Nas linhas de Y são colocadas as concentrações (previamente observados por uma técnica padrão) de cada respectiva amostra e nas colunas os analitos. Para se conseguir estabelecer uma relação entre essas matrizes verifica-se a propriedade de Y gerada por uma função b a partir de dados experimentais, dados por X ($Y = X \cdot B$), como pode-se ver na Figura 07. Uma vez que em todos os casos a matriz Y é conhecida, a matriz X é adquirida experimentalmente, calcula-se a matriz B (com 'p' variáveis e 2 colunas) para poder estabelecer essa relação como verdadeira, que pode ser calculado por $B = (X^T \cdot X)^{-1} \cdot X^T \cdot Y$, e a matriz de erros E .

$$\begin{matrix} & Y & & X \\ & & & \\ \begin{bmatrix} Y_{A1} & Y_{B1} \\ Y_{A2} & Y_{B2} \\ \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot \\ Y_{An} & Y_{Bn} \end{bmatrix} & = & \begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1p} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2p} \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ X_{n1} & X_{n2} & \dots & X_{np} \end{bmatrix} \cdot B_{p \times 2} + E
 \end{matrix}$$

FIGURA 07 – Relação entre as matrizes X e Y em função de B
 FONTE: O autor (2014)

2.5.2. PLS e iPLS

O método de mínimos quadrados parciais (PLS) é uma ferramenta estatística que tem sido aplicada com sucesso para as análises quantitativas no ultravioleta, infravermelho, dados cromatográficos e eletroquímicos (HAALAND; THOMAS, 1988). O PLS é hoje o método de calibração multivariada mais amplamente usado em quimiometria (TAN *et al.*, 2011).

O método é particularmente útil quando for preciso prever um conjunto de variáveis dependentes a partir de um conjunto (muito) grande de variáveis independentes. As I observações descritas por K variáveis dependentes são armazenadas em uma matriz $I \times K$ denominada \mathbf{Y} , os valores de J preditores coletados nessas I observações são colocados em uma matriz $I \times J$, chamada de \mathbf{X} . O objetivo da regressão PLS é prever \mathbf{Y} a partir de \mathbf{X} e descrever sua estrutura comum (ABDI, 2010). Essas matrizes podem ser simultaneamente decompostas na soma de F variáveis latentes (NIAZI, 2006), como segue:

$$\begin{aligned}\mathbf{X} &= \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} = \sum_{f=1}^F t_f \mathbf{p}_f^T + \mathbf{E} \\ \mathbf{Y} &= \mathbf{UQ}^T + \mathbf{F} = \sum_{f=1}^F u_f \mathbf{q}_f^T + \mathbf{F}\end{aligned}$$

No qual \mathbf{T} e \mathbf{U} são as matrizes de *scores* para \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente; \mathbf{P} e \mathbf{Q} são as matrizes de pesos para \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente, \mathbf{E} e \mathbf{F} são as matrizes de resíduos. As duas matrizes são correlacionadas pelos *scores* \mathbf{T} e \mathbf{U} , para cada variável latente, como segue:

$$u_f = b_f t_f$$

No qual b_f é o vetor dos coeficientes de regressão para a $f^{\text{ésima}}$ variável latente. A matriz \mathbf{Y} pode ser calculada a partir de u_f e a concentração de novas amostras pode ser estimada a partir dos novos *scores* T^* , as quais podem ser substituídas levando a equação:

$$\begin{aligned}\mathbf{Y} &= \mathbf{TBQ}^T + \mathbf{F} \\ \mathbf{Y}_{\text{new}} &= \mathbf{T}^* \mathbf{BQ}^T\end{aligned}$$

A combinação de PLS e espectroscopia no UV ou IV tem sido usada para a determinação de vários princípios ativos nas formulações farmacêuticas, como neomicina (SARRAGUÇA; SOARES; LOPES, 2011), ácido acetilsalicílico e ácido ascórbico (SENA *et al.*, 2000), losartan, anlodipino e hidroclortiazida (NAGAVALLI *et al.*, 2010), dentre outros.

Para facilitar o processo de seleção da faixa espectral nos casos em que faixas específicas do espectro são melhores que o espectro completo, utiliza-se um algoritmo desenvolvido exatamente para este fim. O princípio do algoritmo iPLS (*interval partial least squares*) é dividir o espectro em regiões menores, equidistantes e desenvolver modelos para cada subintervalo. Depois disso, a raiz quadrada do erro médio de calibração por validação cruzada (RMSECV) dos subintervalos é comparada com os valores de RMSECV do espectro total (SILVA *et al.*, 2009). O propósito do método iPLS é otimizar a capacidade preditiva de modelos de regressão PLS, localizando o conjunto de variáveis que podem resultar nos melhores modelos, eliminando informações não relevantes como bandas que não contenham nenhuma informação das espécies ou propriedades a serem analisadas, além de eliminar parte dos ruídos do sistema (FRANCESQUETT *et al.*, 2010), e para auxiliar na interpretação. A investigação tem o objetivo de fazer um estudo comparativo do desempenho de predição de métodos diferentes para a seleção de variáveis ou intervalos em comparação com os resultados baseados em modelos usando espectros completos (NORGAARD *et al.*, 2000). Esta técnica auxilia significativamente na seleção das regiões que estão mais bem correlacionadas com os fármacos, eliminando regiões que apresentam pouca ou duvidosa informação, já que a mistura de excipientes é desconhecida, e desta forma aumenta-se a robustez do modelo. Esse algoritmo seleciona uma faixa do espectro e nos casos em que mais de uma faixa são selecionadas ele recebe o nome de siPLS (*synergy interval PLS*).

Duas abordagens simples têm sido propostas para identificar as variáveis mais importantes nos modelos PLS. A primeira abordagem sugere que variáveis importantes terão coeficientes de regressão superior à metade do maior coeficiente. A segunda abordagem baseada na pontuação VIP (*variable influence on projection*), afirma que variáveis importantes terão uma pontuação VIP maior do que 1,0, enquanto que as variáveis sem importância terá uma pontuação VIP inferior a 0,8 (KUBINYI; GERD; MARTIN, 1998).

Uma vez determinado o método que será utilizado, em função dos seus objetivos, deve-se começar o desenvolvimento do modelo quimiométrico e isto envolve a seleção de um planejamento experimental mais adequado, obtenção das matrizes, seleção do melhor pré-processamento e número de variáveis latentes, bem como a detecção de possíveis amostras anômalas.

2.5.3. Planejamento experimental

Em todo trabalho de pesquisa experimental é importante planejar os experimentos, com o objetivo de serem reproduzidos sob condições controladas, obtendo-se resultados confiáveis (MONTGOMERY, 1991).

O primeiro passo para a construção de um modelo quimiométrico é fazer a seleção de um número significativo de amostras de calibração e validação que representem o sistema. No caso de medicamentos, o intervalo de concentração entre o ponto central (concentração em que os fármacos são encontrados nos medicamentos) deve variar aproximadamente + ou - 20% (ANVISA, 2003), em relação ao valor de trabalho, na etapa de construção do modelo, isto muito em função das exigências legais dos órgãos de regulamentação (ICH, 1995; ANVISA, 2003). Este processo se torna mais confiável quando se usa um planejamento experimental. Neste caso foram utilizados diversos planejamentos como o planejamento experimental completo e delineamento composto central rotacional.

A norma ASTM E1655-05 (2012) tem algumas recomendações para o desenvolvimento de um modelo de calibração adequado para espectrometria NIR, como por exemplo o número de amostras de calibração deve estar entre 30 e 50, dependendo da complexidade da matriz e do número de VL. O número de amostras para a calibração deve ser igual a $6x$ (o número de variáveis latentes +1) e o número de amostras de validação igual a $4x$ (o número de variáveis latentes); variações esperadas na amostra ou condições do processo devem ser reproduzidas na etapa de calibração; a faixa de variação deve exceder a faixa esperada para cada fármaco, garantindo assim que o modelo seja interpolado e não extrapolado; o número de amostras depende da complexidade da mistura.

Em um planejamento experimental, a influência de todas as variáveis, fatores e efeitos de interação na resposta são investigados. Se k fatores são analisados em dois níveis, um desenho experimental deve consistir de 2^k experimentos (LUNDSTEDT *et al.*, 1998).

O planejamento composto central (CCD) ou delineamento composto central rotacional (DCCR) é uma evolução dos planejamentos do tipo 3^k , que necessitavam de um número muito grande de experimentos para um número pequeno de fatores e foram inicialmente desenvolvidos por BOX e WILSON (1951). Ele foi criado a partir do estudo de funções polinomiais na indústria com erro experimental pequeno e

condições mais facilmente controláveis. Esse planejamento é um delineamento simétrico e de segunda ordem, constituído de três partes: o fatorial 2^k , um ou mais pontos centrais, e a parte axial (ou estrela), sendo k o número de fatores (Figura 08). A distância de um ponto axial até o ponto central é definido como $\pm \alpha$. Um planejamento com esta característica $2^k + 2^*k + PC$ (ponto central) é dito Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

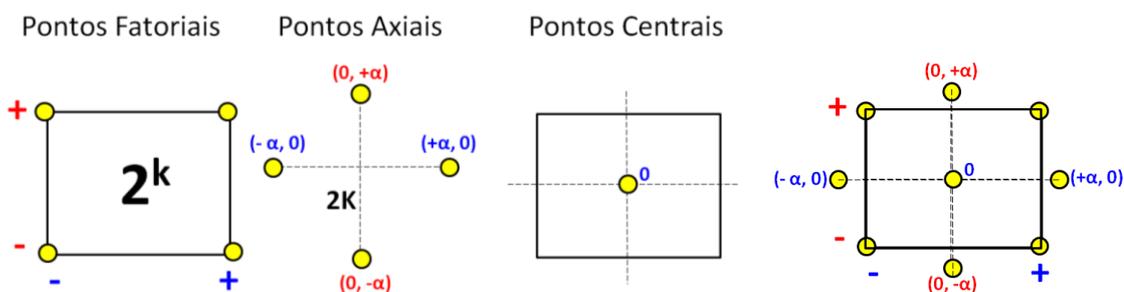


FIGURA 08 – Planejamento de um experimento do tipo delineamento composto central rotacional
 FONTE: O autor (2014)

Os pontos fatoriais são experimentos codificados como -1 e +1, os axiais são $(+\alpha, 0)$, $(-\alpha, 0)$, $(0, +\alpha)$ e $(0, -\alpha)$ e os pontos centrais são representados por 0 ou m . Para cada fator/variável há “5” níveis: Alto extremo (ponto estrela), Alto, Centro, Baixo e Baixo extremo (ponto estrela). O número de experimentos é calculado por $n = 2^k$ (número de pontos fatoriais) + $2k$ (número de pontos axiais ou estrela) + m (número de réplicas do ponto central). Outra importante característica do CCD é ele ser rotacional e ortogonal. A primeira característica providencia precisão igual de estimação em todas as direções e permite que a variância prevista seja constante para pontos situados à mesma distância do centro. A segunda característica propicia uma estimação independente para os coeficientes do modelo, ou seja, os efeitos principais e estimativas de interação são independentes (ATKINSON; DONEV, 1992). Ressalta-se que o método foi utilizado somente para gerar uma superfície de pontos para posterior uso na obtenção de um modelo linear multivariado sem efeitos de interação entre as variáveis.

Para desenvolver o modelo, após a organização do planejamento experimental e depois de obter os dados da matriz X , Y é necessário selecionar o modo como será feita a validação cruzada e o melhor pré-processamento para os seus dados.

2.5.4. Pré-processamento

O pré-processamento de dados é uma parte essencial da análise de dados multivariados, o qual objetiva remover variações indesejáveis (como artefatos instrumentais) e, deste modo, focar na variação química de interesse (ENGEL *et al.*, 2013). A escolha de um método ou da combinação de pré-processamentos depende de diversas propriedades dos dados e do objetivo da análise (BROWN *et al.*, 2005).

O melhor método de pré-processamento será aquele que produzir um modelo robusto em relação à habilidade preditiva. Um pré-processamento de dados apropriado pode remover fontes não relevante de variação e não-linearidades, e concentrar a informação relevante nos primeiros fatores, resultando em modelos mais parcimoniosos (NOORD, 1994).

Dependendo do estado físico das amostras e da ocorrência de desvios de linha de base, uma correção de *background* e de espalhamento pode ser inicialmente aplicada. Para correção de espalhamento e de luz os métodos mais utilizados são SNV (*standard normal variate*) e MSC (*multiplicative scatter correction*) que geram valores de predição semelhantes (DHANOA *et al.*, 1994; HELLAND; NAES; ISAKSSON, 1995). Centrar na média, calcular derivadas e alisar usando o algoritmo Savitzky-Golay são outros métodos também muito usados em técnicas quimiométricas de predição.

Centrar na média significa que o espectro médio é subtraído de todos os espectros (WORKMAN JR; WORKMAN, 2001a). Isto também significa calcular o centróide da matriz de dados, levando-o à origem pela subtração de cada elemento de cada coluna pela sua respectiva média (RIBEIRO, 2001). Para as análises espectroscópicas, calcula-se a média das intensidades para cada comprimento de onda e subtrai-se cada intensidade do respectivo valor médio (FERREIRA *et al.*, 1999).

O alisamento pelo algoritmo Savitzky-Golay é um procedimento que realiza o melhor ajuste através de um polinômio quadrático com pontos sucessivos. Esta técnica determina o ponto central de melhor ajuste para o ajuste polinomial como forçado pelo segmento de dados (ou janela) (WORKMAN JR; WORKMAN, 2001a). É baseado no ajuste por mínimos quadrados de polinômios (O'HAVER, 2012) para muitos outros segmentos menores de dados (um polinômio por janela) (ENGEL *et*

al., 2013). O principal objetivo é aumentar a razão sinal/ruído, suavizando o espectro para eliminar variação aleatória.

A correção multiplicativa de sinal (MSC) é provavelmente a técnica mais amplamente usada no pré-processamento de espectros NIR (seguida de perto por SNV e derivatização). Artefatos ou imperfeições (por exemplo, efeitos de espalhamento não desejados) serão removidos da matriz de dados antes do modelamento (RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009). Esta técnica remove a influência negativa causada por efeitos não químicos, ou seja, físicos, como tamanho de partícula. A MSC faz a correção através da regressão de um espectro medido contra um espectro ideal (que pode ser o médio, mas não necessariamente) e corrige o espectro medido em relação à inclinação e um deslocamento.

Derivadas tem a capacidade de remover efeitos de linha de base tanto aditivos quanto multiplicativos no espectro. Variações na linha de base podem produzir efeitos indesejáveis e críticos nas medidas de absorvância. Isto pode ser corrigido utilizando as derivadas. A primeira derivada remove somente desvios lineares da linha de base e a segunda derivada remove também desvios não-lineares (WORKMAN JR; WORKMAN, 2001b; RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009).

Outra etapa importante no desenvolvimento do modelo é fazer a validação interna, ou, validação cruzada.

2.5.5 Validação cruzada

A validação cruzada pode ser feita através de diversos métodos, dentre os mais usados destacam-se: *Leave-one-out*, *Venetian Blinds*, *Contiguous Blocks* e subconjuntos aleatórios.

No caso do *Leave-one-out* uma amostra por vez é retirada no conjunto de calibração e é usada como amostra de validação, enquanto as outras são usadas para construir o modelo. Isso é repetido tantas vezes quantas for o número de amostras (Figura 09), até que todas as amostras tenham sido previstas e a raiz quadrada da soma do quadrado dos resíduos (RMSECV) (OTTO, 1999; BRERETON, 2000) seja calculado como:

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

Sendo \hat{y}_i e y_i os valores previstos e de referência para a propriedade de interesse.

Concomitante à validação cruzada é importante, na construção do modelo, selecionar o número de variáveis latentes em função RMSECV e verificar se há amostras anômalas.

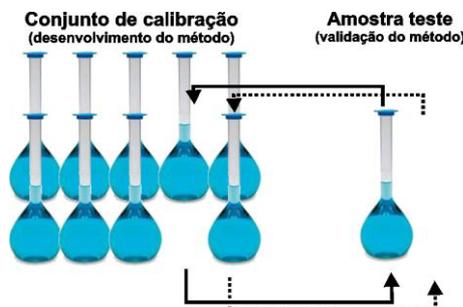


FIGURA 09 – Validação cruzada pelo método *leave-one-out*
FONTE: O autor (2014)

2.5.6 Seleção do número de variáveis latentes

Essa etapa é um ponto fundamental para a qualidade do modelo de calibração. Isso porque se for usado um número menor de variáveis latentes do que o ideal pode resultar em modelos com baixa capacidade de previsão e conseqüentemente o modelo não será capaz de reconhecer ligeiras mudanças espectrais. Por outro lado incluir um número excessivo de variáveis latentes pode resultar em sobreajuste dos dados, levando a resultados incorretos. O parâmetro utilizado para essa análise é o gráfico do erro de calibração (RMSEC) e de validação cruzada (RMSECV) em função do número de variáveis latentes. Em geral, escolhe-se o número de VL em função do menor valor de erro médio. Em situações em que são analisados dois fármacos em sistemas pouco complexos, como no UV, é esperado que o número de VL seja igual ao de fármacos. Em sistemas mais complexos, como no IV, em que nem todos os componentes de uma mistura podem ser modelados, o número de VL geralmente é maior que o de fármacos (analitos).

2.5.7 Detecção de amostras anômalas

Na construção de um modelo de calibração multivariada é sempre possível que uma ou mais amostras não se ajustem devido a fenômenos inevitáveis que podem acompanhar uma análise quantitativa, tais como erros de operadores, presença de ruídos aleatórios, alterações nas respostas de equipamentos

(MARTENS; NAES, 1989). Por isso, ter essas amostras tende a um comportamento muito diferente, quando comparadas com o restante do conjunto (VANDEGINSTE *et al.*, 1998). A influência destas amostras pode comprometer decisivamente o desempenho do modelo proposto, conduzindo a modelos com baixa capacidade preditiva e altos valores de erro (VANDEGINSTE *et al.*, 1998). Estas amostras são conhecidas como anômalas ou *outliers*. Elas podem ocorrer em função de imperfeições no processo, seja por um erro de procedimento, instrumental ou na própria matéria-prima ou por terem uma composição muito diferente.

Após elaborar um modelo quimiométrico deve-se verificar se há a presença dessas amostras anômalas (*outliers*), a fim de garantir sua qualidade. Neste caso, a presença de *outliers*, foi avaliada graficamente por dois critérios: Resíduos de Student x *Leverage* e Resíduos Q x Hotelling T². Para os dados espectrais (**X**), os parâmetros mais utilizados são o *leverage* e os Resíduos Q. Já para os dados de concentração, o parâmetro mais comum para detecção de *outliers* são os resíduos de y de Student, que são resíduos normalizados. Os resíduos de Student indicam se as amostras têm distribuição normal e deve-se observar se nenhuma amostra ultrapassa o valor limite de $\pm 2,5\%$. Essas amostras são as que possuem um valor da propriedade de interesse (Y) significativamente diferente do valor esperado ou apresentado pela técnica de referência. O *Leverage* é uma medida relacionada com a posição das amostras em relação uma das outras, ou ao centróide do conjunto de dados (MARTENS; NAES, 1989) e por este parâmetro verifica-se a influência que uma amostra tem sobre o conjunto, sendo que o limite é calculado como $3 VL / n$, no qual VL corresponde ao número de variáveis latentes e *n* ao número de amostras utilizadas. Amostras com alto valor de *Leverage* podem ser amostras de concentrações extremas ou o valor extremo pode ser causado pela presença de um interferente.

Essa análise das amostras anômalas pode ser mais facilmente feita usando um gráfico de resíduos de Student *versus* Leverage. No caso de uma amostra ultrapassar os limites de Leverage ou Resíduos de Student ela não deve ser automaticamente eliminada do modelo, mas somente no caso de ultrapassar os dois a tendência da amostra é ser retirada do modelo caso não se descubra a fonte do erro.

Os Resíduos Q referem-se à parte da informação espectral não modelada e são calculados como a soma dos quadrados dos resíduos de cada linha (amostra).

Os resíduos Q mostram quanto cada variável espectral contribui para a estatística global para a amostra mantendo o sinal do desvio de uma dada variável. Tais contribuições podem ser úteis na identificação de variáveis as quais contribuem mais para a soma quadrática do erro residual de uma amostra. Tais resíduos podem frequentemente serem usados para determinar se a falta de ajuste é devido a desvios sistemáticos daquela amostra ou variação aleatória simples.

O teste T^2 de Hotelling é usado para testar a igualdade dos vetores médios de duas populações multivariadas, como se fosse um teste t de Student para amostras de calibração multivariada. Trata-se de um teste derivado a partir do princípio geral de construção de procedimentos de teste denominado Método da Razão de Verossimilhança e é apropriado para comparar duas populações representadas por amostras independentes (JOHNSON; WICHERN, 1988). Considerando que resíduos Q representam a magnitude da variação restante em cada amostra após a projeção através do modelo, os valores de T^2 de Hotelling representam uma medida da variação em cada amostra dentro do modelo. Ele indica quão longe cada amostra se distância do centro do modelo. Um gráfico de resíduos Q x T^2 de Hotelling permite detectar amostras que simultaneamente estejam mal modeladas e apresentem grande influência no modelo.

2.6 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Atualmente não há uma gama muito ampla de técnicas simples de quantificação simultânea de pamoato de pirantel, febantel e praziquantel em preparações farmacêuticas. Sendo assim, faz-se necessário o estudo e a consequente validação de mais métodos que quantifiquem esses analitos de forma simultânea, rápida e barata. A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para o procedimento do controle de qualidade de uma substância ativa ou forma farmacêutica (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007). O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de um método conhecido, envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório (BRITO *et al.*, 2003). Esse processo denomina-se validação.

A validação analítica confere ao processo maior confiabilidade na aceitação dos resultados. Ela é feita para assegurar que a metodologia analítica seja exata, específica, reprodutível e robusta sobre um intervalo especificado em que o analito

será analisado (SHABIR, 2003). A validação é uma parte inevitável no desenvolvimento de métodos farmacopeicos ou procedimentos analíticos de controle de qualidade (GRDINIC; VUKOVIC, 2004). A ANVISA (2003) preconiza que o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi ou quantitativa. Pelo fornecimento de evidência objetiva, ela comprova que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (INMETRO, 2007). O processo visa dar aos laboratórios e aos órgãos regulatórios uma garantia de que cada medida que será feita posteriormente será “próxima o suficiente” ao “valor verdadeiro” ou, no mínimo, que a diferença estará abaixo do limite aceitável (HUBERT *et al.*, 2004). Validar um resultado é fazer com que todos os procedimentos, até chegar ao resultado final, sejam aceitos como corretos. A validação de um método analítico não significa que este possa ser aplicado sem restrições para diferentes medicamentos com o mesmo princípio ativo, uma vez que os resultados são influenciados por inúmeros fatores, como diferenças entre as misturas de excipientes de um laboratório para outro (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

Usar testes estatísticos adequados para cada parâmetro faz com que as tomadas de decisão sejam menos subjetivas e, conseqüentemente, deixa o método mais fácil de ser explicado e de ser implementado. Os métodos analíticos podem ser classificados de acordo com a finalidade, como está descrito no Quadro 3:

CATEGORIA	FINALIDADE DO TESTE
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

QUADRO 3 – Classificação dos métodos analíticos de acordo com a finalidade
 FONTE: ANVISA (2003)

Os parâmetros a serem analisados em um método univariado a ser validado são: especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez. Cada categoria descrita no Quadro 3 exige um determinado conjunto de testes, conforme relacionados no Quadro 4:

PARÂMETRO	CATEGORIA I	CATEGORIA II QUANTITATIVO ENSAIO LIMITE		CATEGORIA III	CATEGORIA IV
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Repetibilidade Precisão Intermediária	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a Precisão Intermediária.

QUADRO 4 – Ensaio necessários para a validação de métodos analíticos de acordo com a sua finalidade

FONTE: ANVISA (2003)

Quais parâmetros (figuras de mérito) e o grau de exigência de cada um dependem da aplicação e do propósito regulado por uma norma de um órgão de fiscalização ou dos guias de validação internacionalmente reconhecidos. No caso da calibração multivariada a norma mais utilizada é a da ASTM (*American Society for Testing and Materials*), que regula a validação de métodos analíticos baseados em espectroscopia IV e que não é similar às normas tradicionais. Essa norma, para o desenvolvimento de análises quantitativas usando espectroscopia IV (ASTM E1655-05), trata de recomendações relativas à preparação das amostras dos conjuntos de calibração e validação interna, aos parâmetros estatísticos para avaliar, otimizar e recalibrar modelos de calibração, entre outras. A utilidade da estimação das figuras de mérito em calibração multivariada tem sido limitada.

Como a proposta desse trabalho é desenvolver modelos de calibração multivariada para quantificar os três princípios ativos em produto acabado, os parâmetros analisados não seguem todos os pontos definidos pelas normas univariadas ou recomendações para análises multivariadas, mas sim uma tentativa de unir os conceitos. Os parâmetros analisados foram: sensibilidade (também sob a forma de sensibilidade analítica e seu inverso), linearidade, precisão, seletividade, limite de detecção e quantificação, exatidão, *bias* (tendência), ruído e robustez.

2.6.1 Seletividade

Em calibração univariada a seletividade é a capacidade que um método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003; SHABIR, 2003). Seletividade tem sua origem em “seligo”, que em latim significa escolher ou selecionar. Seletivo é algo que “tende a escolha com cuidado” e seletividade o “estado ou qualidade de ser escolhido” (PERSSON; VESSMAN, 1998). A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (PHARMACOPEIA, 1999).

Em calibração multivariada, o conceito de seletividade tem outra conotação. Ela é a medida do grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e dos interferentes presentes na amostra e indica a parte do sinal que é perdida por essa sobreposição (VESSMAN *et al.*, 2001). Para modelos de calibração multivariada, ela é definida como:

$$SEL = \frac{(n\hat{s}_i)}{\|x_i\|}$$

Sendo que $n\hat{s}_i$ é o escalar NAS estimado para cada amostra ‘i’ e x_i é o vetor de dados original. O valor da seletividade estimado informa quanto do sinal original é usado no modelo (BRAGA, 2004). Como os métodos de calibração multivariada são utilizados justamente quando não se obtém um sinal analítico seletivo não há motivo para definir um valor limite de seletividade, seja inferior ou superior.

