

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Programa de Pós-Graduação
em Química



Determinação do teor de diclofenaco sódico em comprimidos por espectroscopia no infravermelho próximo - NIR com calibração multivariada - PLS

Francisco Ferreira Neto

Dissertação de Mestrado
Natal/RN, fevereiro de 2012

FRANCISCO FERREIRA NETO

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE DICLOFENACO SÓDICO EM COMPRIMIDOS
POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO – NIR
COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA – PLS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Maria de Fátima Vitória de Moura

Área de concentração: Química Analítica

NATAL-RN

Fevereiro de 2012

Ferreira Neto, Francisco.

Determinação do teor de diclofenaco sódico em comprimidos por espectroscopia no infravermelho próximo – NIR com calibração multivariada – PLS / Francisco Ferreira Neto. – Natal, RN, 2012.

62 f. : il.

Orientadora: Maria de Fátima Vitória de Moura.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências Exatas e da Terra. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química.

1. Espectroscopia – Dissertação. 2. Ultravioleta – Dissertação. 3. Infravermelho – Dissertação. 4. Diclofenaco – Dissertação. 5. Quimiometria – Dissertação. I. Moura, Maria de Fátima Vitória de Moura. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

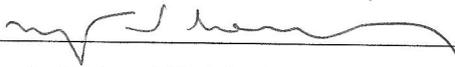
FRANCISCO FERREIRA NETO

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE DICLOFENACO SÓDICO EM COMPRIMIDOS
POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO – NI
COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA – PLS**

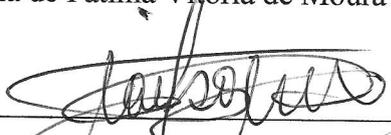
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 29 de fevereiro de 2012.

Comissão Examinadora:



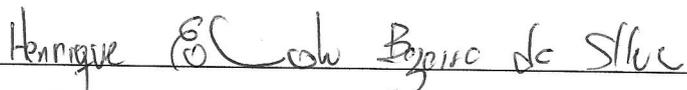
Dra. Maria de Fátima Vitória de Moura – UFRN (orientadora)



Dr. Jailson Vieira de Melo – UFRN



Dr. Djalma Ribeiro da Silva – UFRN



Dr. Henrique Eduardo Bezerra da Silva – UFRN

Agradecimentos

À minha mãe.

Aos amigos do LAQUANAP pelo companheirismo e apoio.

Ao Professor Kássio Lima pela colaboração durante o curso.

A Rafael da Silva Fernandes, pela ajuda com o *software*.

Ao Instituto de Química e a UFRN pela oportunidade de fazer um curso de pós graduação.

À minha orientadora, Maria de Fátima Vitória de Moura, pela orientação e apoio.

Aos demais membros da banca, os professores, Jailson Vieira de Melo, Djalma Ribeiro da Silva e Henrique Eduardo Bezerra da Silva.

Sumario

Lista de tabelas.....	vi
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Siglas e abreviaturas.....	vi
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1 - Introdução.....	11
2 - Objetivos.....	14
2.1 - Objetivo Geral.....	14
2.2 - Objetivos específicos.....	14
3 - Revisão da literatura.....	15
3.1 - Espectroscopia no Infravermelho.....	15
3.1.1 - Histórico.....	15
3.1.2 - NIR e Aplicações	17
3.1.3 - Instrumentação.....	18
3.1.4 - Espectroscopia por Refletância Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier.....	18
3.1.5 - Aplicações da espectroscopia NIR	20
3.1.6 - Espectrometria NIR na indústria farmacêutica	21
3.2 - Espectroscopia - ultravioleta.....	21
3.2.1 - Princípios básicos.....	21
3.2.2 - Lei de Beer.....	22
3.2.3 - Espectrofotômetros.....	23
3.2.4 - Recipientes.....	24
3.2.5 - Procedimentos analíticos em espectrofotometria ultravioleta... ..	24
3.3 - Quimiometria.....	24
3.3.1 - Técnicas de Calibração.....	25
3.3.1.1 - PLS.....	27
3.3.2 - Processamento e Tratamento dos Dados Espectrais.....	28
3.3.2.1 - Filtro de Savitsky-Golay.....	28
3.3.2.2 - Correção do Espalhamento Multiplicativo (MSC).....	29
3.3.2.3 - Correção do Espalhamento Multiplicativo Estendido (EMSC).....	29
3.3.2.4 - Derivadas.....	30
3.3.3 - Parâmetros que indicam a qualidade de um modelo multivariado	31
3.3.4 - Escolha do Número de Variáveis Latentes.....	31
3.3.5 - Escolha dos subconjuntos de calibração, validação e previsão	32
3.3.5.1 - Algoritmo Kennard-Stone (KS).....	32
4 - Parte Experimental.....	33
4.1 - Amostragem.....	33
4.2 - Materiais Utilizados.....	33
4.2.1 - Vidrarias e acessórios.....	33
4.2.2 - Reagentes utilizados.....	33
4.3 - Metodologias Experimentais.....	33
4.3.1 - Obtenção dos espectros NIR.....	33

4.3.2 -	Determinação do teor de diclofenaco em comprimidos por espectroscopia na região do ultravioleta.....	34
4.3.2.1 -	Curva de Calibração.....	34
4.3.2.2 -	Procedimento de análise de diclofenaco sódico nos comprimidos.....	37
4.4 -	<i>Softwares</i> utilizados.....	37
5 -	Apresentação e Discussão dos Resultados.....	37
5.1 -	Modelagem dos dados espectrais.....	37
5.1.1 -	Prétratamentos dos Dados Espectrais.....	38
5.1.2 -	Calibração Multivariada.....	41
5.2 -	Predição de Amostras Externas pelo Melhor Modelo Escolhido.....	49
5.3 -	Validação do procedimento.....	50
5.4 -	Discursão dos Resultados.....	51
6 -	Conclusões.....	52
7 -	Surgestões.....	53
7 -	Referências Bibliográficas.....	54
ANEXOS.....		60
A -	Tabela contendo as amostras analisadas e suas respectivas absorbâncias das soluções analíticas.....	61
B -	Tabela com os teores de diclofenaco de cada comprimido analisado por UV.	63

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Regiões espectrais do Infravermelho.....	16
Tabela 2 - Atribuição das Regiões Espectrais as Transições Vibracionais.	18
Tabela 3 - Concentrações soluções padrão mg/L e respectivas absorbâncias..	35
Tabela 4 - Modelos de calibração desenvolvidos e tipos de prétratamentos utilizados.	43
Tabela 5 - Modelos testados e os parâmetros observados	43
Tabela 6 - Novo modelo testado e os parâmetros observados	45
Tabela 7 - Resultados da predição pelo modelo de calibração desenvolvido x método de referência	50

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1 -	Estrutura química do Ácido 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenil) acético	11
Figura 2 -	Estrutura química do diclofenaco na forma sódica.....	11
Figura 3 -	Esquema simplificado das principais parte de um espectrofotômetro	18
Figura 4 -	Modo de medida na região NIR. (a) refletância difusa em amostra sólida.....	19
Figura 5 -	Organização dos dados na calibração multivariada.....	27
Figura 6 -	Espectro com as leituras das absorbâncias das soluções padrão.....	35
Figura 7 -	Curva de calibração.....	36
Figura 8 -	Gráfico dos espectros dos 90 comprimidos analisados.....	38
Figura 9 -	Gráfico com média dos espectros NIR de todos os 90 comprimidos utilizados nesse trabalho.....	38
Figura 10 -	Gráfico dos espectros após retiradas as regiões ruidosas (selecionado de 1188 nm – 2692 nm).....	39
Figura 11 -	Espectros NIR aplicado MSC.....	40
Figura 12 -	Espectros NIR aplicado Alisamento Savitzky-Golay 15 pontos.....	40
Figura 13 -	Espectros NIR aplicado a primeira derivada Savitzky-Golay15 pontos.	41
Figura 14 -	Gráfico dos scores.....	42
Figura 15 -	Calibração PLS Contendo o Conjunto de Calibração 54 Amostras.....	44
Figura 16 -	Gráfico do resíduo em função dos valores preditos de Y para amostras do conjunto de calibração	44
Figura 17 -	Calibração PLS contendo o conjunto de calibração com 52 amostras..	45
Figura 18 -	Gráfico do resíduo em função dos valores preditos de Y para cada amostra do novo conjunto de calibração agora com 52 amostras.....	46
Figura 19 -	Gráfico RMSEC x número de variáveis.....	47
Figura 20 -	Gráfico dos <i>loadings</i> x variáveis.....	47
Figura 21 -	Gráfico dos coeficientes de correlação x variáveis.....	48
Figura 22 -	Gráfico dos <i>leverage</i> x amostras.....	48
Figura 23 -	Predição do modelo B1 em discussão para amostras externas.....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AINEs - Antiinflamatórios Não Esteroidais

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ATR - Refletância Total Atenuada

NIR - Infravermelho Próximo (do inglês, *Near Infrared*)

MIR - Infravermelho Médio (do inglês, *Middle Infrared*)

FIR - Infravermelho Distante (do inglês, *Far Infrared*)

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

MLR - Regressão Linear Múltipla (do inglês *Multiple Linear Regression*)

PCA - Análise de Componentes Principais (do inglês *Principal Component Analysis*)

PCR - Regressão por Componentes Principais (do inglês *Principal Component Regression*)

CLS - Mínimos Quadrados Clássicos (do inglês *Classic Least Squares*),

PLS - Mínimos Quadrados Parciais (do inglês *Partial Least Squares*)

VL - Variáveis Latente

MSC - Correção do Espalhamento Multiplicativo

EMSC - Correção do Espalhamento Multiplicativo Estendido

KS - Algoritmo Kennard-Stone

RMSECV - Erro Quadrático Padrão de Validação Cruzada

RMSEP - Erro Quadrático Padrão de Predição.

RMSEC - Erro quadrático Padrão de Calibração.

SEC - Erro Padrão de Calibração.

SG - Savtzky-Golay

RESUMO

Neste trabalho são combinadas as potencialidades da técnica de espectroscopia no infravermelho próximo – NIR e da quimiometria visando à determinação do teor de diclofenaco em comprimidos, sem destruição da amostra, para o qual utilizou-se como referência o método de espectroscopia no ultravioleta, que é um dos métodos oficiais. Na construção dos modelos de calibração multivariada estudou-se vários tipos de pré-processamento dos dados espectrais NIR, como correção do espalhamento da luz, primeira derivada. O método de regressão usado na construção dos modelos de calibração foi o PLS (mínimos quadrados parciais) utilizando dados espectroscópicos do NIR de um conjunto de 90 comprimidos divididos em dois conjuntos (calibração e previsão). Na calibração foram usadas 54 amostras e na previsão foram usadas 36, uma vez que o método de calibração utilizada foi o método de validação cruzada (*full cross validation*) que dispensa a necessidade de um conjunto de validação. A avaliação dos modelos foi feita observando os valores de coeficiente de correlação R^2 e os erros quadrados médios RMSEC (erro de calibração) e RMSEP (erro de previsão). Sendo os valores de previsão estimados para as demais 36 amostras, o qual os resultados se mostraram coerentes com os valores obtidos por espectroscopia no ultravioleta.

Palavras chaves: Espectroscopia, ultravioleta, infravermelho, Diclofenaco, Quimiometria.

ABSTRACT

This work is combined with the potential of the technique of near infrared spectroscopy - NIR and chemometrics order to determine the content of diclofenac tablets, without destruction of the sample, to which was used as the reference method, ultraviolet spectroscopy, which is one of the official methods. In the construction of multivariate calibration models has been studied several types of pre-processing of NIR spectral data, such as scatter correction, first derivative. The regression method used in the construction of calibration models is the PLS (partial least squares) using NIR spectroscopic data of a set of 90 tablets were divided into two sets (calibration and prediction). 54 were used in the calibration samples and the prediction was used 36, since the calibration method used was crossvalidation method (full cross-validation) that eliminates the need for a validation set. The evaluation of the models was done by observing the values of correlation coefficient R^2 and RMSEC mean square error (calibration error) and RMSEP (forecast error). As the forecast values estimated for the remaining 36 samples, which the results were consistent with the values obtained by UV spectroscopy.

Keywords: Spectroscopy, ultraviolet, infrared, diclofenac, chemometrics.

1 – Introdução

O diclofenaco é um fármaco que pertence ao grupo dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e possui atividade analgésica e anti-inflamatória. É um inibidor da enzima prostaglandina sintetase (ciclooxigenase) e, devido a esta ação, diminui a formação das prostaglandinas reduzindo, desta maneira, o processo de inflamação dor e febre. É utilizado em tratamentos curtos para processos inflamatórios pós-traumáticos, infecções inflamatórias e alívio da dor e após alguns procedimentos cirúrgicos [1]. O diclofenaco sódico é largamente prescrito para o tratamento de *doenças inflamatórias* [2].

Quimicamente é o Ácido 2-(2-(2,6-diclorofenilamino)fenil) acético, com denominação Comum Internacional de –DICLOFENAC, sua estrutura química está na Figura 1 abaixo.

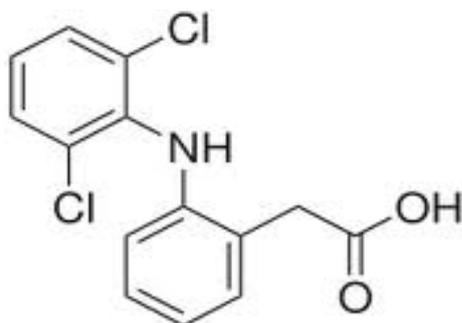


Figura-1- estrutura química do Ácido 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenil) acético

Como mostra a Figura 1 acima é um ácido apresentando uma carbonila e uma hidroxila podendo ser quimicamente preparado com diferentes cátions substituindo o hidrogênio da hidroxila. Atualmente um dos seus derivados mais comercializados é a sua forma sódica (diclofenaco de sódio), a sua estrutura está mostrado na figura 2.

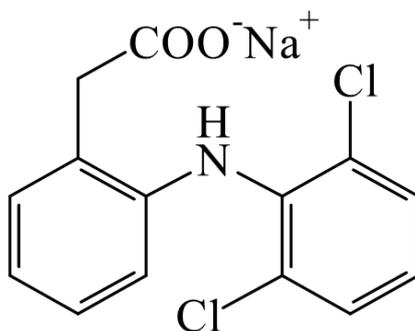


Figura-2 estrutura química do diclofenaco na forma sódica

Uma consequência da grande utilização desse medicamento é a necessidade de técnicas de controle de qualidade com características adequadas para o fornecimento de resultados de maneira rápida e confiável. Entre os problemas que podem ocorrer durante a produção, podem ser citados: contaminações por metais pesados, contaminações microbiológicas e problemas quanto à dosagem de medicamentos [3]. Em especial comprimidos, pois a correta homogeneização de misturas sólido-sólido pode ser difícil no processo de fabricação.

O controle de qualidade da produção de um medicamento é de fundamental importância pois quando um médico prescreve uma certa dosagem para um paciente supõe que aquele medicamento está de acordo com o valor declarado no rótulo, já que essa dosagem é necessária para manter um nível adequado de concentração sanguínea necessária desse medicamento para o sucesso no tratamento. Assim, procedimentos que permitam uma rápida, limpa (sem o uso de muitos reagentes e solventes), precisa e exata determinação da composição dos medicamentos se faz necessário [3].

Os procedimentos que, normalmente, são adotados para o controle da qualidade nas indústrias farmacêuticas, assim como também por alguns órgãos públicos de controle e fiscalização, são os denominados “métodos oficiais”, descritos em monografias e farmacopéias, e servem de referência para os diversos parâmetros de controle de qualidade, tanto para a matéria-prima, como para o produto acabado. Cada substância, descrita em uma farmacopéia, possui metodologias específicas para sua caracterização e determinação, assim como a determinação de prováveis impurezas [3].

Metodologias como a espectrometria no ultravioleta/visível ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o doseamento de princípios ativos necessitam de muitas etapas de pré-tratamento da amostra [4]. Para a atual necessidade (análise de fármacos) estas etapas podem comprometer toda uma linha de produção, pois a demora na obtenção dos resultados pode permitir que uma produção termine sem que a análise seja concluída, bem como podem aumentar o custo das análises de controle .

Sobre o controle e doseamento, a utilização de uma metodologia simples e, principalmente, de menor custo e rápida, pode antecipar a detecção e correção de eventuais problemas que podem acontecer no momento da produção de produtos farmacêuticos, assim como também podem auxiliar aos órgãos governamentais de controle e fiscalização, a analisar e identificar medicamentos que possam estar sendo vendidos adulterado/falsificados ou fora dos padrões aceitáveis.

Como técnica que pode agregar essas características, a espectroscopia no infravermelho oferece a possibilidade de obtenção de espectros com relativa rapidez, além de fornecer informações interessantes, do ponto de vista analítico, tanto qualitativo quanto quantitativo. Esta técnica tem sido utilizada cada vez mais para fins quantitativos, antigamente, era restrito somente à análises qualitativas. Um fator importante é o custo relativamente baixo de um espectrômetro de infravermelho, além de ser uma técnica não destrutiva.

A técnica de refletância total atenuada (ATR), que é utilizada para obtenção de espectros de infravermelho, simplifica e muito, a obtenção dos espectros, já que basta a simples colocação da amostra sólida sobre o dispositivo, não necessitando de maiores operações. Com o uso deste acessório, não é necessária a confecção de pastilhas de brometo de potássio, como nos sistemas convencionais. Este dispositivo permite, em questão de poucos minutos, a obtenção de espectros com definição satisfatória [3].

A quimiometria, associada à espectroscopia no infravermelho, é uma ferramenta que, cada vez mais, torna-se um ramo essencial para a química analítica. A análise quimiométrica considera que espectros de infravermelho, assim como qualquer outro de tipo de análise espectrométrica, fornecem mais informações do que apenas as absorvâncias medidas. Esta ferramenta pode fornecer resultados satisfatórios e interessantes para análises de rotina. Tais informações podem ser utilizadas tanto para a dosagem de certo constituinte, bem como a presença de impurezas. O método que associa a espectroscopia no infravermelho com a quimiometria pode apresentar variações que são equivalentes às obtidas por métodos oficiais, porém em tempo e custo muito reduzidos [3].

