



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro de Tecnologia e Ciências**

**Instituto de Química**

**Jéssica da Silva Alves de Pinho**

**Aplicação da quimiometria e da espectrometria na  
determinação simultânea de Ibuprofeno e Paracetamol e para a  
detecção da adulteração de leite UHT**

**Rio de Janeiro**

**2016**

Jéssica da Silva Alves de Pinho

**Aplicação da quimiometria e da espectrometria na determinação  
simultânea de Ibuprofeno e Paracetamol e para a detecção da adulteração  
no leite UHT**

Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Aderval Severino Luna

Rio de Janeiro  
2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

P654 Pinho, Jéssica da Silva Alves de  
Aplicação de quimiometria e da espectrometria na  
determinação simultânea de Ibuprofeno e Paracetamol e para  
detecção da adulteração de leite UHT. / Jéssica da Silva Alves  
de Pinho. – 2016.  
161 f.

Orientador: Aderval Severino Luna.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro, Instituto de Química.

1. Espectrometria – Teses. 2. Quimiometria – Teses. 3.  
Medicamentos - Utilização - Teses I. Luna, Aderval Severino.  
– Teses. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Instituto de Química. III. Título.

CDU 543.42

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta  
tese.

---

Assinatura

---

Data

Jéssica da Silva Alves de Pinho

**Aplicação da quimiometria e da espectrometria na determinação  
simultânea de Ibuprofeno e Paracetamol e para a detecção da adulteração  
no leite UHT**

Tese apresentada, como requisito para  
obtenção do título de Doutor, ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química, da Universidade  
do Estado do Rio de Janeiro. Área de  
concentração: Processos Químicos,  
Petróleo e Meio Ambiente.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Aderval Severino Luna (Orientador)  
Instituto de Química - UERJ

---

Prof. Dra. Cristiane Assumpção Henriques  
Instituto de Química - UERJ

---

Prof. Dr. André Luiz Hemerly Costa  
Instituto de Química - UERJ

---

Prof. Dra. Iracema Takase  
Instituto de Química - UERJ

---

Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Torres  
Faculdade de Tecnologia - UERJ

---

Prof. Dr. Ricardo Queiroz Aucélio  
Dep. de Química - PUC Rio

Rio de Janeiro

2016

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe, minha maior incentivadora sempre.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades que tive até hoje e pelas que ainda sei que terei.

Agradeço a minha mãe, a pessoa que mais me apoia e incentiva sempre. Agradeço também aos meus padrinhos, Manoel Cardeal Filho e Terezinha de Fátima Silva Cardeal, pelo apoio e por terem contribuído para minha educação.

Agradeço ao meu orientador Aderval Severino Luna, que me ensinou muito do que aprendi na faculdade, mas também que me ensinou muitas coisas além disso.

Agradeço aos amigos do laboratório pela ajuda, aos técnicos: Diego Barros Batista, Francisco de Castro Júnior, Luciana da Cruz Machado e Marina Barbosa da Silva. Aos alunos de iniciação científica Eron Simplicio e Jacqueline Alexandra Santos Leão e a aluna de estágio interno Jéssica Paloma de Assis Barros. Agradeço também as pessoas que me cederam amostras de urina para o meu trabalho. Agradeço aos amigos de um modo geral pela minha ausência em alguns eventos em virtude do doutorado.

Enfim agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

## RESUMO

PINHO, Jéssica da Silva Alves. *Aplicação da quimiometria e da espectrometria na determinação de Ibuprofeno e Paracetamol e para detecção da adulteração de leite UHT*. 2016. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Instituto de Química – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Essa tese compreende dois diferentes estudos de caso: o primeiro baseado no desenvolvimento de um método para determinação simultânea de Ibuprofeno (IBU) e Paracetamol (PAR) por espectrofluorimetria acoplada a calibração multivariada em medicamentos e urina e validação por HPLC. A faixa de concentração foi de 2 a 7 mg.L<sup>-1</sup> (IBU) e 10 a 20 mg.L<sup>-1</sup> (PAR). Os resultados obtidos para padrão aquoso das duas metodologias foram comparados a partir do método da distância ortogonal, enquanto que em medicamentos foram comparados por meio do teste F, para um nível de confiança de 95%. Nos dois casos, foi comprovado que as metodologias eram concordantes. Os valores de LD e LQ: 0,48 mg.L<sup>-1</sup> e 1,54 mg.L<sup>-1</sup> (IBU) e de 1,40 mg.L<sup>-1</sup> e 4,20 mg.L<sup>-1</sup> (PAR). Estudos de precisão e exatidão da metodologia proposta mostraram que a mesma era satisfatória. Para a determinação em urina, foi usado o PARAFAC para fazer a deconvolução dos espectros. Os parâmetros de mérito foram estabelecidos também nesse caso: LD: 0,54 mg.L<sup>-1</sup> e 0,83 mg.L<sup>-1</sup> (IBU e PAR); LQ: 1,65 mg.L<sup>-1</sup> e 2,48 mg.L<sup>-1</sup> (IBU e PAR). O segundo estudo de caso foi baseado na discriminação de adulterantes no leite UHT por espectroscopia NIR acoplada a técnicas quimiométricas de discriminação (SIMCA, PLS-DA e SVM – DA). Os adulterantes usados foram água (5 a 40% v/v), ureia e formol (1 a 5 g.L<sup>-1</sup>). Medidas de reflectância foram feitas na faixa de 1100 a 2500 nm. O método SIMCA não foi capaz de discriminar a ureia em nenhum nível. Os métodos PLS-DA e SVM-DA mostraram resultados satisfatórios para discriminação dos adulterantes mesmo em um nível baixo de adulteração.

Palavras-chave: Medicamentos. Urina. Leite UHT. Classificação.

## ABSTRACT

PINHO, Jéssica da Silva Alves. *The application of chemometrics and spectrometric in simultaneous determination of Ibuprofen and Paracetamol and for the detection of adulteration in UHT milk*. 2016. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Instituto de Química – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

This thesis comprises two different case studies: the first one is based on the development of a method for simultaneous determination of Ibuprofen (IBU) and Paracetamol (PAR) by spectrofluorimetric determination coupled with multivariate calibration in drugs and urine and validation by HPLC. The concentration range was from 2 to 7 mg.L<sup>-1</sup> (IBU) and from 10 to 20 mg.L<sup>-1</sup> (PAR) in both techniques. The results obtained for an aqueous standard for both methodologies were compared by using the orthogonal distance method, while the content of analytes in drugs was compared by using of F test, for a confidence level of 95%. In both cases, the methodologies were concordant. The LOD and LOQ were: 0.48 and 1.54 mg.L<sup>-1</sup> (IBU); 1.40 and 4.20 mg.L<sup>-1</sup> (PAR), respectively. Precision tests and accuracy tests of methodology showed that it was satisfactory. For determination in urine, it was used PARAFAC to perform the deconvolution of spectra. The figures of merit were also established in this case (LOD: 0.54 and 0.83 mg.L<sup>-1</sup> for IBU and PAR; LOQ: 1.65 and 2.48 mg.L<sup>-1</sup> for IBU and PAR). The second case study was based on the discrimination of adulterants in UHT milk by NIR spectroscopy coupled with chemometric discrimination techniques (SIMCA, PLS – DA and SVM – DA). The adulterants used were water (from 5 to 40 % v/v), urea and formaldehyde (from 1 to 5 g.L<sup>-1</sup>). The analysis was done in the range from 1100 to 2500 nm. The spectra of milk with and without adulteration did not show the significative visual difference. The SIMCA method was not able to discriminate the urea at any level. The PLS – DA and SVM – DA methods showed satisfactory results for adulterants discrimination even in a low degree of adulteration.

Keywords: Drugs. Urine. UHT milk. Classification.

## RESUMEN

PINHO, Jéssica da Silva Alves. *La aplicación de la quimiometría y de la espectrometría en la determinación simultánea de Ibuprofeno y Paracetamol y para la detección de la adulteración de la leche UHT*. 2016. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Instituto de Química – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Esta tesis comprende dos diferentes estudios de caso: el primero basado en el desarrollo de una metodología en la determinación simultánea de Ibuprofeno (IBU) y Paracetamol (PAR) por espectrofluorimetría acoplada a calibración multivariante en drogas y en orina por el método de adición estándar y validación por HPLC. La concentración para la determinación espectrofluorimétrica y por HPLC fue de 2 hasta 7 mg.L<sup>-1</sup> (IBU) y 10 hasta 20 mg.L<sup>-1</sup> (PAR). Los resultados obtenidos para un estándar acuoso de las dos metodologías fueron comparados por el método de la distancia ortogonal y los niveles en las drogas por medio del test *F*, para un nivel de confianza de 95%. En los dos casos, fue comprobado que las metodologías eran concordantes. Los valores de LOD y LOQ obtenidos fueron: 0,48 mg.L<sup>-1</sup> y 1,54 mg.L<sup>-1</sup> (IBU); 1,40 mg.L<sup>-1</sup> y 4,20 mg.L<sup>-1</sup> (PAR). Estudios de precisión y exactitud fueron realizados y mostraron que la metodología propuesta era satisfactoria. Para la determinación en orina, fue usado el PARAFAC para hacer la deconvolución de los espectros. Las cifras de mérito también fueron establecidos en este caso: LOD: 0,54 mg.L<sup>-1</sup> y 0,83 mg.L<sup>-1</sup> (IBU y PAR); LOQ: 1,65 mg.L<sup>-1</sup> y 2,48 mg.L<sup>-1</sup> (IBU y PAR). El segundo estudio de caso fue basado en la discriminación de adulterantes en la leche UHT por espectroscopia IR acoplada a técnicas quimiométricas de discriminación (SIMCA, SVM-DA y PLS – DA). Los adulterantes utilizados fueron agua (de 5 hasta 40 % v/v), urea y formaldehído (de 1 hasta 5 g.L<sup>-1</sup>). Análisis fue efectuado de 1100 a 2500 nm. Los espectros con y sin adulteración no mostraron diferencias visuales significativas. El método SIMCA no fue capaz de discriminar la urea. SVM-DA y PLS-DA mostraron resultados satisfactorios inclusive a un bajo nivel de adulteración.