O conceito de NAS foi proposto por LORBER (1986) e é definido como a parte do sinal analítico exclusivamente relacionado ao analito de interesse e ortogonal ao espaço gerado pelos interferentes. É importante notar que o conceito de NAS foi um avanço na teoria de calibração multivariada, que permite a possibilidade de separar a informação do analito a partir do sinal total, possibilitando a estimativa de importantes figuras de mérito em aplicações farmacêuticas e a representação do modelo multivariado em uma forma pseudo-univariada, a qual facilita a interpretação do modelo em análise de rotina (SILVA *et al.*, 2012).

2.6.2 Linearidade

Em calibração univariada, a linearidade de um procedimento analítico é a habilidade para obter resultados dos testes que sejam diretamente proporcionais entre as medidas instrumentais e as concentrações do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007). Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004). Para estabelecer a linearidade, um mínimo de 5 concentrações é recomendada (ICH, 1996). A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b$$

y = resposta medida (absorbância); x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando x= 0.

O coeficiente de correlação linear (r) é frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. Um valor maior que 0,90 é, usualmente, requerido. Quanto mais se aproximar de 1,0 o coeficiente menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004). O critério mínimo aceitável de coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99 (ANVISA, 2003).

Em calibração multivariada o valor do coeficiente de correlação representa o ajuste do modelo. Neste caso ele é avaliado pelo gráfico dos valores de referência *versus* valores previstos pelo modelo. Qualitativamente, o gráfico de dispersão dos resíduos para as amostras de calibração e validação pode indicar se os dados seguem um comportamento linear se essa dispersão for aleatória (MARTENS; NAES, 1989; LAASONEN *et al.*, 2003).

2.6.3 Exatidão

A exatidão ou veracidade expressa a proximidade da concordância entre o valor estimado e o aceito como um valor convencional verdadeiro ou um valor referência aceito (SHABIR, 2003; HUBERT *et al.*, 2007).

A sua estimativa pode ser feita pela comparação dos resultados do procedimento analítico com aqueles de um segundo procedimento bem caracterizado (ICH, 1996; ANVISA, 2003). Em calibração multivariada, ela pode ser estimada uma exatidão média, através da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP), definido por:

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

Sendo \hat{y}_i e y_i os valores previstos e de referência para a propriedade de interesse e n é o número de amostras utilizadas na validação do modelo. Como o RMSEP é calculado com um conjunto de amostras independente daquelas da validação, ele pode ser considerado um conjunto “não viciado”.

2.6.4 Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa a proximidade de concordância (grau de dispersão) entre a série de leituras obtidas de múltiplas medidas da mesma amostra ou várias amostras homogêneas sob condições prescritas (ICH, 1996; INMETRO, 2007).

A precisão pode ser considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (ICH, 1996). A repetitividade e a reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito e devem ser determinadas para um número diferente de concentrações. Neste caso, o desvio padrão relativo pode ser útil, uma vez que foi normalizado com base na concentração e deste modo ele é praticamente constante ao longo da faixa de interesse (INMETRO, 2007).

A precisão pode ser expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{(\text{DP} \times 100)}{\text{CMD}}$$

Em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo da matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (ANVISA, 2003).

2.6.4.1 Repetitividade

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade: mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob mesmas condições; mesmo local, e repetições em curto espaço de tempo (INMETRO, 2007).

2.6.4.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes tempos. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados.

2.6.5 Robustez

A robustez é uma medida da capacidade dos resultados continuarem inalterados frente a variações deliberadas nos parâmetros do método, proporcionando uma indicação da confiabilidade durante usos normais (ICH, 1996). Ela é descrita como a estabilidade do método (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998) e mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando ele está sendo executado (INMETRO, 2007).

2.6.6 Sensibilidade

A sensibilidade é definida como a capacidade de um método em distinguir, com determinado nível de segurança, duas concentrações próximas (ICH, 1996). Para a calibração univariada, a sensibilidade é a inclinação da curva de calibração. Consequentemente, a sensibilidade é o inverso da inclinação para o modelo inverso (OLIVIERI *et al.*, 2006).

Em calibração multivariada, a sensibilidade é definida como a fração de sinal responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração da propriedade de interesse (LORBER, 1986; FERRÉ; BROWN; RIUS, 2001) e pode ser determinado como:

$$SEN = \frac{1}{\| \mathbf{b} \|}$$

em que, \mathbf{b} é o vetor dos coeficientes de regressão estimados pelo PLS.

2.6.7 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica não é abordada em normas ou protocolos de validação de métodos, contudo ela apresenta a sensibilidade do método em termos da unidade de concentração utilizada (BRAGA, 2004), sendo definida como a razão entre a sensibilidade e uma estimativa do desvio padrão da flutuação do sinal analítico (δx) (RODRÍGUEZ *et al.*, 1993; DE LA PEÑA *et al.*, 2002):

$$SEN_A = \frac{SEN}{\delta x}$$

sendo que o inverso desse parâmetro permite estabelecer a menor diferença de concentração entre amostras a qual pode ser distinguida pelo método e δx é estimado por meio do desvio padrão do valor de NAS obtido para 15 espectros do sinal da referencia (BRAGA, 2004). Neste caso considera-se o ruído instrumental aleatório a única fonte de erro.

2.6.8 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação são as menores quantidades da espécie de interesse que podem ser detectadas e mensuradas quantitativamente (com precisão e exatidão adequadas), respectivamente (ICH, 1995). Eles foram calculados pelas equações:

$$LD = \frac{3 \times \text{ruído}}{SEN}$$
$$LQ = \frac{10 \times \text{ruído}}{SEN}$$

no qual o ruído é a estimativa calculada do ruído instrumental e SEN é a sensibilidade calculada para cada analito.

2.5.9 RPD

A RPD (*residual prediction deviation* ou *relative predictive determinant*) ou relação de desempenho do desvio também foi estimada. Ela é calculada pela razão entre a raiz quadrada da variância dos valores de referência nas amostras de calibração ou validação e a magnitude dos erros que ocorrem na previsão. O seu valor representa o quão bem o modelo de calibração prevê um conjunto de amostras específico, independente da amplitude da faixa analítica, e é mais adequado para avaliar o desempenho de um modelo em termos relativos (WILLIAMS, 2001; FOROUZANGO HAR et al., 2008; IGNE; HURBURGH, 2010),

$$RPD_{cal} = \frac{DP_{cal}}{RMSECV}$$

$$RPD_{val} = \frac{DP_{val}}{RMSEP}$$

no qual DP é o desvio padrão dos valores de referência para os conjuntos de calibração, DP_{cal}, e validação, DP_{val}; RMSECV é a raiz quadrada do erro médio de validação cruzada e RMSEP é a raiz quadrada do erro médio de previsão.

O RPD (WILLIAMS, 2001), representa a relação entre a variação natural nas amostras (desvio padrão) em relação ao erro padrão da validação cruzada ou da previsão. Ele é mais útil para comparação de modelos em diferentes conjuntos de dados ou em termos absolutos. Sugere-se que valores maiores que 3 sejam usados para uma avaliação inicial, maiores que 5 para controle de qualidade e maiores que 8 para qualquer aplicação. Dependendo da finalidade, outros autores como CHANG *et al.* (2001) sugerem que modelos com RPD maior que 2 já seriam adequados.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar métodos baseados em espectroscopia molecular e calibração multivariada, em particular pela ferramenta PLS (*partial least squares*), para a quantificação simultânea de praziquantel, pamoato de pirantel e febantel em medicamentos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver métodos por PLS2 para a quantificação de praziquantel e pamoato de pirantel; pamoato de pirantel e febantel por espectroscopia de absorção molecular no IV e no UV; pamoato de pirantel, febantel e praziquantel por espectroscopia no IV, em formulações farmacêuticas, usando calibração multivariada (PLS).

- Otimizar modelos de calibração multivariada para a quantificação dos analitos.

- Validar os métodos analíticos de calibração multivariada desenvolvidos segundo normas nacionais (ANVISA) e internacionais como ICH e recomendações da ASTM;

- Aplicar os métodos em amostras comerciais adquiridas em farmácias de manipulação de produtos veterinários de Curitiba.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

Como este trabalho foi desenvolvido em um ambiente acadêmico, e sem acesso às informações dos fabricantes com relação à composição qualitativa e quantitativa dos excipientes dos medicamentos analisados neste trabalho, foi necessário um estudo mais aprofundado sobre suas prováveis composições.

Para o desenvolvimento dos modelos utilizou-se uma provável formulação com base em dados da literatura para cada uma das formulações. As proporções dos excipientes foram escolhidas em determinados intervalos com a finalidade de incorporar a variabilidade presente no processo, e os modelos desenvolvidos para cada associação foram aplicados a formulações de diferentes marcas disponíveis no mercado brasileiro.

Neste contexto, o desenvolvimento dos modelos multivariados que utilizam infravermelho médio e PLS pode ser considerado exemplo de uma calibração multi-produto (MICKLANDER *et al.*, 2006; ZHENG *et al.*, 2008). Praticamente todos os modelos que utilizam infravermelho, médio ou próximo, juntamente com PLS para o controle de qualidade de princípios ativos tem sido específicos para uma formulação de um fabricante. Uma grande vantagem de um modelo de calibração multi-produto é a possibilidade do seu uso para análise fiscal.

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

A pesquisa foi realizada nos laboratório de controle de qualidade físico-químico e no centro de estudos em biofarmácia (CEB) da Universidade Federal do Paraná. Ela foi dividida basicamente em duas etapas. A primeira etapa compreendeu o desenvolvimento e validação de métodos analíticos por espectroscopia eletrônica nas regiões do UV e Infravermelho médio associados à calibração multivariada para a quantificação de associações contendo pamoato de pirantel, febantel e praziquantel. A segunda etapa foi referente à quantificação dos analitos em amostras comerciais pelos métodos desenvolvidos e comparação estatística dos resultados obtidos em relação à técnica padrão (CLAE).

4.2 MATERIAL

4.2.1 Material e reagentes

- Pamoato de pirantel (96,7%) - Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Febantel (99,6%) - Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Acetonitrila (grau CLAE) - J. T. Baker Chemicals B. V. (Deventer, The Netherlands).
- Metanol (grau CLAE) - J. T. Baker Chemicals B. V. (Deventer, The Netherlands).
- Ácido fosfórico (85,8%) - J. T. Baker Chemicals B. V. (Deventer, The Netherlands).
- Coluna XBridge C18 150 x 4.6 mm (5 µm)
- Coluna guarda XBridge C18 20 x 4.6 mm (5 µm)
- Filtro de membrana Millipore Millex PVDF 0,22 e 0,45 µm de poro (Billerica, EUA);
- Papel de filtro quantitativo Quanty, JP 41, faixa preta, 12,5 cm de diâmetro e 28 µm de poro, J Prolab (São José dos Pinhais, Brasil);
- excipientes: lauril sulfato de sódio e lactose – Via Farma (São Paulo, Brasil); aerosil - Labsynth (São Paulo, Brasil); amido glicolato sódico – Embraparma (São Paulo, Brasil); celulose microcristalina – DEG (São Paulo, Brasil).
- Suspensão oral (Drontal Puppy, Bayer HealthCare AG); cada 100 mL de suspensão contém 1,50 g de FB e 1,44 g de PP.
- Comprimidos da associação PZ (50,5 mg)/PP (145,0 mg) (Canex composto[®] e Helfine[®]), e da associação FB (150,0 mg)/PZ (50,5 mg)/PP (145,0 mg) (Mectal[®], Canex[®] e Drontal[®]).
- Cápsulas de FB (150,0 mg)/PP(145,0 mg) (Farmácia de manipulação).

4.2.2 Equipamentos

- Espectrofotômetro UV-Vis (Agilent 8453E) – Equipamento 1
- Espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu 1800 *double beam*) – Equipamento 2
- Potenciômetro digital (Hanna HI 4521)
- Espectrômetro BRUKER ALPHA-R FT-IV

- Agitador de amostras Mixer Glas-Col (Terre Haute, EUA);
- Balança analítica Mettler Toledo, modelo Excellence Plus XP 205, com precisão de 0,01 mg (Columbus, EUA);
- Banho de ultrassom Branson 2510 (Danbury, EUA);
- Cromatógrafo a líquido marca Agilent, modelo 1200 equipado com bomba binária G1312B, degaseificador G1379B (Wilmington, EUA) e injetor automático CTC Waters 2777 Sample Manager (Milford, EUA);
- Espectrômetro de massas triplo quadrupolo marca Applied Biosystems, modelo API 3200 (Toronto, Canadá), equipado com bomba de infusão Havard 22 Apparatus (South Natick, EUA) e interface *electrospray* (ESI).
- Purificador de água Milli-Q- Millipore, A10 Gradiente (Milford, EUA);

4.2.3. Softwares

- Statistica 10 (StatSoft Inc.)
- Excel (Microsoft®)
- PLS-Toolbox 3.0 (Eigenvector Research, Inc.) operando em ambiente Matlab 7.0.1 (Math Work Inc.)
- OPUS (version 6.0) for windows software from Bruker Optik
- ChemStation A.10.02.

4.2.4. Aquisição dos dados

Os dados de infravermelho (DRIFT) foram adquiridos em um espectrômetro BRUKER ALPHA-R FT-IV em temperatura ($20,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2$) e umidade (45-55%) controladas, entre $4000\text{-}375\text{ cm}^{-1}$, usando o modo absorbância, 64 *scans* e resolução de 4 cm^{-1} .

Os dados de ultravioleta foram adquiridos usando dois espectrofotômetros: Shimadzu 1800 duplo feixe e UV/Vis AGILENT 8453E, com cubeta de quartzo de 1,0 cm, entre 200-400 nm e resolução de 0,5 nm.

4.3 MÉTODOS

4.3.1. Seleção dos excipientes

A absorção dos medicamentos administrados por via oral e a eficácia terapêutica de qualquer fármaco depende da sua solubilidade em meio aquoso e permeabilidade gastrointestinal. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS) (TRSL, 2012) é uma estrutura científica utilizada para prever a biodisponibilidade dos medicamentos com base nas propriedades de solubilidade e permeabilidade (AMIDON *et al.*, 1995).

Além disso, o BCS tem sido utilizado como critério para a seleção de excipientes de formulações farmacêuticas, considerando os aspectos farmacotécnicos que contribuem para a dissolução do fármaco e consequente absorção (MARTINEZ *et al.*, 2002).

De acordo com BCS, substâncias medicamentosas estão divididas em quatro classes: alta solubilidade e alta permeabilidade (I); baixa solubilidade e alta permeabilidade (II); elevada solubilidade e baixa permeabilidade (III), e de baixa solubilidade e baixa permeabilidade (IV).

De acordo com esta classificação, PP e PZ são classificados como drogas de classe II (MARTINEZ *et al.*, 2002) e, portanto, a sua biodisponibilidade é limitada pela velocidade de dissolução. A classificação de FB não estava disponível, e assim, somente os dados de PP e PZ foram considerados para selecionar os excipientes.

Considerando esse contexto e um conhecimento específico dos excipientes mais comuns usados em formulações veterinárias, diversos excipientes foram escolhidos para testes. Os dois principais foram o amido de milho, usado como diluente e lubrificante, e a celulose microcristalina, usada como diluente, lubrificante e desintegrante.

Os outros excipientes foram talco, utilizado para impedir a aderência, laurilssulfato de sódio, utilizado como lubrificante tensoativo e aglutinante, dióxido de silício coloidal, utilizado como absorvente, hidroxitolueno butilado, utilizado como antioxidante, aerosil como dessecante e antiaderente, lactose como diluente e glicolato sódico de amido como desintegrante.

As misturas de excipientes foram preparadas de acordo com um delineamento experimental com três fatores (fármacos). O intervalo desses fatores

variou em torno de 20%. Em seguida, as misturas de excipientes foram combinadas aleatoriamente com as amostras do DCCR. Este procedimento destina-se a obter um modelo representativo e robusto, que seja capaz de prever amostras com composição de excipientes diferentes no intervalo estudado. Além disso, a combinação aleatória entre os modelos experimentais dos analitos e os excipientes visa evitar possíveis correlações, o que também contribui para um modelo robusto (XIANG; KONIGSBERGER *et al.*, 2009).

4.3.2 Desenvolvimento dos métodos multivariados

Para a associação de dois analitos, tanto no UV quanto no IV, foram feitos planejamentos do tipo completo semelhantes ao que se representa na Figura 10. Os pontos foram calculados para cada tipo de planejamento em função da associação e do próprio tipo de planejamento com em média $\pm 20\%$ do valor declarado.

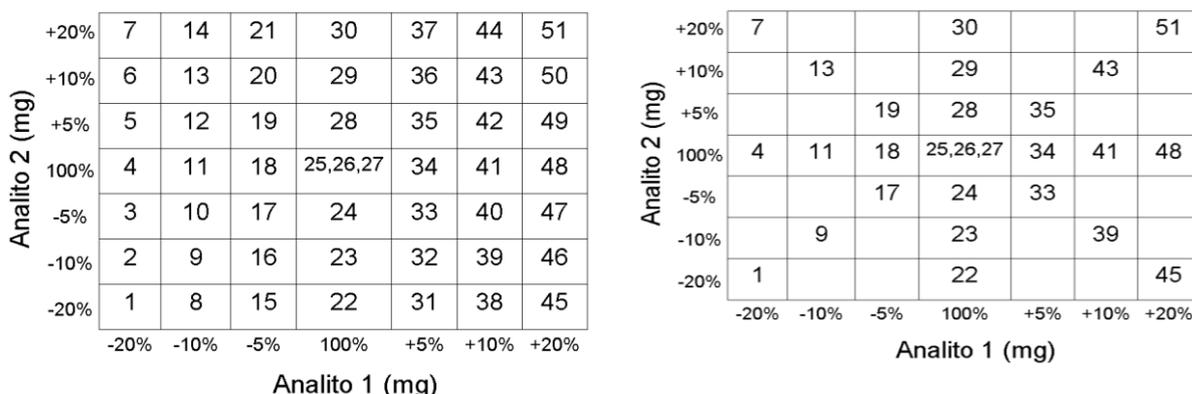


FIGURA 10 – Tipos de planejamento experimental para dois analitos
 FONTE: O AUTOR (2014)

Para os três analitos foi feito um planejamento experimental do tipo DCCR (Figura 11) com $\alpha_{rotabilidade} = 1,6818$, $\alpha_{ortogonalidade} = 1,2872$, 3 fatores (analitos) e 8 níveis, mais ponto central.

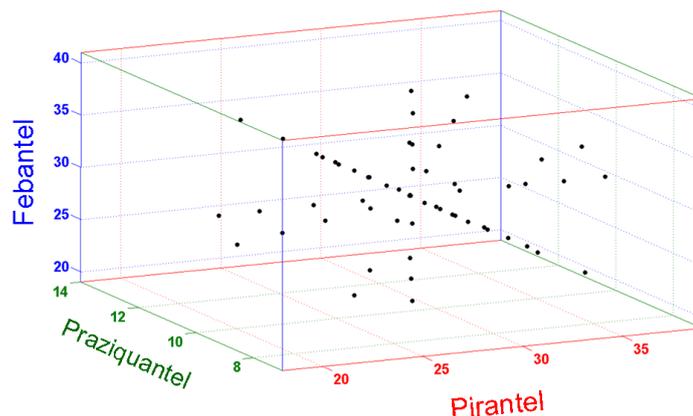


FIGURA 11 – Planejamento experimental DCCR para PP, PZ E FB (mg/0,1g)
 FONTE: O autor (2014)

Os melhores modelos para a quantificação dos fármacos foram validados de acordo com os parâmetros preconizados por órgãos nacionais (ANVISA), internacionais (ICH / USP) e sugeridos pela (ASTM, 2012).

4.3.2.1. Desenvolvimento de métodos por UV

4.3.2.1.1. Associação FB-PP

Soluções estoque dos padrões PP e FB em concentrações de 1 mg.mL^{-1} de cada fármaco foram preparadas separadamente em uma solução diluente de metanol:acetonitrila (50:50 v/v) e armazenados protegidos da luz a 4°C . A partir dessas soluções, uma solução intermediária de cada padrão foi preparada em concentrações de $150 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ na mesma solução diluente. Estas soluções intermediárias foram usadas para preparar misturas de soluções padrão para os conjuntos de calibração e validação.

Para o desenvolvimento dos modelos de calibração multivariada 51 misturas foram preparadas, sendo 31 separadas para a calibração e 20 para a validação, contendo de $6,0$ a $12,0 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de FB e $5,76$ a $11,52 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PP (FIGURA 12-A). O intervalo de variação de concentração foi baseada na concentração nominal do medicamento comercial e a variação máxima neste planejamento foi de $\pm 35\%$.

As amostras comerciais de capsulas e solução oral da associação foram compradas em uma Farmácia Magistral local (Curitiba-PR/Brasil).

4.3.2.1.2 Associação PP-PZ

As soluções de leitura dos padrões de PP e PZ foram feitas exatamente da mesma forma e nas mesmas condições que as soluções de FB e PP (2.3.1.1.1)

Para o desenvolvimento dos modelos de calibração multivariada 51 misturas de padrões foram preparadas, sendo 38 para a calibração e 13 para a validação, contendo de 2,98 a 4,96 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PZ e 9,11 a 15,18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PP (FIGURA 12-B).

As amostras comerciais de comprimidos da associação foram compradas em farmácia de dispensação local (Curitiba-PR/Brasil).

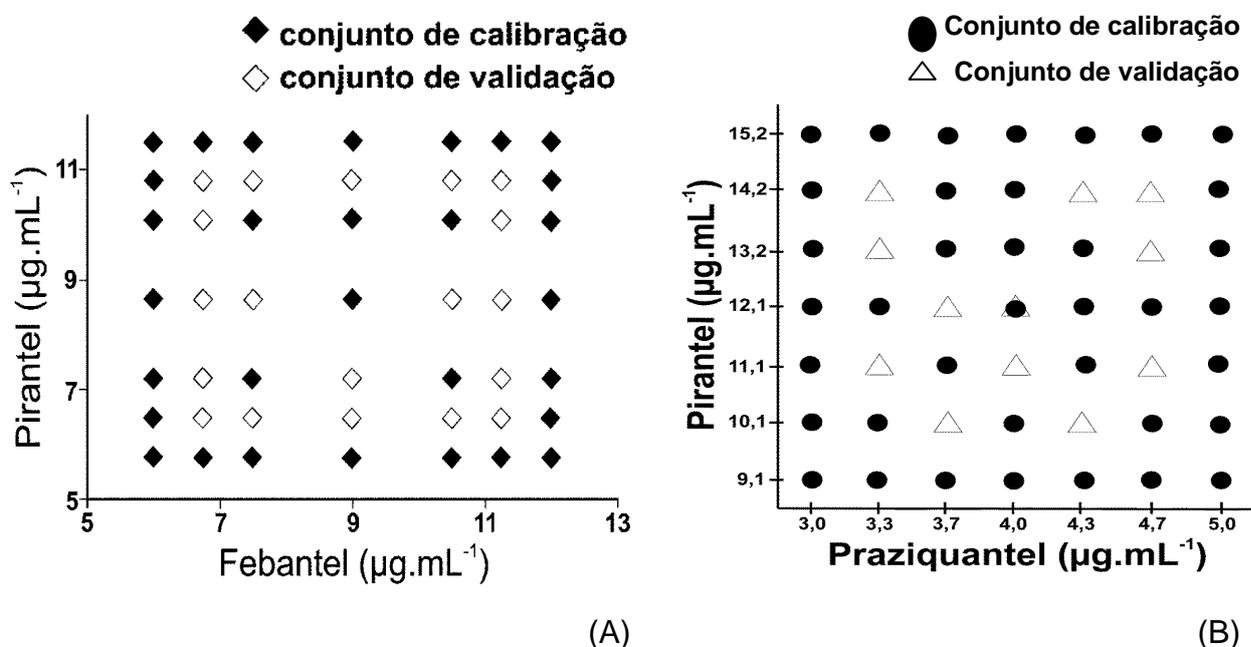


FIGURA 12 - Conjunto de calibração (losango preto) e validação (losango branco) para o modelo por UV de quantificação de FB e PP (A) e conjunto de calibração (círculo preto) e validação (triângulo branco) para PP-PZ (B)

FONTE: O autor (2014)

4.3.2.2. Desenvolvimento de métodos por IV

4.3.2.2.1 Associação FB-PP

Para o desenvolvimento dos modelos 27 misturas, dos padrões com os excipientes (foi usada a mistura Padrão de excipientes como diluente), foram preparadas, sendo 22 para a calibração e 5 para a validação, contendo de 24,0 a

36,0 mg.0,1g⁻¹ de FB e 23,0 a 34,6 mg.0,1g⁻¹ de PP (Figura 13-A). Todas as amostras pulverizadas para análise por infravermelho foram manualmente homogeneizadas e diretamente mensuradas.

4.3.2.2.2 Associação PP-PZ

Para o desenvolvimento dos modelos 27 misturas, dos padrões com os excipientes (foi usada a mistura Padrão de excipientes como diluente), foram preparadas, sendo 22 para a calibração e 5 para a validação, contendo de 14,6 a 45,0 mg.0,1g⁻¹ de PP e 5,64 a 17,0 mg.0,1g⁻¹ de PZ (Figura 13-B).