Como método quimiométrico, a calibração multivariada, através do método dos mínimos quadrados parciais (PLS), pode ser empregada para construção de modelos que permitem a predição de determinados constituintes em amostras, independente do estado físico na qual se encontram, com mínimos erros e com rapidez satisfatória. Com a obtenção de modelos de calibração multivariada, análises rápidas, como por exemplo, com a espectroscopia no infravermelho, podem ser facilmente adaptadas a análises de rotinas em laboratórios de controle de qualidade. Assim modelos de calibração multivariada com infravermelho podem representar boas alternativas para o monitoramento de linhas de produção ou o desenvolvimento de equipamentos específicos até mesmo portáteis e mais baratos para os órgãos de fiscalização sanitária [3].

Desta maneira, neste trabalho é proposto a utilização de um modelo de calibração multivariada que utiliza a espectroscopia no infravermelho próximo para o doseamento de comprimidos de diclofenaco de sódio, medicamento muito utilizado no combate a inflamações, em diferentes dosagens e proveniente de diferentes fabricantes.

2 – Objetivos

2.1 – Objetivo Geral

Aplicar a calibração multivariada, utilizando dados de reflectância difusa no infravermelho próximo, ao controle de qualidade de comprimidos de diclofenaco sódico.

2.2 – Objetivos específicos

Determinar o teor de diclofenaco sódico em comprimidos utilizando calibração multivariada e dados de reflectância difusa no infravermelho próximo.

Validar a metodologia para a determinação de diclofenaco sódico em comprimidos utilizando calibração multivariada e dados de reflectância difusa no infravermelho próximo em comparação ao método oficial que utiliza dados de absorção no ultravioleta.

3 - Revisão da Literatura

3.1 - Espectroscopia no Infravermelho

3.1.1 - Histórico

A espectroscopia compreende o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria, cujo principal objetivo é a determinação dos níveis de energia e transições de espécies atômicas e moleculares. A espectroscopia vibracional divide-se em duas diferentes técnicas: a espectroscopia de absorção no infravermelho e a espectroscopia Raman [5, 9].

Sir Willian Herschel, um astrônomo, descobriu a radiação Infravermelha em 1800. Sua principal descoberta no campo da astronomia foi o planeta Urano, em 1781, além de várias estrelas e nebulosas. [6, 9]. Sir Herschel passou a estudar as propriedades físicas da radiação eletromagnética na região do visível, pois acreditava que a compreensão de tais propriedades poderia ajuda-lo em seus estudos a respeito dos corpos celestes. Sabendo que a luz solar continha todas as cores do espectro, e que era também uma fonte de calor, Herschel queria descobrir qual, ou quais, eram as cores responsáveis pelo aquecimento dos objetos. Idealizou um experimento usando um prisma e termômetros com bulbos pretos onde mediu as temperaturas das diferentes cores. Herschel observou um aumento de temperatura à medida que movia o termômetro de violeta para o vermelho no espectro criado pela luz do sol atravessando o prisma. Descobriu que a temperatura mais quente ocorria, de fato, além da luz vermelha. A radiação que causou esse aquecimento não era visível; Herschel denominou essa radiação invisível como “raios caloríficos”[6, 9]. A descoberta de Herschel demonstrou existir formas de luz que não podem ser observadas pelo olho humano e abriu caminho para a investigação de outras faixas espectrais como a região do ultravioleta e o infravermelho próximo, médio e distante [6, 9].

Inicialmente os trabalhos envolvendo espectroscopia no Infravermelho limitavam-se ao estudo de poucas espécies químicas, as quais eram identificadas por infravermelho médio na caracterização de bandas de absorção de grupos orgânicos [6, 9].

A espectroscopia no infravermelho teve, por ocasião da segunda guerra mundial, sua primeira aplicação no monitoramento de qualidade e controle da produção na indústria petroquímica. Combustíveis, lubrificantes e polímeros foram os principais compostos monitorados pelos equipamentos utilizando a região do MIR [10, 12, 17].

Com o aparecimento de espectrofotômetros dispersivos, no fim dos anos 50, apenas algumas espécies químicas, devido às limitações instrumentais da época, eram identificadas e quantificadas através da espectroscopia em química [10, 11, 12, 18].

Situada depois da região do visível, a região espectral do infravermelho abrange a radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 12.800 a 10 cm^{-1} ou comprimento de onda de 780 a 100.000 nm. Esta região é dividida basicamente em três faixas: a radiação no infravermelho próximo – NIR (do inglês, *Near Infrared*) que compreende de 12.800 a 4.000 cm^{-1} ; a radiação no infravermelho médio - MIR (do inglês,

Middle Infrared) de 4.000 a 200 cm^{-1} ; e a radiação no infravermelho distante - FIR (do inglês, *Far Infrared*) que compreende de 200 a 10 cm^{-1} . Os limites aproximados para cada região são apresentados na Tabela 1 [5, 8, 10, 11, 12].

Tabela 1 - Regiões espectrais do Infravermelho. (Fonte: VALDERRAMA, 2005. p. 21)

Região	Intervalo de número de onda ($\bar{\nu}$), cm^{-1}	Região em comprimento de onda (λ), nm	Região de frequência (ν), Hz
Próximo (NIR)	12.800 a 4.000	780 a 2.500	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Médio (MIR)	4.000 a 200	2.500 a 5.000	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Distante (FIR)	200 a 10	5.000 a 100.000	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$

Não existe um limite específico definindo onde termina uma região e começa outra, é comum encontrar na literatura diferentes valores para cada faixa, como a do NIR: 800 a 2.500 nm [10, 13], 780 a 2.500 nm [10, 14], 770 a 3000 nm [11], 750 a 2500 nm [10], 715 a 2500nm [10], entretanto, a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) define a região NIR sendo de 780 a 2500 nm [10, 16].

A região do MIR era a mais utilizada para aplicações qualitativas, devido a possibilidade de se observar bandas de absorção de grupos orgânicos específicos como N-O, N-H, C-H, O-H, C-C, C=C e S-H [10, 11, 18].

A região do FIR é principalmente útil para estudos de compostos inorgânicos, onde as vibrações de estiramento e deformação angular de átomos metálicos e ligantes, tanto inorgânicos como orgânicos, têm vibrações que podem ser observadas abaixo de 650 cm^{-1} [10, 12].

A partir da década de 70, com o desenvolvimento dos espectrofotômetros com Transformada de Fourier (FT-IR), da informática, do interfaceamento de instrumentos eletrônicos com computadores e a introdução de recursos matemáticos mais sofisticados, as análises quantitativas expandiram-se para as regiões espectrais no NIR e MIR [10, 11, 12]]. Essa expansão desencadeou o interesse de vários grupos de pesquisas governamentais e industriais, visando ao desenvolvimento de metodologias de análise, tendo como consequência um impacto direto no aumento da produtividade industrial, redução de gastos e minimização de resíduos industriais [10, 11, 12]. Apesar de a região NIR ter sido detectada antes da região MIR, esta última foi a que ganhou maior aceitação, seu uso consagrou-se para identificação de grupos funcionais orgânicos. A região NIR foi negligenciada até por volta dos anos 80, quando essa ganhou maior atenção [10].

O trabalho pioneiro envolvendo exploração analítica na região do espectro NIR, datada de 1938, verificava a determinação de água em gelatina. Em seguida a espectroscopia NIR foi aplicada para a determinação de combustível. Inicialmente, visavam encontrar um comprimento de onda para aplicar a Lei de Lambert e Beer na determinação quantitativa. Esta idéia foi abandonada depois que Karl Norris reportou a adoção de modelos com mais de um comprimento de onda para os dados dos espectros com a concentração do analito [10].

Na década de 70, o grupo de pesquisa liderado pelo professor Karl Norris, atuando pelo Departamento de Agricultura dos estados Unidos, tornou-se o pioneiro na utilização do espectro NIR como uma ferramenta para determinações analíticas em amostras complexas e industriais, provando ser possível a aplicação do NIR para determinação de moléculas orgânicas, porém acompanhado de limitações tecnológicas da época [6, 10, 13, 14]. Norris e sua equipe investigaram tópicos como: sangue em ovos, maturação de melões, proteína e umidade em trigo e “dureza” de trigo [6, 10].

Os anos 90 foram marcados pela utilização da espectroscopia no MIR para a análise qualitativa e quantitativa de alimentos, onde a reflexão total atenuada (ATR), detecção fotoacústica e reflexão difusa (DRIFTS) foram introduzidas em análise de alimentos e utilização no controle industrial [10, 19]

A espectroscopia no infravermelho vem ganhando muito espaço nos laboratórios analíticos e em análises de controle de qualidade nos processos industriais, como indústrias farmacêuticas, de alimentos, têxteis, etc. [8, 10, 15].

A possibilidade de realizar medidas de amostras em todos os estados e formas como: gases, líquidos, sólidos, sistemas binários e terciários como as amostras semi-sólidas, pastas, comprimidos, géis e outras, faz com que as regiões do infravermelho sejam de fundamental importância [11, 12, 20].

3.1.2 – Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR)

As principais aplicações da região do infravermelho próximo (entre 12800 e 4000 cm^{-1}), encontram-se na análise quantitativa de materiais industriais e no controle de processos abrangendo as aéreas agrícolas e, farmacêuticas e petroquímicas. Uma das principais desvantagens do uso da técnica NIR é provavelmente, a baixa sensibilidade a constituintes em baixas concentrações, porém fornece resultados de maneira bastante rápida. Com o desenvolvimento dos espectrofotômetros com Transformada de Fourier, grande parte do problema encontrado nessa região foi resolvido, tornando a técnica muito mais acessível para o desenvolvimento de aplicações e pesquisas [5].

A região do NIR é caracterizada por conter bandas fracas e sobrepostas, tipicamente mais fracas (aproximadamente um fator de 10 a 100 vezes) que as bandas fundamentais do MID [5, 13]. Essas intensidades inferiores, se por um lado dificultam em parte a obtenção de medidas, por outro permite, por exemplo, o seu uso em amostras que apresentam alto teor de umidade e garante uma alta penetração da radiação em medidas de reflectância de amostras sólidas [20].

As bandas de absorção referentes aos sobretons ocorrem em aproximadamente metade e um terço do comprimento de onda fundamental. Como exemplo a ligação C-H, que tem no estado fundamental uma vibração de estiramento em 3200 nm, terá seu primeiro sobreton perto de 1600 nm e, seu segundo sobreton ao redor de 1070 nm [13].

A Tabela 2 ilustra as principais regiões espectrais do NIR e a natureza da transição vibracional associada a elas.

Tabela 2 - Atribuição das regiões espectrais às possíveis transições vibracionais (Fonte: COSTA FILHO, 2003. p. 94).

Região espectral (nm)	Natureza da transição vibracional
2200 - 2450	Combinação de estiramento C-H
2000 - 2200	Combinação de estiramento N-H, O-H
1650 -1800	Primeiro sobreton do estiramento C-H
1400 - 1500	Primeiro sobreton de combinações N-H, O-H
1100 - 1225	Primeiro sobreton do estiramento C-H
950 - 1100	Segundo sobretons de combinações N-H, O-H
850 - 950	Terceiro sobretons do estiramento C-H
775 - 850	Terceiro sobretons de combinações N-H, O-H

As análises feitas na região do infravermelho não geram subprodutos tóxicos, apresentam facilidade na preparação de amostras, além não destruir-los [5]. Para as regiões do infravermelho, em geral, é possível realizar medidas de amostras em todos os estados e formas como, gases, líquidos, sólidos, sistemas binários e terciários como as amostras semi-sólidas, pastas, géis e outras [7].

3.1.3 – Instrumentação

A instrumentação utilizada na obtenção dos espectros NIR é composta basicamente por cinco componentes: uma fonte de radiação contínua, um seletor de comprimento de onda (monocromador), um porta amostra, um detector de radiação que converte a energia luminosa em energia elétrica e um dispositivo para ler a resposta do detector, como mostra a Figura 3 [10, 12, 16, 69].

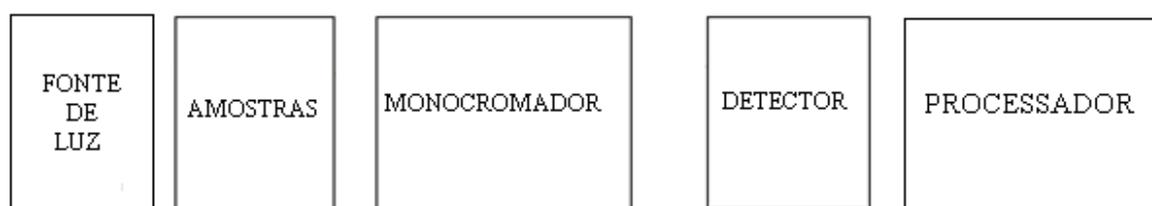


Figura 3 - esquema simplificado das principais partes de um espectrofotômetro

3.1.4 - Espectroscopia por Refletância Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier

inicialmente acreditava-se que as medidas espectrais podiam ser obtidas através da análise de uma porção de radiação refletida de maneira difusa por amostras sólidas através de um sinal de transmitância. A refletância difusa, a qual foi utilizada nesse trabalho, é uma

das várias maneiras para se realizar medida analítica na região NIR. A Figura 4 representa de maneira simplificada uma forma de medida em amostras sólidas [4].

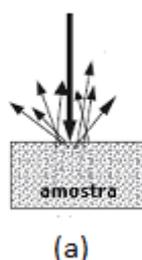


Figura 4 - Modo de medida na região NIR. (a) refletância difusa em amostra sólida.

As medidas de refletância difusa de amostras sólidas (Figura 4), como mencionado anteriormente, é um modo de medida característico para análises empregando a espectrometria NIR. Este modo de medida é apropriado quando a superfície do material reflectante é pouco absorvente no comprimento de onda incidente [4].

Este tipo de reflexão é a base das medidas de espectroscopia NIR de refletância difusa no qual o espalhamento e a absorbância de partículas sólidas contribuem para mudanças na intensidade do sinal. Conforme Simone simões 2008 página 10 devido à sua complexidade, não há teorias rigorosas sobre a refletância difusa. No entanto, uma série de teorias empíricas foram propostas, entre as quais a mais popular é a teoria de Kubelka-Munk como mostrou Simone Simões página 10 [4], e descrita a seguir.

No caso de amostras opacas de espessura infinita a função de Kubelka-Munk é descrita como segue, onde: R_{∞} é a refletância absoluta da amostra.

Esta teoria assume que a radiação incide sobre o meio dispersante sofre um processo de absorção e dispersão, simultaneamente. Deste modo, a radiação refletida pode ser descrita em função das constantes de absorção (K_a) e dispersão (s) de acordo com a equação 01.

$$f(R_{\infty}) = \frac{(1-R)^2}{2R_{\infty}} = \frac{K_a}{s} \quad 01$$

Em análises quantitativas, a Equação 01 pode ser descrita em função da concentração do analíto absorvente (c) de acordo com a equação 02.

$$f(R_{\infty}) = \frac{(1-R)^2}{2R_{\infty}} = \frac{K_a}{s} = \frac{ac}{s} \quad 02$$

onde a é a absortividade molar.

Na prática, ao invés da refletância absoluta R_{∞} é utilizada a refletância relativa R , que é a relação entre as intensidades de luz refletida pela amostra e pelo padrão. Este padrão deve ser um material estável, com refletância absoluta elevada e relativamente constante na região espectral do NIR, por exemplo, brometo de potássio, teflon, sulfato de bário, óxido de magnésio.

Reescrevendo a Equação 02 em termos de refletância relativa teremos a equação 03:

$$f(R_{\infty}) = \frac{(1-R)^2}{2R_{\infty}} = \frac{ac}{s}$$

03

Para amostras que seguem a Equação 03, o gráfico $f(R)$ em função da concentração é uma linha reta com coeficiente angular igual a a/s . Entretanto, se a matriz também absorve ou se o analito apresenta forte absorção, a refletância difusa não obedece a esta relação linear.

Assim a equação de Kubelka-Munk, como também a lei de Beer, é limitada e só pode ser aplicada para bandas de absorção de baixa intensidade. Esta limitação ocorre quando se utiliza a espectrometria NIR, pois não é possível separar a absorção do analito da absorção da matriz, ocorrendo desvios de linearidade. Uma alternativa muito utilizada é a aplicação de uma relação entre a concentração e a refletância relativa, análoga à lei de Beer de acordo com a equação 04.

$$\log \frac{R_{\text{padrão}}}{R_{\text{amostra}}} = \log \frac{1}{R_{\text{amostra}}} + \log R_{\text{padrão}} \cong \frac{ac}{s}$$

04

Para a radiação monocromática o log $R_{\text{padrão}}$ é constante e a Equação 4 pode ser escrita como mostra a equação 05.

$$A = \log \frac{1}{R} = ac$$

05

Onde, A é a absorbância aparente e a é uma constante que engloba os termos $1/s$ e $\log R_{\text{padrão}}$. Apesar de não ter as bases teóricas da equação de Kubelka-Munk, esta equação apresenta resultados muito satisfatórios nas aplicações da espectroscopia por refletância difusa.

3.1.5 - Aplicações da espectroscopia NIR

A espectroscopia NIR pode ser utilizada em varias áreas como por exemplos a indústria farmacêutica e cosméticos [25, 26] , polímeros [27] produtos petroquímicos [28] em produtos agrícolas [29], e entre outros produtos. A espectroscopia NIR apresenta algumas características que a torna uma boa alternativa para o melhoramento e rapidez nas análises como:

- Análise simultânea de mais de um parâmetro;
- Analise não destrutivas;
- Alta velocidade de processamento das informações e rápido fornecimento de resultados quantitativos;
- Não consomem reagentes químicos;
- Baixo custo.

Isso mostra que o uso da espectrometria NIR é uma realidade em varios setores da cadeia produtiva, podendo ser empregada diretamente na linha de produção, ou posteriormente no controle de qualidade tanto de matérias primas quanto de produtos finais.

3.1.6 - Espectrometria NIR na indústria farmacêutica

Muitos trabalhos científicos vêm sendo desenvolvidos visando a aplicação da espectrometria de infravermelho próximo [30]. Atualmente, esta técnica tem se apresentado como uma boa alternativa para a indústria farmacêutica para a identificação, quantificação e controle de parâmetros físicos e químicos, tanto da matéria-prima quanto do produto acabado. Inclusive, algumas agências reguladoras, como a Agência Européia para Avaliação de Produtos médicos (EMA/CVMP/961/01), o Grupo de Ciências Analíticas e Farmacêuticas (PASG) e farmacopeias (como por exemplo: a Farmacopeia Europeia e a Farmacopeia Americana) já estão adotando metodologias que utilizam a espectrometria NIR que, se apresenta como uma alternativa para análises de controle de qualidade de fármacos, considerando suas características vantajosas em relação aos métodos tradicionais.