Palabras- clave: Drogas. Orina. Leche UHT. Clasificación.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do PAR	24
Figura 2	Estrutura química do IBU	25
Figura 3	Representação do estado fundamental e dos estados excitados singleto e tripleto.	33
Figura 4	Diagrama parcial de níveis de energia para um sistema fotoluminescente	34
Figura 5	Representação de dados gerados por espectrofluorescência	38
Figura 6	Vibrações no IR	39
Figura 7	Diagrama de energia potencial para os osciladores.	41
Figura 8	Regiões aproximadas de absorção das principais ligações na região NIR	43
Figura 9	Esquema adaptado para os modos de medida em espectroscopia NIR	44
Figura 10	Tipos de cromatografia	45
Figura 11	Esquema de funcionamento do HPLC	47
Figura 12	Representação de medidas em calibração univariada	48
Figura 13	Representação de uma única amostra em calibração multivariada de primeira ordem.	53
Figura 14	Representação de um conjunto de amostras que gera uma matriz de dados de primeira ordem.	53
Figura 15	Decomposição da matriz de dados pelo PLS	54
Figura 16	Análise gráfica para escolha do número de variáveis latentes	55
Figura 17	Representação de dados de segunda ordem	56
Figura 18	Representação geométrica do modelo PARAFAC - decomposição de um arranjo de dados tridimensionais em tríades de vetores peso	58
Figura 19	Representação do uso do CONCORDIA	60
Figura 20	Representação da região de aceitação para o teste F	62

	bilateral	
Figura 21	Representação da curva de Horwitz	65
Figura 22	Representação geométrica da propriedade de ortogonalidade do NAS	69
Figura 23	Comparação entre o espectro original e após alisamento pela média	74
Figura 24	Alisamento pela média móvel	75
Figura 25	Alisamento pelo método <i>Savgol</i>	76
Figura 26	Uso de derivadas para correção da linha de base em espectros	77
Figura 27	Aplicação do MSC em espectros NIR	78
Figura 28	Comparação entre os dados originais e centrados na média	79
Figura 29	Matrizes do PCA	81
Figura 30	Avaliação da escolha do número de PCs.	82
Figura 31	Teste Hotelling $T^2$	83
Figura 32	Modelo SIMCA	85
Figura 33	Esquema de classificação por meio do SVM	86
Figura 34	Exemplo de classificação usando PLS – DA	87
Figura 35	Representação do KNN	88
Figura 36	Representação do LDA	90
Figura 37	Representação da seleção do algoritmo KS	92
Figura 38	Representação da seleção de dados pelo algoritmo duplex	92
Figura 39	Representação da seleção de dados pelo algoritmo ShenkWest	93
Figura 40	Espectro de emissão de fluorescência do IBU e do PAR	103
Figura 41	Modelo para padrão aquoso de IBU por espectrofluorescência	104
Figura 42	Modelo para padrão aquoso de PAR por espectrofluorescência	105
Figura 43	Modelo para padrão aquoso de IBU por HPLC.	106
Figura 44	Modelo para padrão aquoso de PAR por HPLC.	106
Figura 45	Relação entre concentração estimada por HPLC e por espectrofluorescência	107

Figura 46	Matriz de emissão – excitação de 10 mg.L <sup>-1</sup> de PAR e 2 mg.L <sup>-1</sup> de IBU em amostra de medicamento.	108
Figura 47	Gráfico de valores de RMSECV	109
Figura 48	Sobreposição dos espectros de emissão IBU e PAR	110
Figura 49	Cromatograma de uma mistura sintética de medicamento contendo PAR e IBU.	111
Figura 50	EEM de urina diluída 1000x.	120
Figura 51	EEM de amostra de urina diluída 1000x enriquecida com 3 mg.L <sup>-1</sup> de IBU e 12 mg.L <sup>-1</sup> de PAR	121
Figura 52	Pesos de excitação.	122
Figura 53	Pesos de emissão	122
Figura 54	Relação entre a concentração predita x Escores PARAFAC	123
Figura 55	Cromatograma de amostra de urina diluída 1000x enriquecida com 2 mg.L <sup>-1</sup> de IBU e 10 mg.L <sup>-1</sup> de PAR	125
Figura 56	Modelo de IBU em urina por HPLC.	126
Figura 57	Modelo de PAR em urina por HPLC.	126
Figura 58	Espectro NIR de leite puro e leite adulterado com água.	129
Figura 59	Porção (1380 – 1660 nm) aumentada do espectro NIR de leite puro e leite adulterado com água.	130
Figura 60	Valores de RMSECV para amostras de leite	132
Figura 61	Avaliação do modelo PCA para amostras de leite	133
Figura 62	Avaliação do novo modelo PCA após retirada de <i>outlier</i>	134
Figura 63	Representação da classificação esperada	135
Figura 64	Representação da classificação pelo SIMCA	136
Figura 65	Representação da classificação pelo SVM – DA	137
Figura 66	Representação da classificação pelo PLS – DA	140

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração de PAR e IBU em padrões aquosos	97
Tabela 2	Concentração de PAR e IBU nas misturas sintéticas de padrões aquosos	97
Tabela 3	Teor em miligramas dos medicamentos e concentração teórica do princípio ativo na solução estoques ([P.A.])	99
Tabela 4	Concentrações das misturas sintéticas de medicamentos	99
Tabela 5	Amostras de urina enriquecidas com PAR e IBU	100
Tabela 6	Adulterantes utilizados	102
Tabela 7	Teor médio calculado nos medicamentos por espectrofluorescência molecular.	111
Tabela 8	Teor médio calculado nos medicamentos por HPLC.	112
Tabela 9	Dados de precisão para espectrofluorescência para IBU e para PAR em medicamentos.	113
Tabela 10	Dados do estudo de recuperação para o IBU em medicamentos por espectrofluorescência	114
Tabela 11	Dados do estudo de recuperação para o PAR em medicamentos por espectrofluorescência	115
Tabela 12	Dados de precisão para HPLC para o IBU e para o PAR em medicamentos.	116
Tabela 13	Dados do estudo de recuperação para o IBU em medicamentos por HPLC	117
Tabela 14	Dados do estudo de recuperação para o PAR em medicamentos por HPLC	117
Tabela 15	Comparação entre as metodologias na determinação do teor calculado nos medicamentos.	118
Tabela 16	Valores calculados para teste F para as variâncias.	119
Tabela 17	Número de componentes obtidos pelo PARAFAC	121
Tabela 18	Dados do estudo de recuperação para o IBU em urina por espectrofluorescência.	123
Tabela 19	Dados do estudo de recuperação para o PAR em urina por espectrofluorescência.	124

Tabela 20	Parâmetros de Mérito (PARAFAC) na determinação de IBU e PAR em urina.	124
Tabela 21	Dados do estudo de recuperação para o IBU em urina por HPLC.	127
Tabela 22	Dados do estudo de recuperação para o PAR em urina por HPLC.	127
Tabela 23	Estudo de precisão por HPLC para o IBU e PAR em urina	127
Tabela 24	Níveis de adulteração	131
Tabela 25	Classes para discriminação.	135
Tabela 26	Parâmetros de mérito para a discriminação pelo método SVM-DA.	138
Tabela 27	Parâmetros de mérito para a discriminação pelo método PLS-DA.	140

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AAS	<i>Acetylsalicylic acid</i> (Ácido acetilsalicílico)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BLLS	<i>Bilinear Least Squares</i>
CA	Concentração Adicionada
CC	<i>Core Consistency</i>
CE	Concentração estimada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLS	<i>Classical Least Squares</i>
CMP	Caseinomacropéptido
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DTD	Decomposição Direta Trilinear
EEM	<i>Excitation - Emission matrix</i>
ESPEC	Especificidade
FIR	<i>Far Infrared</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared</i>
GC – MS	<i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i>
GMP	Glicomacropéptido
GSAM	<i>Generalized Standard Addition Method</i>
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IBU	Ibuprofeno
ICH	<i>International Conference on Harmonization's</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IR	<i>Infrared</i>
ISO	<i>International Standard Organization</i>
KS	<i>Kennard Stone</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação

LS – SVM	<i>Least Squares – Support Vector Machine</i>
MC	<i>Mean Centering</i>
MED	Medicamento
MIR	<i>Mid Infrared</i>
MSC	<i>Multiplicative Scatter Correction</i>
NAS	<i>Net Analytical Signal</i>
NIR	<i>Near Infrared</i>
OSC	<i>Orthogonal Signal Correction</i>
PAR	Paracetamol
PARAFAC	<i>Parallel Factor Analysis</i>
PC	<i>Principal Component</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PLS	<i>Partial Least Squares</i>
PLS-DA	<i>Partial Least Squares - Discriminant Analysis</i>
PREC	Precisão
RM	Recuperação Média
RMSECV	<i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i>
RMSEP	<i>Root Mean Square Error of Prediction</i>
SAVGOL	<i>Savitzky-Golay</i>
SEN	Sensibilidade
SIMCA	<i>Soft Independent Modeling Class Analogy</i>
SOSAM	<i>Second Order Standard Addition Method</i>
SVM-DA	<i>Support Vector Machine – Discriminant Analysis</i>
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultra Violeta
UV – VIS	Ultravioleta Visível
VLs	Variáveis Latentes

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b>	22
1.	<b>CONTEXTUALIZAÇÃO</b>	23
1.1	<b>Estudo de caso sobre determinação de fármacos por espectrofluorimetria</b>	23
1.1.1.	<u>Medicamentos utilizados</u>	24
1.1.1.1.	Metodologias para determinação de Ibuprofeno e Paracetamol	26
1.2.	<b>Estudo de caso sobre a determinação da adulteração em amostras de leite UHT</b>	29
1.2.1.	<u>Metodologias para determinação de fraude em amostras de leite</u>	29
2.	<b>FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	33
2.1.	<b>Espectrometria de luminescência</b>	33
2.1.1.	<u>Fatores que afetam a fluorescência</u>	36
2.1.2.	<u>Matrizes de excitação – emissão (EEM) para fluorescência</u>	37
2.2.	<b>Espectroscopia de Infravermelho</b>	38
2.2.1.	<u>Transições rotacionais e rotacionais – vibracionais</u>	41
2.2.2.	<u>Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR)</u>	42
2.3.	<b>Cromatografia</b>	44
2.3.1.	<u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</u>	45
2.4.	<b>Quimiometria</b>	47
2.4.1.	<u>Calibração Univariada</u>	48
2.4.2.	<u>Calibração Multivariada</u>	51
2.4.2.1	Calibração Multivariada de Primeira Ordem	52
2.4.2.2.	Calibração Multivariada de Segunda Ordem	55
2.4.2.2.1.	Método de Adição de Padrão de Segunda Ordem	60
2.4.3.	<u>Testes estatísticos para comparação entre metodologias</u>	61
2.4.3.1	Uso do teste F para proporcionalidade entre as variâncias	61
2.4.4.	<u>Validação da Metodologia</u>	62
2.4.4.1.	Parâmetros de Mérito para calibração univariada	63
2.4.4.1.1.	Coeficiente de correlação e determinação	63