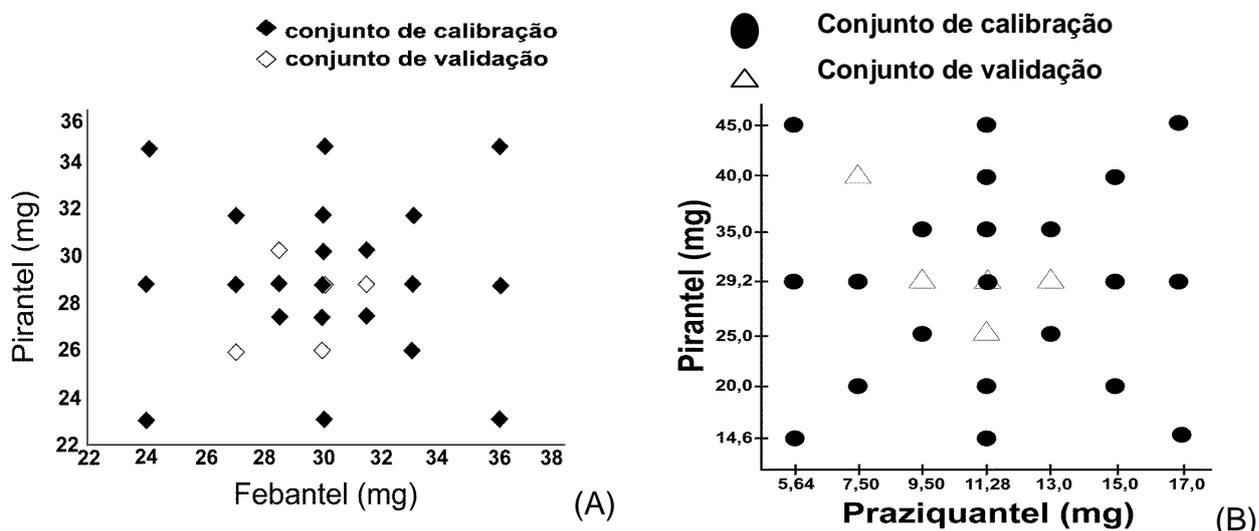


FIGURA 13 - Conjunto de calibração (losango preto) e validação (losango branco) para o modelo por IV de quantificação de FB e PP (A) e conjunto de calibração (círculo preto) e validação (triângulo branco) para PP-PZ (B)

FONTE: O autor (2014)

4.3.2.2.3 Associação FB-PP-PZ

Para o desenvolvimento dos modelos 56 misturas sintéticas foram preparadas, sendo 36 para a calibração e 20 para a validação (Figura 14), contendo de 23,0 a 34,6 mg.0,1g⁻¹ de PP, 8,0 a 12,0 mg.0,1g⁻¹ de PZ e de 24,0 a 36 mg.0,1g⁻¹ de FB, de acordo com um planejamento do tipo DCCR. O ponto central corresponde a 28,8 mg de PP, 10,0 mg de PZ e 30,0 mg de FB por 100 mg de amostra, completo com uma mistura de excipientes.

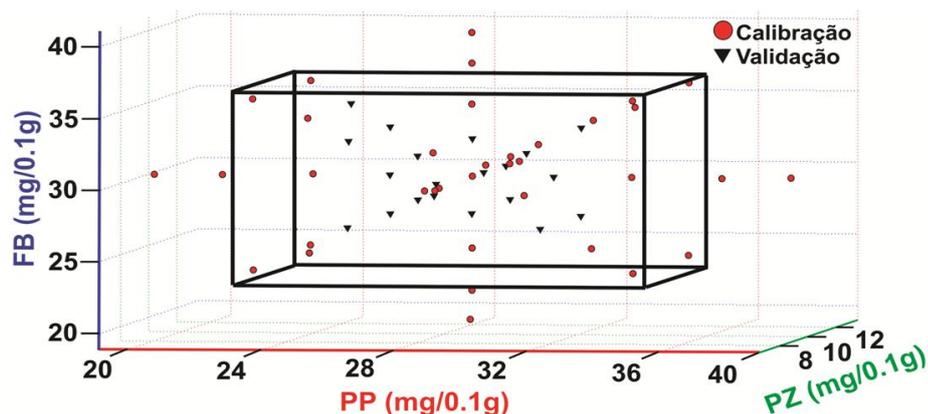


FIGURA 14 - Representação esquemática mostrando o planejamento DCCR para a variação de concentração de FB, PP E PZ. Conjunto de calibração (círculos) e conjunto de validação (triângulos)
 FONTE: O autor (2014)

4.4 VALIDAÇÃO

Os métodos espectrométricos no UV ou no IV uma vez desenvolvidos foram validados tomando por base os parâmetros preconizados pelas normas da ANVISA, ICH e recomendações da ASTM.

4.4.1 Linearidade

A linearidade dos métodos foi estimada pela análise dos parâmetros dos gráficos de valores de referência x valores preditos (coeficiente de correlação, determinação, inclinação, intercepto) e através do comportamento dos resíduos. As faixas de concentração utilizadas estão descritas na Tabela 01. Também foi verificada a normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e cálculo do valor de F para verificar se o modelo linear é adequado.

Tabela 01 – Faixas de concentração utilizadas nos métodos de UV e IV para avaliação da Linearidade

Técnica	Associação	Fármaco / Faixa		
		FB	PP	PZ
UV ^a	FB / PP	6,0 – 12,0	5,8 – 10,1	-
	PZ / PP	-	10,1 – 14,2	3,7 – 4,7
IV ^b	FB / PP	27,0 – 33,0	25,9 – 31,7	-
	PZ / PP	-	24,9 – 39,8	7,7 – 13,0
	FB PZ PP	25,0 – 33,0	25,9 – 31,7	9,5 – 12,5

^a $\mu\text{g.mL}^{-1}$

^b mg.0,1g^{-1}

FONTE: O autor (2014)

4.4.2. Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis (repetitividade e precisão intermediária) e em função do coeficiente de variação, dado por: $CV = s / x \cdot 100$ ($x > 0$), no qual x é a média do teor estimado para uma amostra e s é o desvio padrão) e test-t para amostras independentes.

4.4.2.1. Associação FB-PP / UV

Para a associação FB e PP por espectroscopia eletrônica, a repetitividade foi determinada usando amostras de concentrações a $9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ FB ($n = 6 \times 3$) e $8.64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ PP ($n = 6 \times 3$).

A precisão intermediária também foi avaliada com amostras de concentração de FB ($9 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $n = 6 \times 3$) e PP ($8.64 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $n = 6 \times 3$) em dias, analistas e equipamentos diferentes.

4.4.2.2. Associação PZ-PP / UV

Para a associação PP e PP por espectroscopia eletrônica, a repetitividade foi determinada usando amostras de concentrações a 3,27 e duas de $3,97 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para PZ ($n = 3 \times 3$) e para o PP as concentrações de 10,12 de 12,14 e 14,17 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($n = 3 \times 3$).

A precisão intermediária também foi avaliada com amostras de concentração de PZ (3,27; 3,97 e 4,66 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; $n = 3 \times 3$) e PP (10,12; 12,14 e 14,17 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; $n = 3 \times 3$) em dias, analistas e equipamentos diferentes.

4.4.2.3. Associação FB-PP / IV

Para a associação FB e PP por infravermelho a repetitividade foi determinada usando amostras de concentrações próximas a $30,0 \text{ mg.}0,1\text{g}^{-1}$ para FB ($n = 6 \times 3$) e para o PP as concentrações a $28,8 \text{ mg.}0,1\text{g}^{-1}$ ($n = 6 \times 3$).

A precisão intermediária também foi avaliada com amostras de concentrações próximas a $30,0 \text{ mg} \cdot 0,1 \text{ g}^{-1}$ para FB ($n= 6 \times 3$) e para o PP as concentrações a $28,8 \text{ mg} \cdot 0,1 \text{ g}^{-1}$ ($n= 6 \times 3$).

4.4.2.4. Associação PP-PZ / IV

Para a associação PZ e PP por infravermelho a repetitividade foi determinada usando amostras de concentrações a 9,43 a 11,08 e $13,05 \text{ mg} \cdot 0,1 \text{ g}^{-1}$ para PZ ($n= 3 \times 3$) e para o PP as concentrações a 29,11 a 29,04 e $29,22 \text{ mg} \cdot 0,1 \text{ g}^{-1}$ ($n= 3 \times 3$).

A precisão intermediária também foi avaliada com amostras de concentração de PZ (9,21 e 9,43; 10,95 e 11,08; $13,02$ e $13,05 \text{ mg} \cdot 0,1 \text{ g}^{-1}$; para os analistas 1 e 2, respectivamente; $n= 3 \times 3$) e PP ($28,54$ e $29,02$; $29,04$ e $29,07$; $29,11$ e $29,22 \text{ mg} \cdot 0,1 \text{ g}^{-1}$; para o analista 1 e 2, respectivamente; $n= 3 \times 3$) em dias, analistas e equipamentos diferentes.

4.4.2.5. Associação FB-PZ-PP / IV

Para a associação FB, PZ e PP por infravermelho, a repetitividade foi determinada usando amostras de concentrações a $28,8 \text{ mg} \cdot 0,1 \text{ g}^{-1}$ para PP ($n= 6 \times 3$), $10,05$ e $10,1 \text{ mg} \cdot 0,1 \text{ g}^{-1}$ para PZ ($n=6 \times 3$) e $30,0 \text{ mg} \cdot 0,1 \text{ g}^{-1}$ para FB ($n=6 \times 3$).

A precisão intermediária também foi avaliada com amostras de concentração de PP ($28,8 \text{ mg} \cdot 0,1 \text{ g}^{-1}$ - analista 1 - $28,77$ e $28,80 \text{ mg} \cdot 0,1 \text{ g}^{-1}$ - analista 2) de PZ ($10,05$ e $10,10 \text{ mg} \cdot 0,1 \text{ g}^{-1}$ – analista 1 – $10,07$ e $10,00 \text{ mg} \cdot 0,1 \text{ g}^{-1}$ – analista 2) e FB ($29,99$ e $30,00 \text{ mg} \cdot 0,1 \text{ g}^{-1}$ – analista 1; $29,98$ e $30,00 \text{ mg} \cdot 0,1 \text{ g}^{-1}$ – analista 2; $n= 3 \times 3$).

4.4.3. Exatidão

4.4.3.1 Associação FB-PP / UV

Para a associação FB e PP por espectroscopia eletrônica a exatidão do método foi determinada usando a técnica de adição de padrão. Para as cápsulas, as soluções intermediárias de FB e PP foram adicionadas ao placebo (aerosil® sílica 0.8%; lauril sulfato de sódio 2%; amido de sódio glicolato 8%; celulose

microcristalina 22,3% e lactose 66,9%) até se obter os níveis correspondentes a 80, 100 e 120% da concentração teste ($9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de FB e $8,64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de PP). Para a suspensão oral, as soluções intermediárias de FB e PP foram adicionadas até obter três níveis de concentração, correspondentes a 110, 115 e 120% da concentração teste ($9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de FB e $8,64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de PP). Cada solução foi preparada em triplicata. Todos os espectros foram obtidos entre 200 - 400 nm e com resolução de 0,5 nm. Os dados foram avaliados através dos valores do DPR, RMSEP, % de recuperação e teste-t para amostras independentes.

4.4.3.2 Associação PP-PZ /UV

Para a associação PZ e PP por espectroscopia eletrônica, o método foi o da adição de padrão aos comprimidos. A concentração teste foi de $3,97 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de PZ e $12,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de PP (n= 3x3).

4.4.3.3 Associação FB-PP / IV

Para a associação FB e PP por infravermelho, o método foi o da adição de padrão às cápsulas. A concentração teste foi de $30 \text{ mg.}0,1\text{g}^{-1}$ de PZ e $12,14 \text{ mg.}0,1\text{g}^{-1}$ de PP (n= 3x3).

4.4.3.4 Associação PP-PZ /IV

Para a associação PZ e PP por infravermelho, o método foi o da adição de padrão aos comprimidos. A concentração teste foi de $11,16 \text{ mg.}0,1\text{g}^{-1}$ de PZ e $29,04 \text{ mg.}0,1\text{g}^{-1}$ de PP (n= 3x3).

4.4.3.5 Associação FB-PZ-PP / IV

Para a associação FB, PZ e PP por infravermelho, o método foi o da adição de padrão aos comprimidos. A concentração teste foi de $10,0 \text{ mg.}0,1\text{g}^{-1}$ de PZ, $30,0 \text{ mg.}0,1\text{g}^{-1}$ de FB e $28,8 \text{ mg.}0,1\text{g}^{-1}$ de PP (n= 3x3).

4.4.4 Robustez

4.4.4.1 Associação FB -PP / UV

Para a associação FB e PP por espectroscopia eletrônica, a robustez do método foi analisada estudando os efeitos da variação de proporção de solventes nas soluções diluentes, temperatura e tempo de leitura. Para avaliar a influência de variações na composição do diluente, três proporções diferentes de metanol: acetonitrila foram preparados (45:50, 50:50 e 55:45 v/v). Para avaliar o efeito da variação da temperatura, as amostras foram mantidas a 20, 25 e 30 °C e as leituras foram feitas às 0, 24 e 96 horas. Para determinar o efeito do tempo de leitura, as soluções foram medidas à temperatura ambiente e nos tempos 0, 24 e 96 horas após a preparação inicial da amostra. As análises foram realizadas em triplicata, utilizando uma solução diluída de FB ($9 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e PP ($8,64 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Todos os dados espectrais foram registrados entre 200 e 400 nm, com uma resolução espectral de 0,5 nm. Os dados foram verificados usando teste-t para amostras pareadas, ANOVA e teste de Levene.

4.4.4.2 Associação FB-PZ-PP / IV

Para a associação PZ, FB e PP por infravermelho a robustez do procedimento foi analisada em função da variação da concentração de amido em + 5% (mistura A5) e + 10% (mistura A10) da mistura de escolha para desenvolver os modelos (mistura Padrão). Também foi verificada pela troca da mistura Padrão pelas misturas Número 3 e número 6. Os excipientes foram divididos em quatro misturas e comparados à mistura de excipientes padrão, conforme tabela abaixo:

Tabela 02 – Composição das misturas para avaliação do ensaio de robustez

Excipientes	Mistura (%)				
	Padrão	Número 3	Número 6	A5	A10
Laurilssulfato de sódio	1,5	-	2,0	1,3	1,2
Amido	57,5	24,7	-	62,5	67,5
Celulose microcristalina	30,0	74,3	22,3	26,4	23,0
Aerosil	1,0	1,0	0,8	0,9	0,8
Lactose	-	-	67,0	-	-
Glicolato sódico de amido	-	-	8,0	-	-
Talco	10,0	-	-	8,8	7,7
BHT	0,05	-	-	0,04	-

FONTE: O autor (2014)

4.5. Análise e preparação das amostras comerciais

4.5.1 Associação FB-PP / UV

Existem duas formas farmacêuticas diferentes disponíveis no mercado que contêm PP e FB em associação: cápsulas (144 mg de PP e 150 mg de FB) e suspensão oral (14,4 mg.mL⁻¹ de PP e 15 mg.mL⁻¹ de FB). A composição qualitativa e quantitativa dos excipientes não é fornecida pela indústria, por isso a escolha dos componentes foi baseada nas propriedades de solubilidade e permeabilidade dos fármacos pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutico (BCS) (AMIDON *et al.*, 1995).

O conteúdo de 20 cápsulas foi triturado a pó e homogeneizado. A massa equivalente a 100 mg de febantel e 96 mg de pamoato de pirantel foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico de 100 mL contendo solução diluente (metanol e acetonitrila 50:50 v/v), obtendo-se uma concentração final de 1,00 mg.mL⁻¹ de FB e 0,96 mg.mL⁻¹ de PP. A mistura resultante foi sonicada por 10 minutos e então filtrada através de filtro Millipore Millex PVDF 0,45 mm.

A suspensão oral foi diluída com a solução diluente para se obter uma concentração final de 1 mg.mL⁻¹ de FB e 0,96 mg.mL⁻¹ de PP. O mesmo procedimento descrito para as cápsulas foi subsequentemente feito para a solução oral. Para as análises espectroscópicas, uma alíquota da solução filtrada foi diluída com solução diluente até concentração de 9 µg.mL⁻¹ de FB e 8,64 µg.mL⁻¹ de PP.

4.5.2. Associação PZ-PP / UV

Comprimidos de duas marcas diferentes e uma amostra de farmácia de manipulação foram adquiridos em Curitiba-PR.

O modo de preparo foi similar ao descrito para a associação FB e PP (4.5.1 FB PP).

4.5.3. Associação FB-PP / IV

Foram avaliadas amostras de cápsulas de farmácia de manipulação. O conteúdo de cada cápsula foi totalmente retirado, triturado a pó homogêneo e diretamente lido no IV no modo reflectância difusa (n=3x3).

4.5.4. Associação PZ-PP / IV

Os comprimidos de cada marca foram triturados a pó homogêneo, da mesma forma que o conteúdo das cápsulas da farmácia de manipulação, diretamente analisados no IV no modo reflectância difusa (n= 3x3) e comparados com a técnica padrão (CLAE). O valor rotulado para PP foi 145 mg e para PZ 50,5 mg.

4.5.5. Associação FB-PZ-PP / IV

Comprimidos de três diferentes fabricantes disponíveis no Brasil foram comprados em Curitiba, PR. O conteúdo de 20 comprimidos de cada formulação foi triturado e misturado a pó homogêneo. Os espectros dessas amostras foram adquiridos nas mesmas condições já descritas, com seis repetições. Estas mesmas amostras comerciais foram também analisados por CLAE-DAD e CLAE-EM/EM.

4.5.6. Análise pela técnica padrão: CLAE-DAD e CLAE-EM/EM

As mensurações foram feitas usando uma condição otimizada do procedimento descrito por Bialecka e Kulik (2010) e foram conduzidas usando um equipamento Agilent 1100 (Wilmington, NC, USA), que consiste de uma bomba quaternária, degaseificador, amostrador automático e detector DAD. Os analitos

foram separados usando uma coluna XBridge C18 250 x 4,6 mm (5 μm de diâmetro de partícula) acoplada com uma coluna guarda XBridge C18 20 x 4,6 mm (5 μm). A fase móvel era constituída de água (pH ajustado a 3,5 com ácido fosfórico 85%) e acetonitrila no modo gradiente. O volume de injeção foi de 10 μL , o fluxo de 1,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura da coluna mantida a 40°C e detecção em 215 e 312 nm.

A análise por CLAE-EM/EM foi realizada como descrito por Pontes *et al.* (2013) e foi realizada em um sistema CLAE, marca Agilent, modelo 1200 (Santa Clara, CA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Triplo Quadrupolo (API 3200, Applied Biosystems, Toronto, Canadá), equipado com bomba de seringa Havard 22 Dual Model (Harvard Apparatus, South Natick, Massachusetts, EUA) e fonte de ionização por *electrospray* (ESI). As separações analíticas foram obtidas em uma coluna XBridge C8 50 x 2,1 mm (5 μm), acoplada a uma pré-coluna XBridge C8 10 x 2,1 mm (5 μm) mantida a 20°C. A fase móvel era constituída de água / acetonitrila (15:85 *v/v*) contendo 0,1 % de ácido fórmico e 3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de formato de amônio. O fluxo isocrático foi de 200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e o volume de injeção de 20 μL . A fonte de ionização *electrospray* foi operada no modo positivo sob as seguintes condições de trabalho: voltagem *ion spray* de 5000 V; temperatura da fonte de 450 °C; nebulizador e gás de secagem (nitrogênio) de 45 e 40 psi, respectivamente; gás de colisão e dissociação (CAD) de 4 psi e gás de cortina (CUR) de 10 psi. A quantificação foi realizada em modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), mantendo um tempo de espera de 150 ms.

Para a análise por CLAE-DAD e CLAE-EM/EM, uma massa equivalente a um comprimido (massa média determinada previamente) foi dissolvida, sonicada durante 15 minutos e filtrada através de um Millipore Millex de PVDF. Em seguida, a solução filtrada foi transferida para um balão volumétrico contendo uma solução diluente de metanol e de acetonitrila (50:50 *v/v*). Todas as amostras foram preparadas sob baixa exposição a luz e feitas em triplicata de solução e injeção.

Resultados e discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

A presença de insaturações alternadas e pares de elétrons não ligantes nas moléculas caracterizam um possível cromóforo que deve absorver na região do ultravioleta (200-400 nm) do espectro eletromagnético, justificando assim e tornando viável o desenvolvimento de um método por espectrometria nessa região para os três fármacos. Métodos que se utilizam desta propriedade são chamados espectrofotométricos e preconizam a necessidade de características fundamentais intrínsecas ou adquiridas pela molécula, como a presença de um ou mais cromóforos.

Para análise no infravermelho a exigência não é tão específica quanto no UV e a maior parte das moléculas são passíveis de análise, uma vez que é necessário apenas que o momento dipolar varie ou sofra variação em função do tempo. Essa variação se dá quando a radiação infravermelha interage com a matéria com uma energia que é suficiente apenas para provocar as vibrações entre os átomos em uma molécula.

5.2 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS

O desenvolvimento é uma etapa de grande importância na qual se define o conjunto de parâmetros que devem ser otimizados para o funcionamento do método. O desenvolvimento de métodos analíticos de quantificação utilizando as espectrofotometrias no ultravioleta e no infravermelho, em geral, passa pela análise de diversos parâmetros, tais como a escolha do solvente, definição da concentração de trabalho mais adequada para cada analito, investigação das bandas de absorção, entre outros.

5.2.1 Escolha do solvente

A primeira etapa de desenvolvimento foi verificar o melhor solvente para a solubilização dos fármacos. Pontes *et al.* (2011) desenvolveram um trabalho no qual verificaram a solubilidade dos fármacos em diversos solventes de polaridades

diferentes. Os melhores resultados foram obtidos para a mistura de acetonitrila:metanol (50:50 v/v). A fim de avaliar uma possível influência da solução diluente foi realizado um ensaio com vinte soluções diluentes (todas com a mesma composição) dessa mistura (acetonitrila:metanol) e, como pode-se observar na Figura 15, não há absorção significativa no espectro eletrônico por parte dessa mistura na faixa de 200 a 400 nm.

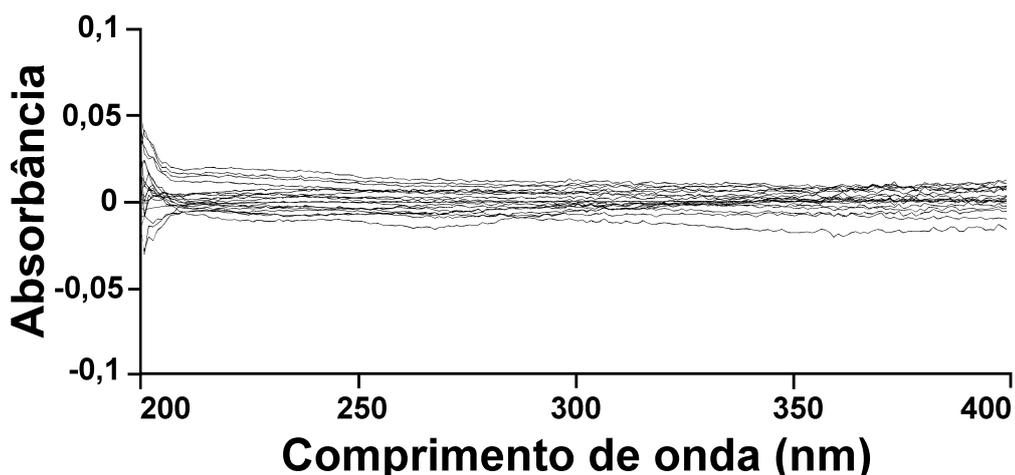


FIGURA 15 - Espectros de UV das soluções de acetonitrila:metanol (50:50 V/V)
FONTE: O autor (2014)

5.2.2. Análises dos espectros de absorção eletrônica

Os espectros de absorção dos padrões isolados em metanol/acetonitrila 50:50 v/v (200-400 nm) podem ser vistos na Figura 16. É possível verificar que há sobreposição dos três fármacos (praziquantel 3 $\mu\text{g/mL}$; pamoato de pirantel 8,64 $\mu\text{g/mL}$; febantel 9 $\mu\text{g/mL}$) próximo a 200 nm e de 200-340 nm entre o febantel e o pamoato de pirantel. Essas concentrações foram escolhidas porque é nessa proporção que os fármacos estão associados nos medicamento. O pirantel tem absorção máxima em $\lambda = 237$ nm, enquanto o praziquantel exibe absorção na faixa entre 200 e 240 nm, e o febantel próximo a $\lambda = 213$ e 282 nm. Há uma clara sobreposição dos sinais espectroscópicos de todas as espécies, o que normalmente impede a quantificação simultânea e direta por espectroscopia eletrônica. Para resolver este problema, provavelmente, o melhor método é a regressão pelo método PLS.

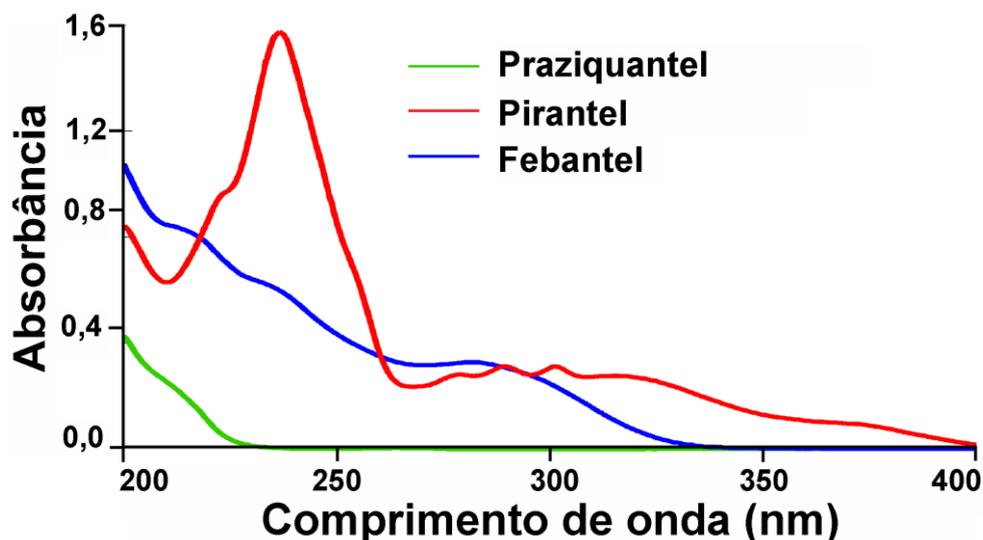


FIGURA 16 - Espectros isolados de UV das soluções de PP (8,64 $\mu\text{g/ml}$), PZ (3 $\mu\text{g/ml}$) e FB (9 $\mu\text{g/ml}$) em acetoneitrila:metanol (50:50 V/V)
 FONTE: O autor (2014)

Da mesma forma que no UV, no método por IV é necessário analisar um branco ou o ruído instrumental e para isso foram feitas vinte leituras da cela de infravermelho vazia. Como se observa na Figura 17 a intensidade de absorção é insignificante na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} .