3.2 – Espectroscopia ultravioleta

3.2.1 - Princípios básicos

A espectrofotometria visível e ultravioleta é um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas. É aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, na identificação do princípio ativo de fármacos [7].

A espectroscopia de absorção molecular é valiosa para a identificação dos grupos funcionais na molécula. Mais importante, entretanto, são as aplicações da espectroscopia de absorção visível/ ultravioleta para a determinação quantitativa de compostos contendo grupos absorventes [7].

A região ultravioleta do espectro é geralmente considerada na faixa de 200 a 400 nm,. As energias correspondentes a essas regiões são em torno de 150 a 72 k.cal.mol⁻¹ na região ultravioleta. Energias dessa magnitude correspondem, muitas vezes, à diferença entre estados eletrônicos de muitas moléculas [7].

A absorção da região ultravioleta depende, em primeiro lugar, do número de arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes. Como consequência, o pico de absorção pode ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está sendo estudada [7].

A espectroscopia de absorção molecular é baseada na medida da transmitância, T, ou absorvância, A, de soluções contidas em células transparentes com caminho óptico de b cm. Geralmente, a concentração de um analito que absorve radiação está relacionada linearmente com a absorvância, como mostra a lei de Beer, de acordo com a equação 6 [9].

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon \cdot b \cdot c \quad 06$$

Onde T é a transmitância, P₀ é a potência radiante incidente, P é a potência radiante transmitida, A é a absorvância, c é a concentração do absorvente, b é o caminho óptico e ε é a absorvância molar.

3.2.2- Lei de Beer

A equação 06 representa a lei de Beer. Um feixe paralelo de radiação monocromática com P₀ incidindo em um bloco perpendicular à sua superfície. Após percorrer uma espessura b do material que contém n átomos, íons ou moléculas absorventes, sua potência decresce para P como resultado da absorção [7].

Limitações da lei de Beer

Poucas exceções são encontradas para a regra geral a qual estabelece que a absorvância está relacionada linearmente com o caminho óptico. Por outro lado, freqüentemente ocorrem desvios da proporcionalidade direta entre a absorvância medida e a concentração quando b é constante. Alguns desses desvios são conhecidos como desvios reais, são fundamentais e representam limitações reais da lei de Beer. Outros resultam da maneira como as medidas de absorvância são feitas (desvios instrumentais) ou são o resultado de mudanças químicas que ocorrem com variações de concentração - desvios químicos [7].

Desvios reais da lei de Beer

A lei de Beer descreve o comportamento da absorção de um meio que contém concentrações relativamente baixas do analito; assim, esta é uma limitação da lei. Em altas concentrações, geralmente mais de 0,01 mol/L, a extensão das interações soluto-solvente, soluto-soluto, ou as ligações de hidrogênio pode afetar o ambiente do analito e, assim, a sua absorvância. Por exemplo, em altas concentrações, a distância média entre moléculas ou íons responsáveis pela absorção diminui a ponto de cada partícula afetar a distribuição de cargas de suas vizinhas. Essas interações soluto-soluto podem alterar a capacidade dos analitos de absorver um determinado comprimento de onda de radiação. Como a extensão da interação depende da concentração, ocorrem desvios da relação linear entre absorvância e concentração. Um efeito semelhante pode eventualmente ser encontrado em um meio contendo baixas concentrações de absorventes, mas altas concentrações de outras espécies, especialmente eletrólitos. A proximidade entre íons e espécies absorventes altera a

absorvibilidade molar dos absorventes por meio de interações eletrostáticas, mas esse efeito é reduzido pela diluição das soluções [7].

Desvios químicos aparentes

Desvios aparentes da lei de Beer ocorrem quando um analito se associa, dissocia ou reage com um solvente para formar um produto com espectro de absorção diferente daquele do analito [7].

Desvios instrumentais devidos à radiação policromática

A lei de Beer se aplica estritamente quando são feitas medidas com fonte de radiação monocromática, mas na prática se utiliza fontes policromáticas associadas a um filtro para isolar uma banda aproximadamente simétrica de comprimentos de onda ao redor do comprimento de onda a ser utilizado. Se a banda de comprimentos de onda selecionada para as medidas espectrofotométricas corresponde à região do espectro de absorção no qual a absorvibilidade molar do analito é essencialmente constante, os desvios da lei de Beer são mínimos [7].

3.2.3 - Espectrofotômetros

Espectrofotômetros são instrumentos capazes de registrar dados de absorvância ou transmitância em função do comprimento de onda. Este registro é chamado de espectro de absorção ou de espectro de transmissão, segundo o dado registrado for de absorvância ou transmitância, respectivamente. O espectro de absorção é característico para cada espécie química, sendo possível a identificação de uma espécie química por seu “espectro de absorção” [7].

A característica mais importante dos espectrofotômetros é a seleção de radiações monocromáticas, o que possibilita inúmeras determinações quantitativas regidas pela Lei de Beer. Quando a região espectral usada é a ultravioleta/visível, são necessários componentes ópticos de quartzo e detectores altamente sensíveis capazes de detectar radiações nessa extensa faixa espectral em que atua o instrumento. Os espectrofotômetros, em geral, contêm cinco componentes principais: fontes de radiação, monocromador, recipientes para conter as soluções, detectores e indicadores de sinal [7].

Tipos de espectrofotômetros para região visível e ultravioleta

Os espectrofotômetros variam em sua complexidade e desempenho. Existem modelos simples e mais sofisticados, equipados com softwares especiais de acordo com a necessidade industrial. Os componentes dos espectrofotômetros estão relacionados com a

faixa do comprimento de onda, a exatidão e a precisão requeridos para as análises[9]. Podem ser de dois tipos:

1) Espectrofotômetros mono-feixe: ajusta-se a transmitância em 0 %, fechando o obturador entre a fonte de radiação e o detector. Após ocorre o ajuste de transmitância em 100 %. Coloca-se o solvente (branco) no caminho ótico, abre-se o obturador e varia-se a intensidade da radiação até que o sinal seja de 100 % de transmitância. Então substitui-se o recipiente com solvente pelo recipiente com a amostra e o percentual de transmitância da mesma é lido no indicador de sinal [7].

2) Espectrofotômetros de duplo-feixe: dois feixes de radiação são formados no espaço. Um feixe passa pela solução de referência (branco) até o transdutor e o segundo feixe, ao mesmo tempo, passa através da amostra até o segundo transdutor. Nos espectrofotômetros deste tipo o ajuste do 0 % é feito com a interrupção de radiação nos dois feixes e o 100 % de transmitância é ajustado com o solvente (branco) colocado no caminho ótico dos dois feixes [7].

3.2.4 - Recipientes

São usados como recipientes cubas ou cubetas retangulares de vidro ou quartzo, as cubetas de vidro são usadas quando se trabalha na região do visível. Para a região do ultravioleta, devem-se usar as cubetas de quartzo, que são transparentes à radiação ultravioleta, pois o vidro absorve a mesma [7].

3.2.5 - Procedimentos analíticos em espectrofotometria ultravioleta.

Análise qualitativa: pela análise da absorvância é possível determinar qual espécie química esta presente na amostra. Também é possível detectar contaminações ou processos de decomposição de matérias-primas pela comparação dos espectros de absorção da matéria e do padrão da mesma [7].

Análise quantitativa: a condição essencial para qualquer determinação por espectrofotometria no visível e ultravioleta é a observação da lei de Beer [9].

Outras condições como pH, técnicas de extração por solventes, ajuste do estado de oxidação, remoção prévia dos interferentes, controle da força iônica do meio, e as variações das temperaturas também são observadas [71, 72] .

3.3 - Quimiometria

Quimiometria pode ser definida como sendo a área da química que utiliza métodos e técnicas de cálculos matemáticos, estatísticos e de lógica formal para planejar ou selecionar procedimentos de medidas e experimentos que possam extrair o máximo de informação química, através da análise de conjuntos complexos de dados [9, 34].

Usualmente, as soluções dos problemas em química analítica eram obtidas através de métodos tradicionais de análises por via úmida como, titulação, precipitação, reações específicas, extração e etc, tais métodos tradicionais são ainda muito importantes, porém em alguns casos são considerados lentos e dispendiosos. A utilização de métodos matemáticos para extrair informações a partir de modelos desenvolvidos para os dados disponíveis foram inicialmente desenvolvidos e empregados em outras áreas do conhecimento. A partir de 1970, com o surgimento de métodos instrumentais computadorizados para a análise química, foi possível obter grande quantidade de informações de forma rápida e com boa qualidade. Tais dados, além de grandes dimensões, são às vezes, complexos e variados, não podendo dessa maneira ser explicados por modelos teóricos da química clássica [9, 34, 35].

Nos últimos 20 anos, os notáveis avanços da informática em termos de “Hardware” e “Software” proporcionaram um grande salto na aquisição de dados, tornando possíveis análises complexas de soluções e substâncias. Este avanço beneficiou fortemente a quimiometria, que pode ser estendida para aplicações envolvendo análises *on-line* e *inline* de variáveis de processos que antes dependiam de análises com resposta lenta e resultados insatisfatórios [39, 40].

Com esta evolução, a quantidade de informações também cresceu, gerando uma massa de dados gigantesca que deve ser tratada, analisada e correlacionada com a propriedade desejada. Nesse contexto, torna-se necessário investir em técnicas de calibração capazes de correlacionar de modo robusto os dados obtidos com as propriedades de interesse [40].

A quimiometria é usada para a classificação de amostras de acordo com suas propriedades, assim como a quantificação de variáveis e até mesmo para previsão de resultados, através de análises de resultados relevantes. No entanto é importante não esquecer dos princípios químicos implícitos na quimiometria, ou seja, a resposta precisa está relacionada com propriedades químicas das amostras, caso contrario o método quimiométrico foi mal aplicado ou não foi planejado adequadamente [10].

A quimiometria divide-se em algumas áreas principais, muito pesquisadas e aplicadas atualmente, como: processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, calibração multivariada, monitoramento e modelagem de processos multivariados e métodos de inteligência artificial [9, 36, 37].

A construção de modelos de regressão a partir de dados de primeira ordem, ou seja, dados que podem ser representados através de um vetor para cada amostra, tem sido a

principal linha de pesquisa da quimiometria aplicada à química analítica. A construção desses modelos é denominada de calibração multivariada [9, 38].

3.3.1- Técnicas de Calibração

Existem várias técnicas disponíveis para os tratamentos dos dados espectrais, sendo impossível definir uma regra universal para qualquer estudo de calibração envolvendo dados de espectrofotometria NIR. Dentre as técnicas mais conhecidas destacam-se MLR (*Multiple Linear Regression*), PCA (*Principal Component Analysis*), PCR (*Principal Component Regression*), CLS (*Classic Least Squares*), PLS (*Partial Least Squares*), dentre outras, mas sem sombra de dúvidas a mais atualmente utilizada é a PLS [39, 40].

Os métodos multivariados são escolhidos de acordo com os objetivos da pesquisa, pois sabe-se que a análise multivariada é uma análise exploratória de dados, prestando-se a gerar hipóteses, e não tecer confirmações a respeito dos mesmos, o que seria uma técnica confirmatória, como nos testes de hipóteses, nos quais se tem uma afirmação a respeito da amostra em estudo. Embora, “as vezes, possa ser utilizada para confirmação dos eventos [43]. Quando o interesse é verificar como as amostras se relacionam, ou seja, o quanto estas são semelhantes, segundo as variáveis utilizadas no trabalho, destacam-se dois métodos, que podem ser utilizados: a análise de agrupamentos hierárquico e a análise fatorial com análise de componentes principais [43].

A partir desse momento abordaremos as técnicas quimiométricas utilizadas nesse trabalho, quais sejam, PLS (*Partial Least Squares*) e os pré-tratamentos empregados nos dados espectrais, sendo assim, é preciso entender melhor como são preparados os dados a serem processados.

Para cada amostra é selecionado um espectro (ou na maioria das vezes a média de vários espectros), o qual é organizado sob a forma de uma matriz M_{ij} que corresponde ao valor da absorvância da amostra ‘i’ no comprimento de onda ‘j’.

Como por exemplo, para o dado espectral X (que pode ser absorvância, transmitância, segunda derivada da absorvância, etc) temos:

$$M = \begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1j} \end{bmatrix}$$

Para duas amostras de X teríamos:

$$M = \begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1j} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2j} \end{bmatrix}$$

E assim sucessivamente como mostrou Araujo, 2007 [49].

De modo análogo, organiza-se o conjunto de variáveis desejadas ou analito sob a forma de um conjunto de dados N , que será utilizado na derivação das equações de correlação com a matriz M . Em particular, os elementos da matriz N representam o valor da propriedade ‘j’ da amostra ‘i’. As técnicas de calibração estabelecem uma relação

matemática entre as duas matrizes, para obter uma melhor descrição da variável de interesse, sendo que após concluído, deve-se obter de qualquer amostra do mesmo composto ou similar valores próximos para a propriedade calibrada [40].

A organização dos dados na calibração multivariada a partir de dados espectroquímicos pode ser ilustrada como mostrou “Simone Simões” página 18 e está ilustrado na Figura 8 abaixo [4].

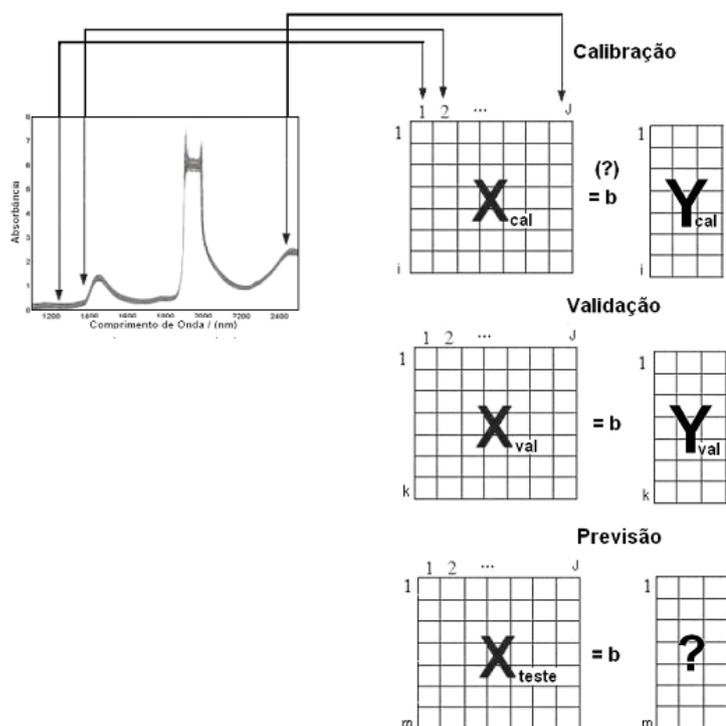


Figura 5- Organização dos dados na calibração multivariada.

3.3.1.1 - PLS

A técnica de regressão por mínimos quadrados parciais (do inglês *Partial Least Squares Regression – PLS*) foi introduzida por Wold (1975) e, geralmente, apresenta um grande poder de previsão [48]. Onde durante a etapa de calibração, a modelagem PLS utiliza a informação da matriz de dados X , que pode ser espectros ou outro tipo de dados, e da matriz Y , que pode ser concentração ou outra variável investigada, obtendo-se novas variáveis denominadas variáveis latentes, fatores ou componentes [41]. É considerado o método mais utilizado para a construção de modelos de calibração multivariada. Tal método não requer o conhecimento de todos os componentes que compõem as amostras, sendo possível realizar a previsão de amostras externas mesmo na presença de interferentes [9].

O método PLS foi originalmente desenvolvido para análise de dados na área da economia, tendo sido “adotado” pelos químicos, o qual tem uma grande aplicação em química analítica, podendo ser utilizado em diversos tipos de análises química, sendo hoje o método de calibração mais utilizado em química analítica [38].

No PLS o procedimento é realizado em três etapas: montagem da matriz de dados X a partir dos dados espectrais e Y a partir das propriedades investigadas; Seleção das regiões de interesse ao sistema, através de combinações lineares das colunas da matriz X, e das combinações lineares da matriz Y; Obtenção de uma relação matemática entre as matrizes X e Y [48, 49].

3.3.2 - Processamento e Tratamento dos Dados Espectrais

Atualmente, existe um grande número de trabalhos utilizando a espectroscopia no infravermelho em análises quantitativas. Porém, apesar da espectroscopia no infravermelho fornecer um grande número de dados, parte destes não possuem informações correlacionadas diretamente com o(s) analito(s), o que pode ocasionar distorções ao modelo, e consequentemente a conclusões errôneas nas análises [60].

O tratamento dos dados é aplicado antes da fase de calibração para melhorar a eficiência do método, produzindo um modelo de regressão com a melhor capacidade de previsão de novas amostras.

Os sinais analíticos são os dados obtidos de procedimentos e técnicas analíticas. Tais sinais provenientes de instrumentos apresentam-se misturados com ruídos e com informações não relevantes, o que dificulta a interpretação e modelagem das propriedades associadas a esses. Por isso, faz-se o uso de processos matemáticos a fim de solucionar ou minimizar efeitos devido a variações aleatórias ou sistemáticas que não estão relacionadas ao parâmetro de interesse. Diversos pré-tratamentos da resposta (sinal medido) têm sido relatados na literatura, como por exemplo: normalização, correção de linha base, cálculo da derivada, alisamento, filtragem digital para remoção de ruído, correção multiplicativa de sinal.

Determinações quantitativas a partir de espectros obtidos no infravermelho podem apresentar problemas de deformação da linha de base, variações no caminho óptico, ruídos, entre outros [57,63, 64, 69].

Os espectros NIR devem ser convenientemente pré-processados e pré-tratados, de modo que reduzam informações indesejadas. No entanto informações espectrais importantes podem ser significativamente removidas na etapa de pré-processamento devendo essa etapa ser realizada com cautela [10, 69]. Alguns métodos usados nessa etapa são: centrar os dados espectrais na média; escalonamento (ou escalamento) pela variância e o autoescalamento dos dados (combinação dos dois métodos anteriores). Alguns métodos usados para o pré-tratamento dos espectros são: suavização e remoção de ruído instrumental, primeira e segunda derivadas [10, 70].

Os dados originais do conjunto de calibração e validação apresentam, muitas vezes, problemas de espalhamento e variação de linha base que precisam ser corrigidos se eles não

contiverem informação relevante. Os espectros de validação devem receber o mesmo tratamento do que aqueles de calibração por serem idênticos [51].