2.4.4.1.2.	Linearidade	64
2.4.4.1.3.	Precisão	64
2.4.4.1.4.	Exatidão	66
2.4.4.1.5.	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	66
2.4.4.1.6.	Sensibilidade e sensibilidade analítica	68
2.4.4.1.7.	Teste F para significância do modelo	68
2.4.5.	<u>Parâmetros de Mérito para Calibração Multivariada</u>	69
2.4.5.1.	Sinal Analítico Líquido ( <i>Net Analytical Signal – NAS</i> )	68
2.4.5.2.	Sensibilidade, sensibilidade analítica e seletividade para dados multivariados	70
2.4.5.3.	Exatidão para dados multivariados	72
2.4.5.4.	Precisão para dados multivariados	72
2.4.5.5.	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para dados multivariados	72
2.5.	<b>Pré - tratamento dos dados</b>	73
2.5.1.	<u>Transformação dos dados</u>	73
2.5.1.1.	Técnicas de alisamento	73
2.5.1.1.1	Alisamento pela média	74
2.5.1.1.2.	Alisamento pela média móvel	74
2.5.1.1.3.	Alisamento pelo método de Savitzky – Golay ( <i>Savgo</i> )	75
2.5.1.2.	Técnicas da correção da linha de base	76
2.5.1.2.1.	Derivadas	76
2.5.1.2.2.	Correção do sinal multiplicativo (MSC – <i>Multiplicative Signal Correction</i> )	77
2.5.1.2.3.	Correção do sinal ortogonal (OSC – <i>Orthogonal Signal Correction</i> )	77
2.5.2	<u>Pré – processamento dos dados</u>	78
2.5.2.1	Centralização na média (MC – <i>Mean centering</i> )	78
2.5.2.2.	Escalamento pela variância	79
2.5.2.3.	Autoescalamento ( <i>Autoscale</i> )	79
2.6.	<b>Técnicas quimiométricas</b>	80

2.6.1.	<u>Aprendizagem Não Supervisionada</u>	80
2.6.1.1.	Análise do Componente Principal	80
2.6.2.	<u>Aprendizagem Supervisionada</u>	84
2.6.2.1.	SIMCA	84
2.6.2.2.	SVM-DA	86
2.6.2.3	PLS-DA	86
2.6.2.4.	KNN	88
2.6.2.5.	LDA e QDA	89
2.7.	<b>Algoritmos para seleção de dados ou variáveis</b>	91
2.7.1.	<u>Algoritmo KS</u>	91
2.7.2.	<u>Algoritmo Duplex</u>	92
2.7.3.	<u>Algoritmo Select (ShenkWest)</u>	93
2.8.	<b>Parâmetros de Mérito para Métodos de Discriminação</b>	93
3.	<b>EXPERIMENTAL</b>	95
3.1.	<b>Determinação de Ibuprofeno e Paracetamol</b>	95
3.1.1	<u>Materiais e Métodos</u>	95
3.1.1.1.	Para determinação por espectrofluorescência	95
3.1.1.2.	Para determinação por HPLC	96
3.1.2.	<u>Testes preliminares para determinação de PAR e IBU por espectrofluorescência</u>	96
3.1.3.	<u>Determinação de PAR e IBU em padrões aquosos</u>	97
3.1.3.1.	Por espectrofluorescência	97
3.1.3.2.	Por HPLC	98
3.1.4.	<u>Determinação de PAR e IBU em medicamentos</u>	98
3.1.4.1.	Por espectrofluorescência	98
3.1.4.2.	Por HPLC	99
3.1.5.	<u>Determinação de PAR e IBU em urina</u>	100
3.1.5.1.	Por espectrofluorescência	100
3.1.5.2.	Por HPLC	101
3.2.	<b>Determinação de adulteração no leite UHT</b>	101
3.2.1.	<u>Análise por espectroscopia NIR</u>	101
4.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	103
4.1.	<b>Determinação de Ibuprofeno e Paracetamol</b>	103

4.1.1.	Testes preliminares para determinação de PAR e IBU em padrões aquosos por espectrofluorescência	103
4.1.2.	<u>Quantificação de IBU e PAR em padrão aquoso</u>	104
4.1.2.1.	Por espectrofluorescência	104
4.1.2.2.	Por HPLC	105
4.1.2.3.	Comparação para determinação de PAR e IBU em padrões aquosos por espectrofluorescência e HPLC	107
4.1.3.	<u>Determinação de PAR e IBU em medicamentos</u>	108
4.1.3.1.	Por espectrofluorescência	108
4.1.3.2.	Por HPLC	111
4.1.4.	<u>Parâmetros de Mérito para PAR e IBU em medicamentos por espectrofluorescência</u>	112
4.1.4.1.	Linearidade para determinação de PAR e IBU em medicamentos por espectrofluorescência	112
4.1.4.2.	Precisão para determinação de PAR e IBU em medicamentos por espectrofluorescência	113
4.1.4.3.	Exatidão para determinação de PAR e IBU em medicamentos por espectrofluorescência	114
4.1.5.	<u>Parâmetros de Mérito para PAR e IBU em medicamentos por HPLC</u>	115
4.1.5.1.	Linearidade para determinação de PAR e IBU em medicamentos por HPLC	115
4.1.5.2.	Precisão para determinação de PAR e IBU em medicamentos por HPLC	116
4.1.5.3.	Exatidão para determinação de PAR e IBU em medicamentos por HPLC	116
4.1.6.	<u>Comparação da determinação de PAR e IBU em medicamentos por espectrofluorescência e HPLC</u>	118
4.1.7.	<u>Determinação de PAR e IBU em urina</u>	119
4.1.7.1.	Por espectrofluorescência	119
4.1.7.2.	Por HPLC	125
4.1.7.3.	Comparação entre as metodologias para determinação de PAR e IBU em urina	128

4.2.	<b>Discriminação de adulterantes no leite</b>	128
4.2.1.	<u>Análise do Espectro</u>	128
4.2.2.	<u>Emprego do PCA</u>	131
4.2.3.	<u>Discriminação dos adulterantes</u>	134
4.2.3.1.	SIMCA	136
4.2.3.2.	SVM – DA	136
4.2.3.3.	PLS – DA	139
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	142
	<b>REFERÊNCIAS</b>	146
	<b>ANEXO A</b> – Resumo do trabalho aceito para apresentação na forma de pôster no VIII Colloquim Chemometricum Mediterraneum (CCM)	157
	<b>ANEXO B</b> – Trabalho publicado em 18/06/2014 em <i>Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry</i>	158
	<b>ANEXO C</b> – Capítulo de livro aceito e publicado em dezembro de 2015 pela <i>Nova Science Publishers, NY, USA.</i>	159
	<b>ANEXO D</b> – Trabalho submetido em 03/02/2016 em <i>Analytical Methods</i>	160
	<b>ANEXO E</b> - Trabalho futuro ( <i>Projeto em colaboração com o Prof. Dr. Wagner Felipe Pacheco – UFF</i> )	161
	<b>ANEXO F</b> – Orientações (trabalho de conclusão de curso – monografia, iniciação científica – IC e estágio interno complementar – EIC) realizadas durante o doutorado	162

## INTRODUÇÃO

Cada vez mais há um interesse por parte das indústrias alimentícia e farmacêutica de se ter um controle de qualidade nos produtos gerados por esses setores. Muitas vezes para isso é necessário o uso de ferramentas analíticas acopladas à quimiometria.

No tocante à indústria farmacêutica, há sempre o risco da falsificação de medicamentos, o que faz com que tais produtos sejam potencialmente nocivos para quem consome, havendo então uma necessidade crescente de se desenvolver metodologias confiáveis, que ofereçam resultados precisos e exatos na identificação do princípio ativo em medicamentos.

No tocante à indústria de alimentos, também há o risco de fraude em diferentes tipos de produtos, como, por exemplo, o leite, o qual muitas vezes se encontra adulterado com água, amido, formol, etc. Dessa forma, há uma necessidade de se detectar, de maneira confiável, se há ou não a adulteração e quando houver o tipo de adulterante usado.

No primeiro estudo de caso, a proposta foi desenvolver um método alternativo baseado na espectrofluorescência molecular acoplada à calibração multivariada (primeira ordem para medicamentos e segunda ordem para urina) que fosse capaz de determinar simultaneamente paracetamol (PAR) e ibuprofeno (IBU) e posterior validação por cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography – HPLC). Tal método foi proposto levando em consideração que a grande maioria das determinações dos analitos é feita de forma individual e nos casos em que é feita de forma simultânea não se estabeleceram parâmetros de mérito para o método desenvolvido quando o mesmo difere da técnica de referência (de acordo com a Farmacopéia Americana) que é o HPLC.

No segundo estudo de caso, a proposta foi desenvolver um método que fosse capaz não apenas de identificar fraude em amostras de leite bovino, mas também de discriminar os adulterantes utilizados por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) acoplada às técnicas quimiométricas de discriminação.

No final do trabalho, há uma sessão de anexos com publicações, trabalhos apresentados/submetidos e orientações ao longo do doutorado.

## **1. CONTEXTUALIZAÇÃO**

### **1.1. Estudo de caso sobre a determinação de fármacos por espectrofluorimetria**

O setor de controle de qualidade de produtos farmacêuticos tem se tornado cada vez mais representativo e a determinação do teor do princípio ativo no medicamento final tem sido bastante requerida. No controle de qualidade, a maioria dos métodos são fundamentados em técnicas instrumentais que são relativamente demoradas e dispendiosas, como a Cromatografia Líquida de Alta Performance (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC), o que pode impossibilitar o estabelecimento de análises rápidas.

O desenvolvimento de novas tecnologias voltadas para a produção e controle de fármacos e medicamentos tem recebido bastante atenção por parte de centros de ensino e pesquisa. Portanto, se faz necessária a introdução de uma tecnologia de rápida incorporação no mercado farmacêutico.

A espectroscopia de luminescência é uma ferramenta analítica extremamente sensível, sendo amplamente aplicada na resolução de problemas que requerem baixos limites de detecção. A sensibilidade da técnica é consideravelmente maior do que em comparação a outras metodologias, entre elas a espectrofotometria UV – Visível (UV – Vis). A sensibilidade e seletividade oferecidas pela espectroscopia de luminescência têm encontrado amplo uso na análise de numerosas substâncias de interesse farmacêutico, biológico, ambiental e industrial. A estas características devem ser adicionadas a simplicidade instrumental e o baixo custo de manutenção e análise, quando comparados com outros métodos analíticos (SOTOMAYOR *et al.*, 2008).