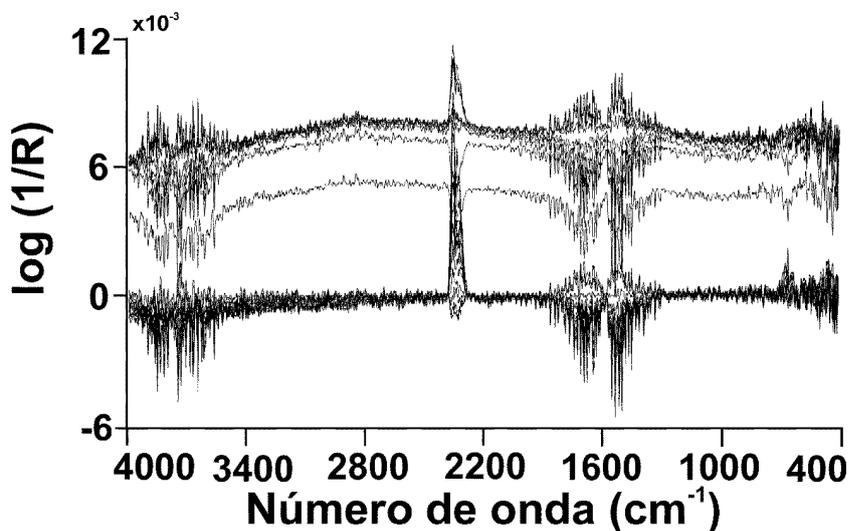


FIGURA 17 - Espectros de IV do branco (cela sem analitos)
 FONTE: O autor (2014)

Mesmo para moléculas relativamente simples, o espectro no IV é geralmente complexo. Para fins de comparação foram adquiridos os espectros de cada analito padrão no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} (Figura 18). A interpretação destes espectros ajuda a destacar as regiões que mais podem contribuir para os modelos de previsão. Para cada analito foram identificadas as principais bandas relacionadas

(SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). No espectro do Pamoato de Pirantel é possível observar uma banda larga com picos próximos a 3067, 2969 e 2892 cm^{-1} , os quais estão relacionados a vibrações de estiramento de C-H, O-H fenólico e carboxílico, respectivamente; um pico intenso em 1659 cm^{-1} do estiramento de C=O carboxílico e aromático; um pico em 1612 cm^{-1} da ligação C=N de imina cíclica; um pico em 1150 cm^{-1} de estiramento C-N de amina terciária e um pico em 713 cm^{-1} de deformação fora do plano de O-H de anel tiofeno (HEGELUND; LARSEN; PALMER, 2008). No espectro do Praziquantel pode ser observada uma pequena banda com dois picos em 3291 e 3234 cm^{-1} , relacionados a estiramentos de ligações =C-H aromáticos; dois picos intensos em 2898 e 2848 cm^{-1} de estiramentos ligados a amins terciárias em anel lactâmico; uma intensa banda entre aproximadamente 1700-1600 cm^{-1} e centrada em 1666 cm^{-1} de estiramento de dois grupos carbonila de amida e uma intensa banda centrada próxima de 1450 cm^{-1} característica de amida di-substituída. No espectro do Febantel nota-se uma larga banda com pico em 3209 cm^{-1} correspondente a estiramentos N-H de carbamato; dois picos em 2977 e 2825 cm^{-1} de estiramento C-H de grupos O-CH₃; dois picos intensos em 1769 e 1687 cm^{-1} de estiramento C=O de carbamato e um pico centrado em 1514 cm^{-1} de ligação N-H de carbamato.

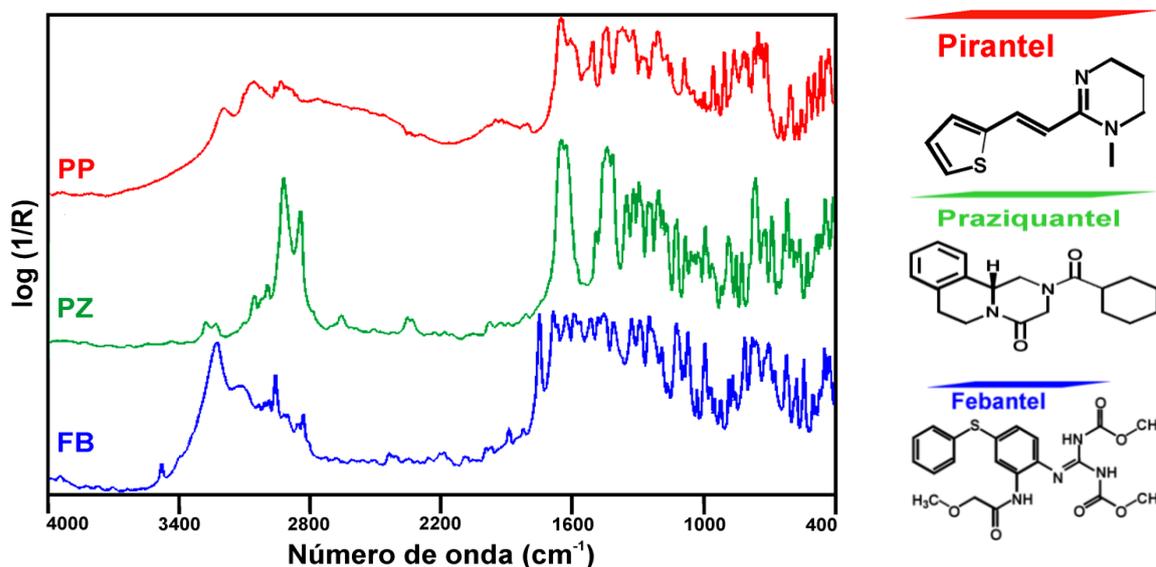


FIGURA 18 - Espectros de IV das amostras padrão de PZ, FB e PP no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1}
 FONTE: O autor (2014)

Sabendo como absorvem os fármacos de forma individual, fez-se o estudo das associações. Os espectros de absorção no UV dos padrões de Pirantel e Praziquantel e da mistura podem ser vistos na Figura 19-A. Observa-se que a região

crítica da quantificação da associação se dá em toda a faixa em que o Praziquantel absorve, próximo a 200-225 nm, que é uma região um pouco crítica por ser pouco seletiva e suscetível a interferentes. Outro ponto crítico é que o PZ está numa concentração quase três vezes menor que o Pirantel.

Os espectros de absorção dos padrões de Pirantel e Praziquantel e da mistura podem ser vistos na figura 19-B. Apesar de estar numa concentração um pouco superior ao PP, o FB apresenta um espectro bem menos “característico” e de menor absorção. Seu espectro se sobrepõe ao PP de 200 nm a próximo de 325 nm e a região após este ponto que poderia ajudar a quantificar melhor o PP tem baixa absorção, que é um fator complicador.

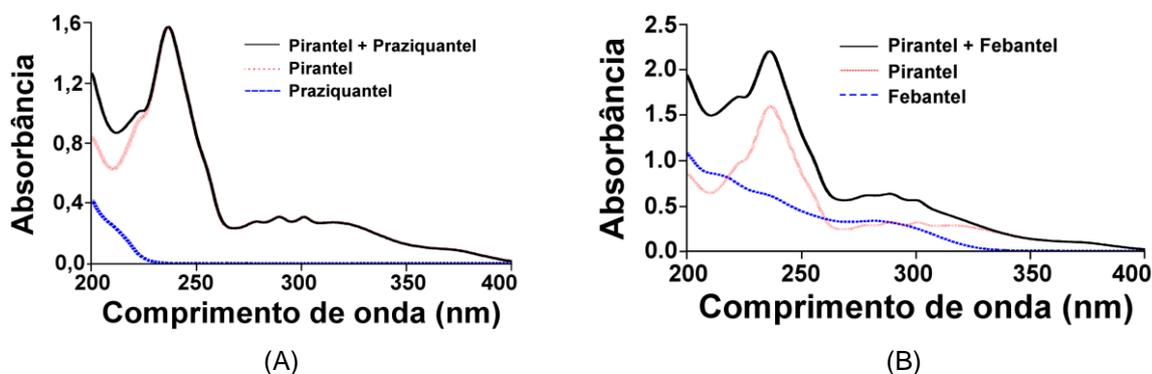


FIGURA 19 – Espectros de absorção no UV dos padrões de (A) PP ($8,64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e PZ ($3,00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); (B) PP ($8,64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e FB ($9,00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); e as misturas de cada associação em metanol-acetonitrila (50:50, V/V).

FONTE: O autor (2014)

Uma vez caracterizados e estudados os principais parâmetros partiu-se para o desenvolvimento dos métodos por calibração multivariada. Para tanto foram feitos vários estudos que começaram com um planejamento experimental, que foi ligeiramente diferente entre as técnicas (UV e IV) para os modelos FB-PP e PP-PZ e um pouco mais complexo para o modelo FB-PP-PZ. Cada método então foi desenvolvido levando-se em conta os aspectos fundamentais como a utilização dos pré-processamentos e suas combinações mais apropriadas, seleção do número de variáveis latentes, avaliação do erro percentual médio de predição, RMSEC, RMSECV, RMSEP, etc. Além de utilizar sempre em um primeiro momento o espectro completo, seja no UV ou no IV, também foram utilizadas as técnicas de seleção de variáveis *i*PLS e *s*PLS, que melhoraram significativamente os parâmetros dos modelos. Após estudo sobre cada associação e técnica foram obtidos vários modelos de boa qualidade e a avaliação do melhor deles para cada técnica e associação estão descritos a seguir.

5.3. AVALIAÇÃO DOS MODELOS MULTIVARIADOS PARA UV

Como existem normas e regras que devem ser cumpridas no âmbito clássico e univariado, avaliar e validar modelos que são essencialmente multivariados através das mesmas normas e regras univariadas não é uma tarefa simples. Para tanto foram feitas considerações que tentam obter as melhores estimativas no caso de algumas figuras de mérito.

O primeiro passo foi executar o planejamento experimental para as amostras das associações FB-PP e PP-PZ. Os dados de calibração e validação podem ser vistos graficamente nas figuras 20-A e 20-B, respectivamente. Nota-se que, conforme planejado e esperado, as amostras de calibração são as mais externas (linhas vermelhas) e as de validação (linhas pretas) são as mais internas. Assim, nenhuma amostra de validação está nas extremidades, fato que evita um erro de quantificação por uma possível extrapolação. A seleção das amostras de calibração foi feita preferencialmente com as amostras mais externas e as de validação mais internas.

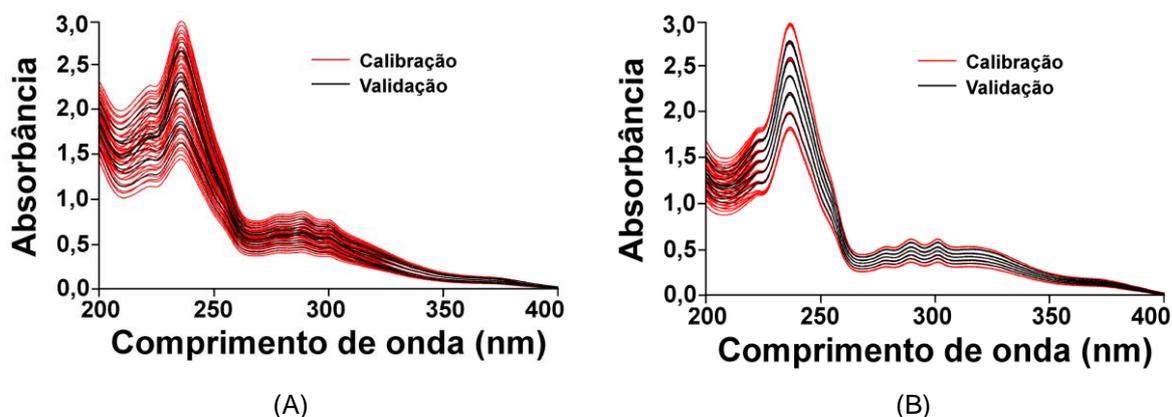


FIGURA 20 – Espectros de absorção no UV das misturas de FB e PP (A) e PP-PZ (B) do conjunto de calibração (—) e validação (—) em metanol-acetonitrila (50:50, V/V).
FONTE: O autor (2014)

Para a seleção da faixa espectral foram construídos modelos utilizando toda a faixa espectral, utilizando faixas restritas às principais bandas de cada analito e também através da técnica de iPLS. Os parâmetros foram definidos com o número de intervalos automático, número de variáveis latentes máximo igual a 3, modo *forward* e o tamanho do intervalo subdividindo a região espectral a cada 100, 50,40 e 20 nm para cada um dos pré processamentos e combinações indicadas para UV.

O próximo passo foi a escolha do número de variáveis latentes adequado para cada modelo ou associação. Para isto foi analisado o gráfico de RMSECV x VL (Figura 21-A para FB-PP e 21-B para PP-PZ), através do qual seleciona-se o número de VL que produz o menor erro de previsão sem perder significativamente a variância dos dados. Pode-se notar que em ambos os modelos (PP-PZ e PP-FB) o número ideal de variáveis latentes é igual a 2, fato que já era esperado uma vez que os espectros no ultravioleta são mais “comportados” e dois é o número de fármacos ou de variáveis dependentes a serem determinadas. Um aumento para três VL não se justifica em nenhum dos casos, uma vez que o valor do erro não diminui significativamente.

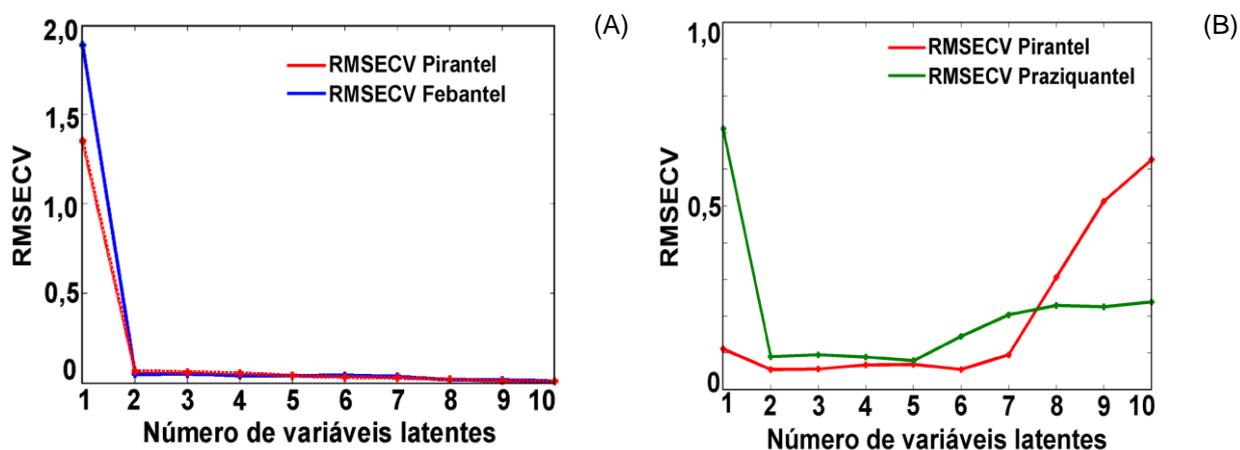


FIGURA 21 – Escolha do número de VL para os modelos FB-PP (A) e PP-PZ (B) por UV
 FONTE: O autor (2014)

Outro ponto bastante importante na avaliação de um modelo é a detecção de *outliers*. Esses *outliers*, ou amostras anômalas, podem afetar adversamente a capacidade preditiva do modelo e, portanto, foram investigadas pela análise dos resíduos de student x *leverage*, com os limites de $\pm 2,5$ e $3 (LV) / n$, respectivamente, considerando um limite de confiança de 95%. Também foi avaliado o gráfico de resíduos Q x Hotelling T^2 .

Considerando o critério para resíduos de Student e *Leverage*, nos modelos das associações FB-PP e PP-PZ (Figura 22-A e 22-B, respectivamente), não foram identificadas amostras anômalas.

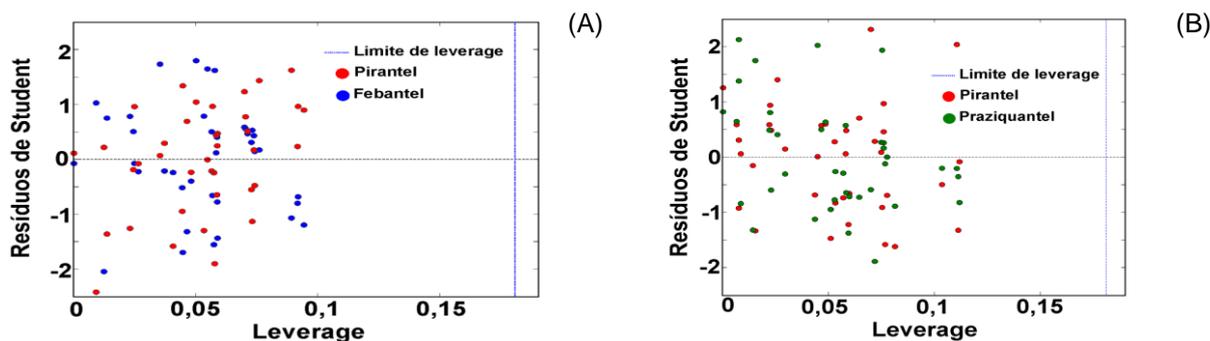


FIGURA 22 – Avaliação de *outliers* no modelo FB-PP (A) e PP-PZ (B) por UV através dos resíduos de student x *leverage*

FONTE: O autor (2014)

Para o critério de resíduos Q x Hotelling T^2 , nos modelos das associações FB-PP e PP-PZ (Figura 23-A e 23-B, respectivamente), apesar de algumas amostras apresentarem valores mais altos que o limite para Resíduos Q nos dois modelos, tanto para calibração quanto validação, elas não foram classificadas como amostras anômalas. Isto uma vez que as mesmas não foram identificadas como *outliers* no gráfico de Resíduos de Student x *Leverage* e pelo valor associado aos Resíduos Q ser muito baixo. Nos dois gráficos ainda pode-se verificar que os *scores* capturaram praticamente toda a variância como, por exemplo, com 99,96%, enquanto que restaram apenas 0,04% para os resíduos no modelo FB-PP e no modelo PZ-PP os valores são muito semelhantes.

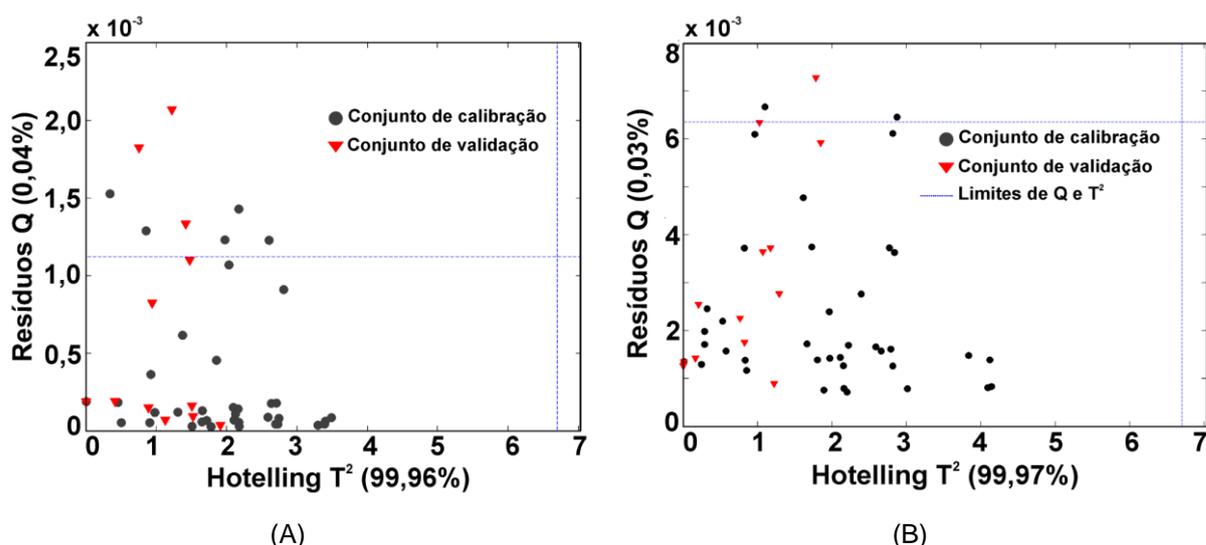


FIGURA 23 – Avaliação de *outliers* no modelo FB-PP (A) e PP-PZ (B) por UV através dos resíduos Q X Hotelling T^2

FONTE: O autor (2014)

Outro aspecto que pode ser analisado é a importância das variáveis espectrais no desenvolvimento do modelo PLS. Essa análise pode ser feita

comparando os valores de *loadings*, coeficiente de regressão e mais recentemente os dados de *VipScores* com os espectros originais. No caso do modelo para FB-PP, ficou um pouco mais clara a comparação entre o espectro original com os *loadings* e nota-se que para o Febantel (Figura 24-A) é importante a primeira região selecionada pelo modelo (280-320 nm), enquanto que para o Pirantel (Figura 24-B) tanto a primeira região (280-320 nm) quanto a segunda (380-400 nm) foram importantes na elaboração do modelo. Nas figuras 24 e 25 não há escala e os valores foram normalizados para poderem ser avaliados juntos.

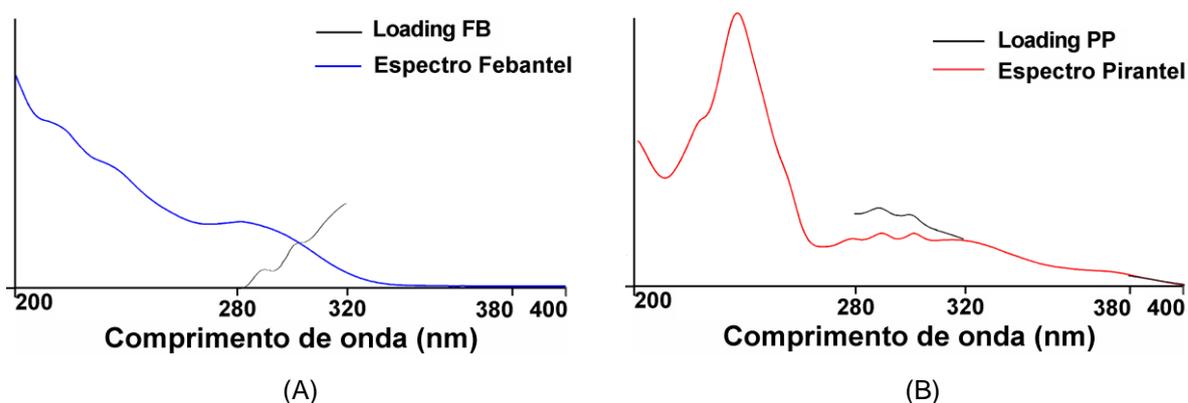


FIGURA 24 – Comparação dos espectros de absorção no UV do FB (A) e PP (B) com os dados de *loadings* no modelo FB-PP por UV
 FONTE: O autor (2014)

Já para o modelo PP-PZ o resultado que melhor descreveu o espectro original foi a comparação com o *VipScore*. Nesse caso foi usado todo o espectro na elaboração do modelo e todo ele foi significativo para o PP (Figura 25-A), sendo muito similar ao espectro do próprio fármaco e parecido com o PZ (Figura 25-B), que somente tem absorção próxima a 200 nm.

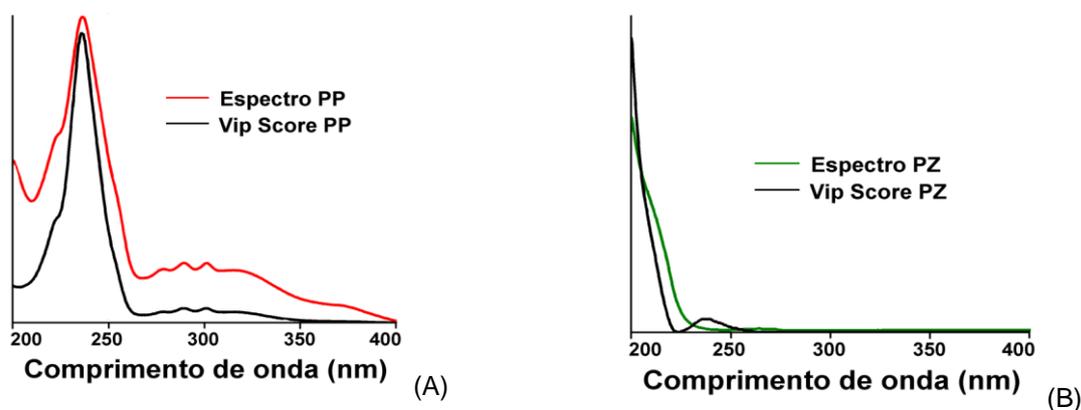


FIGURA 25 – Comparação dos espectros de absorção no UV do PP (A) e PZ (B) com os dados de *VipScores* no modelo PZ-PP por UV
 FONTE: O autor (2014)

Em resumo, os modelos foram feitos usando PLS-2 (que quantifica simultaneamente 2 ou mais fármacos) e os números de variáveis latentes foram escolhidos, principalmente, de acordo com o menor valor de RMSECV. A validação cruzada foi feita utilizando o método *leave-one-out*. Após todos os critérios terem sido avaliados e aprovados, alguns parâmetros ficaram definidos e o resumo dos modelos com o número de variáveis latentes, faixa, variância explicada nos blocos X e Y, erros de predição, o tipo de pre-processamento, o R², RMSEC, RMSECV e RMSEP está descrito nas Tabelas 03 e 04.

TABELA 03 - Resumo dos parâmetros analisados para o melhor modelo desenvolvido para UV das associações FB/PP e PZ/PP

Faixa (nm)	Associação	VL	Pré-processamento	R ²		RMSEC ^a		RMSECV ^a		RMSEP ^a	
				PP	PZ	PP	PZ	PP	PZ	PP	PZ
200-400	PZ / PP	2	(Bloco X) Centrado na média	0,999	0,990	0,050	0,069	0,055	0,074	0,07	0,08
			(Bloco Y) Centrado na média								
				PP	FB	PP	FB	PP	FB	PP	FB
280-320 380-400	FB / PP	2	(Bloco X) Centrado na média	0,999	0,999	0,060	0,044	0,055	0,050	0,06	0,06
			(Bloco Y) Centrado na média								

^a unidade em µg.mL⁻¹

FONTE: O autor (2014)

TABELA 04 - Variância explicada e erro de predição para o melhor modelo desenvolvido para UV das associações FB/PP e PZ/PP

Associação	Variância explicada (%)		Erro relativo do modelo (%)	
	Bloco X	Bloco Y	PZ	PP
PZ / PP	99,97	99,86	1,41	0,52
			FB	PP
FB / PP	99,96	99,94	0,57	0,82

FONTE: O autor (2014)

Para a associação PZ-PP o melhor modelo utilizou toda a faixa espectral (200-400 nm), 2 variáveis latentes e dados centrados na média. Para a associação FB-PP o melhor modelo foi escolhido através de seleção de variáveis (280-320 e 380-400 nm), 2 variáveis latentes e dados centrados na média. Para os dois modelos o coeficiente de determinação foi superior a 0,99, os valores obtidos para RMSEC, RMSECV e RMSEP foram baixos e satisfatórios, a variância explicada para os blocos X e Y foi superior a 99% e o erro médio de predição inferior a 1,5%. Estes resultados sugerem fortemente que os modelos desenvolvidos no UV são adequados.