3.3.2.1 - Filtro de Savitsky-Golay

Basicamente, o filtro de Savitsky-Golay ajusta um polinômio a certa janela com um número fixo de pontos do espectro. O valor dado pelo polinômio no ponto de interesse corresponde ao valor filtrado. Em seguida, há um deslocamento de um ponto nesta janela, ajustando-se outro polinômio (da mesma ordem), e assim sucessivamente, ocorre o deslocamento até o final do espectro [60].

3.3.2.2 - Correção do Espalhamento Multiplicativo (MSC)

A não homogeneidade da amostra, principalmente pelas diferenças de granulometria, geometria, empacotamento e orientação das partículas, provoca durante a aquisição dos espectros por técnicas de reflexão fenômenos não desejados, como por exemplo, o espalhamento da luz. A presença de ruídos das mais diversas origens, que acompanham os sinais analíticos obtidos por técnicas instrumentais, pode dificultar a interpretação e assim, etapa de modelagem das propriedades associadas aos sinais espectrais [10, 18, 15, 57].

Para corrigir o efeito do espalhamento de luz presente nos espectros obtidos por técnicas de reflectância, utiliza-se o método de Correção do Espalhamento Multiplicativo – MSC (do inglês, MultiplicativeSignalCorrection), originalmente chamada de multiplicativescatter (ou scattering) correction[10]. Tal método é um processo matemático que minimiza a interferência relativa ao espalhamento de luz corrigindo a linha base dos espectros de reflectância difusa de modo que todos os espectros possuam o espalhamento “ideal” (entenda-se ideal como o espalhamento médio de todos os espectros formadores na matriz de dados X, assim sendo, um espectro de referência) [10].

O procedimento realizado pela técnica inicia-se calculando o espectro médio \bar{x} , daí, para cada espectro individual x_i , os parâmetros a_i e b_i são estimados por regressão em \bar{x} , resultando na equação da reta do tipo apresentado pela equação 18 [8, 10, 64].

$$X_i = a_i + Xb_i \quad 18$$

Por fim, os coeficientes linear (a_i) e angular(b_i) estimados são utilizados para corrigir cada um dos espectros originais, conforme equação 19 [8, 19, 64].

$$X_{i \text{ corrigido}} = X_i - \frac{a_i}{b_i} \quad 19$$

3.3.2.3 - Correção do Espalhamento Multiplicativo Estendido (EMSC)

Outro método que permite corrigir espalhamentos de sinais é a Correção do Espalhamento Multiplicativo Estendido (EMSC - do inglês, Extended multiplicative signal correction), Desenvolvido por Martens et al. esse método de pré-processamento permite a separação dos efeitos físicos de espalhamento de luz dos efeitos químicos (vibracional) de absorção da luz no espectro [10, 65, 66, 67, 68]

Esta técnica é capaz de estimar e separar efeitos físicos multiplicativos (tamanho da amostra, espalhamento de luz) dos efeitos químicos (absorbância de analitos e interferentes) e físicos (mudança de temperatura, variações de linha base, etc.) adicionais [10, 67].

A EMSC também pode ser usada para remover efeitos de interferentes físicos e químicos identificados, porém indesejados, enquanto mantendo identificados, mas efeitos desejados como também efeitos indesejados nos dados. Por esses propósitos, a EMSC permite o uso de conhecimento prévio sobre o sistema e seus componentes (constituintes espectrais) na correção, que pode às vezes ser bem útil e bons rendimentos nos resultados de calibração [10, 67, 68].

A EMSC parece ser aplicável para diferentes tipos de dados espectroscópicos (UV, VIS, NIR, IR, Raman), cromatografia, eletroforeses e dados sensoriais [10, 67].

3.3.2.4 - Derivadas

A inclinação e desvios da linha de base podem ser removidos pela aplicação de derivadas. As linhas de base da curva que apresentam tais características podem ser aproximadas por um modelo linear como mostra a equação 20.

$$A = a\lambda + b \quad 20$$

Em que a absorvância A é influenciada por uma inclinação a e por um termo constante b , que representa o desvio da linha base. A derivada primeira da expressão acima fornece, a equação 21.

$$\frac{da}{d\lambda} = a \quad 21$$

e, deste modo, o termo constante b é removido.

Aplicando-se a derivada segunda sobre a equação 21 obtém-se, também, a exclusão do termo a , que representa a inclinação da linha de base, como mostra a equação 22.

$$\frac{d^2A}{d^2\lambda} = 0 \quad 22$$

A equação 22 revela que, pela aplicação da segunda derivada, uma completa regularização da linha de base é obtida.

Os gráficos resultantes das derivações não possuem mais a mesma forma dos espectros originais, guardando as características inerentes das derivadas. Os métodos de regularização de linha base pela aplicação de derivadas apresentam a desvantagem de diminuir a razão sinal/ruído e assim, quando os espectros apresentam regiões ruidosas, deve-se realizar um alisamento prévio eficiente (este pode ser facultado uma vez que a derivada de Savtzyk-Golay é acompanhada de um filtro) [63].

Vários algoritmos têm sido empregados para o cálculo das derivadas, entre eles destacam-se a derivada de Norris e a derivada de Savtzyk-Golay[69], essa última, foi aempregada para a aplicação de primeira derivada nos espectros aqui em estudo visando encontrar o melhor modelo.

3.3.3 - Parâmetros que indicam a qualidade de um modelo multivariado

Alguns parâmetros, calculados com os resultados obtidos pelos modelos, indicam a eficiência do modelo utilizado. Estes parâmetros servem para fazer a escolha e seleção de modelos mais adequados à predição.

Alguns parâmetros que podem ser adotados como critério de seleções são: o coeficiente de correlação (R^2), o número de variáveis latentes, os valores do erro quadrático padrão de validação cruzada (RMSECV), erro quadrático padrão de predição (RMSEP) e o erro padrão de calibração (SEC). Estes parâmetros permitem escolher, com segurança diferentes modelos quanto a capacidade de predição para amostras externas. RMSECV é calculado segundo a equação 23 , onde y_r é o valor de referência e y_p é o valor predito pelo modelo.

A mesma expressão matemática serve para calcular o SEC e o RMSEP.

$$RMSECV = \frac{\sqrt{\sum (Y_r - Y_p)^2}}{n} \quad \text{eq.23}$$

Para o RMSECV, o valor predito é obtido através do modelo construído com todas as amostras menos a amostra predita. Para o RMSEP, os valores de predição são para amostras não contidas no set de calibração. Para o SEC, os valores são preditos após a construção do modelo com todas as amostras, ou seja, o modelo faz a predição para as todas as amostras de calibração de uma única vez.

A análise do valor de R^2 nos mostra a correlação dos pontos da curva de calibração, quanto mais próximo a 1,00 este valor, mais correlacionado estão os valores com a reta obtida.

3.3.4 - Escolha do Número de Variáveis Latentes

O número de variáveis latentes utilizadas em um modelo é de fundamental importância nos resultados a serem obtidos. A utilização de um número menor de variáveis latentes poderá fornecer resultados não satisfatórios, uma vez que toda a informação disponível dos dados originais não estará sendo utilizada. Ao passo que se for utilizada uma quantidade muito grande de variáveis latentes, ocorrerá a modelagem de ruídos, podendo ocasionar em problemas no modelo [9].

Para a determinação do número correto de variáveis latentes (LV), do inglês Latent Variables, o método mais utilizado consiste no método de Validação Cruzada (CV – do inglês, Cross Validation). Tal método é baseado na habilidade de previsão de um modelo construído por parte de um conjunto de dados, seguido pela previsão do restante do conjunto de dados, que é realizada pelo modelo construído [9].

A validação cruzada pode ser realizada em blocos, ou seja, um número determinado de amostras é deixado de fora no processo de construção do modelo e a seguir essas amostras são previstas pelo modelo construído, ou ainda por um caso conhecido como “leave-one-out” (deixe uma fora por vez), em que uma amostra é deixada de fora no processo de construção do modelo e a seguir essa amostra é prevista pelo modelo construído. Em ambos os casos, o processo é repetido até que todas as amostras tenham sido previstas e a raiz quadrada do erro quadrático médio da validação cruzada (RMSECV) é calculada [9, 42].

O cálculo é realizado para o número de componentes de 1 até A, e os resultados de RMSECV são apresentados em um gráfico em função do número de LV. O comportamento típico para esses gráficos é a observação de um mínimo ou um patamar, que indica a melhor dimensionalidade do modelo de regressão, ou seja, o melhor número de LV que produziu o menor erro de previsão sem perda significativa da variância dos dados [9, 61, 62].

3.3.5 - Escolha dos subconjuntos de calibração, validação e previsão

3.3.5.1 - Algoritmo Kennard-Stone (KS)

O algoritmo KS tem como objetivo selecionar um subconjunto significativo em um conjunto N de amostras. Para assegurar a uniformidade de distribuição de cada subconjunto ao longo do espaço de dados X (respostas instrumentais), o KS segue o procedimento stepwise no qual uma nova seleção é feita nas regiões do espaço longe das amostras já selecionadas. Para este propósito, o algoritmo emprega a distância Euclidiana $d_x(a,b)$ entre os vetores X de cada par (a,b) de amostras calculado de acordo com a equação 24.

$$d_x(a, b) = \sqrt{\sum_{j=1}^J [X_a(j) - X_b(j)]^2}; \quad a, b \in N \quad 24$$

Para dados espectrais, $X_a(j)$ e $X_b(j)$ são as respostas instrumentais no j -ésimo comprimento de onda para as amostras a e b , respectivamente, e_j denota o número de comprimentos de onda no espectro. A seleção começa tomando o par (a_1, a_2) de amostras nas quais a distância $d_x(a_1, a_2)$ é maior. A cada iteração subsequente, o algoritmo seleciona a amostra que exibe a maior distância mínima em relação a uma amostra já selecionada. Cada procedimento é repetido até que o número de amostras especificado pelo analista seja alcançado [4, 73].

4 - Parte Experimental

4.1 - Amostragem

Foram adquiridas 18 caixas de diclofenaco sódico e numeradas de 1 a 18, sendo chamado a caixa 1 de A1, a caixa dois de A2, e assim sucessivamente até a A18. De cada caixa foram escolhidos aleatoriamente 5 comprimidos para representar a amostra (caixa) e nomeados com "C" para comprimido e o número de ordem de análise, ficando assim: para o primeiro comprimido retirado de cada caixa chamou-se de C01, para o segundo chamou-se de C02 e assim sucessivamente. Então a nomenclatura dos comprimidos ficou assim: para o primeiro comprimido da amostra A1 ficou A1C01, para o segundo A1C02, para o quarto comprimido da amostra A10 ficou A10C04 e assim sucessivamente para todas as 18 caixas totalizando 90 comprimidos conforme anexo A.

4.2- Materiais Utilizados

4.2.1 - Vidrarias e acessórios

Balões volumétricos de 50 e 200 ml, berquers, funil, balança analítica, cadinho ..., espátula, papel de filtro todos disponíveis no laboratório de química analítica UFRN.

4.2.2 - Reagentes utilizados

A- Diclofenaco sódico padrão disponibilizado pelo departamento de Farmácia da UFRN.

B - Álcool Metílico (metanol) PA

C - Amostras

Todos os Comprimidos de diclofenaco sódico foram adquiridos nas farmácias de natal.

4.3. – Metodologias Experimentais

4.3.1 - Obtenção dos espectros

Foram colhidos os Espectros na faixa do infravermelho próximo, usando um espectrômetro (Bomem), MB-160 DFT-NIR, com uma resolução espectral de 8cm⁻¹, usando o modo de reflectância difusa. Registrou-se os espectros em absorvância versus número de onda. Os espectros foram salvos em formato ASC para a transferência dos dados ao software e posterior confecção da matriz dos dados para análise multivariada.

4.3.2 - Determinação do teor de diclofenaco em comprimidos por espectroscopia na região do ultravioleta.

De acordo com a Farmacopeia brasileira 4ª Edição o doseamento deve ser feito por: A-espectrofotometria no ultravioleta ou B-cromatografia líquida de alta eficiência

Nesse trabalho foi utilizado espectrofotometria no ultravioleta por que é uma técnica relativamente mais simples e disponível (o equipamento) no laboratório de química analítica (instrumentação) da UFRN.

Farmacopeia brasileira 4ª Edição

- A. Por espectrofotometria no ultravioleta (V.2.14.-3). Pesar e pulverizar 20 comprimidos. Transferir quantidade do pó equivalente a 50 mg de diclofenaco sódico para balão volumétrico de 200 ml. Adicionar cerca de 100 ml de metanol. Deixar a solução em banho de ultra-som por 15 minutos, completar o volume com o mesmo solvente, homogeneizar e filtrar. Diluir, sucessivamente, em metanol, até concentração de 0,00125% (p/V). Preparar solução padrão na mesma concentração, utilizando o mesmo solvente. Medir as absorvâncias das soluções resultantes em 285 nm, utilizando metanol para ajuste do zero. Calcular o teor de C₁₄H₁₀Cl₂NNaO₂ na amostra, a partir das leituras obtidas.

Observação: Cada comprimido deve conter, no mínimo, 90,0% e, no máximo, 110,0% da quantidade declarada de C₁₄H₁₀Cl₂NNaO₂.

Nesse trabalho não foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima, tendo em vista que esse procedimento é o utilizado pela indústria que não pode analisar muitas unidades individualmente, assim como também como nesse trabalho foi necessário adquirir um número considerável de amostras o demandaria uma despesa relativamente grande com a aquisição de varias caixas de comprimidos, resolveu-se então fazer a determinação de 5 comprimidos de 18 caixas adquiridas, totalizando 90 comprimidos que formam o conjunto

de amostras relatado nesse trabalho. Foi utilizado espectroscopia no ultravioleta conforme procedimento descrito abaixo.

4.3.2.1 - Curva de Calibração

Procedimento:

Inicialmente obteve-se uma curva de calibração obedecendo os limites da lei Beer, como segue:

1º preparação de uma solução padrão inicial com concentração de 200 mg/l. (pesou-se 0,0400 gramas de diclofenaco padrão, diluiu-se em 200 ml de metanol)

2º diluição da solução preparada inicialmente para concentrações de 2, 4, 8, 16, 20, 28 mg/l para obter a curva analítica.

3º Observando as absorvâncias a medida que aumenta-se a concentração das soluções. Certificando-se para não sair dos limites da lei de Beer.

Realizou-se a leitura das soluções preparadas anteriormente no espectrofotômetro na faixa de comprimento de onda de 190 – 400 nm (região do ultravioleta) conforme figura abaixo:

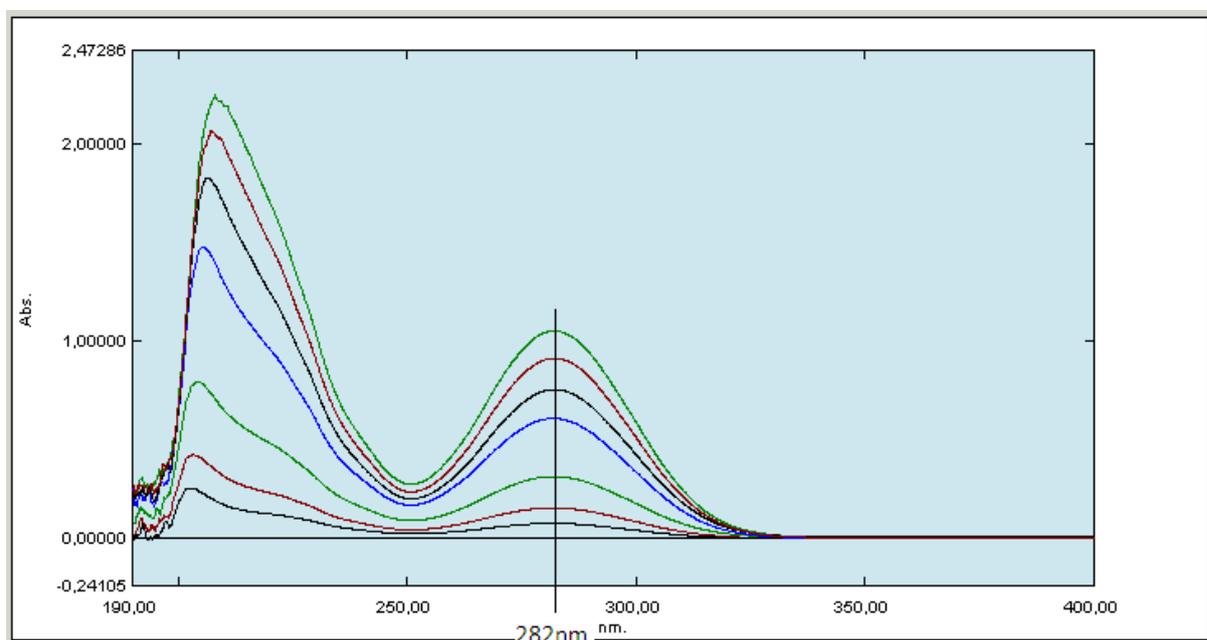


Figura 6 espectro com as leituras das absorvâncias das soluções padrões

Foi observado um pico de absorção entre 250 e 330nm onde o ponto máximo foi em 282nm, foi escolhido então esse comprimento de onda (282nm) para obtenção da curva analítica, medindo as absorvâncias das soluções anteriormente citadas (2, 4, 8, 16, 20, 24, 28mg/l) e organizado na tabela 3 abaixo.

Tabela 3 concentrações soluções padrão mg/l e respectivas absorvâncias

Concentração em mg/l	Absorbância em 282nm
2	0,0743
4	0,1528
8	0,3121
16	0,6063
20	0,7526
24	0,9111
28	1,0499

Utilizando o software excel do pacote Microsoft office 2010 com os dados da tabela 3 acima obteve-se a curva de calibração do diclofenaco sódico 2-28 mg/l conforme mostra figura 10.