A importância do controle químico de produtos farmacêuticos como resultado do impacto na saúde pública e socioeconômica demanda métodos analíticos sensíveis e confiáveis. Adicionalmente a estas exigências juntam-se aquelas que implicam o acompanhamento das análises em larga escala com

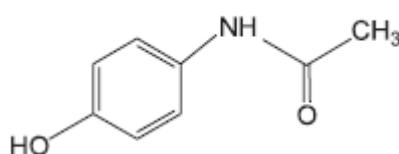
altas velocidades de amostragem. Nos últimos anos, muitos grupos de pesquisas têm se dedicado ao desenvolvimento de novos métodos analíticos baseados na emissão de luminescência, dentre eles a quimiluminescência e fluorescência no intuito de determinar diferentes fármacos em diversos tipos de preparações farmacêuticas. Como em muitos casos ao se trabalhar com fármacos pode-se haver sinais superpostos, o uso da calibração multivariada tem sido uma ferramenta útil na resolução desses sinais. Métodos como o *Partial Least Squares* (PLS), *Parallel Factor Analysis* (PARAFAC), *Bilinear Least Squares* (BLSS) e redes neurais de Kohonen possibilitam a determinação desses fármacos em amostras complexas como urina e soro (SOTOMAYOR *et al.*, 2008).

#### 1.1.1. Medicamentos utilizados

O Paracetamol (PAR) é um sólido cristalino branco inodoro, moderadamente solúvel em água (1 g por 70 mL a 25°C) e que apresenta grande estabilidade em solução aquosa em pH 5 - 7 (LOURENÇÃO, 2009). É um analgésico e antitérmico presente no mercado em várias especialidades farmacêuticas, em diversas apresentações: suspensões, solução, comprimido, cápsula e mastigáveis. Em 1949, pesquisadores confirmaram por estudos e uso clínico a sua efetividade e segurança como analgésico e antitérmico. Porém, foi na década de 60 que seu uso foi amplamente difundido no alívio dos sintomas de adultos e crianças (CONCEIÇÃO, 2009).

Quimicamente, o PAR é uma amida aromática acetilada (Figura 1) que sintetizada por Von Mering em 1893, podendo apresentar-se sob duas formas cristalinas: a monoclinica (comercial) e a ortorrômbica que ocorre pelo aquecimento da primeira (MOYNIHAN; O'HARE, 2002).

Figura 1: Estrutura química do PAR

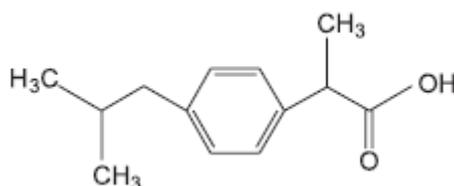


Fonte: SENA *et al.*, 2007.

O Ibuprofeno (IBU) é uma droga não-esteroidal e antiinflamatória que também possui efeito analgésico e antipirético (SENA *et al.*, 2007). É um derivado simples do ácido fenilpropiónico. Em doses de, aproximadamente, 2,4 g por dia tem efeito antiinflamatório equivalente ao de 4 g de AAS. O fármaco frequentemente é prescrito em doses menores, nas quais tem ação analgésica não tendo ação antiinflamatória (RIBEIRO, 2006).

Com os nomes comerciais Advil e Nuprin, por exemplo, é vendido sem prescrição, em apresentações que contêm baixas doses. Aproximadamente, 80% da dose é absorvida no trato gastrointestinal havendo diferença quando da administração em jejum ou pós refeição, pois a presença de alimentos diminui a absorção. A ação se inicia em cerca de 30 minutos após a administração e o tempo de duração da ação analgésica é de 4 a 6 horas (RIBEIRO, 2006). A Figura 2 mostra a estrutura do IBU.

Figura 2: Estrutura química do IBU



Fonte: SENA *et al.*, 2007.

Ao contrário de outros analgésicos e antipiréticos como o ácido acetilsalicílico (AAS), dipirona e ibuprofeno, o PAR não apresenta propriedades anti-inflamatórias (BOSCH *et al.*, 2006). Atualmente, inúmeros estudos têm indicado o PAR em substituição a outros fármacos antitérmicos e analgésicos como a dipirona, levando em consideração que esta pode provocar efeitos colaterais mais evidentes, como uma significativa queda na pressão arterial e no débito urinário além de granulocitose que é rara e, portanto, de difícil prevenção sendo, potencialmente, letal (CONCEIÇÃO, 2009). Diversas pesquisas em pediatria também apontam o Ibuprofeno e o PAR como preferenciais aos demais, em casos de dor e febre, visto que o AAS pode provocar a síndrome de Reye em crianças, doença que causa dano cerebral e pode levar à morte (WRIGHT; LIEBELT, 2007; BILENKO *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que as epidemias de dengue no Brasil contribuíram para um aumento no uso do paracetamol, pois fármacos como o

AAS são contra indicados por proporcionarem maior risco de hemorragias, porém, o PAR também deve ser utilizado com indicação médica, pois doses acima de usual podem prontamente levar à hepatotoxicidade.

### 1.1.2. Metodologias para determinação de Ibuprofeno e Paracetamol

Nos últimos anos, a combinação entre métodos quimiométricos e técnicas de espectroscopia molecular apresentou grandes contribuições para a química analítica, tornando possível, por ex., a determinação de espécies sem resolução de sinal analítico. Uma das aplicações para a qual essa combinação demonstrou importância foi a determinação direta de fármacos. Uma revisão recente da literatura mostrou um aumento do número de publicações propondo o uso de métodos quimiométricos (GILPIN; PACHLA, 2005).

Atualmente, a maioria das metodologias propostas para determinação de fármacos é baseada em técnicas cromatográficas e determinações com métodos univariados. Apesar de essas metodologias estarem bem estabelecidas e serem reconhecidas pelos organismos reguladores, elas podem apresentar desvantagens em certas situações, tais como custo e tempo de análise, relativamente, altos. Desta forma, a partir da última década, o emprego de espectroscopia molecular e calibração multivariada passaram a representar uma alternativa promissora na determinação direta de fármacos e o desenvolvimento desse tipo de método tornou-se importante, tendo como objetivo sua futura aceitação pelas agências reguladoras. Como consequência disso, tornou-se necessário também o estabelecimento de parâmetros de mérito para metodologias multivariadas, requisito para sua validação analítica (SENA *et al*, 2007).

Vários métodos já foram empregados na determinação individual de cada um destes dois fármacos em comprimidos, tais como espectrofotométricos, cromatográficos e potenciométricos para o PAR e espectrofotométricos, cromatográficos e eletroforéticos para o IBU. Os métodos oficiais de acordo com a Farmacopéia Americana (*United States Pharmacopeia* - USP) para determinação das duas espécies simultaneamente são baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção no UV. O fato de PAR e IBU apresentarem espectros de absorção sobrepostos no UV impede

que sejam realizadas determinações espectrofotométricas diretas e simultâneas (SENA *et al.*, 2007).

Milch & Szabo (1991) desenvolveram um método espectrométrico que mostrou ser possível a determinação de paracetamol mesmo na presença de impurezas. Elragehy *et al.* (1994) desenvolveram um procedimento rápido, sensível e específico para determinação de ibuprofeno. A solução do medicamento em clorofórmio foi tratada com Cu (II) em pH 5,5 formando uma substância de cor azul extraída em fase orgânica. A substância então obtida teve sua medida espectrofotométrica feita em 675 nm com uma curva analítica de 0,5 a 3,2 mg.mL<sup>-1</sup>.

Donato *et al.* (1994) fizeram determinação de drogas antiinflamatórias não esteroidais (ibuprofeno, piroxicam e diclofenaco) em drágeas, suspensões, supositórios, cápsulas, soluções injetáveis e comprimidos por eletroforese capilar de zona e cromatografia eletrocínética capilar micelar. Os experimentos foram realizados sem pré - tratamento específico das amostras. Resultados obtidos mostraram uma boa alternativa para método convencional (HPLC).

Ramos *et al.* (1998) desenvolveram um novo método FT - MIR para determinação de paracetamol. O método proposto foi baseado na hidrólise alcalina do analito seguida da oxidação do mesmo, tendo sido o método aplicado para determinação de paracetamol em medicamentos, enquanto que Basu *et al.* (1998) utilizaram espectrofotometria e regressão linear múltipla.

Gasco – Lopez *et al.* (1999) desenvolveram um método de cromatografia (HPLC) para determinação de ibuprofeno e seu produto de degradação e subsequente validação em diferentes fármacos (comprimido, gel, sachês). A detecção foi feita em 254 nm. Franeta *et al.* (2001) desenvolveram um método por HPLC para determinação de paracetamol, cafeína e fenobarbitol, que se mostrou eficaz (estudo de recuperação foram realizados e mostraram resultados entre 96,51 a 98,1%).

Ramos – Martos *et al.* (2001) desenvolveram um método baseado em HPLC para determinação simultânea de paracetamol, cafeína, ácido acetilsalicílico, piridoxina e tiamina em formulações farmacêuticas, com detecção em 285 nm para todos os analitos exceto a tiamina (detectada em 240 nm). A curva analítica se mostrou linear na faixa de 50 a 500 mg.L<sup>-1</sup>.

Sadecka *et al.* (2001) desenvolveram um método para determinação de ibuprofeno em medicamentos através de isotacoforese capilar.

Van Staden & Tsanwani (2002) desenvolveram um método para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas. Tal método envolvia a oxidação do paracetamol por  $K_3Fe(CN)_6$  e uma subsequente reação com fenol na presença de hidróxido de amônio. O complexo azul formado era medido em 630 nm e foi obtido um limite de detecção de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  e a curva analítica se mostrou linear até  $60 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Vieira *et al.* (2003) determinaram paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha, tendo sido os resultados obtidos para o paracetamol em concordância com os de procedimentos de referência da Farmacopéia com um nível de confiança de 95%. Hergert & Escandar (2003) desenvolveram um método para determinação espectrofluorimétrica do complexo betaciclodextrina – ibuprofeno e determinação de ibuprofeno em preparações farmacêuticas.

A determinação simultânea de paracetamol e ibuprofeno é relatada em poucos artigos. Em um deles, essa determinação é feita através de espectrometria de ressonância magnética nuclear de próton (HUSAIN *et al.*, 1994), mas os parâmetros de mérito não foram estabelecidos.

Como já foi mencionado anteriormente, tanto o paracetamol quanto o ibuprofeno são medicamentos largamente consumidos. Então visando ter um controle de qualidade a respeito desses medicamentos pode-se fazer a determinação simultânea ao invés de fazer determinação individual dos analitos.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método alternativo para determinação simultânea de Ibuprofeno e Paracetamol por espectrofluorescência molecular acoplada com calibração multivariada. No caso da determinação em fármacos, foi usada a calibração multivariada de primeira ordem, enquanto que na determinação em amostras de urina foi usada a calibração multivariada de segunda ordem. Para validação do método, os resultados obtidos foram comparados com os obtidos pela técnica de referência (HPLC).