5.4. AVALIAÇÃO DOS MODELOS MULTIVARIADOS NO IV

Nos modelos multivariados por espectroscopia no IV seguiu-se uma estratégia de tratamento de dados similar à usada nos modelos multivariados obtidos por espectroscopia no UV, com algumas peculiaridades inerentes à maior dificuldade dessa técnica. Dentre elas, pode-se citar o fato de que a falta de informação da composição de excipientes não é um fator que afeta significativamente os modelos no UV, uma vez que escolhendo um bom solvente – que dissolva os fármacos e não os excipientes – o processo de filtração consegue reter os componentes insolúveis, que poderiam interferir na análise dos fármacos. De acordo com a literatura, foram selecionadas cinco misturas de excipientes (Tabela 02). A mistura que seria mais adequada em função das características dos fármacos foi a mistura Padrão, que tinha em sua composição: laurilssulfato de sódio (1,5%), amido (57,5%), celulose microcristalina (30,0%), aerosil (1,0%), talco (10,0%) e BHT (0,05%).

Para se escolher um bom modelo no IV deve-se utilizar alguns parâmetros como o RMSEP e RMSECV ou focar a seleção em função das características inerentes a cada analito como bandas de absorção específicas e diferentes uns dos outros. No início desse milênio foi desenvolvida uma técnica que colabora significativamente nesse tipo de estudo, o método dos mínimos quadrados parciais por intervalo (*i*PLS) (NORGAARD *et al.*, 2000), e uma variante própria, o *si*PLS, que seleciona não um, mas dois ou mais intervalos de modo sinérgico. Neste caso, todas essas possibilidades foram usadas em conjunto para desenvolver cada um dos três modelos no IV, uma vez que o fato de não se saber a composição qualitativa e quantitativa da mistura dos excipientes dificultou a análise.

Como nos modelos no UV, o primeiro passo foi executar o planejamento experimental para as amostras das associações FB-PP, PP-PZ e FB-PP-PZ. Os dados de calibração e validação podem ser vistos graficamente nas Figuras 26-A, 26-B e 27, respectivamente. Nota-se que, conforme planejado e esperado, as amostras de calibração são as mais externas (linhas vermelhas) e as de validação (linhas pretas) são as mais internas nos três casos. Assim, nenhuma amostra de validação está nas extremidades, fato que evita um erro de quantificação por uma possível extrapolação.

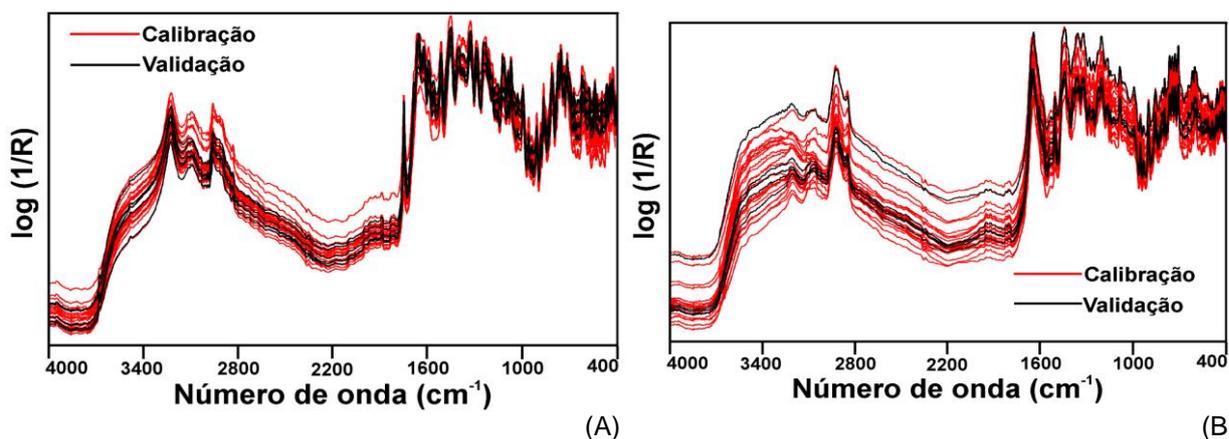


FIGURA 26 – Espectros de absorção no IV das misturas de FB-PP (A) e PP-PZ (B) do conjunto de calibração (—) e validação (—)
 FONTE: O autor (2014)

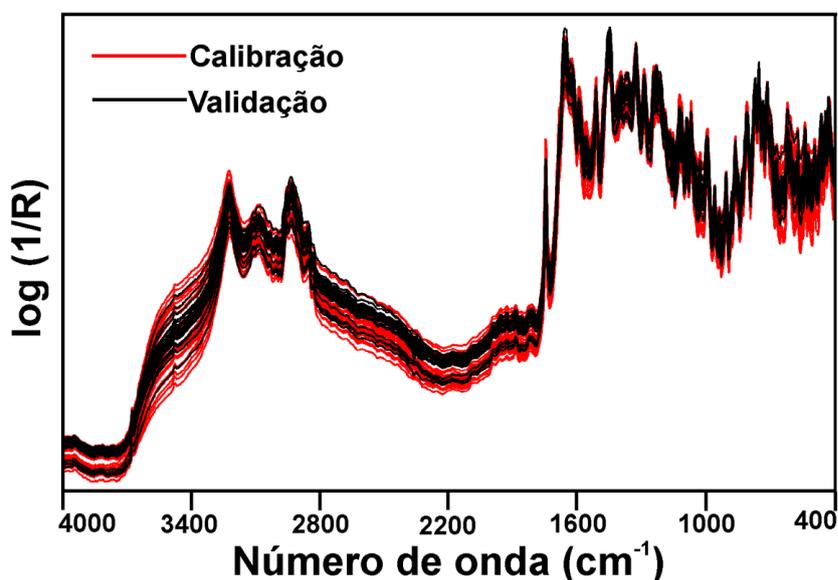


FIGURA 27 – Espectros de absorção no IV das misturas de PZ, FB e PP do conjunto de calibração (—) e validação (—)
 FONTE: O autor (2014)

Os modelos foram construídos usando PLS-2 (que quantifica simultaneamente 2 ou mais fármacos) e foram escolhidos de acordo com o valor do menor valor de RMSECV, tendo em vista também o número de variáveis latentes e ausência de *outliers*. Para otimizar cada modelo os parâmetros foram definidos com o número de intervalos automático, número de variáveis latentes máximo igual a 5, modo *forward* e o tamanho do intervalo subdividindo a região espectral a cada 400, 380, 200, 180, 100, 90, 50 ou 45 cm^{-1} para cada um dos pré processamentos e combinações indicadas no IV. A validação cruzada foi feita utilizando o método *leave-one-out*. Cada conjunto foi composto pela união de intervalos, de acordo com

o tamanho escolhido. Nos melhores modelos foram selecionados 3 subconjuntos (modelo PP-PZ e FB-PP-PZ) e 1 subconjunto (FB-PP), com validação cruzada (*leave one out*) e 5 variáveis latentes.

Dos três modelos no IV, somente foi possível atender as recomendações da ASTM (2012) sobre o número mínimo de amostras de calibração ($6 \times (\text{número de VL} + 1)$) e validação ($4 \times (\text{número de VL})$) de modelos quantitativos multivariados por infravermelho, para o modelo FB-PP-PZ. Para esta associação o melhor modelo foi obtido com o espectro dividido em 12 intervalos e combinados em 5 subintervalos. Estes (em cinza claro na Figura 28) correspondem a três regiões espectrais, entre $3715\text{-}3150\text{ cm}^{-1}$, $2865\text{-}2583\text{ cm}^{-1}$ e $2298\text{-}1733\text{ cm}^{-1}$, que incluem absorções específicas de cada analito, como uma banda larga e pouca intensa (~ 2130 e 1790 cm^{-1}) centrada em 1923 cm^{-1} do PP; pequenos picos de estiramento de C-H na região de $3300\text{-}3220\text{ cm}^{-1}$, relacionados a estiramentos de C-H aromático, e um pico em 2848 cm^{-1} , relacionado à vibração de estiramento de ligação -C-H de amina terciária do PZ; e uma banda intensa centrada em 3209 cm^{-1} , característica de carbamatos, e um estiramento de carbonila em 1760 cm^{-1} de FB (mas não de vibrações de carbonila dos outros analitos). Deve-se notar que toda a região espectral com números de onda abaixo de 1700 cm^{-1} levou a uma diminuição na capacidade de previsão do modelo.

Para exemplificar como o método *sPLS* é interpretado, na Figura 28 a linha contínua representa o espectro médio das amostras de calibração, a linha pontilhada o erro médio para 5 variáveis latentes utilizando o espectro completo (modelo global), as barras são os intervalos criados pelo melhor modelo *tPLS* (a altura é o valor de RMSECV para aquele intervalo e o número na base é o número de VL que foram utilizadas), sendo as barras escuras aquelas que não foram selecionadas e as barras claras as que foram selecionadas, em função do RMSECV. Como mais de um intervalo foi selecionado, pode-se também considerar que a técnica de seleção de variáveis utiliza o *sPLS*, que de forma idêntica ao *tPLS*, seleciona a melhor região do espectro, nesse caso as regiões foram combinadas de forma sinérgica. O número de intervalos (nesse caso foram 5) foi selecionado automaticamente pelo método.

O segundo passo foi a escolha do número de variáveis latentes adequado para cada modelo. Para isto foi analisado o gráfico de RMSECV x VL (Figura 29-A para FB-PP, 29-B para PP-PZ e 29-C para FB-PP-PZ) e pode-se notar que em todos os modelos o número de variáveis latentes foi igual a 5. Um aumento para seis VL não se justifica em nenhum dos casos uma vez que o valor do erro não diminui significativamente em nenhum fármaco e uma diminuição para quatro VL não é suficiente para manter nenhum dos modelos com boa capacidade preditiva.

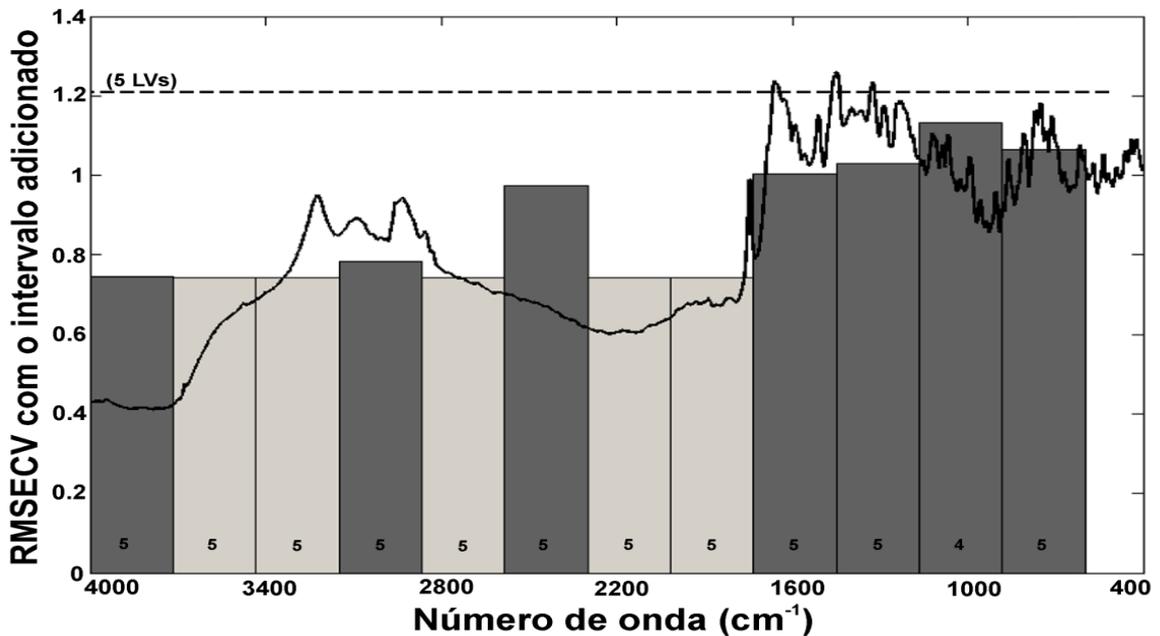


FIGURA 28 - Resultado do *s*PLS2. a média espectral das 36 amostras de calibração e a média dos valores de RMSECV ($\text{mg} \cdot 0,1\text{g}^{-1}$) para cada intervalo. Os números na porção inferior de cada barra indicam o número de VL para cada intervalo e a linha pontilhada indica o valor de RMSECV para o modelo com o espectro completo. As regiões selecionadas estão em cinza claro.
 FONTE: O autor (2014)

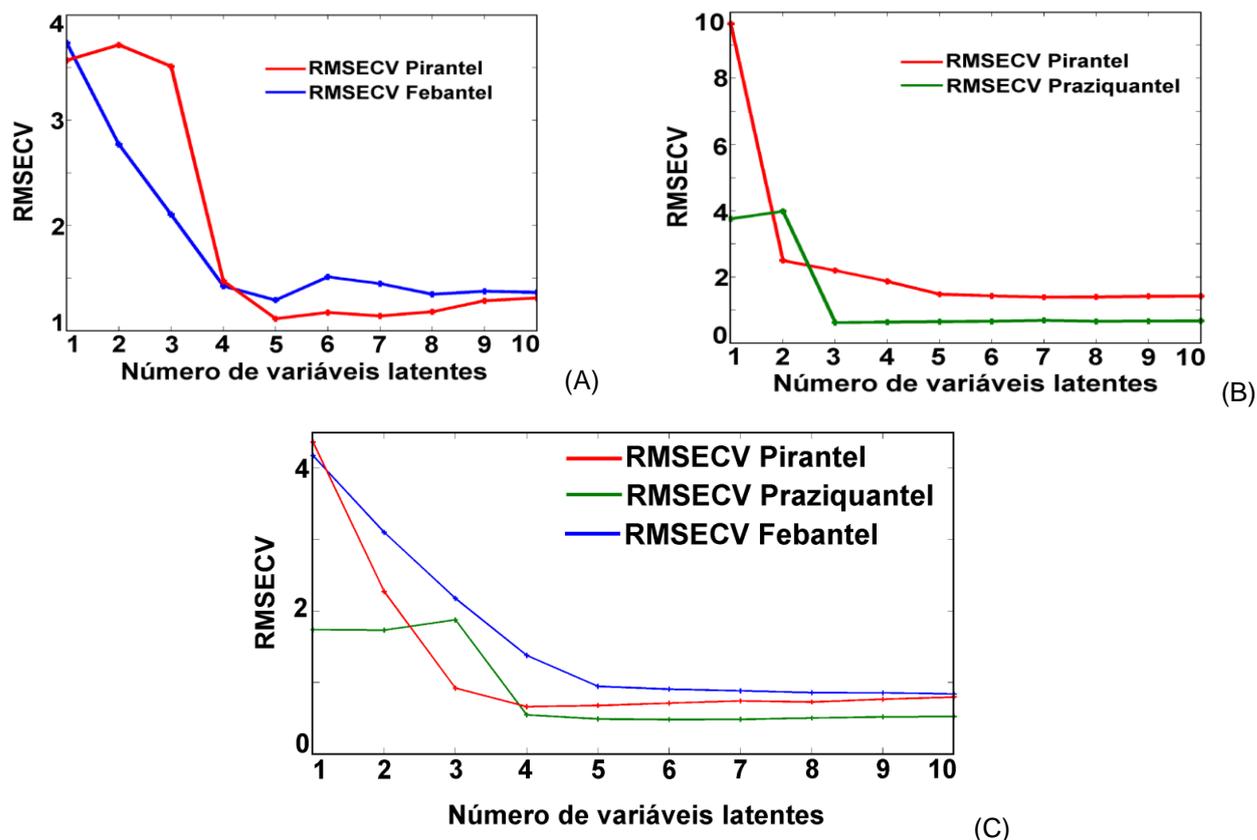


FIGURA 29 – Escolha do número de variáveis latentes para o modelo FB-PP (A), PP-PZ (B) e FB-PP-PZ (C) por IV
 FONTE: O autor (2014)

Na análise dos *outliers*, considerando o critério para resíduos de Student e *Leverage*, nos modelos das associações FB-PP e PP-PZ (Figura 30-A e 30-B, respectivamente) não foram identificadas amostras anômalas, uma vez que nenhuma amostra apresentou simultaneamente alto valor de *leverage* e resíduos de Student. Para a associação FB-PP-PZ (Figura 30-C), apenas uma amostra teve valor de *Leverage* maior que o limite para os três fármacos, mas o valor dos resíduos de Student não superaram 2,5% e, por isso, ela não foi descartada.

Para o critério de resíduos Q x Hotelling T^2 , nos modelos das associações FB-PP, PP-PZ e FB-PP-PZ (Figura 31-A, 31-B e 31-C, respectivamente), algumas amostras foram identificadas com alto valor de resíduos Q ou Hotelling T^2 , mas não simultaneamente. Todas as amostras que apresentaram valor superior ao limite de *leverage*, resíduos de Student, resíduos Q ou Hotelling T^2 foram retiradas dos seus modelos e como não houve perda ou ganho significativo da capacidade preditiva elas não foram classificadas como *outliers* e, por isso, não foram excluídas dos modelos.

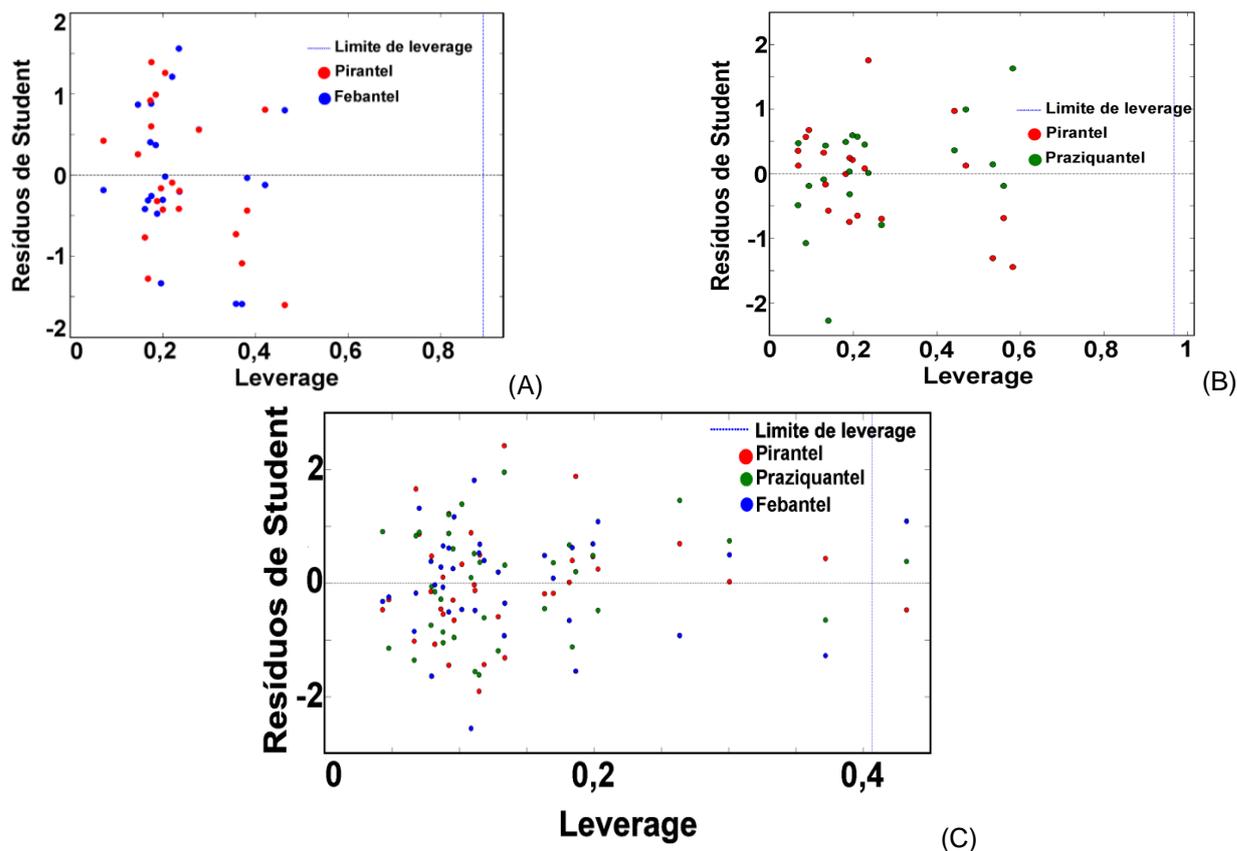


FIGURA 30 – Avaliação de *outliers* no modelo FB-PP (A), PP-PZ (B) e FB-PP-PZ (C) no IV através dos resíduos de student x *leverage*
 FONTE: O autor (2014)

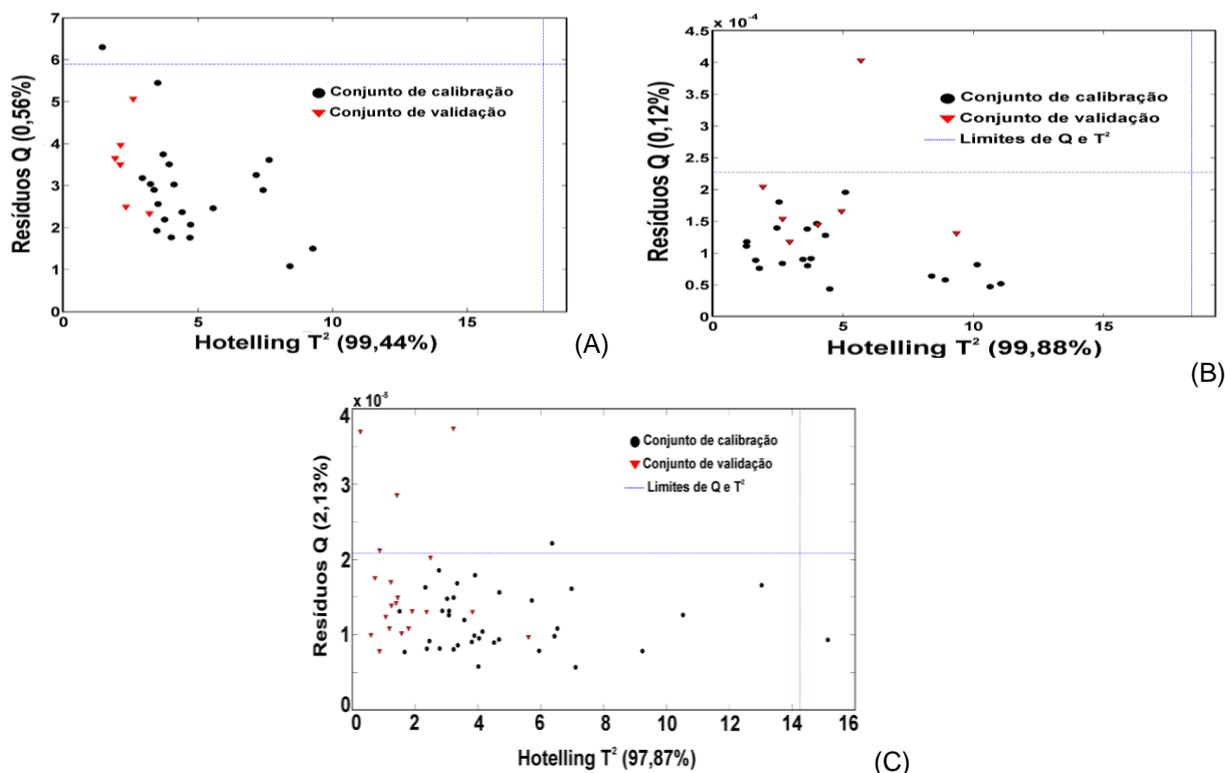


FIGURA 31 – Avaliação de *outliers* no modelo FB-PP (A), PP-PZ (B) e FB-PP-PZ (C) no IV através dos resíduos Q X Hotelling T^2
 FONTE: O autor (2014)

A análise dos pesos atribuídos às bandas espectroscópicas foi feita pela comparação dos dados de VipScore com os valores dos espectros originais para os modelos FB-PP (Figura 32-A para o Febantel e 32-B para o Pirantel) PP-PZ (Figura 32-C para o Pirantel e 32-D para o Praziquantel) e FB-PP-PZ (Figura 33-A para o Pirantel, 33-B para o Febantel e 33-C para o Praziquantel)

Na associação FB-PP, apesar de haver uma coincidência em algumas bandas, não foi possível estabelecer quais as regiões espectrais foram as maiores responsáveis pelo peso associado ao modelo.

Para a associação PP-PZ foi possível notar que uma das principais bandas que foram importantes na elaboração do modelo para o Praziquantel foi a próxima de 2848 cm^{-1} , identificada como característica do analito, que é de estiramento ligado a amins terciárias em anel lactâmico. No caso do Pirantel, um dos picos identificados como importante está próximo de 2969 cm^{-1} , relacionado à vibração de estiramento de O-H fenólico.