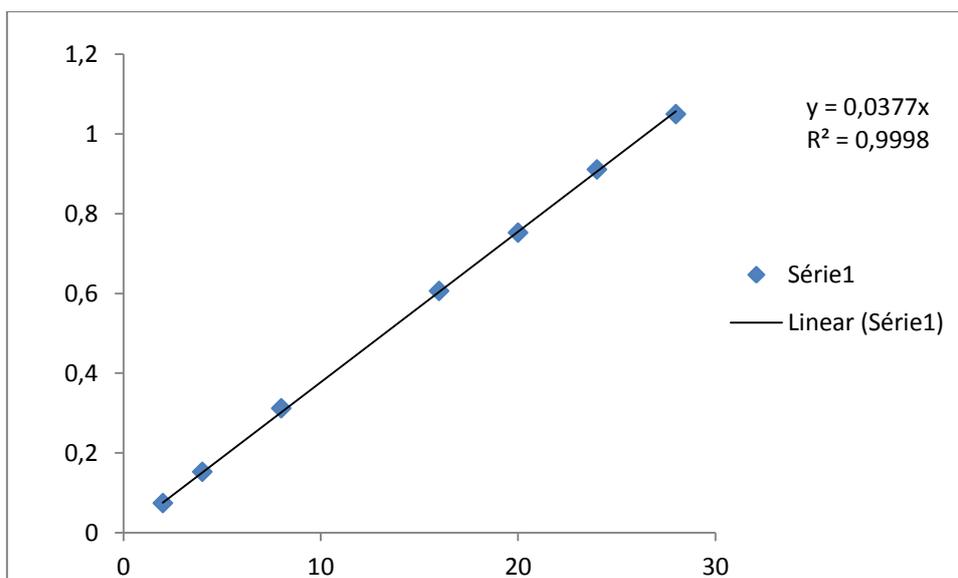


Figura 7 - Curva de calibração

Na curva de calibração acima obteve-se a equação seguinte:

$$Y=0,0377X \text{ e um coeficiente de correlação } R^2 = 0,9998$$

Onde,

Y é a absorbância observada da solução analítica

X é concentração

0,0377 é coeficiente angular da curva analítica,

Fazendo um paralelo com a lei de Lambert beer, $A=\epsilon bC$, onde A é a absorbância observada da solução analítica ϵ é o coeficiente de absorvidade molar da substância em análise, b é o caminho ótico e C é a concentração da solução analítica.

$$\text{Então } Y=A, \quad X=C, \quad \epsilon=0,0377$$

Se $b=1\text{cm}$ (caminho ótico), então $A=\epsilon bC= \epsilon C$

Rearranjando para isolar C,

$$C = \frac{A}{0,0377} \quad \text{eq.25}$$

Onde C, é a concentração da solução analítica.

4.3.2.2 - Procedimento de análise de diclofenaco sódico nos comprimidos

A determinação do teor de diclofenaco nos comprimidos utilizados nesse trabalho se deu por espectroscopia no ultravioleta conforme procedimento descrito abaixo e os teores estão no anexo B.

O Procedimento de análise realizado para todos os comprimidos foi o seguinte:

Cada comprimido foi pulverizado e retirou-se uma massa de aproximadamente 20mg (0,02 gramas) que foi mantida em contato com aproximadamente 40 ml de metanol em um bequer no ultrason por 15 minutos, após decorrido esse tempo, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml, utilizando-se filtração com papel qualitativo, após a filtração foi aferido o balão. Em seguida da solução preparada anteriormente retirou-se uma alíquota de 5 ml, que foi diluída no mesmo solvente para em um outro balão volumétrico de 50 ml e esta nova solução (solução analítica) foi utilizada para leitura de absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 282nm, utilizando cubeta de quartzo com largura (caminho ótico) de 1 cm. Os dados referente a estes experimentos estão no anexo A.

Deve-se salientar que os resultados apresentados no anexo B referentes ao teor de princípio ativo de diclofenaco em comprimidos é expresso em porcentagem de massa, como serão esses dados que serão carregados na matriz Y (na calibração multivariada), os resultados obtidos também serão dados na mesma unidade (porcentagem de massa).

4.4 - softwares utilizados

The Unscramble 9.7, Microsoft Excel 2010, Matlab R 2010.

5 – Apresentação e Discursão dos Resultados

5.1 - Modelagem dos dados espectrais

Os modelos de regressão apresentados nesse trabalho foram desenvolvidos utilizando-se o aplicativo do *The Unscrambler 9.7*, sendo baseado no método dos mínimos quadrados

parciais (PLS). Assim como, a classificação das amostras, por análise de componentes principais (PCA) e em todos os tratamentos foram realizados com o mesmo software.

Espectros originais

Os espectros foram obtidos em triplicata e feita a média dos espectros de cada comprimido como mostrado na figura 8 abaixo.

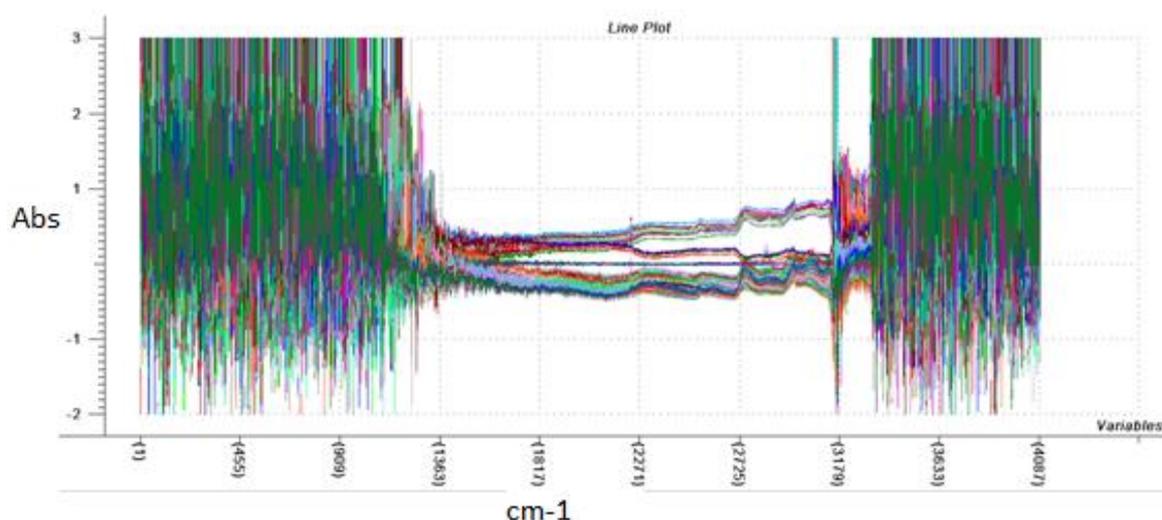


Figura 8 – gráfico dos espectros dos 90 comprimidos analisados

5.1.1 – Prétratamentos dos dados espectrais

Abaixo estão especificados cada tratamento realizado e os respectivos gráficos.

Inicialmente os espectros com a média de cada comprimido foram transformados de número de onda (cm^{-1}) para comprimento de onda (nm) resultando no espectro abaixo na figura 9.

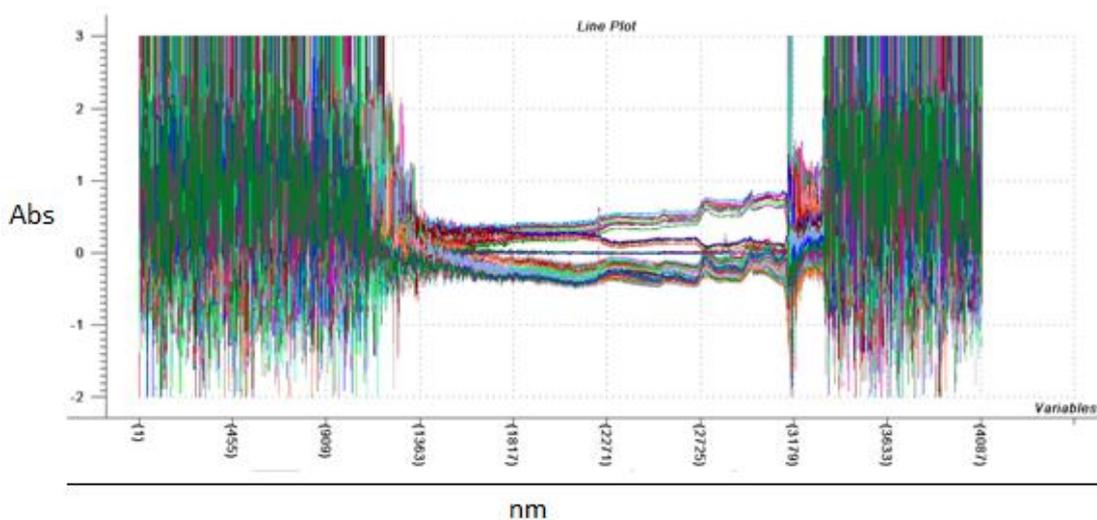


Figura 9 - gráfico com média dos espectros NIR de todos os 90 comprimidos utilizados nesse trabalho

Seleção das variáveis

Da região varrida pelo espectrofotômetro, observada na figura 18 retirou-se as regiões espectrais que não continham informações relevantes sobre as amostras, com também ruídos das mais diversas origens que acompanham os sinais analíticoa.

Sabe-se que a presença desse tipo ruído pode dificultar a modelagem das propriedades de interesse no sinais espectrais, sendo necessário minimizar ou eliminar esse ruídos.

Nos modelos testados, a região espectral utilizada na faixa entre 951 nm a 2706 nm como mostrado na figura 10 abaixo o qual mostra os espectros NIR excluídos as regiões ruidosas.

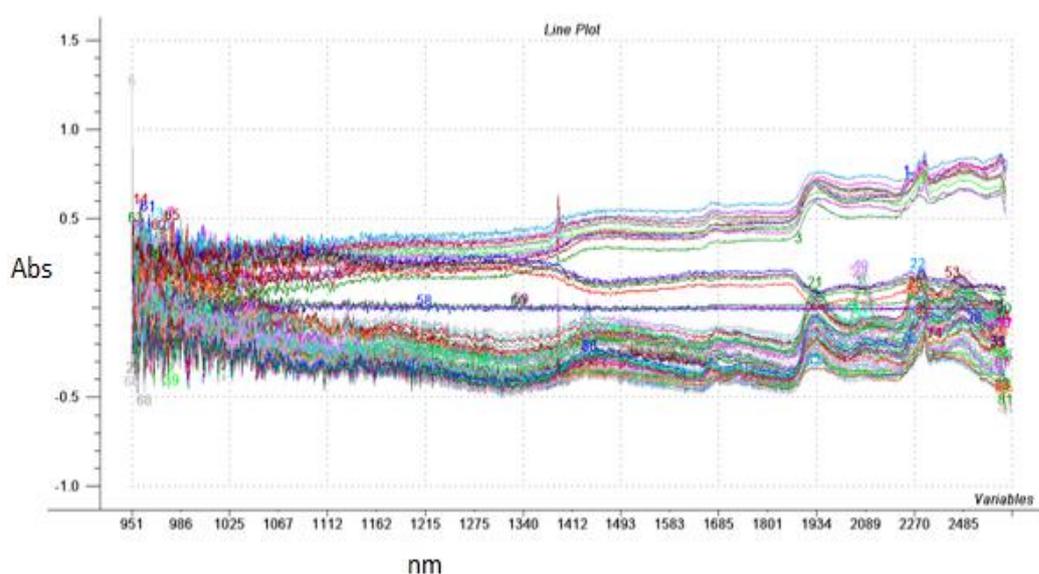


Figura 10 - gráfico com os espectros retirado as regiões ruidosas (selecionado de 951 nm a 2706 nm)

Nessa região escolhida estão algumas variáveis que contém informações relevantes para a construção dos modelos na calibração da determinação do teor de diclofenaco, conforme tabela 2.

Correção do Espalhamento da Luz (MSC)

O método MSC, quando bem aplicado, é capaz de reduzir significativamente os efeitos relativos ao espalhamento de luz. Tipicamente, obtém-se uma melhora expressiva no desempenho dos modelos construídos para a relação existe entre a intensidade de reflectância e a concentração das espécies absorventes.

A figura 11 abaixo mostra os espectros com correção do espelhamento da luz MSC.

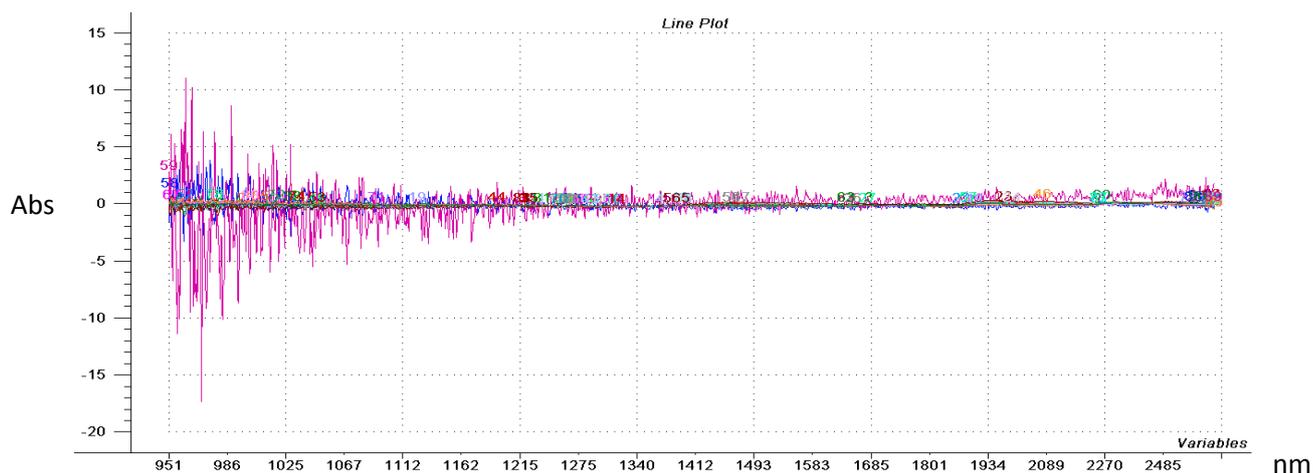


Figura 11 - espectros NIR aplicado MSC

Alisamento Savitzky-Golay

O método de alisamento empregando algoritmo Savitzky-Golay é um dos mais clássicos empregados para a suavização de sinais analíticos. Neste trabalho foi usado o alisamento empregando algoritmo SaviSavitzky-Golay, para o conjunto de espectros, com polinômio de 2º de 15 pontos (1 janela).

A figura 12 abaixo mostra os espectros com aplicação do alisamento Savitzky-Golay 15 pontos.

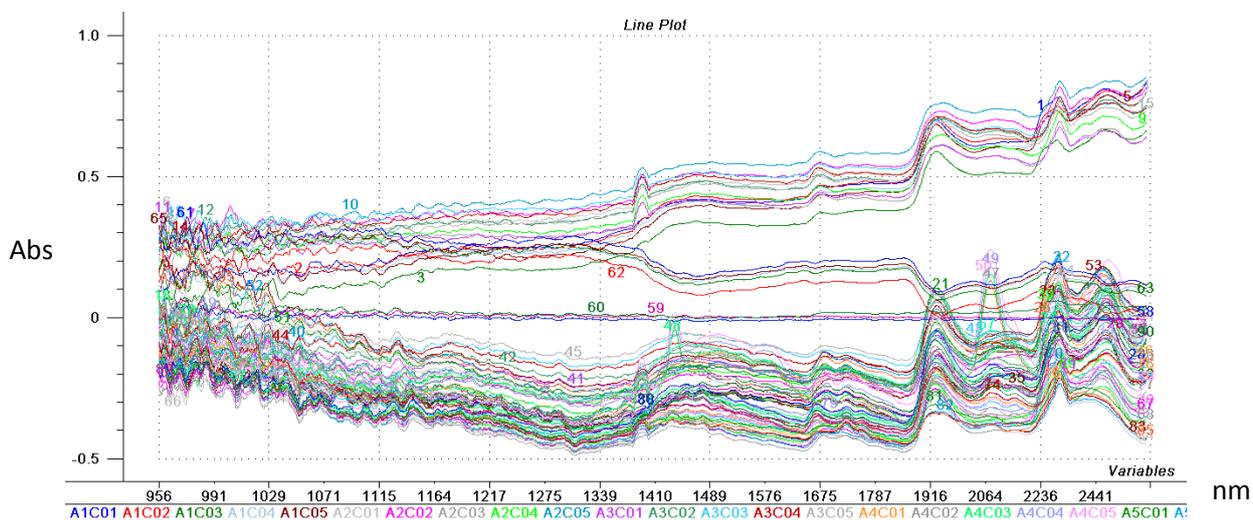


Figura 12 - espectros NIR aplicado alisamentoSavitzky-Golay 15 pontos.

Aplicação da primeira derivada

Ao aplicarmos as operações de derivação com o algoritmo Savitzky-Golay na região espectral selecionada, as informações contidas ao longo dos diferentes comprimentos de onda são geralmente acentuadas.

Na figura 13 pode-se observar que a quantidade de informações, assim como a intensidade dos espectros é maior para os espectros com derivada do que no espectro sem tratamento.

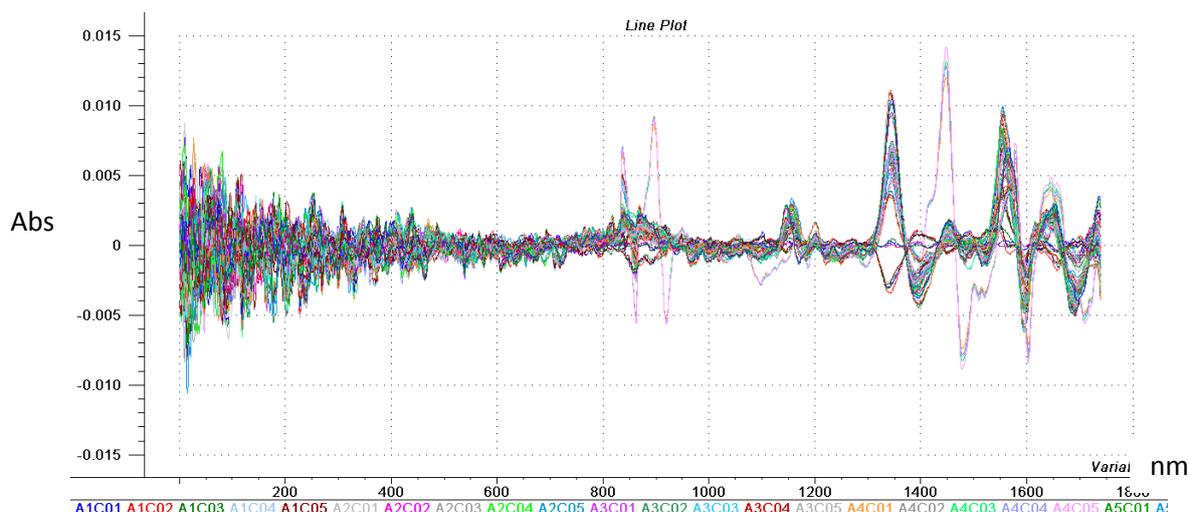


Figura 13 - espectros NIR aplicado primeira derivada Savitzky-Golay15 pontos.