## 1.2. Estudo de caso sobre a determinação da adulteração em amostras de leite UHT

O leite e seus derivados são alimentos ainda muito consumidos mundialmente, mesmo com a existência de indivíduos intolerantes à lactose. Dessa forma, o controle de qualidade físico – químico é muito importante para garantir a saúde das pessoas que os consomem. São estabelecidos limites para tal variação, visando detectar: problemas na produção ou adulterações no produto. Quando o produto fica fora das especificações ele pode ser considerado fraudado ou falsificado.

Como há uma demanda por produtos lácteos que possuam maior duração e com uma melhor conservação das propriedades sensoriais e nutritivas, para serem consumidos, há um interesse crescente por parte da indústria e conseqüentemente do produtor na qualidade do leite tendo como ponto de partida o local de produção.

### 1.2.1. Metodologias para determinação de fraude em amostras de leite

O leite, quanto ao seu aspecto e coloração é um líquido branco, opalescente e homogêneo. Alguns exemplos de alterações estão, portanto, relacionadas ao seu aspecto: presença de grumos, leite filamentososo, material estranho em suspensão e depósito de material estranho. O leite pode ser considerado como adulterado, fraudado ou falsificado quando for adicionado ao mesmo, água ou outras substâncias. Ao longo do tempo novos tipos de adulterações foram surgindo, como adição de soro de queijo, conservantes como peróxido de hidrogênio, neutralizantes tais como hidróxido de sódio ou bicarbonato de sódio e também reconstituintes da densidade e crioscopia tais como sal, açúcar ou amido (BRASIL, 2011).

Uma maneira de verificar se o leite está dentro do padrão, pode ser feito o teste do alizarol. Caso o leite esteja dentro do padrão, o teste resulta no aparecimento de uma coloração vermelho cor de tijolo, sem grumos ou com uma leve precipitação. Quando o leite está levemente ácido, o mesmo resulta em uma tonalidade entre o marrom claro e amarelo enquanto que o fortemente ácido apresenta uma coloração amarelada com coagulação forte. O leite

alcalino apresenta uma coloração lilás ou violeta. Também se podem fazer testes visando identificar se há presença de adulterantes, tais como peróxido de hidrogênio, formaldeído, cloro, hipocloritos, hidróxido e bicarbonato de sódio. Também é possível procurar fraude por adição de soro, como, por exemplo, por meio do índice de caseinomacropéptido (CMP) (BRASIL, 2006).

Como a qualidade dos alimentos de um modo geral é um problema mundial torna-se cada vez mais importante que sejam desenvolvidas metodologias capazes de identificar produtos que apresentem algum tipo de fraude ou baixa qualidade, tanto por razões econômicas quanto por questões de saúde (EGITO *et al.*, 2006). De acordo com Venturini, Sarcineli & Silva (2007), a determinação de gordura é uma das maneiras de verificar fraude em leite.

A espectroscopia NIR foi aplicada (acoplada à quimiometria) para fins de classificação de leite (DOWNEY *et al.*, 1990) e casos de adulteração com gordura (SATO, KAWANO, 1990). Sasic & Osaki (2001) usaram espectroscopia NIR para determinar o teor de proteína e lactose em leite, enquanto que Sorensen, Lund & Juul (2003) usaram para determinar teor de caseína no leite.

Ferrão *et al.* (2007) desenvolveram um método baseado em espectroscopia NIR acoplada ao PLS e ao *Least Squares – Support Vector Machine* (LS – SVM) para quantificar adulterantes em leite pó. Carvalho (2007) desenvolveu um método baseado em espectroscopia MIR para detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo baseada na quantificação de GMP (glicomacropéptido), que é geralmente quantificado por métodos cromatográficos (particularmente a cromatografia de exclusão molecular, HPLC em fase reversa e cromatografia de troca iônica).

A espectroscopia NIR acoplada ao PLS pode ser usada para detecção e quantificação de melamina no leite cru e também em pó (Jawaid *et al.*, 2013; Mauer *et al.*, 2009). Chenghui *et al.* (2009) desenvolveram um método baseado em espectroscopia NIR acoplada a LS – SVM para detectar melamina no leite.

A combinação de NIR e *Partial Least Squares – Discriminant Analysis* (PLSDA) foi usada por Dong *et al.* (2009) para diferenciar leite puro de leite adulterado, assim como por Liu *et al.* (2011) que usaram essa combinação para detecção de melamina no leite. Smirnov (2011) usou espectroscopia NIR

e MIR para discriminar a presença de melamina no leite combinado a técnica com redes neurais artificiais.

Cassoli *et al.* (2011) desenvolveram uma metodologia baseada em FT - MIR acoplada ao PCA (*Principal Component Analysis*) para discriminar os adulterantes: bicarbonato de sódio, citrato de sódio e soro de queijo em diferentes níveis de adulteração: 0,05 a 0,25% (bicarbonato de sódio); 0,025 a 0,075% (citrato de sódio) e 5 a 20% (soro de queijo) em leite cru. Obtiveram bons resultados de sensibilidade e especificidade usando PCA na discriminação de bicarbonato de sódio nos valores de 100% e 93%, respectivamente, ao usar 12 PCs, independentemente do teor da adulteração. Para o citrato de sódio, a sensibilidade variou de 10 a 26% (para o menor nível de adulteração), 22 a 77% (para o nível intermediário de adulteração) e 52 a 98% (nível máximo de adulteração). Essas variações se deram ao fato de terem sido calculados diferentes modelos PCA, variando-se o número de PCs, onde o número mínimo de PCs foi de seis e o máximo de vinte. Para o soro de queijo, no primeiro nível de adulteração, a discriminação variou de 5,5 a 15%; para o segundo nível variou de 4,5 a 10% enquanto que para o nível máximo de adulteração variou de 11 a 47%. Vale ressaltar que o PCA utilizado para realizar a discriminação não é uma técnica efetivamente de classificação, mas sim de análise exploratória dos dados. No caso da metodologia proposta, os parâmetros de mérito calculados foram apenas a sensibilidade a especificidade, não tendo sido calculadas a precisão e exatidão, também necessárias para avaliar a eficácia da metodologia de classificação desenvolvida.

Oliveira *et al.* (2011) usaram espectroscopia Raman acoplada ao PLS - DA para identificar a adulteração do leite em pó com amido, soro de leite e uma mistura de ambos. A faixa de concentração dos adulterantes de forma individual e nas misturas foi de 0 a 50% m/m. Uma concentração mínima de 10% m/m permitiu a identificação da adulteração. Para as amostras não adulteradas, a taxa de sucesso na classificação foi de, aproximadamente, 96% enquanto que a discriminação apenas do soro de leite foi de 95%, aproximadamente, e de 100% quando havia apenas amido. Já na mistura dos adulterantes, a discriminação foi de 99%, aproximadamente. No caso da

metodologia proposta, apenas foram calculadas as taxas de acerto na classificação, não tendo sido calculados os parâmetros de mérito.

Balabin *et al.* (2011) mostraram que a espectroscopia de IR é uma ferramenta útil na determinação de melamina no leite. Eles mostraram que a relação entre o espectro MIR/NIR e o teor de melamina era não linear e por isso métodos de regressão eram requeridos para predizer corretamente a adulteração presente. A regressão dos mínimos quadrados parciais polinomial (Poly – PLS) forneceu resultados satisfatórios na detecção do adulterante mesmo em baixas concentrações.

Zhang *et al.* (2013) desenvolveram um método baseado em espectroscopia NIR acoplada com quimiometria (KNN e SVM) para uma identificação rápida de adulterantes (ureia, melamina e nitrato de amônio) em leite de vaca. Eles obtiveram uma taxa de acerto na discriminação de, aproximadamente, 99,7% no conjunto de treinamento e de 97% no conjunto teste ao se usar SVM. Já ao se usar KNN, obtiveram uma taxa de acerto de 91% no conjunto de treinamento e de 89% no conjunto teste.

No Brasil, entre as fraudes mais comuns praticadas têm-se a adição de soro de leite, amido, sacarose e com menor frequência maltodextrina e soda cáustica. A faixa de fraude mais comum é entre 20 e 25%, visto que nessa faixa o consumidor pode não perceber a adulteração no sabor, mas a fraude pode chegar em até 60% (Ferrão *et al.*, 2007).

O objetivo deste trabalho tipos de adulterantes em amostras de leite bovino por meio da espectroscopia NIR acoplada à técnicas quimiométricas de discriminação para discriminar adição de ureia, água e formol em leite bovino e estabelecer os parâmetros de mérito para o método proposto.

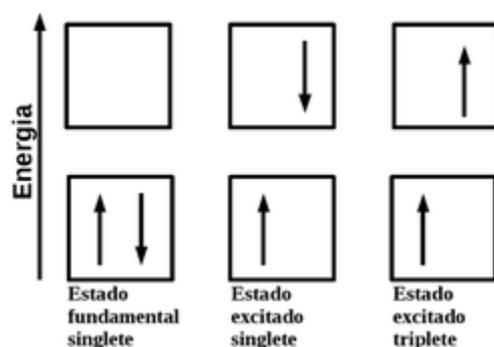
## 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1. Espectrometria de luminescência

A luminescência é a emissão de radiação eletromagnética de qualquer substância, ocorrendo a partir de estados eletrônicos excitados (LAKOWICZ, 2006). O fenômeno luminescente pode ser dividido em fluorescência, fosforescência e quimiluminescência (SOTOMAYOR *et al.*, 2008). Os métodos baseados em fluorescência e fosforescência são aqueles nos quais ocorre a excitação da molécula, que é conduzida pela absorção de fótons, mas que possuem transições eletrônicas diferentes (LAKOWICZ, 2006).

A fluorescência é resultado da absorção de energia radiante com posterior emissão de uma parte desta energia na forma de radiação eletromagnética, que, normalmente, é emitida em um comprimento de onda maior do que é absorvida (Lei de Stokes) (MENDHAM *et al.*, 2002). O estado excitado envolvido é o singleto (no qual o spin do elétron conserva sua orientação original). Já na fosforescência, a orientação do spin do elétron é invertida (transição proibida), o que caracteriza o estado tripleto (LAKOWICZ, 2006; MENDHAM *et al.*, 2002). Na Figura 3 pode-se observar a representação da transição do estado fundamental para o excitado tanto para o estado singleto, quanto para o tripleto.