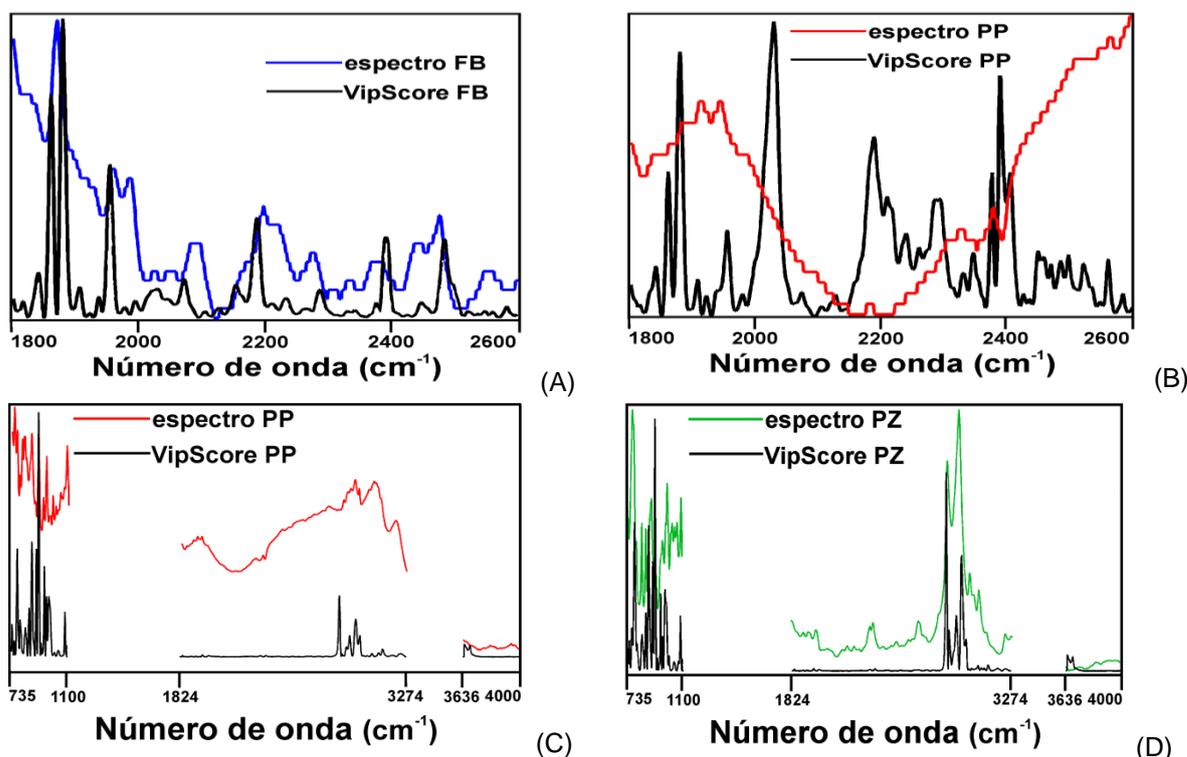


FIGURA 32 – Comparação dos espectros de absorção no IV com os dados de vipscores no modelo FB-PP (A e B), PP-PZ (C e D) por IV
FONTE: O autor (2014)

Para a associação FB-PP-PZ o nível de interferência espectral foi muito maior e, por isso, mais complexo na tentativa de associar as faixas selecionadas com algumas absorções específicas de cada analito e coincidentes com o alto peso dado pelo modelo. Para o FB (Figura 33-B) pode-se associar um estiramento de carbonila próximo a 1760 cm^{-1} de FB (mas não de vibrações das carbonilas dos outros analitos); uma banda larga com pico em 3209 cm^{-1} correspondente a estiramentos N-H de carbamato; pico próximo a 2825 cm^{-1} de estiramento C-H de grupos O-CH_3 ; Para o PZ (Figura 33-C) pode ser observada uma pequena banda com dois picos próximos a 3291 e 3234 cm^{-1} relacionado a estiramento $=\text{C-H}$ aromático e um pico próximo a 2848 cm^{-1} relativo ao estiramento ligado a aminas terciárias em anel lactâmico.

O resumo dos modelos com o número de variáveis latentes, faixa, variância explicada no bloco X e Y, erro de predição médio, o tipo de pre-processamento, o R^2 , RMSEC, RMSECV e RMSEP é mostrado nas Tabelas 05 e 06.

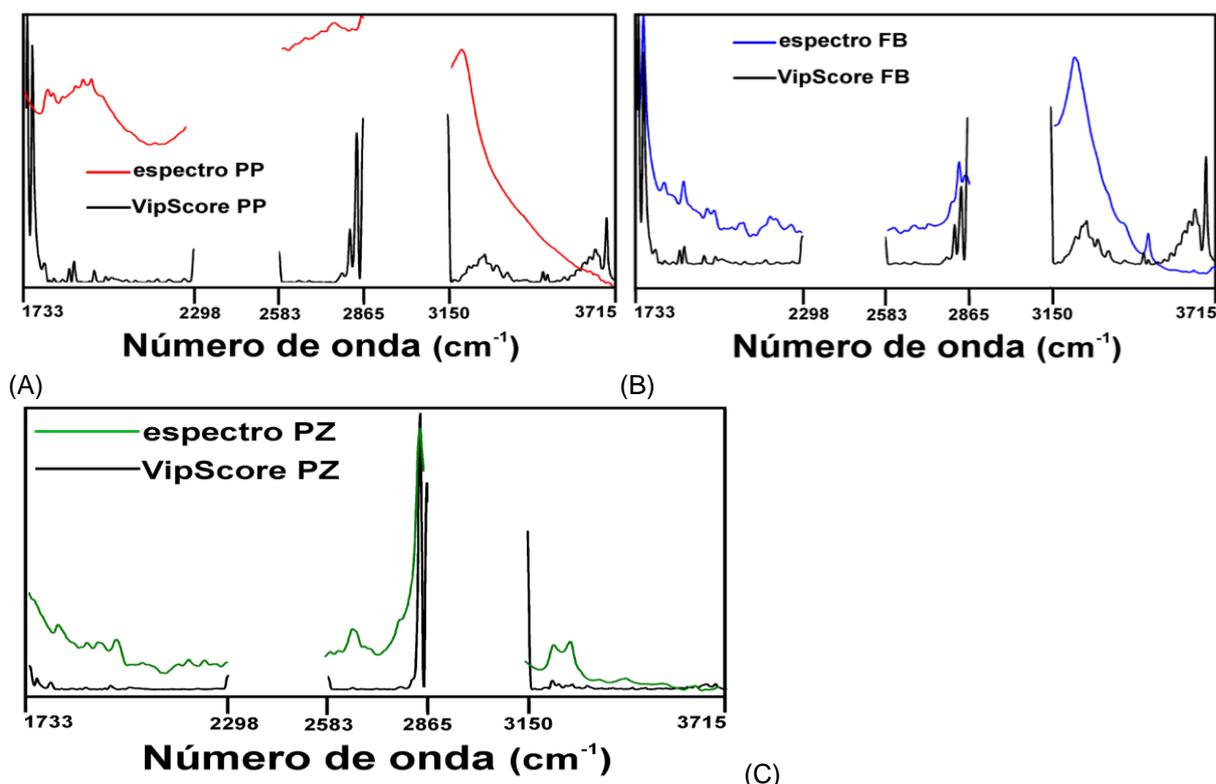


FIGURA 33 – Comparação dos espectros de absorção no IV com os dados de vipcores no modelo FB-PZ-PP (PIRANTEL – A; FEBANTEL – B; PRAZICQUANTEL - C) por IV
 FONTE: O autor (2014)

TABELA 05 - Variância explicada e erro de predição para o melhor modelo desenvolvido para IV das associações FB/PP, PZ/PP e FB/PP/PZ

Associação	Variáveis Latentes	Faixa (cm ⁻¹)	Variância explicada (%)		Erro de predição (%)			Pré-processamento
			Bloco X	Bloco Y	PZ	PP	FB	
PZ / PP	5	3998-3636 3274-1824 1100-735	99,89	99,94	1,42	1,01		(Bloco X) 1 ^a derivada + MSC (Bloco Y) sem pré-processamento
FB / PP	5	2548-1823	99,44	95,61	1,42	1,39		(Bloco X) 1 ^a derivada + SNV (Bloco Y) CM
FB / PP / PZ	5	3715-3150 2865-2583 2298-1733	97,87	97,99	1,89	1,80	1,79	(Bloco X) 1 ^a derivada + CM (Bloco Y) CM

FONTE: O autor (2014)

TABELA 06 - Resumo dos parâmetros analisados para o melhor modelo desenvolvido para IV das associações FB/PP, PZ/PP e FB/PP/PZ

Associação	R ²			RMSEC ^a			RMSECV			RMSEP ^a		
	PP	PZ	FB	PP	PZ	FB	PP	PZ	FB	PP	PZ	FB
PZ / PP	0,995	0,978	-	0,649	0,534	-	1,312	0,817	-	0,348	0,174	-
FB / PP	0,964	-	0,949	0,633	-	0,814	1,113	-	1,289	0,492	-	0,447
FB / PP / PZ	0,979	0,944	0,986	0,630	0,380	0,560	0,960	0,540	0,720	0,670	0,340	0,690

^a unidade em mg.g⁻¹

FONTE: O autor (2014)

Para as três associações os melhores modelos foram escolhidos por seleção de variáveis. Para a associação PZ-PP utilizou-se três faixas espectrais (3998-3636, 3274-1824 e 1100-735 cm⁻¹), 5 variáveis latentes e dados processados por primeira derivada (com alisamento Savitzky-Golay) mais MSC. Para a associação FB-PP, apenas uma faixa espectral (2548-1823 cm⁻¹), 5 variáveis latentes e dados processados por primeira derivada (com alisamento Savitzky-Golay) mais SNV. Para a associação FB-PP-PZ, também foram usadas três faixas espectrais (3715-3150, 2865-2583 e 2298-1733 cm⁻¹), 5 variáveis latentes e dados processados por primeira derivada e centrados na média. O coeficiente de determinação em todos os fármacos nos três modelos foi superior a 0,9, os valores obtidos para RMSEC, RMSECV e RMSEP foram baixos (inferiores a 1,3 µg/mL) e satisfatórios, a variância explicada para os blocos X e Y foi superior a 95% e os erros médios de predição inferiores a 1,89%. Estes dados sugerem fortemente que os modelos desenvolvidos no IV são adequados para quantificação dos três analitos em suas respectivas associações.

5.5 VALIDAÇÃO DOS MODELOS MULTIVARIADOS

Uma vez desenvolvidos os modelos de calibração multivariada no UV e no IV, a validação analítica é essencial para o controle de qualidade das formulações.

A determinação de figuras de mérito (FOM) é um requisito importante para a validação destes tipos de métodos multivariados, visando sua possível aceitação pelos órgãos reguladores no futuro (CANTARELLI *et al.*, 2011). Ao expressar as figuras de mérito (FOM) para métodos de calibração multivariada, a parte do sinal que se relaciona exclusivamente com o analito de interesse é mais importante do que o sinal total (SENA *et al.*, 2004). Este sinal é denominado sinal analítico líquido (NAS) e é definido como a parte do sinal que é ortogonal em relação ao sinal das interferências presentes na amostra (LORBER; FABER; KOWALSKI, 1997). O NAS permite a estimativa das figuras de mérito em modelos de calibração multivariada, tais como sensibilidade (SEN), seletividade (SEL), sensibilidade analítica (γ), limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e, assim, a comparação entre métodos analíticos.

O resumo das figuras de mérito multivariadas estimadas para os modelos no UV (Tabela 07) e no IV (Tabela 08) estão descritas abaixo:

A interpretação do conceito de seletividade para métodos multivariados é diferente em relação aos métodos univariados e não tem interesse prático para fins de controle de qualidade. A definição é apenas útil dentro de um determinado grupo de amostras de composição qualitativa semelhante, e sua estimativa indica aproximadamente quanto do sinal analítico foi utilizado para estimar a concentração de cada um dos analitos. Nota-se que a seletividade dos métodos no UV foi sempre maior do que a dos métodos no IV.

Como o valor puro da sensibilidade não é apropriado para a comparação com outros métodos, os seus valores foram divididos pela estimativa do ruído instrumental e a sensibilidade analítica foi estimada. O inverso da sensibilidade analítica indica a mínima diferença de concentração que o método é capaz de discriminar considerando o ruído instrumental aleatório como única fonte de erros. Em todos os casos, os valores que o método teoricamente foi capaz de discriminar foram menores que a capacidade mínima de diferenciação dos instrumentos disponíveis, como no caso do UV, no qual não é possível discriminar valores da ordem de ng.mL^{-1} que foram estimados, usando, por exemplo, pipetas automáticas.

Apesar de não ser necessário para este tipo de método, o LOD e o LOQ também foram estimados. Percebe-se que em todos os modelos os valores foram muito baixos, mais até que a própria técnica seria capaz de atingir em condições normais de trabalho e mesmo usando instrumentos de alta precisão como micropipetas automáticas no caso do UV ou balanças de alta precisão para o caso do IV.

O valor de *bias* foi estimado para as amostras de validação e a avaliação foi feita através de um test-t. Considerando o valor do *bias* e o seu desvio associado, o intervalo estimado sempre conteve o zero e, assim, demonstrou-se ausência de erros sistemáticos nos modelos.

Para os métodos no UV praticamente todos os valores de RPD foram superiores a 8, já no IV praticamente todos foram superiores a 3. Esses resultados são relativamente bons, uma vez que o cálculo depende do desvio padrão dos valores estipulados pelo planejamento experimental e como nem todos os modelos foram feitos com o mesmo tipo de planejamento fica mais complexa a comparação direta entre eles.

O ruído em todos os modelos também apresentou valores baixos e considerados insignificantes, não comprometendo os resultados obtidos.

Os métodos também foram validados de acordo com o as normas nacionais e internacionais para determinação de princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matéria-prima. Os parâmetros analisados foram linearidade, precisão, exatidão e robustez.

TABELA 07 - Figuras de mérito multivariadas para os métodos por UV das associações PP-PZ e FB-PP

Associação		Figuras de mérito									
		Seletividade (%)	Sensibilidade Abs/($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Sensibilidade analítica (SA) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1/SA ($\mu\text{g.mL}$)	LD	LQ	Bias	RPD		Ruído (Abs)
						($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			Calibração	Validação	
FB/PP	FB	33,0	1,2	216,28	5.10^{-3}	0,015	0,046	0,02	49,8	27,9	$5,6 \times 10^{-3}$
	PP	39,0	1,6	282,63	4.10^{-3}	0,012	0,035	-0,05	34,8	22,0	
PP/PZ	PZ	24,3	2,3	417,0	2.4×10^{-3}	7.9×10^{-3}	2.4×10^{-2}	0,002	9,6	6,9	$6,0 \times 10^{-2}$
	PP	83,0	16,1	2876,0	3.5×10^{-4}	1.1×10^{-3}	3.5×10^{-3}	0,003	39,6	20,9	

FONTE: O autor (2014)

TABELA 08 - Figuras de mérito multivariadas para os métodos por IV das associações PP-PZ e FB-PP

Associação		Figuras de mérito									
		Seletividade (%)	Sensibilidade Abs/(mg/0,1g)	Sensibilidade analítica (SA) (mg/0,1g) ⁻¹	1/SA (mg/0,1g)	LD	LQ	Bias	RPD		Ruído (Abs)
						(mg/0,1g)			Calibração	Validação	
FB/PP	FB	5,9	7,8	2017,3	$5,0 \times 10^{-4}$	0,02	0,06	0,41	3,1	5,3	$3,9 \times 10^{-3}$
	PP	4,4	6,0	1556,0	$6,4 \times 10^{-4}$	0,02	0,06	-0,18	2,9	4,7	
PP/PZ	PZ	16,8	0,24	89,3	$1,6 \times 10^{-4}$	0,05	0,16	-0,19	4,5	12,0	$4,0 \times 10^{-3}$
	PP	23,6	0,33	63,3	$1,1 \times 10^{-2}$	0,04	0,11	-0,08	7,4	15,8	
FB / PP/ PZ	FB	30,1	0,05	68,2	$2,0 \times 10^{-2}$	0,05	0,15	-0,05	6,4	3,2	$6,6 \times 10^{-4}$
	PP	20,8	0,03	41,1	$2,0 \times 10^{-2}$	0,08	0,24	-0,19	4,9	3,2	
	PZ	20,1	0,03	40,2	$3,0 \times 10^{-2}$	0,08	0,25	0,08	3,4	3,1	

FONTE: O autor (2014)

5.5.1 Linearidade

A avaliação deste parâmetro em calibração multivariada utilizando PLS é problemática, uma vez que as variáveis são decompostas pelas variáveis latentes. Assim, uma medida quantitativa para a linearidade não corresponde a uma tarefa simples (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). Não existem curvas de calibração (sinal analítico x concentração) para modelos multivariados.

A linearidade do método foi avaliada através do gráfico de valores de referência *versus* valores preditos das amostras de calibração de cada modelo (Figura 34 para UV e 35 para IV). Os coeficientes de correlação, determinação, intercepto e inclinação estão descritos nas Tabelas 09 e 10. Tendo em vista a complexidade das matrizes e do fato de a técnica ser capaz de quantificar os fármacos simultaneamente, os valores dos coeficientes de correlação foram considerados satisfatórios por todos serem superiores ao mínimo exigido pela norma do INMETRO, que é de 0,9, porém nem todos atenderem o valor mínimo exigido pela norma da ANVISA, que é de 0,99.

Outra forma de avaliar a linearidade é através da verificação do comportamento aleatório da distribuição dos erros para cada um dos analitos (Figura 34 para UV e 35 para IV). Como os valores dos coeficientes de correlação foram altos e o comportamento dos resíduos foi aleatório, pode-se concluir que há uma boa linearidade nas faixas estudadas. Considerando esses resultados, o intervalo de trabalho de cada um dos métodos pode ser encontrado nas Tabelas 09 e 10.

Para testar se a característica estudada de cada amostra é oriunda de uma população com distribuição normal foi aplicado o teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov ao conjunto de dados da linearidade nas faixas de concentração estudadas. O teste é baseado na maior diferença absoluta entre a frequência acumulada observada e a estimada pela distribuição normal. As hipóteses do Teste são:

- Hipótese Nula (H_0): A variável segue distribuição Normal.
- Hipótese Alternativa (H_1): A variável não segue distribuição Normal

Para a distribuição ser considerada Normal, o valor de p (Asymp. Sig. 2-tailed) deve ser maior que 0,05, ou seja, não se rejeita a hipótese nula.

Os valores de “p” foram calculados para os modelos FB-PP e PP-PZ no UV e no IV, e foram superiores a 0,05. Isto significa que não houve evidência suficiente para rejeitar a hipótese nula e conclui-se que os valores nessas populações seguem a distribuição Normal. Para seguir essa distribuição, parte-se da premissa que a distribuição dos erros amostrais é normal e independente com variâncias homogêneas. A consequência disto é que se pode utilizar testes paramétricos, que em geral são mais poderosos que a estatística não paramétrica, para averiguar, por exemplo, a igualdade entre amostras.

As razões das médias quadráticas da regressão pelas médias quadráticas dos resíduos (F_{calc}) foram sempre muito maiores que os valores de F_{tab} dos modelos (Tabelas 09 e 10), tanto no UV quanto no IV. Por isso rejeita-se a hipótese nula e aceita-se o modelo linear como adequado e que não há falta de ajuste nos modelos multivariados.

TABELA 09 - Avaliação da linearidade nos métodos por UV

Parâmetro	FB-PP		PZ-PP	
	FB	PP	PZ	PP
Faixa	6,0 - 12,0 ^a	5,76 - 11,52 ^a	2,98 - 4,96 ^a	9,11 - 15,18 ^a
Inclinação	0,9996	0,9992	0,9904	0,9994
Intercepto	0,0034	0,0067	0,0383	0,0067
r	0,9998	0,9996	0,9952	0,9997
R ²	0,9996	0,9992	0,9904	0,9994
Asymp. Sig. 2-tailed (p)	0,146	0,255	0,770	0,513
$F_{\text{tab}1,36}$	4,17			
F_{calc}	22.204,1	19.329,2	649,5	11.394,0

^a $\mu\text{g.mL}^{-1}$

FONTE: O autor (2014)

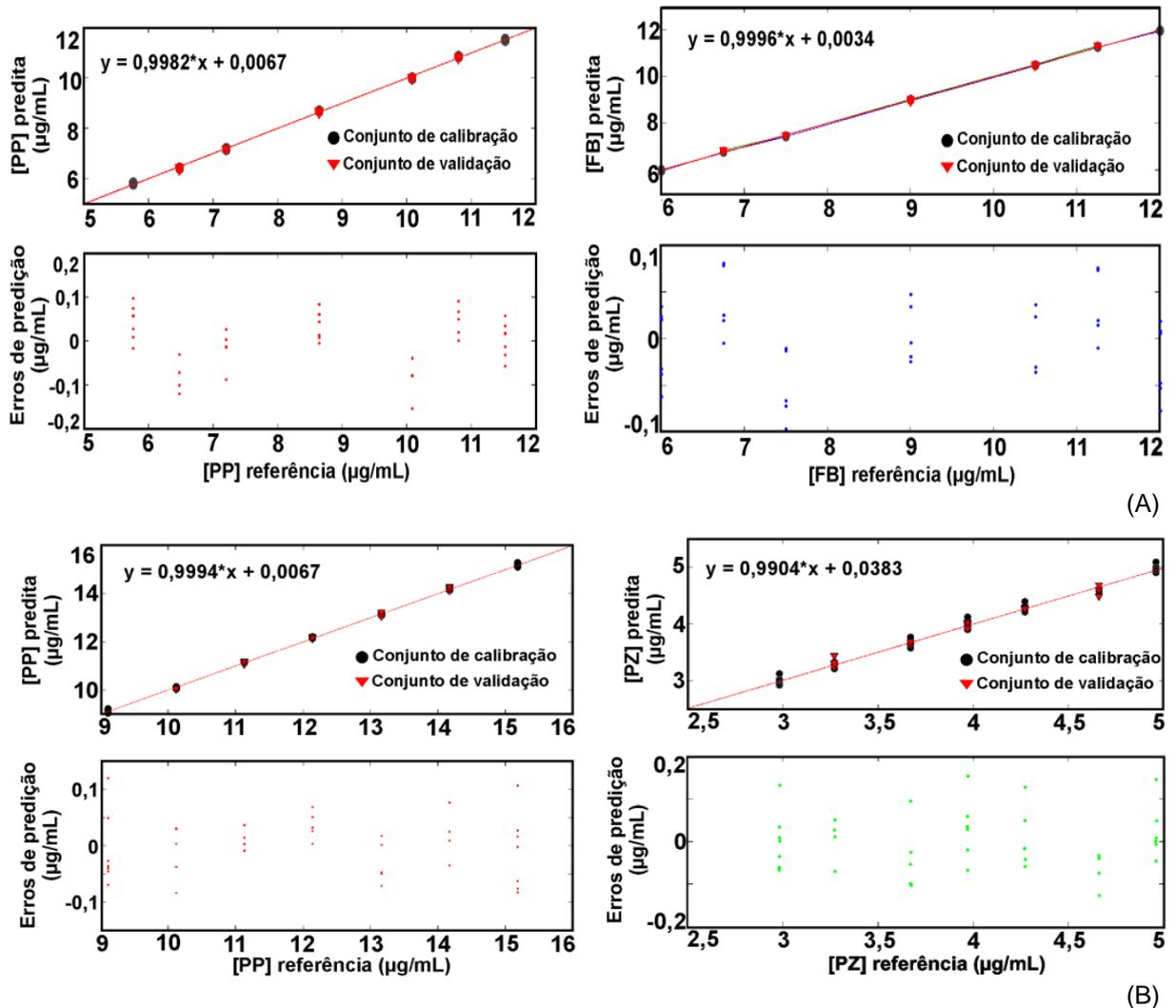


FIGURA 34 – Avaliação da linearidade pela relação entre valores de referência vs. valores preditos e distribuição dos resíduos no modelo FB-PP (A) E PP-PZ (B) no UV
 FONTE: O autor (2014)

TABELA 10 - Avaliação da linearidade nos métodos por IV

Parâmetro	FB-PP		PZ-PP		FB-PP-PZ		
	FB	PP	PZ	PP	FB	PP	PZ
Faixa	24,0 – 36,0 ^a	23,0–34,6 ^a	5,64 – 17,0 ^a	14,6 – 45,0 ^a	24,0 – 36,0 ^a	23,0 – 34,6 ^a	8,0 – 12,0 ^a
Inclinação	0,9487	0,9645	0,9778	0,9953	0,9753	0,9789	0,9475
Intercepto	1,531	1,031	0,2556	0,1392	0,7606	0,6737	0,4933
r	0,9743	0,9819	0,9888	0,9976	0,9928	0,9892	0,9718
R ²	0,9492	0,9641	0,9778	0,9953	0,9857	0,9785	0,9444
'p'	0,967	0,931	0,891	0,798	0,789	0,892	0,802
F _{tab}	F _{1,19} = 4,38		F _{1,20} = 4,35		F _{1,34} = 4,17		
F _{calc}	81,6	35,0	115,1	93,2	147,8	69,0	22,2

^a mg.0,1g⁻¹

FONTE: O autor (2014)