5.1.2 - Calibração Multivariada

PCA

A análise de componentes principais foi utilizada nesse trabalho com espectros sem nenhum tipo de tratamento com o intuito de observar a distribuição das amostras no gráfico do escore afim de verificar a similaridade ou a presença de amostras estranhas ao conjunto de todas as amostras utilizadas nesse trabalho tanto as amostras de calibração como também as amostras de previsão.

Na figura 14 abaixo é mostrado o gráfico dos escores do PCA dos dados sem pré-tratamento.

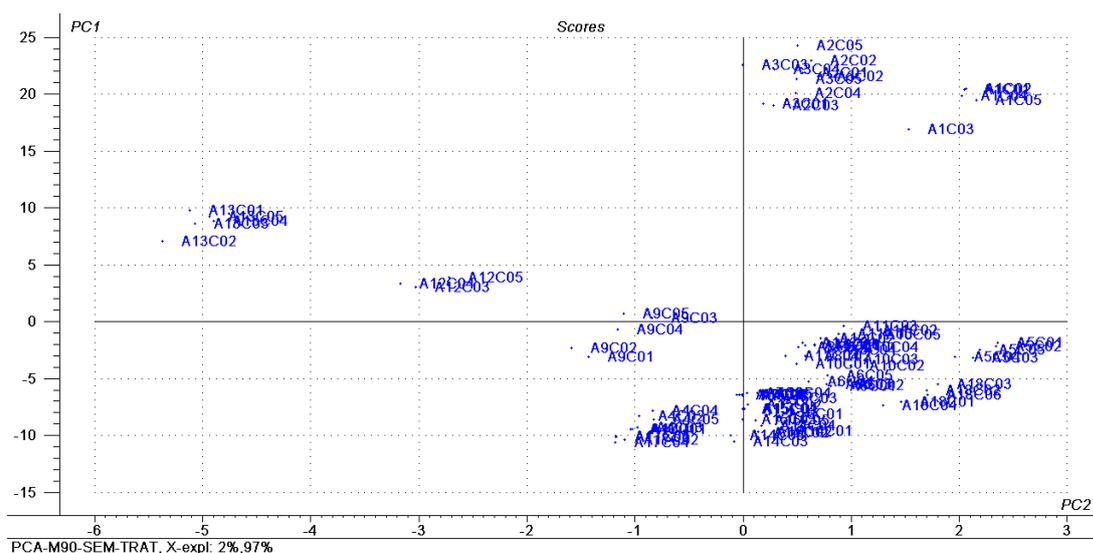


Figura 14 - gráfico dos scores

Escolha dos conjuntos de calibração, validação e previsão

A escolha dos subconjuntos de amostras de calibração, previsão foi feita empregando o Algoritmo Kennard-Stone (KS), que seleciona as amostras que tem a maior variabilidade ou seja as amostras que melhor representam o conjunto como um todo, o qual selecionou 54 amostras para calibração (mcal) sendo o restante 36 amostra utilizadas na previsão (mpred), e como o método de calibração utilizado foi o método de validação cruzada, onde a validação é feita com as próprias amostras de calibração, o que dispensa um conjunto de validação.

PLS

Para determinar o teor de diclofenaco, foram testados vários modelos de calibração dos dados espectrais sendo realizadas modelagem dos dados sem pre-tratamento, e dos dados empregando alguns prétratamentos e algumas combinações destes.

Na tabela 4 abaixo estão descritos os diferentes tratamentos que foram realizados nos dados espectrais com os quais cada modelo foi desenvolvido:

Tabela 4 - Modelos de calibração desenvolvidos e tipos de prétratamentos utilizados

Modelo	Prétratamentos
A	dados brutos
B	primeira derivada Savitzky-Golay 15 pontos
C	Alisamento Savitzky-Golay 15 pontos, MSC e primeira derivada Savitzky-Golay 15 pontos
D	Alisamento Savitzky-Golay 15 pontos e MSC
E	Alisamento Savitzky-Golay 20 pontos, MSC e primeira derivada Savitzky-Golay 20 pontos
F	Primeira derivada 20 pontos
G	Alisamento Savitzky-Golay 20 pontos e MSC
H	MSC e primeira derivada Savitzky-Golay 20 pontos

A tabela 5 abaixo apresenta os melhores valores de R^2 (coeficiente de correlação na calibração), RMSEC (erro quadrático médio de calibração) e RMSEP (erro quadrático médio de previsão) para os oito melhores modelos testados nesse trabalho.

Tabela 5 - Modelos testados e os parâmetros observados.

Modelos	parâmetros		
	Correlação (R^2)	RMSEC	RMSEP
A	0,701	5,072	6,230
B	0,778	4,470	6,000
C	0,729	4,871	5,752
D	0,721	4,931	5,939
E	0,741	4,784	5,655
F	0,762	4,615	5,894
G	0,722	4,925	5,838
H	0,730	4,865	5,755

Definição do melhor modelo

De acordo com a tabela 4 acima, dentre os modelos testados o que apresentou o melhor coeficiente de correlação (R^2) e o menor erro (RMSEC) foi o modelo "B" o qual é apresentado na figura 15 abaixo.

Curva de calibração obtida para o modelo B.

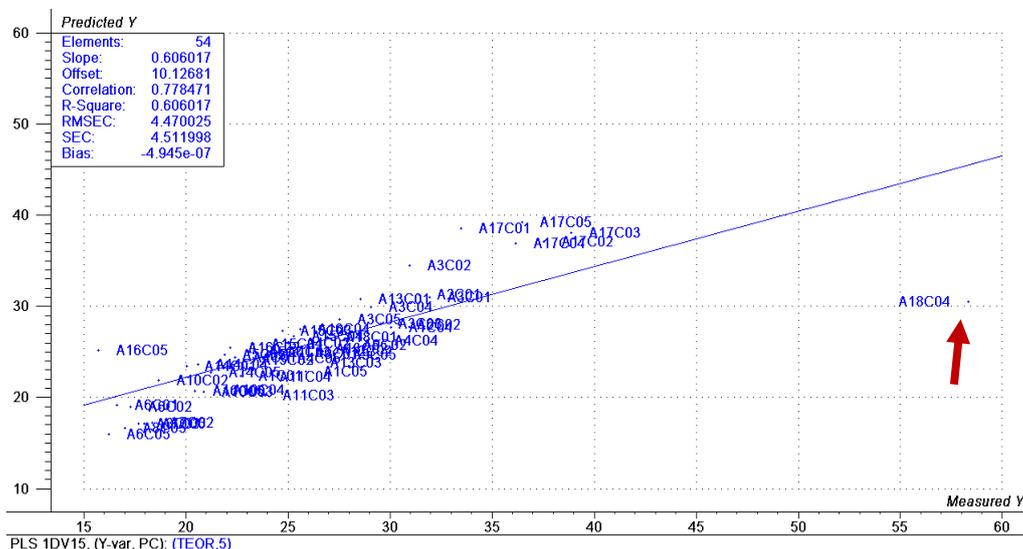


Figura 15- calibração PLS contendo o conjunto de calibração 54 amostras

Posteriormente após análise e escolha do modelo com melhor correlação dentre os testados (modelo B), observou-se que algumas amostras se afastavam da linha de tendência o que pode indicar que estão influenciando negativamente o modelo calibrado. Amostras anômalas podem influenciar negativamente então o modelo pode apresentar alto resíduo.

Na calibração multivariada o resíduo é a diferença entre o valor predito de Y e o valor de referência de Y para cada mostra da calibração, sendo que Y no caso em estudo é o teor de principio ativo em porcentagem de massa, quanto mais próximo do zero menor é o resíduo.

É mostrado na figura 16 o gráfico dos resíduos para o modelo B.

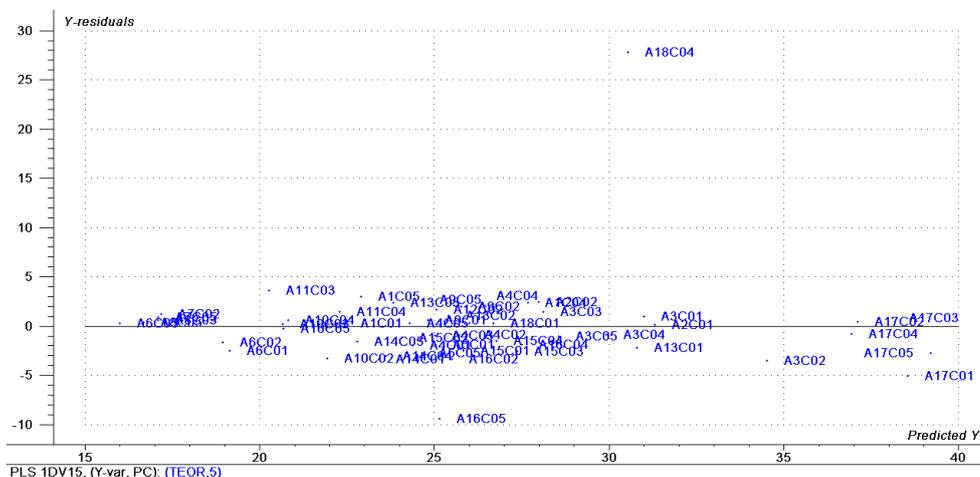


Figura 16 - gráfico do resíduo em função dos valores preditos de Y para cada amostra do conjunto de calibração com todas as 54 amostras selecionadas.

Retirou-se então as amostras A16C05 e A18C04 do conjunto de calibração e foi recalculado o modelo. Encontrou-se melhores coeficientes de correlação e menor erro de calibração e de previsão, conforme tabela 6 abaixo.

Tabela 6- Novo modelo testado e os parâmetros observados

Novo modelo	Amostras retiradas	Parâmetros		
		R2	RMSEC	RMSEP
B1	A16C05, A18C04	0,969	1,351	2,313

De acordo com a tabela 6 foi encontrado melhor coeficiente de correlação (R^2) no novo modelo, assim como também menores erros RMSEC e RMSEP. O que indica que as amostras A18C04 e a A16C05 influenciam negativamente o conjunto de calibração. O modelo utilizado para predição foi modelo **B1**, com um $R^2 = 0,969$ e um **RMSEC = 1,351** e **RMSEP = 2,313**, conforme tabela 6. Possivelmente essas amostras (A18C04 e A16C05) contém um erro nos dados, seja na determinação do teor pelo método de referência, pois conforme anexo B as amostras em comento apresentam porcentagem de principio ativo fora da media das demais amostras sendo a amostra A16C05 muito abaixo da média e amostra A18C04 muito acima da média das demais, outra possibilidade é de problemas ocorridos durante a obtenção do espectros dessas amostras. Decidiu-se então por excluir essas amostras do conjunto de calibração.

A figura 17 abaixo mostra a curva de calibração (regressão) para o conjunto de calibração agora com 52 amostras (o modelo B1).

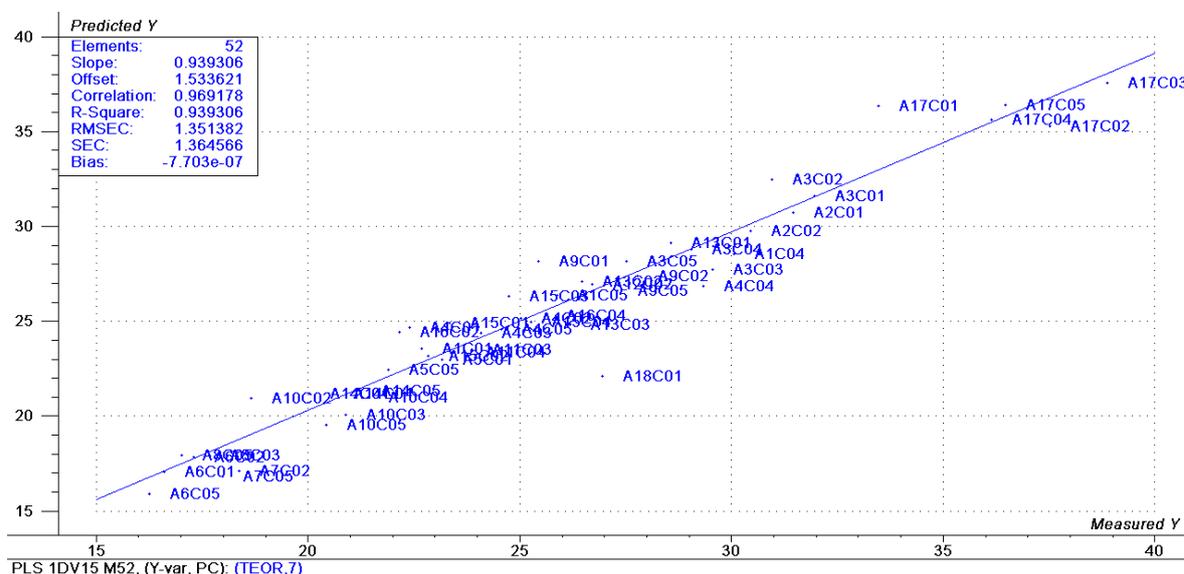


Figura 17 - calibração PLS contendo o conjunto de calibração com 52 amostras

É mostrado na figura 18 o gráfico dos resíduos para o modelo B1.

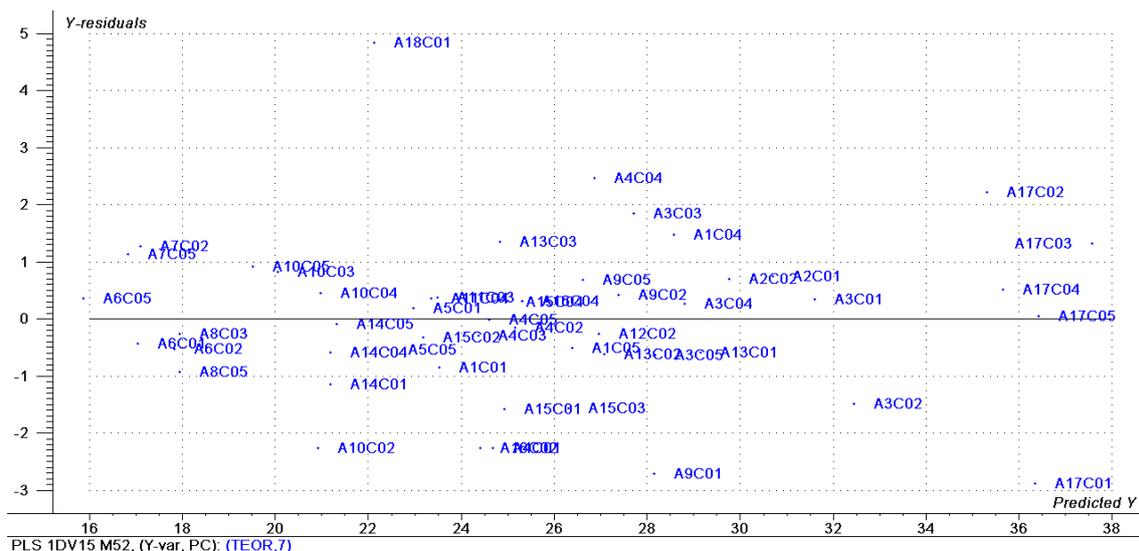


Figura 18 - gráfico do resíduo em função dos valores preditos de Y para cada amostra do novo conjunto de calibração agora com 52 amostras.

Definição do número de variáveis Latentes (VL)

O número ideal de VL é importante no desenvolvimento de um modelo de calibração multivariada, pois se forem definidas poucas variáveis latentes o modelo pode está deixando de calibrar informações, e por outro lado se forem usadas muitas VL o modelo pode está calibrando ruídos, o que aumentaria os erros de calibração e de previsão do modelo. Na validação cruzada a escolha do numero de VL é feita internamente pelo algoritmo, foi o método usado nesse trabalho. A figura 20 abaixo mostra o gráfico do numero de variáveis latentes (ou PC) em função do erro quadrático médio de validação(RMSECV) para o modelo B1, onde observa-se que 7 VL é o numero ideal de variáveis, ou seja numero de variáveis com o menor erro possível. Observa-se que se determinar menos que 7 variaveis o modelo deixa de calibrar informações importantes para calibração e se forem utilizadas mais do 7 VL o modelo estar calibrando ruído aumentando o erro.

A figura 19 abaixo é o gráfico do RMSE (erro quadrático médio) versos número de variáveis latentes (ou PCs). Nesse caso RMSEC (erro quadrático médio de calibração). Mostra a relação do numero de variáveis latentes em função do erro, e indica que para esse modelo em questão (B1) o menor erro encontrado é com 7 VL. Significa que com menos de 7 VL o modelo pode estar deixando de modelar informações importantes, e como mais de 7 VL o modelo pode estar modelando ruídos.

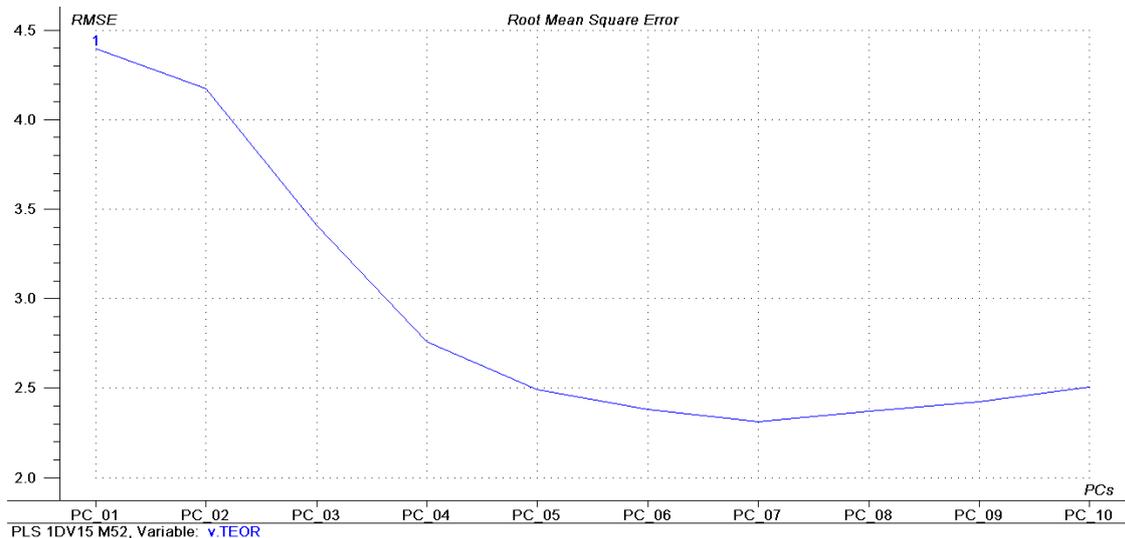


Figura 19- gráfico RMSEC x numero de variáveis latentes

O gráfico dos *loadings*, que representa as partes do espectro que tem maior influência (maior variação) no modelo é mostrado na figura 20 abaixo .