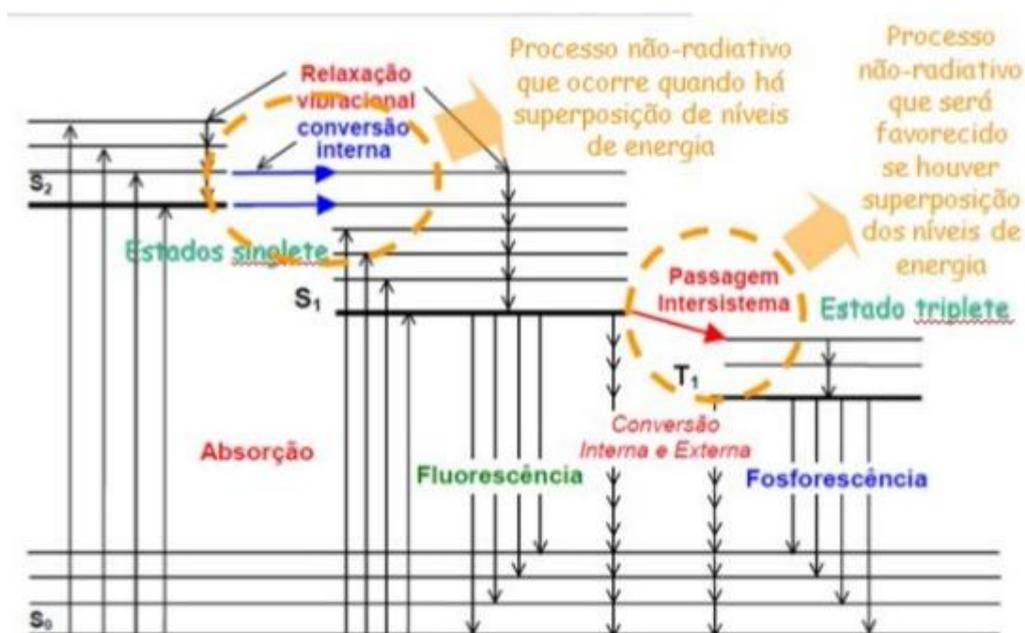
Figura 3: Representação do estado fundamental e dos estados excitados singleto e tripleto.



Fonte: MARKOS, 2006.

O tempo típico para a emissão de fluorescência é da ordem de  $10^{-9}$  (1 ns) a  $10^{-8}$  s<sup>-1</sup>. Já no processo de fosforescência, a taxa é de  $10^3$  a  $10^0$  s<sup>-1</sup>, por isso o tempo de fosforescência é tipicamente de milissegundos a segundos (LAKOWICZ, 2006). O processo que ocorre entre a absorção e a emissão da radiação eletromagnética é usualmente representado pelo *Diagrama de Jablonski* (Figura 4).

Figura 4: Diagrama parcial de níveis de energia para um sistema fotoluminescente.



Fonte: PEREIRA, 2013.

A linha horizontal espessa (na parte inferior) representa a energia do estado fundamental, denominada de S<sub>0</sub> (já que normalmente é um estado singleto). As linhas mais espessas na parte superior são os níveis de energia para os estados fundamentais vibracionais de três estados eletrônicos excitados (S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> à esquerda e T<sub>1</sub> à direita que representa o primeiro estado tripleto). Numerosos níveis de energia vibracional estão associados a cada um dos quatro estados eletrônicos, conforme sugeridos pelas linhas horizontais mais estreitas. Como é possível observar no Diagrama já apresentado, as transições de absorção podem ocorrer do estado eletrônico excitado singleto (S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>). A transição para o estado tripleto não está sendo mostrada, uma vez que essa transição envolve mudança na multiplicidade, a probabilidade da sua

ocorrência é baixa, sendo chamada então de transição proibida (ATVARS, MARTELLI, 2002).

As moléculas excitadas para os estados eletrônicos  $S_1$  e  $S_2$  perdem rapidamente qualquer excesso de energia vibracional e relaxam para o nível vibracional fundamental daquele estado eletrônico. Esse processo não radiante é denominado *relaxação vibracional*. A *conversão interna* é uma transição entre dois estados de mesma multiplicidade (singleto – singleto ou tripleto – tripleto). É particularmente eficiente quando dois níveis eletrônicos de energia estão suficientemente próximos para que ocorra uma superposição nos níveis de energia vibracionais. Essa conversão também pode ocorrer entre o estado  $S_1$  e o estado eletrônico fundamental  $S_0$ . Tal fenômeno através de níveis vibracionais superpostos é geralmente mais provável que a perda de energia por fluorescência, a partir de um estado excitado mais alto (ATVARS, MARTELLI, 2002).

A desativação de um estado eletrônico excitado pode envolver uma interação e transferência de energia entre a molécula excitada e o solvente ou outros solutos. Tal processo é denominado de *conversão externa*. A evidência para esse tipo de conversão inclui um forte efeito exercido pelo solvente na intensidade de fluorescência da maioria das espécies. Além disso, as condições tendem a reduzir o número de colisões entre partículas (baixa temperatura e alta viscosidade) geralmente levam a um aumento da fluorescência. O *cruzamento intersistemas* é um processo no qual há conversão entre estados eletrônicos de diferentes multiplicidades. O processo mais comum é do estado singleto para o estado tripleto ( $S_1 \rightarrow T_1$ ). Assim como na conversão interna, a probabilidade de ocorrer um cruzamento intersistemas aumenta se os níveis vibracionais dos dois estados se superpõem (ATVARS, MARTELLI, 2002).

A fluorescência ocorre, tipicamente, em moléculas aromáticas. Algumas moléculas típicas que exibem fluorescência são: fluoresceína, rodamina e quinina. Já as substâncias contendo estruturas alifáticas e carbonilas alicíclicas ou estruturas de ligações duplas altamente conjugadas também podem apresentar fluorescência, mas em menor intensidade que nos sistemas aromáticos. A maioria dos hidrocarbonetos aromáticos não substituídos fluorescem em solução sendo que a eficiência quântica geralmente aumenta

com o número de anéis e seu grau de condensação. Grupos que são doadores de elétrons aumentam a fluorescência já em contrapartida os que são aceptores diminuem a fluorescência (LAKOWICZ, 2006).

### 2.1.1. Fatores que afetam a fluorescência

Alguns fatores podem afetar a fluorescência, tais como: temperatura, solvente, pH, oxigênio dissolvido e a concentração afetam a intensidade de fluorescência. O rendimento quântico diminui com o aumento da temperatura, em virtude do aumento da frequência das colisões, fazendo com que cresça a probabilidade de conversão externa. Mudanças na temperatura podem alterar o comprimento de onda de emissão máxima da substância (LAKOWICZ, 2006).

A polaridade do solvente também pode influenciar na intensidade de fluorescência de uma determinada substância ou até mesmo pode acarretar em um deslocamento do comprimento de onda da mesma. Algumas substâncias podem exibir baixa ou nenhuma fluorescência em solventes apolares enquanto fluorescem intensamente em solventes polares (LAKOWICZ, 2006).

A viscosidade pode afetar a fluorescência, visto que a mesma diminui as taxas de colisões desativadoras (*quenching*) pela diminuição da difusão das espécies desativadoras. Já o pH também é um fator importante, já que a fluorescência de uma substância aromática com os substituintes do anel com propriedades ácidas ou básicas é usualmente dependente do pH. A forma ácida e sua base conjugada exibem espectros de fluorescência diferentes. Dessa forma, substâncias em pH mais básico podem exibir pouca ou nenhuma fluorescência enquanto que em pH menos básico ou ácido exibe fluorescência. (LAKOWICZ, 2006)

Qualquer processo que resulte na redução da intensidade de fluorescência de uma substância é denominado de supressão da fluorescência. Na atenuação colisional (dinâmica), o fluoróforo e o atenuador entram em colisão. Quando ocorre o contato, o fluoróforo retorna ao estado fundamental sem emitir o fóton. A outra atenuação que pode ocorrer é a estática. Assim como na dinâmica, o contato entre o fluoróforo e o atenuador é necessário. Nesse contato, há a formação, no estado fundamental, de um complexo não

fluorescente, mas essa formação resulta em perturbação do espectro de absorção do fluoróforo, algo que não ocorre na atenuação dinâmica, já que a mesma só afeta o estado excitado do fluoróforo (LAKOWICZ, 2006).

### 2.1.2. Matrizes de excitação – emissão (EEM) para fluorescência

Os espectros de excitação são produzidos pela medida da intensidade de luminescência mantendo-se constante o comprimento de onda de emissão e varrendo-se o de excitação. Já os espectros de emissão são obtidos de forma contrária, mantendo-se o comprimento de onda de excitação constante e varrendo-se o de emissão.

Para se obter uma EEM, o comprimento de onda de excitação é fixo e a excitação é variada em uma faixa pré determinada, ao terminar a faixa de emissão, o comprimento de onda de excitação é variado e o processo de varredura de emissão é repetido. Tal processo é feito até se atingir o último comprimento de onda de excitação que foi previamente estipulado.

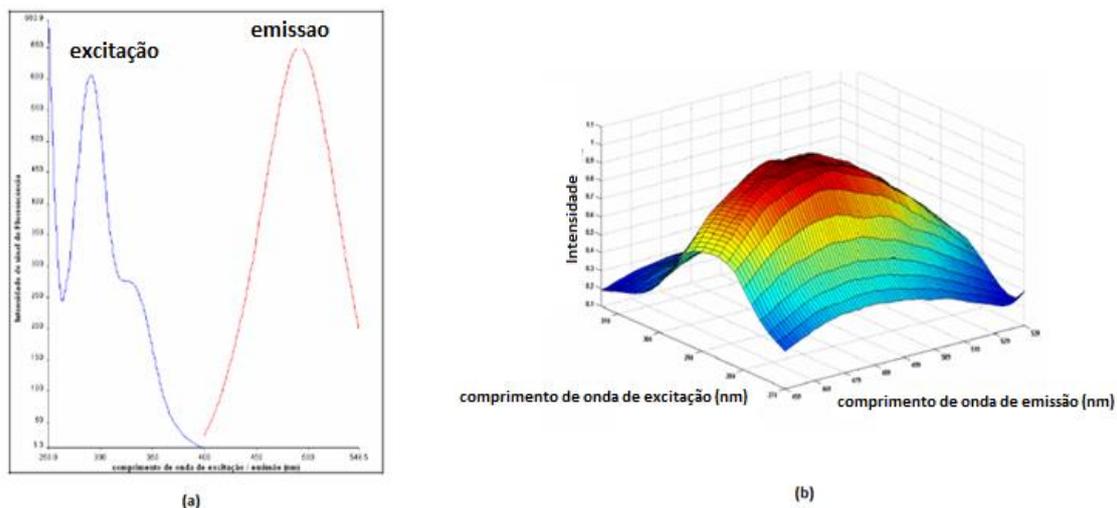
Por exemplo: escolhe-se uma região de excitação entre 220 e 260 nm e uma faixa de emissão entre 280 e 400 nm. Em ambos os casos, pode-se fixar o intervalo em que será feita a medida (por exemplo: 1nm, 2nm, 5nm). No caso do exemplo o intervalo é de 2 nm tanto para emissão quanto para excitação. O comprimento de excitação será fixado em 220 nm e uma varredura de emissão é feita na região previamente mencionada. Ao terminar essa varredura, a excitação muda para o comprimento de onda seguinte, que de acordo com o intervalo (de 2 nm) muda para 222 nm e uma nova varredura na região de emissão é feita. Esse processo é repetido até o último valor do intervalo (260 nm). A projeção desses espectros gera uma superfície tridimensional de fluorescência total, com a presença de todas as bandas de excitação e emissão dos fluoróforos presentes (HARRIS, 2012).