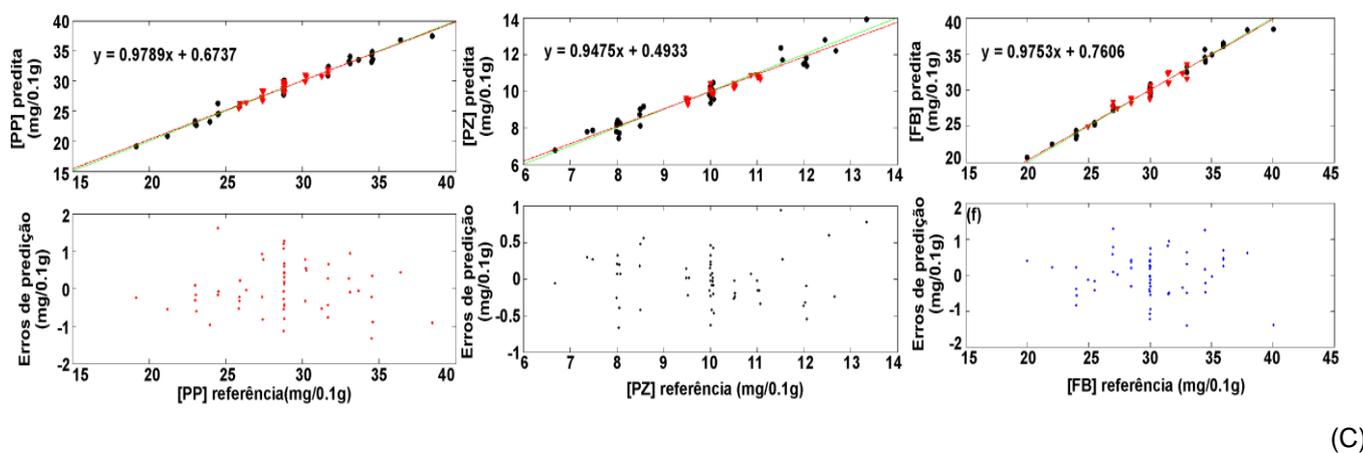
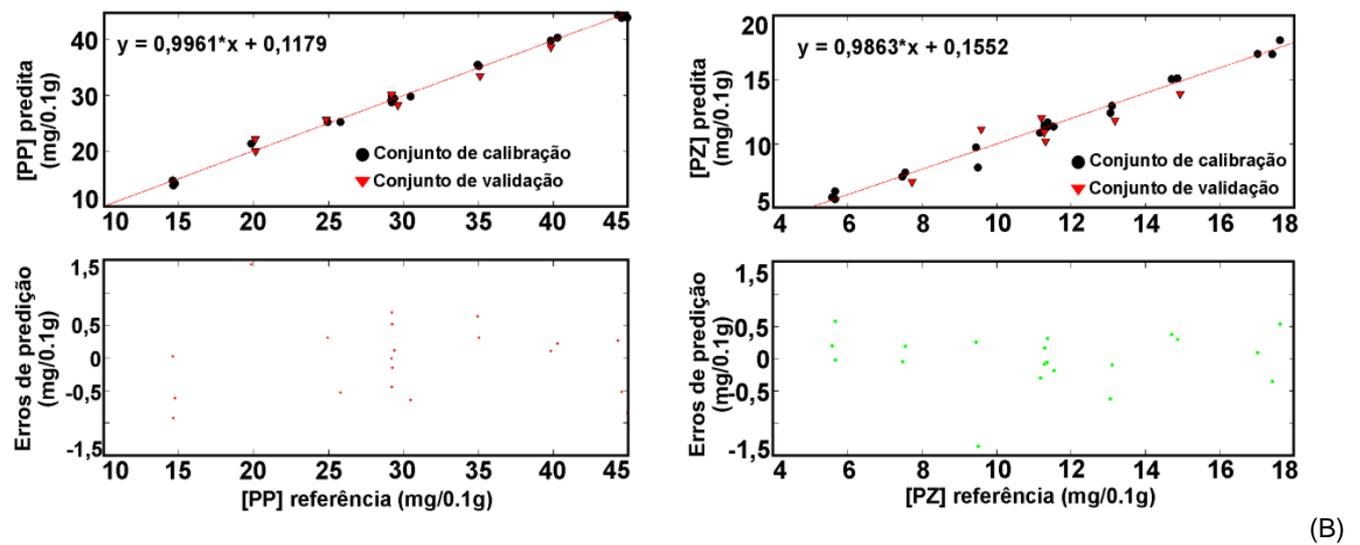
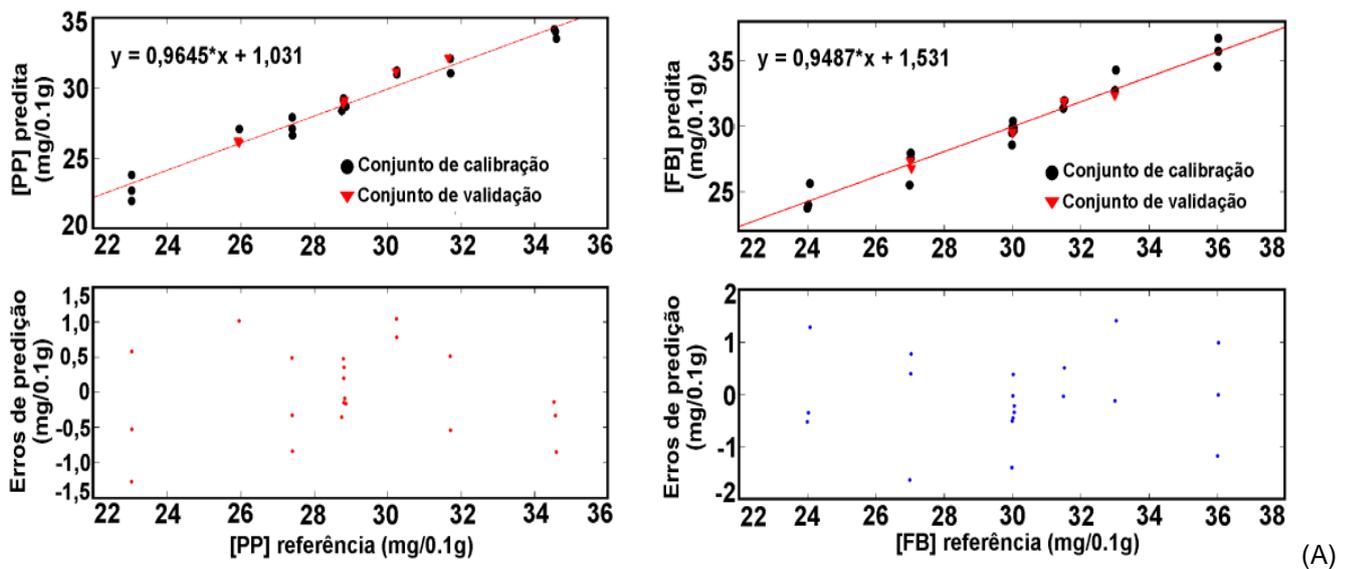


FIGURA 35 – Avaliação da linearidade pela relação entre valores de referência vs. valores preditos e distribuição dos resíduos no modelo FB-PP (A), PP-PZ (B) e FB-PP-PZ (C) no IV
 FONTE: O autor (2014)

5.5.2 Precisão

A precisão é a avaliação da dispersão dos resultados entre ensaios independentes e foi avaliada em dois níveis: repetitividade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias). A reprodutibilidade não foi avaliada nesse estudo em virtude da impossibilidade de se realizar os mesmos ensaios sob condições ideais de trabalho em outra unidade analítica fora de Curitiba.

5.5.2.1 Repetitividade e precisão intermediária

Repetitividade é o grau de concordância entre os resultados obtidos de um mesmo analito por um único analista em um mesmo equipamento num curto espaço de tempo. A repetitividade foi avaliada através do DPR (desvio padrão relativo) e de um teste t para amostras independentes. Este ensaio visa representar se há concordância entre os resultados das leituras de modo sucessivo do método a ser validado.

Os resultados para a repetitividade encontram-se nas Tabelas 11 (PP-PZ por UV e IV), 12 (FB-PP por UV e IV) e 13 (FB-PP-PZ por IV), sendo que cada valor para cada concentração representa a média da triplicata de três a seis amostras. Em todas as concentrações testadas, o valor de DPR foi menor que o limite especificado pela norma vigente da ANVISA, que preconiza 5%. Isso satisfaz o critério para a repetitividade e indica que o método apresentou boa precisão intra-dia.

Outra forma de se avaliar esse parâmetro é pela utilização de dois testes, o de Levene e o teste t para amostras independentes. O valor de “Sig.” do Teste de Levene é verificado para identificar se as variâncias são constantes em toda a faixa analítica, ou seja, se há homocedasticidade. Se o valor for maior que 0,05 assume-se que as variâncias são constantes. Então anota-se o valor de “Sig(2-tailed)” e este valor servirá de comparação entre as amostras para serem consideradas como conjuntos de valores iguais ou diferentes através de um teste t. Desta forma, das 19 comparações entre valores considerados reais e preditos, em 16 delas o valor de ‘p’ gerado pelo teste t foi superior a 0,05. Isso significa que não se deve rejeitar a hipótese nula e os valores são estatisticamente iguais. Apesar de 3 conjuntos apresentarem valores menores de 0,05 para ‘p’, os resultados analiticamente são

muito semelhantes e acredita-se que esse fato se deu em função do grau de complexidade e dificuldade que é conseguir pesar e misturar ou diluir perfeitamente cada uma das amostras que ainda foi lida em triplicata. É possível que aumentando o número de amostras seria suficiente para que esses conjuntos fossem dados como iguais.

TABELA 11 - Resultados da precisão (repetitividade) para a associação PP-PZ por UV e IV

Repetitividade										
	Praziquantel					Pirantel				
	[Real]	[Predita] (média,n=3)	DPR	Sig,	Sig (2-tailed)	[Real] ^a	[Predita] (média,n=3)	DPR	Sig,	Sig (2-tailed)
UV ^a	3,97	4,00	0,67	0,071	0,065	10,12	10,15	0,78	0,116	0,551
	3,27	3,32	0,64	0,033	0,060	12,14	12,15	0,75	0,030	0,863
	3,97	4,00	0,36	0,033	0,157	14,17	14,25	0,41	0,116	0,082
IV ^b	9,43	9,38	1,21	0,105	0,467	29,11	29,48	0,12	0,082	0,000
	11,08	10,87	0,53	0,024	0,026	29,04	28,45	0,30	0,024	0,007
	13,05	13,03	0,33	0,053	0,879	29,22	29,22	0,54	0,050	0,972

DPR: DESVIO PADRÃO RELATIVO; ^a µg.mL⁻¹; ^b mg.0,1g⁻¹

FONTE: O autor (2014)

TABELA 12 - Resultados da precisão (repetitividade) para a associação FB-PP por UV e IV

Repetitividade										
	Febantel					Pirantel				
	[Real]	[Predita] (média,n=18)	DPR	Sig,	Sig(2-tailed)	[Real]	[Predita] (média,n=18)	DPR	Sig,	Sig(2-tailed)
UV ^a	9,00	8,97	1,38	0,001	0,560	8,64	8,59	1,45	0,002	0,419
IV ^b	30,06	30,08	1,18	0,309	0,933	28,85	28,88	1,11	0,006	0,785

DPR: DESVIO PADRÃO RELATIVO; ^aµg.mL⁻¹; ^bmg.0,1g⁻¹

FONTE: O autor (2014)

TABELA 13 - Resultados da precisão (repetitividade) para a associação FB-PP-PZ por IV

Repetitividade					
Fármaco	Parâmetros				
	[Real] ^a	[Predita] ^a (n=6x3)	DPR	Sig.	Sig.(2-tailed)
PP	28,80	29,23	1,819	0,004	0,106
FB	30,00	29,76	1,532	0,001	0,881
PZ	10,10	10,06	1,798	0,021	0,262

DPR: DESVIO PADRÃO RELATIVO; ^amg.0,1g⁻¹

FONTE: O autor (2014)

Na avaliação da precisão intermediária uma mesma amostra é analisada por analistas diferentes, em equipamentos e em dias diferentes. Para a avaliação da precisão intermediária foram realizadas análises em dias consecutivos e os resultados médios foram verificados através do DPR (desvio padrão relativo) e teste t para amostras independentes obtidos para cada conjunto de dados.

Os resultados para a precisão intermediária encontram-se nas Tabelas 14 (FB-PP por UV e IV), 15 (FB-PP-PZ por IV) e 16 (PP-PZ por UV e IV), sendo que cada valor para cada concentração representa a média da triplicata de três a seis amostras. Em todas as concentrações testadas o valor de DPR calculado entre as amostras dos dois analistas é menor que o estabelecido pela norma vigente da ANVISA, que preconiza 5%. Isso satisfaz o critério para a precisão intermediária e indica que o método apresenta boa precisão inter-dia. O teste t para amostras independentes foi feito em duas etapas, sendo a primeira pela comparação dos resultados obtidos entre os analistas e como o valor de 'p' foi superior a 0,05 elas foram classificadas como iguais. A segunda parte foi a comparação entre os dois conjuntos de valores obtidos pelos analistas e os valores reais e é esse valor de 'p' que está descrito na tabela. Observa-se que os valores também são superiores a 0,05 e por isso foram considerados estatisticamente iguais.

TABELA 14 - Resultados da precisão intermediária para a associação FB-PP por UV e IV

Precisão intermediária									
	Febantel					Pirantel			
	Analista /dia / instrumento	[Real]	[Predita] (média,n=6)	DPR	p	[Real]	[Predita] (média,n=6)	DPR	p
UV ^a	1	9,00	8,97	1,13	0,833	8,64	8,60	1,31	0,426
	2	9,00	8,96			8,64	8,65		
IV ^b	1	30,06	30,08	1,00	0,654	28,85	28,88	1,03	0,935
	2	30,13	30,16			28,85	28,90		

DPR: DESVIO PADRÃO RELATIVO

^a $\mu\text{g.mL}^{-1}$

^b mg.0,1g^{-1}

FONTE: O autor (2014)

Tabela 15 - Resultados da precisão intermediária para a associação PP-PZ por UV e IV

Precisão intermediária						
Parâmetros	Analista					
	1		2		2	
	Pirantel		Febantel		Praziquantel	
[Real] ^a	28,80	28,78	30,00	29,99	10,07	10,05
[Predita] ^a (média,n=6)	29,39	28,72	29,33	29,94	10,08	10,42
DPR	2,581		2,142		3,392	
p	0,123		0,099		0,106	

DPR: DESVIO PADRÃO RELATIVO; ^a mg.0,1g^{-1}

FONTE: O autor (2014)

TABELA 16 - Resultados da precisão intermediária para a associação PP-PZ por UV e IV

Precisão intermediária									
Praziquantel					Pirantel				
Analista	[Real]	[Predida] (média,n=3)	DPR	p	[Real]	[Predida] (média,n=3)	DPR	p	
UV ^a	1	3,27	3,35	0,78	0,116	10,12	10,15	0,87	0,179
	2	3,29	3,32			10,09	10,05		
	1	3,97	4,00	0,58	0,123	12,14	12,29	0,91	0,058
	2	3,93	3,97			12,10	12,15		
	1	4,66	4,62	0,40	0,047	14,17	14,25	0,66	0,052
	2	4,60	4,64			14,10	14,10		
IV ^b	1	9,21	9,44	0,99	0,524	28,54	28,44	0,43	0,000
	2	9,43	9,38			29,02	29,55		
	1	10,95	10,86	1,73	0,942	29,04	28,45	0,37	0,000
	2	11,08	10,87			29,07	29,17		
	1	13,02	13,03	0,93	0,694	29,11	29,48	0,20	0,049
	2	13,05	13,08			29,22	29,22		

DPR: DESVIO PADRÃO RELATIVO; ^a $\mu\text{g.mL}^{-1}$; ^b mg.0,1g^{-1}
 FONTE: O autor (2014)

5.5.3. Exatidão

A exatidão expressa o grau de concordância entre um valor de referência aceito como verdadeiro e o valor previsto pelo modelo. Para a verificação da exatidão do método, para quantificação dos fármacos nas associações utilizando UV ou IV, utilizou-se o ensaio de recuperação e os valores de RMSEP. Para as associações, seja no UV ou no IV, o ensaio foi realizado pela adição de padrão à matriz. Os resultados do ensaio de exatidão estão descritos para a associação PP-PZ no UV e no IV (Tabela 17), FB-PP no UV e no IV (Tabela 18 e 19) e FB-PP-PZ (Tabela 20). Para a associação FB-PP, no UV, o valor de RMSEP dos dois fármacos foi igual a $0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Todos os valores de 'p' foram maiores que 0,05 e isto significa que não se deve rejeitar a hipótese nula e os valores são estatisticamente iguais aos de referência. Baixos valores de RMSEP e recuperação próxima a 100% indicam que os métodos são exatos.

TABELA 17 – Resultados do teste de exatidão da associação PP-PZ pela adição de padrão, por UV e IV

	Exatidão											
	Praziquantel						Pirantel					
	[Real]	[Predito] (n=3)	DPR	Rec. (%)	p	RMSEP	[Real]	[Predito] (n=3)	DPR	Rec. (%)	p	RMSEP
UV	3,97 ^a	4,02 ^a	0,31	101,26	0,09	0,08 ^a	12,14 ^a	12,18 ^a	0,34	100,29	0,20	0,07 ^a
IV	11,16 ^b	10,96 ^b	1,72	98,21	0,15	0,17 ^b	29,04 ^b	28,51 ^b	0,30	98,17	0,00	0,35 ^b

DPR: Desvio Padrão Relativo

^a µg.mL⁻¹

^b mg.0,1g⁻¹

FONTE: O autor (2014)

TABELA 18 – Resultados do teste de exatidão da associação FB-PP pela adição de padrão, por UV

Forma Farmacêutica	Nível (%)	Exatidão									
		Febantel					Pirantel				
		[Real] ^a	[Predito] ^a (Média, n=9)	DPR (%)	Rec. (%)	p	[Real] ^a	[Predito] ^a (Média, n=9)	DPR (%)	Rec. (%)	p
Cápsulas	120	10,80	10,69	1,45	98,95	0,21	10,37	10,21	0,59	98,42	0,12
	100	9,00	9,05	0,71	100,59	0,68	8,64	8,60	1,96	99,50	0,62
	80	7,20	7,20	0,99	99,95	0,42	6,91	6,85	0,96	99,13	0,33
Suspensão Oral	120	10,80	10,91	1,53	101,02	0,25	10,36	10,50	0,42	101,35	0,32
	115	10,35	10,31	0,96	99,61	0,06	9,93	10,01	0,21	100,84	0,07
	110	9,90	10,06	0,35	101,65	0,32	9,50	9,58	0,10	100,84	0,07

DPR: Desvio Padrão Relativo; ^a µg.mL⁻¹

FONTE: O autor (2014)

TABELA 19 – Resultados do teste de exatidão da associação FB-PP pela adição de padrão, por IV

	Exatidão											
	Febantel						Pirantel					
	[Real] ^a	[Predito] ^a (Média, n=6)	DPR (%)	Rec. (%)	p	RMSEP	[Real] ^a	[Predito] ^a (Média, n=6)	DPR (%)	Rec. (%)	p	RMSEP
	30,11	29,93	2,39	99,40	0,568	0,45	28,84	28,87	1,43	100,10	0,874	0,50

DPR: Desvio Padrão Relativo; ^a mg.0,1g⁻¹

FONTE: O autor (2014)

TABELA 20 – Resultados do teste de exatidão da associação FB-PP-PZ pela adição de padrão, por IV

	Exatidão		
	Febantel	Pirantel	Praziquantel
[Real] ^a	30,00	28,80	10,00
[Predito] ^a (média, n=6)	29,84	28,84	9,98
DPR (%)	1,787	1,212	1,388
Recuperação (%)	99,47	100,15	99,80
p	0,63	0,84	0,82
RMSEP ^a	0,69	0,67	0,34

DPR: Desvio Padrão Relativo; ^a mg.0,1g⁻¹

FONTE: O autor (2014)

5.5.4. Robustez

A robustez é um ensaio que tem por objetivo verificar a capacidade do método em suportar pequenas variações em seus parâmetros de modo que os resultados continuem inalterados. Ela mede a confiabilidade do método em condições normais, permitindo verificar as tolerâncias dos parâmetros críticos. No caso do método no UV para FB-PP foram avaliados os fatores: proporção de solventes em soluções diluentes, temperatura e tempo de leitura. Para o método no IV para FB-PP-PZ foi avaliada a influência de diferentes composições de excipientes.

Com relação à robustez do método no UV para FB-PP, em relação a proporção de solventes em soluções diluentes, a temperatura e o tempo de leitura não há qualquer influência sobre os resultados do método proposto. A homogeneidade de variâncias foi verificada usando o teste de Levene e os resultados indicaram que as variâncias são homogêneas para a proporção de diluente ($F_{\text{calculado}} < F_{(0,05;2;6)} = 5,1433$; $p > 0,05$), tempo de leitura ($F_{\text{calculado}} < F_{(0,05;2;14)} = 3,7389$; $p > 0,05$) e temperatura ($F_{\text{calculado}} < F_{(0,05;2;20)} = 3,4928$; $p > 0,05$). Além disso, foi usada uma análise de variância (ANOVA) para concluir que não houve diferenças significativas entre os resultados ($p = 0,05$).

Para o método no IV para FB-PP-PZ, o parâmetro analisado foi a influência da diferença de composição de excipientes. Várias misturas foram preparadas e lidas logo após o seu preparo, em temperatura e umidade controladas. A análise estatística foi realizada usando-se o teste t para amostras independentes e ANOVA *one way*. No primeiro teste, observou-se que somente o Praziquantel para a mistura de excipientes número 3 e A5 não sofreu interferência significativa ($p > 0,05$) e, assim, os valores são estatisticamente iguais. Como pôde ser observado (Tabela 21), houve diferença significativa nos valores de concentração em praticamente todas as composições de excipientes em quase todos os fármacos. Deste modo o fator composição dos excipientes é um parâmetro crítico inerente ao método e deve ser controlado rigorosamente.

TABELA 21 – Resultado do ensaio de robustez para a associação FP-PP-PZ por IV

Robustez									
Excipiente	Febantel			Pirantel			Praziquantel		
	[Real] ^a	[Predita] ^a (média, n=3)	p	[Real] ^a	[Predita] ^a (média, n=3)	p	[Real] ^a	[Predita] ^a (média, n=3)	p
3	29,99	31,59	0,00	28,80	29,56	<0,05	9,99	9,90	0,617
6	29,99	30,68	0,00	28,81	28,43	<0,05	10,02	11,20	<0,05
A5	30,02	29,65	0,00	28,77	27,89	<0,05	10,01	10,16	0,060
A10	30,00	30,35	0,00	28,82	28,26	<0,05	10,00	10,87	<0,05

DPR: Desvio Padrão Relativo

^a mg.0,1g⁻¹

FONTE: O autor (2014)

O segundo teste realizado foi o de análise de variâncias (ANOVA) e a sua homogeneidade de variâncias foi verificada pelo teste de Levene (Tabela 22), sendo: $H_0: s^2_1 = s^2_2 = s^2_3$; H_1 : hipótese alternativa ($s^2_1 \neq s^2_2 \neq s^2_3$). Se o valor do teste calculado for menor que o tabelado e o valor de 'p' maior que $\alpha=0,05$ conclui-se que as variâncias são homogêneas, isto é, dentro de cada um dos tratamentos a variabilidade é apenas devida a causas aleatórias.

TABELA 22 - Teste de homogeneidade de variâncias da associação FB-PP-PZ

Fármacos	Levene <i>Statistic</i>	df1	df2	Sig.
Pirantel	2,669	4	19	0,064
Praziquantel	15,065	4	19	0,000
Febantel	4,621	4	19	0,009

df: graus de liberdade; Sig.: valor de 'p' para o nível de significância selecionado

FONTE: O autor (2014)

O valor tabelado é $F_{(0,05;4;19)} = 2,895$ e, assim, somente as amostras referentes ao Pirantel têm variâncias homogêneas. O valor de 'p' (0,064) é maior que $\alpha=0,05$, o que corrobora com a análise anterior. Já para as amostras com Praziquantel e Febantel o valor calculado do teste é maior que o tabelado e o valor de 'p' menor que 0,05. Por ANOVA *one way* (Tabela 23), o valor de F tabelado continua igual ($F_{(0,05;4;19)} = 2,895$) para todos os casos. Em todos os grupos os valores de F calculados foram muito maiores que o tabelado ($F_{PP}=802$; $F_{PZ}=102$; $F_{FB}=722$) e o valor de 'p' para cada grupo foi menor que $\alpha=0,05$. Sendo assim, conclui-se que existem diferenças significativas entre as misturas de excipientes com um nível de significância de 5%.

TABELA 23 - Teste de robustez por ANOVA do modelo por IV para FB-PP-PZ

Fármacos		Soma dos quadrados	df	Média Quadrática	F	Sig.
Pirantel	Entre os grupos	5,082	4	1,270	802,839	0,000
	Dentro dos grupos	0,030	19	0,002		
	Total	5,112	23			
Praziquantel	Entre os grupos	4,960	4	1,240	102,838	0,000
	Dentro dos grupos	0,229	19	0,012		
	Total	5,189	23			
Febantel	Entre os grupos	7,829	4	1,957	722,138	0,000
	Dentro dos grupos	0,051	19	0,003		
	Total	7,881	23			

df: grau de liberdade; Sig.: valor de 'p' para o nível de significância selecionado

FONTE: O autor (2014)

Se a variabilidade 'entre os grupos' for maior que a 'dentro dos grupos' pode-se dizer que os grupos são heterogêneos entre si e homogêneos dentro deles próprios. Assim, espera-se que a média para a variável dependente seja significativamente diferente e, portanto, a hipótese nula seja rejeitada. Outra implicação é a de que quanto maior for a diferença entre a soma dos quadrados 'entre os grupos' e 'dentro dos grupos', maior será o valor de F, sendo maior também a possibilidade de a hipótese nula ser rejeitada.

Uma alternativa que auxilia o teste de ANOVA é a realização de análises complementares, que são os testes de comparações múltiplas (*a posteriori* ou *post-hoc*), usados quando o teste 'F' é significativo (indicar diferença entre as médias dos tratamentos). Como visto anteriormente, o teste de Levene indicou que somente o grupo para o fármaco Pirantel tem variância homogênea e, por isso, foram feitos os testes: LSD, Tukey, Bonferroni e Scheffe. Para o Praziquantel e Febantel (variância não homogênea): teste de Dunnett's T3, Dunnett's C e Games-Howell.

Para o Pirantel nenhum teste indicou que não há diferença estatística entre os grupos. Para o Praziquantel o teste de Dunnett's T3 e Games-Howell indicaram que não houve diferença significativa entre o grupo do excipiente padrão x excipiente A5 e excipiente padrão x excipiente 3. Para o Febantel somente o teste de Dunnett's T3 indicou que não há diferença significativa entre o excipiente padrão x excipiente A5.

5.6. APLICAÇÃO EM AMOSTRAS COMERCIAIS

O melhor modelo multivariado para cada associação e técnica (UV ou IV) foi aplicado para a determinação simultânea dos fármacos em amostras comerciais (cápsulas, comprimidos ou solução oral). O grau de concordância entre os métodos, PLS-2 e CLAE-DAD, foi avaliado e comparado estatisticamente usando um teste t para amostras independentes.

Para a associação PP-PZ (Tabela 24) foram testadas as amostras comerciais na forma de comprimido (Canex composto[®] e Helfine[®]) e cápsula (Manipulado). Na comparação CLAE x UV ou IV os valores de 'p' para a associação PP-PZ foram superiores a 0,05 em 11 das 12 comparações das três amostras comerciais testadas (comprimidos: Canex composto[®] e Helfine[®]; cápsulas: Manipulado). Portanto, a hipótese nula não pode ser rejeitada e os valores são estatisticamente iguais aos da técnica padrão (CLAE). Somente o PP no medicamento Canex composto[®] teve valor de 'p' inferior a 0,05, mesmo com diferença próxima de 2,5% entre as médias, não sendo estatisticamente igual, mas analiticamente muito similar.