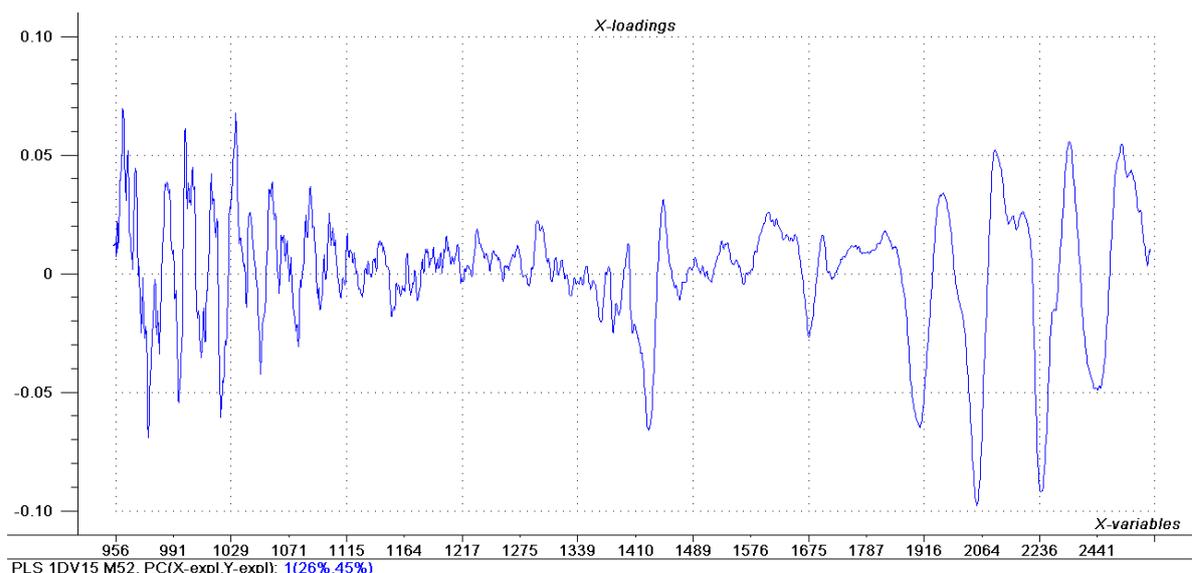


Figura 20 gráfico dos loadings x variáveis

Na figura 21 abaixo é mostrado o gráfico do coeficiente de regressão versus variáveis (nm), que representa o espectro e sua relação com a concentração (teor), quanto mais perto do zero menor é a relação que um determinado comprimento de onda tem com a concentração.

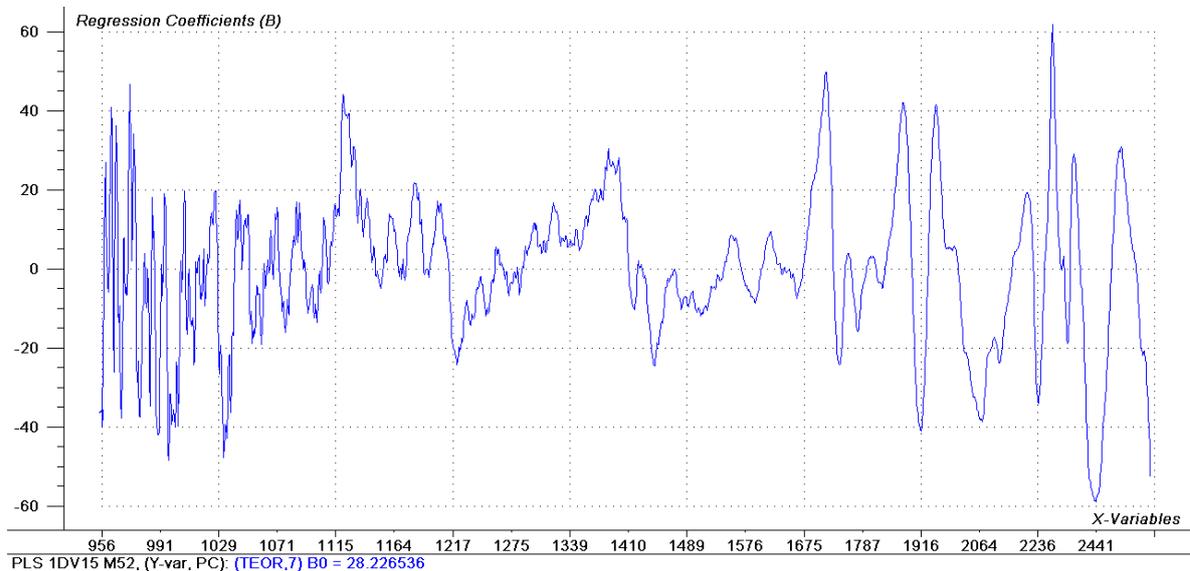


Figura 21 - gráfico coeficientes de correlação x variáveis

Na figura 22 abaixo é mostrado o gráfico da leverage, que é a influencia que cada amostra tem no conjunto de calibração, se a amostra tem a leverage baixa está perto do centro do conjunto de calibração e tem pouca importância, se tem leverage alta está longe da média das outras amostras e pode ter influencia no modelo.

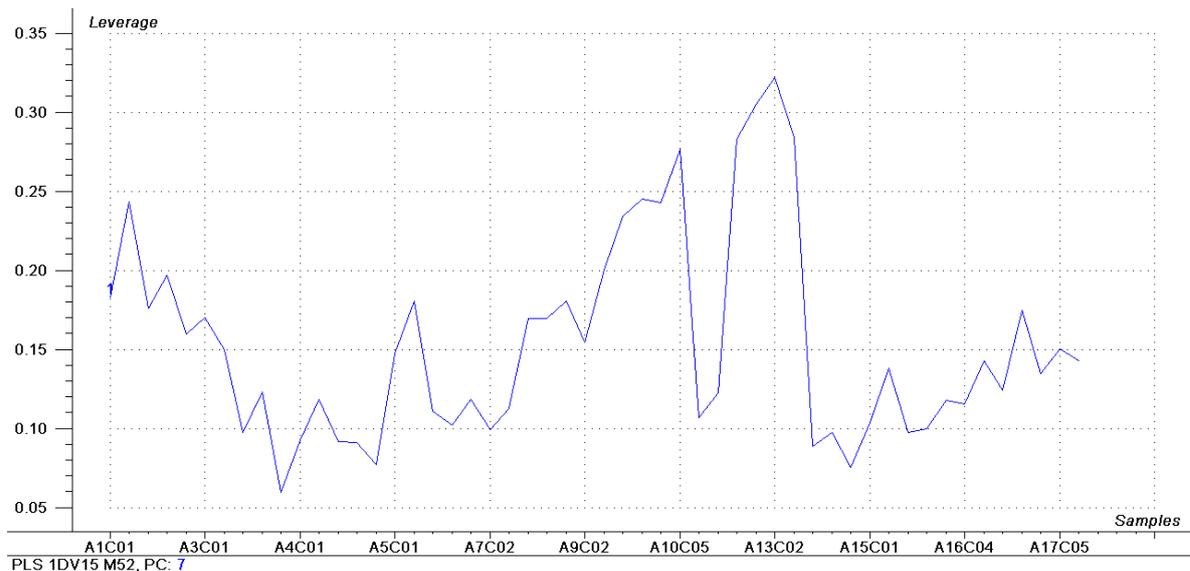
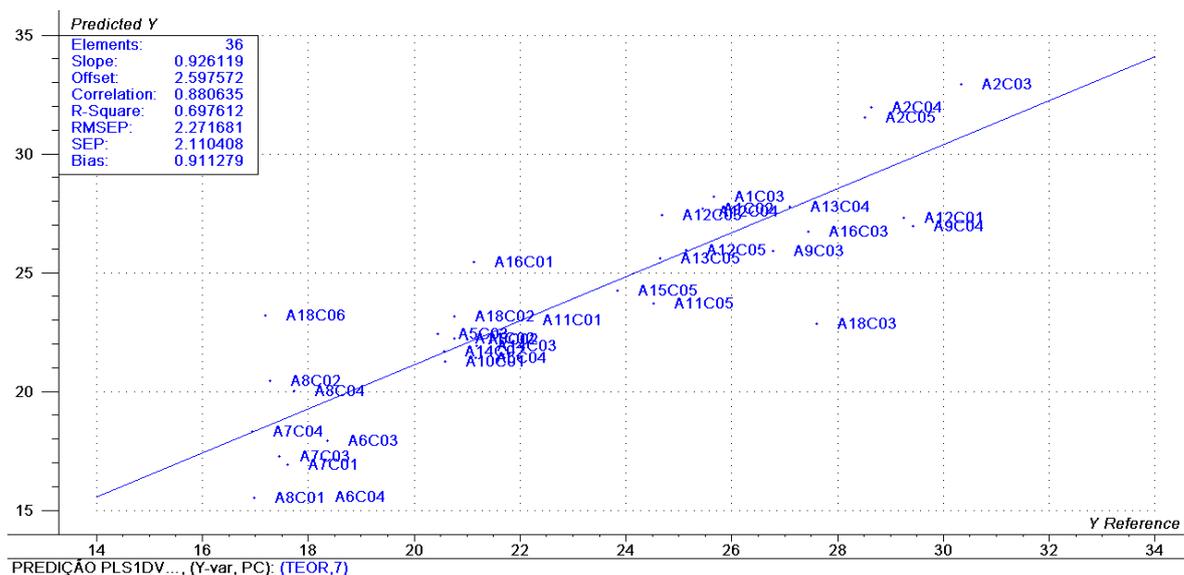


Figura 22- gráfico dos leverage x amostras

5.2 – Predição de Amostras Externas pelo Melhor Modelo Desenvolvido

A predição dos teores de diclofenaco em comprimidos, de amostras externas, pelo modelo de calibração multivariada B1 analisado nesse trabalho é apresentado na figura 26 abaixo e mostrou um coeficiente de correlação de 0,880635 e um erro, RMSEP, de 2,271681.

A figura 23 mostra o gráfico da previsão do teor de diclofenaco para as 36 amostras de previsão, usando a calibração com dados espectrais com pré tratamento primeira derivada Savitzky-Golay de 15 pontos.



A figura 23 predição do modelo B1 em discursão para amostras externas

5.3 - Validação do modelo de calibração

Comparações dos teores de princípio ativo obtido pelo método de referência e pelo método desenvolvido com espectros NIR e calibração multivariada. Os valores dos teores referidos na tabela abaixo são porcentagem de massa do princípio ativo presente no comprimido, e os valores do erro relativo para cada amostra também são em porcentagem.

Tabela 7- Resultados predição pelo modelo de calibração desenvolvido x método de referência

Amostra	Valor Rotulado %	Valor Predito por NIR + PLS	Valor de Referência UV	Erro Relativo (NIR/UV) %
A1C02	25,88	27,682	25,459	8,732
A1C03	25,934	28,206	25,659	9,926
A2C03	27,125	32,948	30,328	8,639
A2C04	28,027	31,952	28,64	11,564
A2C05	27,307	31,536	28,522	10,567
A5C02	21,496	22,200	21,004	5,694
A5C03	22,222	22,442	20,449	9,746
A5C04	21,815	21,406	21,166	1,134
A6C03	17,253	17,944	18,364	-2,287
A6C04	17,575	15,548	18,123	-14,208
A7C01	17,649	16,929	17,613	-3,883
A7C03	17,106	17,281	17,446	-0,946
A7C04	17,422	18,324	16,949	8,113
A8C01	17,218	15,532	16,983	-8,544
A8C02	17,094	20,452	17,282	18,343
A8C04	16,858	20,028	17,734	12,936
A9C03	24,462	25,919	26,776	-3,201
A9C04	22,645	26,964	29,419	-8,345
A10C01	21,124	21,251	20,586	3,230
A11C01	22,232	22,994	22,03	4,376
A11C02	21,422	22,239	20,757	7,140
A11C05	22,401	23,689	24,516	-3,373
A12C01	24,691	27,321	29,254	-6,608
A12C03	25,329	27,446	24,673	11,239
A12C04	25,773	27,567	25,366	8,677
A12C05	25,189	25,969	25,134	3,322
A13C04	25,654	27,794	27,09	2,599
A13C05	26,607	25,625	24,639	4,002
A14C02	20,408	21,706	20,573	5,507
A14C03	20,534	21,905	21,185	3,399
A15C05	23,708	24,236	23,836	1,678
A16C01	23,364	25,464	21,122	20,557
A16C03	23,607	26,737	27,446	-2,583
A18C02	31,486	23,181	20,762	11,651
A18C03	31,786	22,858	27,604	-17,193
A18C06	31,349	23,213	17,195	34,999

5.4 - Discussão dos resultados

Na tabela 7 acima são comparados os resultados da determinação do teor de diclofenaco por infravermelho próximo-NIR com PLS com os resultados obtidos por ultravioleta.

Também na tabela 7 é apresentado o erro relativo entre as duas, que se apresenta razoável com exceção de poucas amostras que apresentaram um erro relativo maior.

É importante salientar que alguns desvios podem ser atribuídos a erros na determinação do teor pelo método de referencia, ou a problemas durante a aquisição dos espectros.

A tabela 5 mostra para o modelo (B1) em discussão um erro quadrático médio de previsão, que expressa a capacidade de previsão de amostras externa, RMSEP = 2,313. Podendo ainda serem analisados outros procedimentos na tentativa de melhorar a capacidade de predição do modelo calibrado (tentar diminuir esse erro de previsão) a partir dos mesmo dados de espectroscopia NIR.

O modelo de calibração apresentado pode ter limitações na capacidade de predição de teores de diclofenaco devido ao fato que as amostras utilizadas na calibração multivariada não apresentarem uma grande variação nas suas concentrações como mostra a figura 14 (gráfico dos scores da análise das componentes principais) como também o anexo B, que contem todas as amostras utilizadas, onde observa-se pouca variação entre as amostras, mostrando que a diferença entre suas concentrações podem ser próximas. Possivelmente uma amostra que a concentração seja muito baixa ou muito alta pode não ser prevista corretamente, necessitando assim que o modelo seja testado quanto a esse parâmetro.

6- conclusões

Foi possível demonstrar a calibração multivariada utilizando dados de reflectância difusa no infravermelho próximo no controle de qualidade de comprimidos de diclofenaco sódico tanto do ponto de vista quantitativo assim como também mostra a potencialidade da técnica na separação em grupos de amostras.

Foi possível determinar o teor de diclofenaco sódico em amostras externas através do modelo de calibração multivariada desenvolvido nesse trabalho apartir de dados de reflectância difusa no infravermelho próximo.

A determinação dos teores de diclofenaco sódico em comprimidos por infravermelho próximo com calibração multivariada foi comparada com o método oficial utilizado, ultravioleta, obtendo-se resultados coerentes.

7 - Sugestões

Para resolver o problema da limitação na capacidade de predição de teores de diclofenaco devido amostras não apresentarem uma grande variação, uma sugestão seria desenvolver o modelo com amostras preparadas em laboratório para aumentar a janela de concentração (variação) do conjunto de calibração aumentando assim a capacidade de predição da técnica em estudo.

Outra alternativa para melhorar o desempenho do modelo é fazer a calibração pelo método IPLS - PLS por intervalos - esse método consiste em selecionar as regiões espectrais que tem maior relação com a concentração e fazer a calibração utilizando apenas essas regiões espectrais com mais significância .

8- Referências Bibliográficas

- [1] - <http://www.criasaude.com.br/N4143/diclofenaco.html>
- [2] - GIAGOUDAKIS, G.; MARKANTONIS, S.L. An alternative high-performance liquid-chromatographic method for the determination of diclofenac and flurbiprofen in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Oxford, vol.1, p. 897-901, ago. 1998.
- [3] – Zeni, Diego, DETERMINAÇÃO DE CLORIDRATO DE PROPRANOLOL EM MEDICAMENTOS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, Brasil 2005.
- [4] - Simões, Simone da Silva. Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIRR e calibração multivariada - Tese (doutorado) – UFPB/CCEN. João Pessoa, 2008.
- [5] - SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental. 5. ed. São Paulo: Bookman, 2002.
- [6] - BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. Handbook of Near-Infrared Analysis. New York: Marcel Dekker, 2001.
- [7] - Skoog, West, Holler, Crouch - FUNDAMENTOS DA QUÍMICA ANALÍTICA - Tradução da 8a.edição norte-americana, EDITORA THOMSON-2005.
- [8] -BORIN, A. Aplicação de quimiometria e espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de lubrificantes. 2003. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [9] -ARAUJO, TIAGO PUCCA. Emprego de Espectroscopia no Infravermelho e Métodos Quimiométricos para a Análise Direta de Tetraciclina em Leite Bovino.2007. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual de Campinas – instituto de Química - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [10] - PANERO, JOÃO DOS SANTOS, Determinação de Proteína, Óleo e Umidade por Espectroscopia NIR em Grãos de soja do ESTADO DE RORAIMA. 2007. Dissertação (Mestrado)- UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA. Boa Vista, Roraima.
- [11] - NETO, W.B. Parâmetros de qualidade de lubrificantes e óleo de oliva através de espectroscopia vibracional, calibração multivariada, e seleção de variáveis. 2005. Tese, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [12] - VALDERRAMA, P.Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo. 2005. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [13] - SOUSA, E.R. Determinação de parâmetros de qualidade de gasolina e estudo de contaminantes utilizando espectros do infravermelho próximo na fase vapor. 2005. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.