Quanto maior a complexidade da matriz, como é o caso de amostras biológicas, maior a dificuldade de interpretação direta destas superfícies, pois ocorrem grandes superposições espectrais. Amostras de urina, sangue e leite apresentam uma grande variedade de componentes que exibem fluorescência. A identificação dos constituintes presentes pode se dar pela comparação dos

máximos de intensidade destas bandas com os dados relacionados na literatura (HARRIS, 2012).

Os espectrofluorímetros permitem a produção de um espectro somente de excitação ou emissão da fluorescência (Figura 5a) ou de ambos variando simultaneamente, o que gera uma matriz de excitação – emissão (Figura 5b).

Figura 5: Representação de dados gerados por espectrofluorescência



Legenda: (a) Espectro de excitação e emissão (b) Matriz de excitação – emissão

Fonte: COSTA, 2009

## 2.2. Espectroscopia de Infravermelho

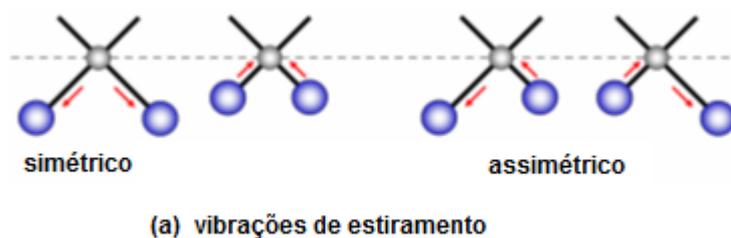
A descoberta da região do Infravermelho (*Infrared* – IR) do espectro eletromagnético foi feita no início do século 19, a partir do trabalho executado por Frederick William Herschel. A partir dessa descoberta inicial, outros estudos foram desenvolvidos usando faixas espectrais como IR próximo, médio, distante e também na região do UV – visível (ILHARCO, 1998).

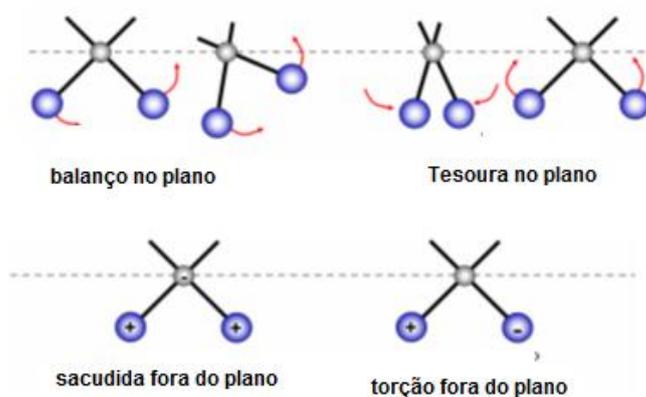
A espectroscopia de IR possui faixas de número de onda (ou comprimento de onda) e as respectivas energias relativas. As regiões do infravermelho são divididas em: infravermelho médio (*Mid Infrared* – MIR) na região de 4000 a 200  $\text{cm}^{-1}$  (ou 2,5 a 50  $\mu\text{m}$ ), próximo (*Near Infrared* – NIR) na região de 12800 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  (ou 0,78 a 2,5  $\mu\text{m}$ ) e distante (*Far Infrared* – FIR) na região de 200 a 10  $\text{cm}^{-1}$  (ou 50 a 1000  $\mu\text{m}$ ) (DOMINGO *et al.*, 2014).

A técnica é baseada na vibração dos átomos de uma molécula. Uma das formas de se obter um espectro de IR é a partir da passagem de radiação infravermelha pela amostra, determinando-se a fração dessa radiação é absorvida (STUART, 2004). Apenas moléculas que possuem momento dipolo que muda são capazes de ter radiação nessa região. Para que haja transferência de energia, uma ligação deve apresentar um dipolo elétrico que mude na mesma frequência da radiação que está sendo introduzida (PAVIA *et al.*, 2015). Esse dipolo varia em função da expansão ou encurtamento da ligação. Um entendimento da simetria da molécula é importante no entendimento da absorção na região do IR. Dessa forma, ligações simétricas como no  $H_2$  ou  $Cl_2$  não absorvem radiação no IR (PAVIA *et al.*, 2015; STUART, 2004).

As vibrações (Figura 6) podem envolver mudança no comprimento da ligação (estiramento) ou no ângulo (deformação). O estiramento e a deformação podem ser no plano ou fora do plano (STUART, 2004). São quatro tipos de deformação: simétrica no plano e fora do plano (tesoura e sacudida respectivamente), assimétrica no plano e fora do plano (balanço e torção respectivamente) (PAVIA *et al.*, 2015).

Figura 6: Vibrações no IR.





(b) vibrações de deformação angular

Legenda: (a) vibrações de estiramento; (b) vibrações de deformação angular

Fonte: NASCIMENTO, 2008.

A vibração de estiramento de uma molécula diatômica pode ser descrita de forma similar ao do modelo de física clássica de duas massas unidas por uma mola. Se uma massa suspensa por uma mola for deslocada a uma distância  $y$  do ponto de equilíbrio, por aplicação de uma força ao longo do eixo da mola, a força restauradora  $F$  é proporcional ao seu deslocamento, o que é conhecido como a Lei de Hooke, equação 1 (STUART, 2004).

$$F = -ky \quad (1)$$

onde  $k$  = constante de força da mola e  $y$  = deslocamento da mola.

Quando uma molécula absorve radiação IR, seus átomos vibram com maior amplitude. Esse comportamento é similar ao de um oscilador harmônico (equação 2) que, pela mecânica quântica, apresenta os níveis de energia vibracional entre dois átomos de uma molécula quantizados (STUART, 2004).

$$E_{vib} = h\nu(\eta + 1/2) \quad (2)$$

onde  $E_{vib}$  e a energia vibracional,  $h$  e a constante de Planck,  $\nu$  e a frequência vibracional clássica e  $\eta$  e o numero quântico vibracional ( $\eta = 0, 1, 2, \dots$ ).

No oscilador anarmônico, o comportamento das moléculas desvia da idealidade, já que o modelo de oscilador harmônico não pode explicar o

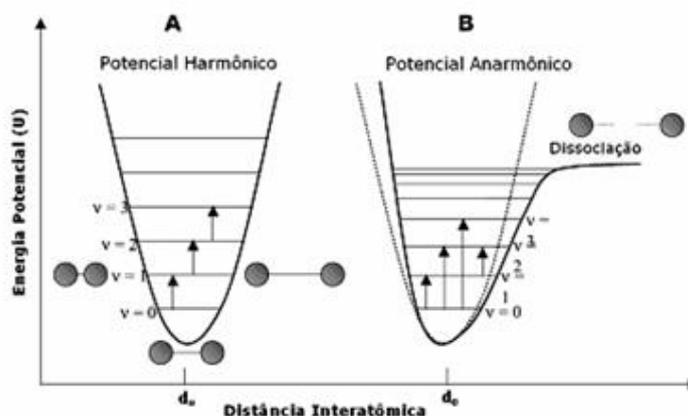
comportamento de moléculas reais, já que o mesmo não considera a interação coulômbica entre átomos ou rompimento das ligações. Conseqüentemente, os níveis de energia quantizados não são igualmente espaçados. Isso é explicado pelo modelo do oscilador anarmônico, onde a diferença dos níveis de energia diminui com o aumento de  $n$ , é mostrado na Equação 3 a seguir (PEREIRA, 2007).

$$E_{vib} = hv[1 - (2n + \Delta n + 1)y] \quad (3)$$

onde  $y$  é o fator de anarmonicidade.

A anarmonicidade resulta de transições entre estados de energia vibracional (onde  $\Delta n = \pm 2, \pm 3, \dots$ ), tais transições produzem bandas de absorção conhecidas como sobretons (transições vibracionais mais fracas) e são muito pouco prováveis de ocorrer se comparadas as transições fundamentais (PEREIRA, 2007). Na Figura 7 podem-se observar os diagramas de energia potencial dos osciladores harmônico e anarmônico.

Figura 7: Diagrama de energia potencial para osciladores



Legenda: (a) harmônico; (b) anarmônico.

Fonte: PEREIRA, 2007.

### 2.2.1. Transições vibracionais e rotacionais – vibracionais

Os níveis de energia vibracionais são também quantizados, sendo que para a maioria das moléculas as diferenças de energia entre estados quânticos correspondentes à região do MIR. O espectro de IR de um gás normalmente

consiste de uma série de linhas muito próximas, já que existem vários níveis de energia rotacionais para cada nível vibracional. Em contrapartida, na rotação em líquidos e sólidos, as linhas rotacionais – vibracionais coalescem, aparecendo apenas bandas vibracionais um pouco alargadas (PAVIA *et al.*, 2015).

A energia requerida para causar uma variação no nível rotacional é muito pequena ( $\lambda > 100 \mu\text{m}$ ). Devido ao fato dos níveis rotacionais serem quantizados, a absorção de radiação por gases, na região do infravermelho distante é caracterizada por linhas discretas bem definidas enquanto que nos líquidos e sólidos, as colisões e interações intermoleculares causam o alargamento das linhas produzindo um espectro contínuo (transições rotacionais) (PAVIA *et al.*, 2015).

### 2.2.2. Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR)

O sinal de NIR é associado com vibrações moleculares, especificamente a sobretons e combinações de bandas fundamentais. As ligações químicas entre moléculas de N – H, C – H e O – H tem frequências vibracionais (LOHUMI *et al.*, 2015).