TABELA 24 – Comparação dos resultados entre os métodos por PLS e CLAE da associação PP-PZ em cápsulas e comprimidos

Valor declarado	Concentração (DPR)						p
			CLAE		PLS		
	PZ (mg)	PP(mg)	PZ (média, n=3)	PP (média, n=3)	PZ (média, n=3)	PP (média, n=3)	
UV ^a			47,78 mg (0,04)	140,98 mg (0,80)	47,94 mg (0,45)	141,98 mg (0,07)	0,197 (PP) 0,286 (PZ)
IR ^a					47,90 mg (0,36)	144,30 mg (0,32)	0,009 (PP) 0,298 (PZ)
UV ^b	50,5	145,0	46,13 mg (3,64)	138,98 mg (1,35)	47,71 mg (0,84)	137,80 mg (0,27)	0,162 (PP) 0,050 (PZ)
IR ^b					47,18 mg (3,24)	139,87 mg (2,08)	0,540 (PP) 0,287 (PZ)
UV ^c			44,97 mg (2,99)	158,71 mg (0,54)	43,96 mg (4,66)	157,47 mg (1,35)	0,213 (PP) 0,335 (PZ)
IR ^c					45,92 mg (4,13)	160,45 mg (1,56)	0,137 (PP) 0,340 (PZ)

^acanex composto; ^bhelfine; ^cmanipulado;

DPR: Desvio Padrão Relativo

FONTE: O autor (2014)

Para a associação FB-PP foram testadas as amostras comerciais na forma de solução oral (Drontal Puppy[®]) e cápsula (Manipulado). Os resultados (Tabela 25) deste modelo indicam uma boa concordância entre os resultados da calibração multivariada e o método cromatográfico padrão (CLAE). Na comparação CLAE x UV

ou IV os valores de 'p' na associação FB-PP foram superiores a 0,05 para os dois fármacos em quase todas as análises, exceto para Pirantel por UV na forma Suspensão oral. Com 95% de confiança, os resultados não foram significativamente discrepantes (diferença próxima de 3% entre as médias).

TABELA 25 - Comparação dos resultados entre os métodos por PLS e CLAE da associação FB-PP em cápsulas e suspensão oral

Formulação	Valor declarado		Técnica	Concentração (DPR %)				p
	FB	PP		Modelo multivariado		CLAE		
				FB (média, n=3)	PP (média, n=3)	FB (média, n=3)	PP (média, n=3)	
Cápsulas ^a	150	144	UV	152,28 (0,11)	137,60 (0,05)	155,63 (0,64)	136,75 (1,38)	0,054 (FB) 0,481 (PP)
			IV	157,92 (0,89)	151,36 (1,99)	160,37 (0,59)	153,50 (0,82)	0,066 (FB) 0,321 (PP)
Suspensão oral ^b	15	14,4	UV	15,54 (0,63)	15,27 (0,17)	15,50 (1,19)	15,79 (0,92)	0,778 (FB) 0,028 (PP)

FONTE: O autor (2014)

Para a associação FB-PP-PZ foram testadas as amostras comerciais na forma de comprimido (Mectal[®], Canex[®] e Drontal[®]). A comparação foi feita entre os resultados no IV com CLAE-DAD e CLAE/EM-EM. Também foi verificado se os resultados obtidos pelas duas técnicas padrão foram estatisticamente iguais. As amostras foram analisadas em sextuplicata pelo método no IV e triplicata para ambos os métodos cromatográficos (Tabela 26).

De acordo com o teste t não houve diferença entre os valores preditos dos três analitos e os valores de referência obtidos pela técnica padrão nas formulações #1 e #3, e para PP e FB na formulação #2, com 99% de nível de confiança (todos os valores de t calculados foram inferiores ao $t_{crítico} = 3,499$). Os resultados de predição na formulação #2 do PZ não foram estatisticamente iguais entre o modelo multivariado e os cromatográficos, sendo a predição claramente discrepante. Uma possível explicação para este resultado é a presença de um agente palatilizante, encontrado somente nesta formulação e não nas outras, que está indicado na caixa do medicamento, mas não identificado. Desta forma, esta substância não foi incluída no modelo e poderia absorver gerando uma sobreposição das bandas do PZ, que está em menor concentração, e poderia sofrer uma interferência significativa na quantificação. Para contornar esse problema, uma das possibilidades seria identificar essa substância e incluí-la em um planejamento experimental somente para este medicamento. Como não foi possível identificá-la, a alternativa adotada foi

tentar prever PZ na formulação #2 testando sub-modelos construídos com cada uma das três regiões espectrais selecionadas por sPLS. Essa possibilidade alternativa foi aplicada com sucesso pela seleção somente da região entre 3715-3150 cm^{-1} , na qual PZ apresenta vibrações específicas de estiramento C-H de aromáticos. Este sub-modelo usou os mesmos pré-processamentos, 4VL e explicou 91,78% da variância em X e 91,84% em Y. No lugar de $70,4 \pm 1,2$ mg/comprimido com o modelo completo, o novo modelo previu $51,0 \pm 2,9$ mg/comprimido de PZ na formulação #2, valor sem diferença significativa com 99% de confiança por teste t, entre os resultados obtidos por IV e pelos dois métodos cromatográficos. Os outros sub-modelos que envolviam as outras duas regiões forneceram previsões igualmente ruins para PZ, indicando que muito provavelmente o agente palatilizante tem interferência negativa e significativa.

TABELA 26 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS ENTRE O MÉTODO PROPOSTO POR IV-PLS (N=6) E AS TÉCNICAS PADRÃO CLAE-DAD (N=3), CLAE/EM-EM (N=3) DA ASSOCIAÇÃO FB-PP-PZ EM COMPRIMIDOS

Valor declarado (mg/comprimido)			CLAE-DAD (mg/comprimido ± DP)			CLAE/EM-EM (mg/ comprimido ± DP)			Modelo Multivariado (mg/ comprimido ± DP)		
PP	PZ	FB	PP	PZ	FB	PP	PZ	FB	PP	PZ	FB
^a 144	50	150	157,4 ± 5,0	49,7 ± 0,3	155,3 ± 2,1	155,3 ± 4,4	44,4 ± 1,8	151,4 ± 3,1	158,9 ± 1,1	48,5 ± 1,8	155,7 ± 1,9
^b 144	50	150	153,8 ± 6,2	49,8 ± 0,2	158,3 ± 3,0	154,7 ± 7,7	45,1 ± 0,5	154,8 ± 2,6	160,2 ± 1,3	70,4 ± 1,2	158,6 ± 1,3
^c 144	50	150	144,9 ± 0,6	52,8 ± 1,3	148,8 ± 2,0	145,9 ± 0,5	54,2 ± 1,4	142,5 ± 2,9	143,7 ± 2,0	53,5 ± 1,3	146,9 ± 2,3

^a Comprimido commercial marca #01.

^b Comprimido commercial marca #02.

^c Comprimido commercial marca #03.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho foram obtidas as seguintes conclusões:

- Os métodos PLS2 desenvolvidos no UV e no IV foram considerados adequados para a quantificação espectroscópica de Pirantel, Febantel e Praziquantel em suas associações.

- A utilização dos algoritmos *i*PLS e *si*PLS mostrou que a seleção de variáveis por intervalos foi muito eficiente para a obtenção de modelos de regressão multivariados para a previsão de amostras sintéticas e comerciais desses antiparasitários utilizando a espectroscopia por reflectância difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier (DRIFTS).

- Os modelos de calibração no UV (FB/PP: 2 VL, centrado na média, 280-320 e 380-400 nm; PZ/PP: 2 VL, centrado na média, 200-400 nm) e por IV (FB/PP: 5 VL, 1ª derivada + SNV, 2548-1823 cm^{-1} ; PZ/PP: 5 VL, 1ª derivada + MSC, 3998-3636, 3274-1824 e 1100-735 cm^{-1} ; FB/PZ/PP: 5 VL, 1ª derivada + centrado na média, 3715-3150, 2865-2583 e 2298-1733 cm^{-1}) foram validados e os resultados se encontraram dentro dos limites estabelecidos pela norma de validação da ANVISA para os parâmetros linearidade, exatidão e precisão.

- As principais vantagens dos métodos desenvolvidos, em relação aos métodos já descritos na literatura, é que eles são métodos de menor custo, envolvendo equipamentos mais acessíveis e simples, que são de fácil execução e rápidos. Cabe destacar que os métodos no IV tem também a vantagem de não usar solventes orgânicos, sendo até dez vezes mais rápidos a técnica oficial (CLAE).

- Em amostras comerciais os métodos desenvolvidos forneceram resultados estatisticamente iguais aos métodos oficiais (CLAE-DAD e CLAE-EM/EM). Isto, mesmo sem o acesso à composição qualitativa ou quantitativa dos excipientes, que seria um grave fator limitante da técnica principalmente no infravermelho. Os métodos desenvolvidos são adequados para o controle de qualidade desses fármacos na rotina de laboratórios que prestam serviço, bem como na indústria ou em farmácias de manipulação.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI, H. Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression). **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, n. 1, p.97-106, 2010.
- ADAMS, H. R. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- ALLENDER, W. J. High-performance liquid chromatographic determination of oxantel and pyrantel pamoate. **Journal of Chromatographic Science**, v. 26, n. 9, p.470-472, 1988.
- AMIDON, G. L. *et al.* A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: The correlation of invitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n., p.413-420, 1995.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. ed. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002.
- ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002.
- ANVISA. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos - Resolução - RE no 899**. ed, 2003.
- ARGEKAR, A. P.; RAJ, S. V.; KAPADIA, S. U. Simultaneous determination of mebendazole and pyrantel pamoate from tablets by high performance liquid chromatography-reverse phase (RP-HPLC). **Talanta**, v. 44, n. 11, p.1959-65, 1997.
- ASTM. **Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis - E1655-05**, 2012. p.
- ATKINSON, A. C.; DONEV, A. N. **Optimum experimental design** ed. Oxford: Clarendon Press, 1992.
- BABIC, S. *et al.* Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 3, p.1185-94, 2010.
- BELOTTO, A. J. **Criando um amigo**. Disponível em:<http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/manual_educador02_1253732588.pdf> Acesso em:23/05/2012.
- BIALECKA, W.; KULIK, A. Determination of active substances in multicomponent veterinary preparations of antiparasitic action by HPLC method. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 67, n. 5, p.463-8, 2010.
- BLANCO, M.; ALCALÁ, M. Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation: Development and validation of a near infrared spectroscopic method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 2-3, p.280-286, 2006.
- BONATO, P. S. *et al.* Simultaneous determination of albendazole metabolites, praziquantel and its metabolite in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 2, p.558-63, 2007.
- BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v. 13, n. 1, p.1-45, 1951.
- BRAGA, J. W. B. **Avaliação de figuras de merito em calibração multivariada, aplicada na determinação de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho proximo e medio**. 153 f. - Química, Unicamp, Campinas, 2004.
- BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, v. 125, n. 11, p.2125-2154, 2000.
- BRITISH, PHARMACOPOEIA. ed. London: The Stationery Office, 2005.

BRITO, N. M. *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, n., p.129-146, 2003.

BROWN, M. *et al.* A metabolome pipeline: from concept to data to knowledge. **Metabolomics**, v. 1, n. 1, p.39-51, 2005.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.-L. Practical method validation: Validation sufficient for an analysis method. **Mikrochimica Acta**, v. 128, n. 1-2, p.93-106, 1998.

BUDAVARI, S. **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 12. ed. New Jersey: Merck, 1996.

BUNACIU, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; FLESCHIN, S. Application of Fourier Transform infrared spectrophotometry in pharmaceutical drugs analysis. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 45, n. 3, p.206-219, 2010.

CANTARELLI, M. A. *et al.* Simultaneous determination of amoxicillin and diclofenac in pharmaceutical formulations using UV spectral data and the PLS chemometric method. **Analytical sciences**, v. 27, n. 1, p.73-8, 2011.

CAPANEMA, L. X. L. *et al.* **Panorama da indústria farmacêutica veterinária**. Disponível em:<http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/onhecimento/bnset/set2506.pdf> Acesso em:23/05/2012.

CHANG, C. W. *et al.* Near-infrared reflectancespectroscopy - Principal components regressionanalyses of soil properties. **Soil Science Society of America Journal**, v. 65, n., p.480-490, 2001.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel. **Parasitology Research**, v. 90 Supp 1, n., p.S3-9, 2003.

CLUTTON-BROCK, J. **Origins of the dog: domestication and early history**. In: Serpell, J. (Ed.), **The domestic dog: Its evolution, behaviour and Interactions with people**. . ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas: Unicamp, 2006.

DAVIS, A.; WEGNER, D. H. Multicentre trials of praziquantel in human schistosomiasis: design and techniques. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 57, n. 5, p.767-71, 1979.

DE LA PEÑA, A. M. *et al.* Comparative study of net analyte signal-based methods and partial least squares for the simultaneous determination of amoxycillin and clavulanic acid by stopped-flow kinetic analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 463, n. 1, p.75-88, 2002.

DHANOVA, M. S. *et al.* The link between Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Standard Normal Variate (SNV) transformations of NIR spectra. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 2, n., p.43-47, 1994.

DOTSON, M. J.; HYATT, E. M. Understanding dog-human companionship. **Journal of Business Research**, v. 61, n. 5, p.457-466, 2008.

DUSI, G.; GAMBA, V.; FAGGIONATO, E. Rapid determination of the antiparasitic drugs flubendazole and febantel in feeds by HPLC with ultraviolet detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 2, p.375-379, 2005.

ENGEL, J. *et al.* Breaking with trends in pre-processing ? **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, n., p.96-106, 2013.

EUROPEAN, P. 6. ed. Strasbourg: Council of Europe 2007.

European Pharmacopoeia. 6. ed. Strasbourg, 2007.

FERRÉ, J.; BROWN, S. D.; RIUS, F. X. Improved calculation of the net analyte signal in inverse multivariate calibration. **Journal of Chemometrics**, v. 15, n. 6, p.537-553, 2001.

FERREIRA, A. B. D. H. **Dicionário Aurélio Básico da Língua Portuguesa**. ed: Editora Positivo, 2010.

- FERREIRA, M. H.; GOMES, J. F. F.; SENA, M. M. Development and validation of a multivariate calibration model for determination of dipyrone in oral solutions by near infrared spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 9, p.1680-1686, 2009.
- FERREIRA, M. M. C. *et al.* Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v., n. 22, p.724, 1999.
- FOROUZANGO HAR, M. *et al.* Midinfrared Spectroscopy and Chemometrics to Predict Diuron Sorption Coefficients in Soils. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 9, p.3283-3288, 2008.
- FRANCESQUETT, J. Z. *et al.* Modelos de regressão multivariada empregando seleção de intervalos para a quantificação do biodiesel em blendas biodiesel/diesel. **Tecno-Logica**, v. 14, n. 2, p.87-92, 2010.
- FURNISS, B. S. *et al.* **Vogel's Textbook of practical organic chemistry**. 5th. ed. London: Longman scientific and technical, 1989.
- GHONEIM, M. M.; MABROUK, M. M.; TAWFIK, A. Direct determination of praziquantel in pharmaceutical formulations and human plasma by cathodic adsorptive stripping differential-pulse voltammetry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 4, p.1311-8, 2002.
- GONÇALVES, M. L. S. S. **Métodos instrumentais para análise de soluções**. 2^a. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990.
- GRDINIC, V.; VUKOVIC, J. Prevalidation in pharmaceutical analysis Part I. Fundamentals and critical discussion. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 3, p.489–512, 2004.
- HAALAND, D. M.; THOMAS, E. V. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. **Analytical chemistry**, v. 60, n. 11, p.1193-1202, 1988.
- HEGELUND, F.; LARSEN, R. W.; PALMER, M. H. The high-resolution infrared spectrum of thiophene between 600 and 1200 cm^{-1} : A spectroscopic and theoretical study of the fundamental bands ν_6 , ν_7 , ν_{13} and the c-Coriolis interacting dyad ν_5 , ν_{19} . **Journal of Molecular Spectroscopy**, v. 247, n. 1, p.100-114, 2008.
- HELLAND, I. S.; NAES, T.; ISAKSSON, T. Related versions of the multiplicative scatter correction method for preprocessing spectroscopic data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 29, n. 2, p.233-241, 1995.
- HOLLAS, J. M. **Modern spectroscopy**. 4th. ed. New York: John Wiley and Sons, 2004.
- HUBERT, P. *et al.* Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part I. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 3, p.579-586, 2004.
- _____. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part II. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 1, p.70-81, 2007.
- ICH. **Q2A Text on Validation of Analytical Procedures**. ed. London, 1995.
- _____. **International Conference on Harmonization: Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)** 1996.
- IGNE, B.; HURBURGH, C. R. Local chemometrics for samples and variables: optimizing calibration and standardization processes. **Journal of Chemometrics**, v. 24, n. 2, p.75-86, 2010.
- INMETRO. **DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos** 2007.
- JAIN, R.; JADON, N.; RADHAPYARI, K. Determination of antihelminthic drug pyrantel pamoate in bulk and pharmaceutical formulations using electro-analytical methods. **Talanta**, v. 70, n. 2, p.383-6, 2006.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied Multivariate Statistical Analysis**. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1988.

JUNQUEIRA, E.; QUEIRÓS, A.; SANTOS, D. **New Business**. Disponível em: <http://www.josedornelas.com.br/wp-content/uploads/2008/09/pn_new_business_pets.pdf> Acesso em: 23/05/2012.

KAZAKEVICH, Y. V.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007.

KOPP, S. R. *et al.* Pyrantel in small animal medicine: 30 years on. **The Veterinary Journal**, v. 178, n. 2, p.177-184, 2008.

KUBINYI, H.; GERD, F.; MARTIN, Y. C. **3D QSAR in Drug Design. Ligand-Protein Interactions and Molecular Similarity**. ed. London: Kluwer Academic Publishers, 1998.

LAASONEN, M. *et al.* Development and Validation of a Near-Infrared Method for the Quantitation of Caffeine in Intact Single Tablets. **Analytical chemistry**, v. 75, n. 4, p.754-760, 2003.

LI, J. *et al.* A high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy-based analysis of commercially available praziquantel tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 2, p.263-7, 2007.

LORBER, A. Error propagation and figures of merit for quantification by solving matrix equations. **Analytical chemistry**, v. 58, n. 6, p.1167-1172, 1986.

LORBER, A.; FABER, K.; KOWALSKI, B. R. Net analyte signal calculation in multivariate calibration. **Analytical chemistry**, v. 69, n. 8, p.1620-1626, 1997.

LUNDSTEDT, T. *et al.* Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, n. 1-2, p.3-40, 1998.

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate Calibration**. ed. New York: John Wiley & Sons, 1989.

MARTIN, R. J. Modes of action of anthelmintic drugs. **The Veterinary Journal**, v. 154, n. 1, p.11-34, 1997.

MARTINEZ, M. *et al.* Applying the biopharmaceutics classification system to veterinary pharmaceutical products. Part I: biopharmaceutics and formulation considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 6, p.805-824, 2002.

MAZUREK, S.; SZOSTAK, R. Comparison of infrared attenuated total reflection and Raman spectroscopy in the quantitative analysis of diclofenac sodium in tablets. **Vibrational Spectroscopy**, v. 57, n. 1, p.157-162, 2011.

MCKELLAR, Q. A.; JACKSON, F. Veterinary anthelmintics: old and new. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p.456-61, 2004.

MCMASTER, M. **HPLC: A Practical User's Guide, 2nd Edition**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2006.

MICKLANDER, E. *et al.* Multi-product calibration models of near infrared spectra of foods. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 14, n. 1, p.395-402, 2006.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis Experiments**. 5th. ed. New York: Wiley, 1991.

MOROVJAN, G. *et al.* Determination of fenbendazole, praziquantel and pyrantel pamoate in dog plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 797, n. 1-2, p.237-44, 1998.

MÜLLER, A. L. H. *et al.* Simultaneous diffuse reflectance infrared determination of clavulanic acid and amoxicillin using multivariate calibration techniques. **Drug Testing and Analysis**, v. 4, n. 6, p.500-506, 2012.

NAGAVALLI, D. *et al.* Simultaneous spectrophotometric determination of losartan potassium, amlodipine besilate and hydrochlorothiazide in pharmaceuticals by chemometric methods. **Acta Pharmaceutica**, v. 60, n. 2, p.141-52, 2010.

NIAZI, A. Spectrophotometric simultaneous determination of uranium and thorium using partial least squares regression and orthogonal signal correction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n., p.1020-1026, 2006.

NOORD, O. E. The influence of data preprocessing on the robustness and parsimony of multivariate calibration models. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 23, n. 1, p.65-70, 1994.

NORGAARD, L. *et al.* Interval partial least-squares regression (iPLS): A comparative chemometric study with an example from near-infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 54, n. 3, p.413-419, 2000.

O'HAVER, T. **An Introduction to Signal Processing with applications in Chemical Analysis**. ed, 2012.

OLIVIERI, A. C. *et al.* Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration. **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 3, p.633-661, 2006.

OTTO, M. **Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry**. 3. ed. Weinheim: John Wiley, 1999.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p.198-219, 2003.

PAX, R.; BENNETT, J. L.; FETTERER, R. A benzodiazepine derivative and praziquantel: Effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 304, n. 3, p.309-315, 1978.

PERSSON, B.-A.; VESSMAN, J. Generating selectivity in analytical chemistry to reach the ultimate – specificity. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, n. 3, p.117-119, 1998.

PIANTAVINI, M. S. *et al.* Simultaneous Spectrophotometric Determination of Pyrantel Pamoate and Febantel in Two Different Pharmaceutical Preparations Using Partial Least-Squares Regression. **Journal of Analytical Chemistry**, v., n., 2014.

PONTES, F. L. D. *et al.* Development and validation of an HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of Ivermectin, Febantel, Praziquantel, Pyrantel Pamoate and related compounds in fixed dose combination for veterinary. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. 2, p.191-200, 2013.

RAHMATOOLA, R. J. *et al.* Comparison of pyrantel pamoate with other anthelmintic drugs. **Archives of disease in childhood**, v. 47, n. 253, p.465-7, 1972.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L. **Aplicação de métodos de análise multivariada no estudo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. f. - Instituto de Química Unicamp, Campinas, 2001.

RINNAN, A.; BERG, F. V. D.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p.1201-1222, 2009.

ROCHA, W. F. C. *et al.* Determination and validation of nimesulide in pharmaceutical formulation by near infrared spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 10, p.1929-1936, 2010.

RODRÍGUEZ, L. C. *et al.* Estimation of Performance Characteristics of an Analytical Method Using the Data Set Of The Calibration Experiment. **Analytical Letters**, v. 26, n. 6, p.1243-1258, 1993.

SARRAGUÇA, M. C.; SOARES, S. O.; LOPES, J. A. A near-infrared spectroscopy method to determine aminoglycosides in pharmaceutical formulations. **Vibrational Spectroscopy**, v. 56, n. 2, p.184-192, 2011.

SCHAD, G. A. Hookworms: pets to humans. **Annals of Internal Medicine**, v. 120, n. 5, p.434-5, 1994.

SENA, M. M. *et al.* Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 4, p.743-749, 2004.

_____. Application of two- and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid mixtures using ultraviolet spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 409, n. 1-2, p.159-170, 2000.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1-2, p.57-66, 2003.

SILVA, F. E. B. *et al.* Simultaneous determination of sulphamethoxazole and trimethoprim in powder mixtures by attenuated total reflection-Fourier transform infrared and multivariate calibration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 3, p.800-805, 2009.

SILVA, M. A. M. *et al.* Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of amoxicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 89, n. 0, p.342-351, 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7th. ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.

SINDAN. **Faturamento do mercado veterinário**. Disponível em:<<http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>> Acesso em:23/05/2012.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN. **Princípios de análise instrumental**. 5^a. ed. São Paulo: Bookman, 2002.

SKOOG, D. A. *et al.* **Analytical chemistry : an introduction**. 7th. ed. Philadelphia, 2000.

SOLOMONS, T. W. G. **Química orgânica**. 6a. ed. Rio de janeiro: LTC Editora SA, 1996.

STUART, B. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. ed: John Wiley and sons, 2004.

TAN, C. *et al.* A simple ensemble strategy of uninformative variable elimination and partial least-squares for near-infrared spectroscopic calibration of pharmaceutical products. **Vibrational Spectroscopy**, 2011.

TRSL. **Therapeutic Systems Research Laboratories. BCS (Biopharmaceutics Classification System)**. Disponível em:<<http://69.20.123.154/services/bcs/search.cfm>> Acesso em:22/11/2012.

USP. **The United States Pharmacopoeia**. 31. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2008.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. State of the art of figures of merit in multivariate calibration. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p.1278-1287, 2009.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi**, v. 11, n. 2, p.26-31, 2007.

VANDEGINSTE, B. G. M. *et al.* Chapter 36 Multivariate calibration. In: (Ed.). **Data Handling in Science and Technology**.: Elsevier, 1998. p. 349-381.

VASCONCELLOS, S. A. Zoonoses e saúde pública: Riscos causados por animais exóticos. **Biológico**, v. 63, n. 1-2, p.63-65, 2001.

VESSMAN, J. *et al.* Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 8, p.1381-1386, 2001.

VILÀ, C. *et al.* Multiple and ancient origins of the domestic dog. **Science**, v. 276, n. 5319, p.1687-9, 1997.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical analysis A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. 1. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

WILLIAMS, P. Implementation of Near-infrared Technology. In: WILLIAMS, P. C. e NORRIS, K. (Ed.). **Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries**. 2nd. ed. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 2001. p. 143-167.

WOLLWEBER, H. *et al.* Febantel, a new broad-spectrum anthelmintic. **Arzneimittelforschung**, v. 28, n. 12, p.2193-5, 1978.

WORKMAN JR, J.; WORKMAN, J. 27 - Practices For Data Preprocessing For Optical Spectrophotometry. In: (Ed.). **The Handbook of Organic Compounds**. Burlington: Academic Press, 2001a. p. 295-300.

_____. 29 - Review of Chemometrics Applied to Spectroscopy: Data Preprocessing. In: (Ed.). **The Handbook of Organic Compounds**. Burlington: Academic Press, 2001b. p. 327-337.

XIANG, D. *et al.* Robust calibration design in the pharmaceutical quantitative measurements with near-infrared (NIR) spectroscopy: Avoiding the chemometric pitfalls. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 3, p.1155-66, 2009.

_____. Development of robust quantitative methods by near-infrared spectroscopy for rapid pharmaceutical determination of content uniformity in complex tablet matrix. **Analyst**, v. 134, n. 7, p.1405-15, 2009.

ZHENG, Y. *et al.* Determination of moisture content of lyophilized allergen vaccines by NIR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 3, p.592-596, 2008.