- [14] - BLANCO, M.; VILLARROYA, I. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 21, No. 4, 240-250, 2002.
- [15] - FIDÊNCIO, P.H. Análise de solos por espectroscopia no infravermelho próximo e aplicação de métodos quimiométricos. 2001. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [16] - SILVA, H.E.B. Desenvolvimento de Um Espectrofotômetro no Infravermelho Próximo com Transformada de Hadamard. 1999. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [17] - COSTA FILHO, P. A.; POPPI, R. J. Aplicação de algoritmos genéticos na seleção de variáveis em espectroscopia no infravermelho médio. Determinação simultânea de glicose, maltose e frutose. Química Nova, Vol. 25, No. 1, 46-52, 2002.
- [18] - COSTA FILHO, P. A. Estudo comparativo entre técnicas de inteligência artificial e modelos lineares em determinações quantitativas no infravermelho próximo. 2003. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [19] - FERRÃO, M.F. Aplicação de técnicas espectroscópicas de reflexão no infravermelho no controle de qualidade de farinha de trigo. 2000. Tese, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [20] - SCAFI, S.H.F. Espectroscopia no Infravermelho próximo para identificação de medicamentos falsificados. 2000. Dissertação, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [21] - KUBELKA, P.; MUNK, F.Z.; Tech. Physik., 12:593, 1931
- [22] - BIRTH, G. S.; Agricul. Mark., appud, 2:2, 1957.
- [23] - TAVARES, W. In: Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. Agentes infecciosos. 2. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996.
- [24] - WEY, S.B. Bactérias multi-resistentes: podemos minimizar este problema? Anais do 1º encontro de doenças infecciosas adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar. Arquivo Brasileiro de Medicina, Rio de Janeiro, v.70, n.2, 1996, p.97-110.
- [25] - COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implication for a post anti-microbial era. Science, 257, 5073 (1992), 1050 – 1055.
- [26] - ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet. Brasília, Novembro de 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>>. Acesso em 01/12/2011.
- [27] - COSTA, E.O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. Higiene Alimentar, 10, 44 (1996), 15-17.
- [28] - VASSIL, M. Resistance to antibiotics in Staphylococcus aureus isolated from dairy cow mastitis, milk, udder smears and milking installation. Veterinary Medicine, 44, 4 (1999), 115-120.
- [29] - KATZUNG, B. G. In: Farmacologia Básica e Clínica, 6 ed., Guanabara, Copyright, 1998.

- [30] - MOATS, W. A.; HARIKKAHN, R. Rapid HPLC Determination of Tetracycline antibiotics in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 4 (1995), 931-934.
- [31] - SENYK, G. F.; DAVIDSON, J.H.; BROW, J.M.; HALLSTEAD, E.R.; SHERBON, J.W. Comparison of rapid tests used to detect antibiotic residues in milk. *Journal of Food Protection*, 53, 2 (1990), 158-164.
- [32] - AURELI, P.; FERRINI, A.M.; MANNONI, V. Effect of some proteolytic enzymes on microbial detection levels for tetracyclines and sulfonamides in milk serum. *Archiv Fur Lebensmittel hygiene*, 50, 415 (1999), 115-118.
- [33] - Monograph on Residues and Contaminants in Milk and Milk Products. International Dairy Federation Special Issue 9701. IDF General Secretariat: 41, Square Vergote, B-1040 Brussels (Belgium), p. 189, 1991.
- [34] - BORGES, W.N. Aplicação de métodos de Reconhecimento de Padrões para classificação de Óleos Vegetais. Dissertação de Mestrado (2001) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás.
- [35] - BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. *Quimiometria*, *Quim. Nova*, 8 (1995), 84-99.
- [36] - OTTO, M. *Chemometrics – Statistics and Computer application in Analytical Chemistry*, Weinheim: Wiley, 1999.
- [37] - BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; Seasholtz, M. B. *Chemometrics: A practical guide*. New York: Wiley, 1998.
- [38] - BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry, *Analyst*, 125 (2000), 2125-2154.
- [39] - FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPEY, P. L. O. *Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial*, *Quím. Nova*, 22(5), 1999.
- [40] - Araujo, Augusto Maynard- Monitoramento de processos em tempo real via espectrofotometria no infravermelho próximo – Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes (SE) Aracaju, 2007.
- [41] - Nunes, Pedro Germano Antonino, Uma nova técnica para seleção de variáveis em calibração multivariada aplicada às espectrometrias UV-VIS e NIR/ Pedro Germano Antonino Nunes – João Pessoa, 2008.
- [42] - WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal Component Analysis, *Chemometrics And Intelligent Laboratory Systems*, 2, 37–52, 1987.
- [43] - Vicini, Lorena, *Análise multivariada da teoria à prática* – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria- RS, 2005.
- [44] - REGAZZI, A. J. INF 766 - *Análise multivariada*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Departamento de Informática, 2001. 166p. Apostila de disciplina.
- [45] - SOUZA, A. M. *Monitoração e ajuste de realimentação em processos produtivos multivariados*. 2000. Tese (Doutorado Engenharia de Produção) – Universidade Federal Santa Catarina, 2000.

- [46] - LOPES, L. F. D. Análise de componentes principais à confiabilidade de sistemas complexos. 2001. Tese (Doutorado Engenharia de Produção) Universidade Federal Santa Catarina, 2001.
- [47] - GELADI, P., KOWALSKI, B.R., Partial least square regression: a tutorial, *Analytica Chimica Acta*, 185:1, 1986.
- [48] - COSTA FILHO, P. A. Algoritmo Genético na Seleção de Variáveis em Calibração Multivariada de Dados Espectroscópicos. 1998. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [49] - FIDÊNCIO, P.H. Análise de solos por espectroscopia no infravermelho próximo e aplicação de métodos quimiométricos. 2001. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [50] - FRANK, I. E.; KALIVAS, J. H.; KOWALSKI, B. R. Partial Least Squares Solutions for Multicomponent Analysis. *Analytical Chemistry*, Vol. 55, No. 11, 1800-1804, 1983.
- [51] - SIMAS, R. C. Determinação de proteína bruta e aminoácidos em farelo de soja por espectroscopia no infravermelho próximo. 2005. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [52] - PASTI, L.; JOUAN-RIMBAUD, D.; MASSART, D. L.; NOORD, O. E. Application of Fourier transform to multivariate calibration of near-infrared data. *Analytica Chimica Acta*, 364, 253-263, 1998.
- [53] - PARREIRA, T.F. Utilização de Métodos Quimiométricos em Dados de Natureza Multivariada. 2003. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [54] - LIMA, S. L. T. Seleção de Variáveis em Calibração Multivariada a partir da Hessiana dos erros. 2000. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [55] - NAGATA, N.; BUENO, M. I. M. S.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Métodos matemáticos para correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de raios-X. *Química Nova*, Vol. 24, No. 4, 531-539, 2001.
- [56] - MESSERSCHMIDT, I. Análise quantitativa por espectroscopia no infravermelho médio empregando técnicas de refletância e calibração multivariada. 1999. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [57] - MELLO, C.A. Redes Neurais e Técnicas de Pré-Processamento de Sinais em Espectroscopia de Refletância no Infravermelho Próximo. 1998. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [58] - BARTHUS, R.C. Aplicação de Métodos Quimiométricos para Análises de Controle de Qualidade de Óleos Vegetais utilizando Espectroscopias no Infravermelho e Raman. 1999. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [59] - SENA, M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Química Nova*, 23(4), 547-556, 2000.
- [60] - POPPI, R. J. Quantificação de Picos Cromatográficos Superpostos por Métodos de Calibração Multivariada - Dissertação de Mestrado (1989), UNICAMP.

- [61] - LINDGREN, F; GELADI, P.; WOLD, S. Kernel-based PLS regression: Cross Validation and applications to spectral data. *Journal of Chemometrics*, 8 (1994), 377- 389.
- [62] - NIEMEYER, J.; CHEN, Y.; BOLLAG, J.M. Characterization of humic acids, composts and peat by diffuse reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy. *Soil Science Society of America Journal*, 56 (1992), 130-135.
- [63] - PEDRO, A. M. K. Determinação Simultânea e Não-Destrutiva de Sólidos Totais e Solúveis, Licopeno e Beta-Caroteno em Produtos de Tomate por Espectroscopia no Infravermelho Próximo Utilizando Calibração Multivariada. 2004. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [64] - MORGANO, M.A.; FARIA, C.G.; FERRÃO, M.F.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M.M.C.; Determinação de proteína em Café Cru por Espectroscopia NIR e Regressão PLS. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas. 25(1): 25-31, jan.-mar. 2005.
- [65] - WILLIAMS, P.; NORRIS, K. *Near Infrared Technology; in the Agricultural and Food Industries*. Second edition. AAVV, Inc. St. Paul, Minnesota, USA. (ISBN 1-891127-24-1), 2001.
- [66] - MARTENS, H.; NIELSEN, J. P.; ENGELSEN, S. B. Light Scattering and Light Absorbance Separated by Extended Multiplicative Signal Correction. Application to Near Infrared Transmission Analysis of Powder Mixtures. *Analytical Chemistry*, 75, 394-404, 2003.
- [67] - SÁIZ-ABAJO, M.J.; MEVIK, B.-H.; SEGTMAN, V.H.; NÆS, T. Ensemble methods and data augmentation by noise addition applied to the analysis of spectroscopic data. *Analytica Chimica Acta*, 533, 147–159, 2005.
- [68] - CHEN, Z.-P.; MORRIS, J.; MARTIN, E. Extracting Chemical Information from Spectral Data with Multiplicative Light Scattering Effects by Optical Path-Length Estimation and Correction. *Analytical Chemistry*, 78, 7674-7681, 2006.
- [69] - SOUSA, E.R. Determinação de parâmetros de qualidade de gasolina e estudo de contaminantes utilizando espectros do infravermelho próximo na fase vapor. 2005. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [70] - FREDERICO, F.R. Desenvolvimento de um Sensor Químico de Fibras Ópticas para a Determinação Simultânea de Metais Pesados Empregando Métodos de Calibração Multivariada. 2003. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, São Paulo.
- [71] - Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C., Identificação espectrométrica de compostos orgânicos 5ª ed., LTC.
- [72] - Vinadé, Maria Elisabeth do Canto; Vinadé, Elsa Regina do Canto, Métodos espectroscópicos de análise quantitativa, editora UFSM.
- [73] - KENNARD, R.W.; STONE, L.A.; Computer aided design of experiments, *Technometrics*, 11:137, 1969.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela contendo as amostras analisadas e suas respectivas absorvâncias das soluções analíticas.

AMOSTRA / COMPRIMIDO	MASSA DO P. ATIVO DECLARADA NO COMPRIMIDO (mg)	MASSA COMPRIMIDO (g)	MASSA DILUIDA (g)	ABSORVÂNCIA
A1C01	50	0,1949	0,0200	0,342
A1C02	50	0,1932	0,0199	0,382
A1C03	50	0,1928	0,0199	0,385
A1C04	50	0,1882	0,0177	0,401
A1C05	50	0,1877	0,0202	0,394
A2C01	75	0,2755	0,0229	0,543
A2C02	75	0,2755	0,0263	0,604
A2C03	75	0,2765	0,0279	0,638
A2C04	75	0,2676	0,0276	0,596
A2C05	75	0,2747	0,0279	0,600
A3C01	75	0,2760	0,0276	0,665
A3C02	75	0,2772	0,0269	0,629
A3C03	75	0,2744	0,0294	0,655
A3C04	75	0,2747	0,0272	0,596
A3C05	75	0,2738	0,0280	0,581
A4C01	50	0,2116	0,0203	0,343
A4C02	50	0,2101	0,0211	0,398
A4C03	50	0,2010	0,0256	0,465
A4C04	50	0,2118	0,0212	0,469
A4C05	50	0,2039	0,0231	0,428
A5C01	50	0,2287	0,0225	0,393
A5C02	50	0,2326	0,0221	0,350
A5C03	50	0,2250	0,0227	0,350
A5C04	50	0,2292	0,0245	0,391
A5C05	50	0,2270	0,0229	0,378
A6C01	50	0,2891	0,0285	0,357
A6C02	50	0,2952	0,0276	0,360
A6C03	50	0,2898	0,0273	0,378
A6C04	50	0,2845	0,0292	0,399
A6C05	50	0,2898	0,0289	0,354
A7C01	50	0,2833	0,0250	0,332
A7C02	50	0,2920	0,0322	0,446
A7C03	50	0,2923	0,0298	0,392
A7C04	50	0,2870	0,0259	0,331
A7C05	50	0,2893	0,0225	0,305
A8C01	50	0,2904	0,0221	0,283
A8C02	50	0,2925	0,0264	0,344
A8C03	50	0,2885	0,0267	0,356
A8C04	50	0,2966	0,0264	0,353
A8C05	50	0,2894	0,0290	0,372
A9C01	50	0,2032	0,0219	0,420
A9C02	50	0,2083	0,0241	0,505
A9C03	50	0,2044	0,0264	0,533
A9C04	50	0,2208	0,0220	0,488
A9C05	50	0,2059	0,0203	0,418
A10C01	50	0,2367	0,0230	0,357
A10C02	50	0,2408	0,0226	0,318
A10C03	50	0,2550	0,0228	0,359
A10C04	50	0,2435	0,0278	0,449
A10C05	50	0,2365	0,0235	0,362

A11C01	50	0,2249	0,0239	0,397
A11C02	50	0,2334	0,0292	0,457
A11C03	50	0,2288	0,0220	0,396
A11C04	50	0,2256	0,0222	0,397
A11C05	50	0,2232	0,0231	0,427
A12C01	50	0,2025	0,0209	0,461
A12C02	50	0,1996	0,0222	0,447
A12C03	50	0,1974	0,0179	0,333
A12C04	50	0,1940	0,0183	0,350
A12C05	50	0,1985	0,0267	0,506
A13C01	50	0,1899	0,0176	0,379
A13C02	50	0,1924	0,0210	0,419
A13C03	50	0,1835	0,0190	0,375
A13C04	50	0,1949	0,0282	0,576
A13C05	50	0,1875	0,0225	0,418
A14C01	50	0,2406	0,0286	0,432
A14C02	50	0,2450	0,0254	0,394
A14C03	50	0,2435	0,0226	0,361
A14C04	50	0,2446	0,0266	0,413
A14C05	50	0,2411	0,0273	0,437
A15C01	50	0,2121	0,0208	0,366
A15C02	50	0,2115	0,0245	0,422
A15C03	50	0,2141	0,0239	0,446
A15C04	50	0,2153	0,0264	0,503
A15C05	50	0,2109	0,0217	0,390
A16C01	50	0,2140	0,0216	0,344
A16C02	50	0,2103	0,0237	0,396
A16C03	50	0,2118	0,0216	0,447
A16C04	50	0,2152	0,0234	0,452
A16C05	50	0,2100	0,0221	0,262
A17C01	100	0,2906	0,0262	0,661
A17C02	100	0,2884	0,0311	0,880
A17C03	100	0,2940	0,0249	0,730
A17C04	100	0,2748	0,0299	0,815
A17C05	100	0,2827	0,0292	0,803
A18C01	50	0,1575	0,0152	0,309
A18C02	50	0,1588	0,0191	0,299
A18C03	50	0,1573	0,0209	0,435
A18C04	50	0,1563	0,0198	0,476
A18C06	50	0,1597	0,0199	0,258

ANEXO B

Tabela com os teores de diclofenaco de cada comprimido analisado por UV

Teores de diclofenaco de cada comprimido analisado por UV			
Amostra	Teor P. ativo Rotulado (%)	Teor de p. ativo encontrado UV (%)	% do p. ativo previsto
A1C01	25,654	22,679	88,403
A1C02	25,880	25,459	98,373
A1C03	25,934	25,659	98,940
A1C04	26,567	30,047	113,097
A1C05	26,638	25,869	97,111
A2C01	27,223	31,448	115,519
A2C02	27,223	30,459	111,885
A2C03	27,125	30,328	111,810
A2C04	28,027	28,640	102,186
A2C05	27,303	28,522	104,466
A3C01	27,174	31,955	117,595
A3C02	27,056	30,962	114,437
A3C03	27,332	29,548	108,105
A3C04	27,303	29,061	106,440
A3C05	27,392	27,520	100,466
A4C01	23,629	22,409	94,836
A4C02	23,798	25,017	105,120
A4C03	24,876	24,090	96,843
A4C04	23,607	29,340	124,286
A4C05	24,522	24,573	100,209
A5C01	21,863	23,165	105,958
A5C02	21,496	21,004	97,711
A5C03	22,222	20,449	92,020
A5C04	21,815	21,166	97,025
A5C05	22,026	21,892	99,390
A6C01	17,295	16,613	96,057
A6C02	16,938	17,299	102,134
A6C03	17,253	18,364	106,435
A6C04	17,575	18,123	103,117
A6C05	17,253	16,246	94,159
A7C01	17,649	17,613	99,794
A7C02	17,123	18,370	107,280
A7C03	17,106	17,446	101,990
A7C04	17,422	16,949	97,290
A7C05	17,283	17,978	104,022
A8C01	17,218	16,983	98,639
A8C02	17,094	17,282	101,097
A8C03	17,331	17,683	102,034
A8C04	16,858	17,734	105,196
A8C05	17,277	17,013	98,470
A9C01	24,606	25,435	103,368
A9C02	24,004	27,791	115,777
A9C03	24,462	26,776	109,462
A9C04	22,645	29,419	129,914
A9C05	24,284	27,309	112,459
A10C01	21,124	20,586	97,453
A10C02	20,764	18,662	89,874
A10C03	19,608	20,883	106,502
A10C04	20,534	21,421	104,318
A10C05	21,142	20,430	96,634
A11C01	22,232	22,030	99,092
A11C02	21,422	20,757	96,893

A11C03	21,853	23,873	109,241
A11C04	22,163	23,717	107,013
A11C05	22,401	24,516	109,438
A12C01	24,691	29,254	118,478
A12C02	25,050	26,704	106,604
A12C03	25,329	24,673	97,409
A12C04	25,773	25,366	98,419
A12C05	25,189	25,134	99,783
A13C01	26,330	28,560	108,470
A13C02	25,988	26,462	101,826
A13C03	27,248	26,176	96,067
A13C04	25,654	27,090	105,595
A13C05	26,667	24,639	92,396
A14C01	20,781	20,033	96,399
A14C02	20,408	20,573	100,806
A14C03	20,534	21,185	103,171
A14C04	20,442	20,592	100,736
A14C05	20,738	21,230	102,370
A15C01	23,574	23,337	98,996
A15C02	23,641	22,844	96,631
A15C03	23,354	24,749	105,977
A15C04	23,223	25,269	108,809
A15C05	23,708	23,836	100,540
A16C01	23,364	21,122	90,402
A16C02	23,776	22,160	93,206
A16C03	23,607	27,446	116,262
A16C04	23,234	25,618	110,261
A16C05	23,810	15,723	66,037
A17C01	34,412	33,460	97,235
A17C02	34,674	37,528	108,230
A17C03	34,014	38,882	114,314
A17C04	36,390	36,151	99,342
A17C05	35,373	36,472	103,107
A18C01	31,746	26,961	84,929
A18C02	31,486	20,762	65,940
A18C03	31,786	27,604	86,842
A18C04	31,990	58,331	182,342
A18C06	31,309	17,195	54,920