No IR pode haver sobretons das bandas de absorção (Figura 8), que são múltiplas das bandas fundamentais. A energia requerida para o primeiro sobreton é duas vezes maior que a fundamental. Levando em consideração que a energia é proporcional a frequência absorvida e ao número de onda, o primeiro sobreton irá aparecer no espectro em uma região duas vezes maior de número de onda do que a banda fundamental (STUART, 2004).

Figura 8: Regiões aproximadas de absorção das principais ligações na região NIR

Infravermelho Próximo		
2500	C - H	<b>Combinação de vibrações</b>
2200	O - H    N - H	<b>Combinação de vibrações</b>
1800	C - H	<b>Primeiro sobretom</b>
1600	O - H    N - H	<b>Primeiro sobretom</b>
1420	C - H	<b>Sobretom de combinações</b>
1300	C - H	<b>Segundo sobretom</b>
1100	C - H    N - H	<b>Terceiro sobretom</b>
800		

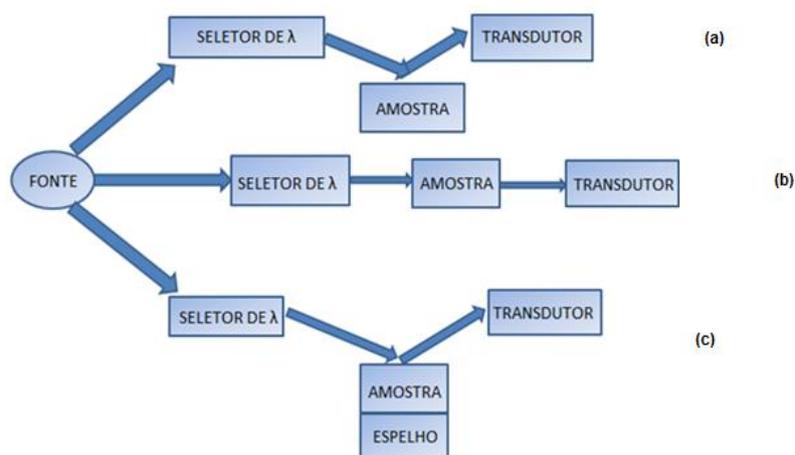
Fonte: SILVA, 2011.

A espectroscopia na região do NIR tem sido largamente usada nos últimos anos em diversos segmentos: alimentício, petroquímico, farmacêutico, entre outros, com o propósito de quantificação. Nessa região, as ocorrências espectrais correspondem aos sinais relacionados aos sobretoms e combinações de transições fundamentais que ocorrem na região do MIR. As ligações envolvidas nas transições vibracionais ativas no NIR são tipicamente C – H, N – H e O – H (PARREIRA, 2003).

O desenvolvimento da microeletrônica, o que permitiu desenvolvimento de equipamentos mais sofisticados bem como o advento da quimiometria permitiram o uso da espectroscopia NIR visando diferentes aplicações (relacionadas tanto a informações químicas quanto físicas, tais como densidade e índice de refração). Há um grande interesse na técnica devido ao fato da mesma apresentar algumas vantagens tais como: a rapidez de análise, a manipulação da amostra é mínima, baixo custo. No entanto, também apresenta algumas desvantagens como qualquer outra técnica, tais como: a complexidade do sinal NIR obriga a aplicação de métodos quimiométricos para modelagem dos dados e posterior quantificação das propriedades de interesse, a técnica é pouco sensível especialmente em medidas de reflectância difusa, impossibilitando geralmente a determinação de componentes menores (NUNES, 2008).

As absorções na região do NIR podem ser feitas de diferentes maneiras: reflectância, transmitância e transflectância, sendo a diferença básica entre elas o posicionamento da amostra no instrumento (Figura 9) (NUNES, 2008).

Figura 9: Esquema adaptado para os modos de medida em espectroscopia NIR:



Legenda: (a) reflectância (b) transmitância (c) transflectância

Fonte: Esquema adaptado de NUNES, 2008.

### 2.3. Cromatografia

Os primeiros artigos que abordaram a cromatografia foram publicados em 1906 por Michael Tswett, um botânico russo, que separou algumas substâncias de extratos de plantas. A partir daí, a técnica desenvolveu-se e ampliou-se até uma forma instrumental com alta sofisticação (MUHLEN, LANÇAS, 2004).

A cromatografia é um método físico – químico de separação. Está fundamentada na migração diferencial de componentes de uma mistura que ocorre devido à diferentes interações, entre a fase móvel e a estacionária (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; JIN *et al.*, 2008).

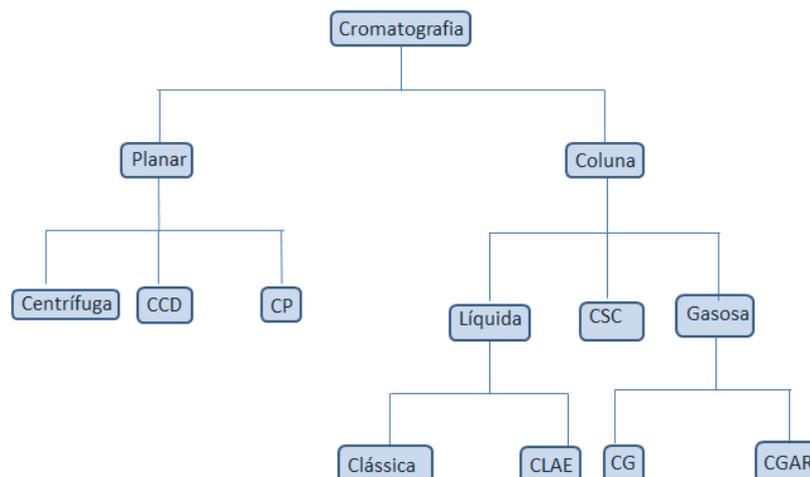
A cromatografia pode ser aplicada para a identificação de substâncias, por meio de comparação com padrões previamente existentes para a purificação de compostos, separando os mesmos de substâncias consideradas como indesejáveis e, posteriormente, para a separação dos componentes da

mistura. Os diferentes tipos de cromatografia podem ser classificados levando-se em conta diversos critérios tais como (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998):

- a) Forma física do sistema cromatográfico: a cromatografia pode ser subdividida em cromatografia em coluna e cromatografia planar.
- b) Fase móvel empregada: cromatografia gasosa, líquida (clássica e de alta eficiência) e supercrítica (na qual se usa um vapor pressurizado acima de sua temperatura crítica).
- c) Fase estacionária empregada: pode ser sólida, líquida ou quimicamente ligada.

A subdivisão da cromatografia pode ser observada na Figura 10 a seguir:

Figura 10: Tipos de cromatografia



Fonte: Adaptado de DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998

### 2.3.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE ou HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) é um tipo de cromatografia líquida na qual se trabalha com alta pressão na coluna (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). É uma técnica que permite separação tanto para fins qualitativos quanto quantitativos, apresentando boa sensibilidade, permitindo separação de diversas substâncias químicas. É muito usada na

indústria farmacêutica, laboratórios de pesquisa e em outros campos da ciência como na medicina e análises ambientais (NOGUEIRA *et al.*, 2011; COLLINS *et al.*, 2002).

A fase móvel deve ser um solvente que dissolva completamente a amostra sem qualquer tipo de interação química, devendo ter também um alto grau de pureza ou ser de fácil purificação, para que seja possível elevada sensibilidade nas análises. Também devem estar livres de oxigênio ou outros gases dissolvidos, sendo filtradas e degaseificadas antes do uso (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998). Também deve ser compatível com o tipo de detector usado e possuir polaridade adequada para permitir uma separação adequada dos analitos presentes na amostra. Normalmente, os solventes mais usados são água, metanol ou acetonitrila. Já na fase estacionária são usados sólidos rígidos ou semi – rígidos, cujas partículas porosas esféricas ou irregulares apresentam diferentes diâmetros e suportam uma pressão de até 350 bar (PFARMA, 2009)<sup>1</sup>.

As colunas usadas em CLAE, normalmente, são constituídas de aço inoxidável, tendo um diâmetro interno em torno de 0,45 cm para separações analíticas. O comprimento pode variar, normalmente, entre 10 – 25 cm. A coluna cromatográfica pode ter como fase estacionária sílica - gel ou alumina que são mais polares que o eluente, o que resulta em uma eluição mais rápida dos componentes apolares em detrimento dos polares (são as chamadas de coluna de fase normal). Algumas colunas têm sua polaridade aumentada ao serem introduzidos grupos polares, tais como –  $(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  ou  $(\text{CH}_2)_3\text{CN}$  as partículas de sílica gel. Já quando a eluição de componentes polares é mais rápida tem-se a coluna de fase reversa (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998).

A bomba do cromatógrafo deve proporcionar ao sistema uma vazão contínua sem pulsos e com alta reprodutibilidade, fazendo com que a eluição da fase móvel ocorra a uma vazão adequada (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998).

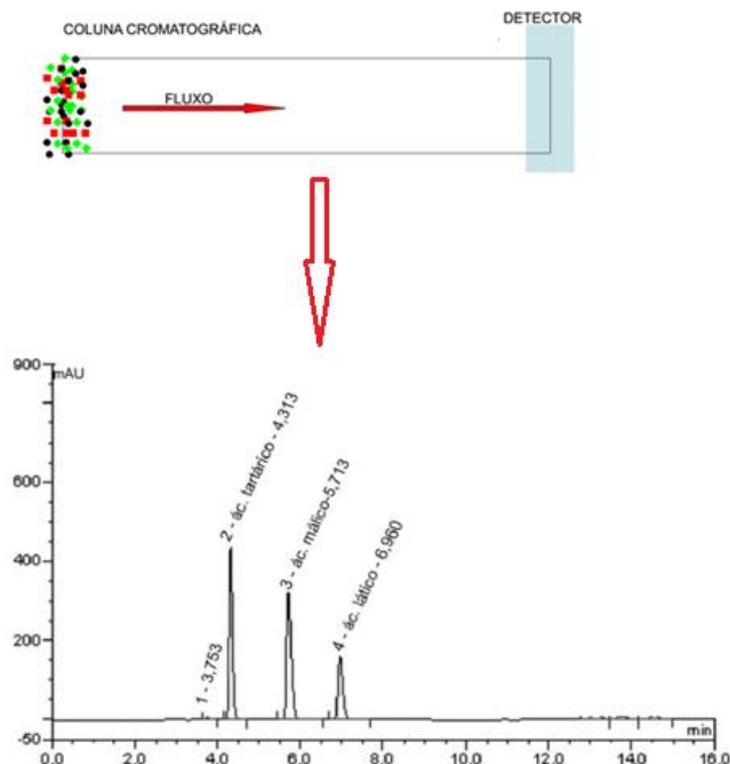
O cromatógrafo possui ainda um detector (Figura 11) que transmite para um registrador um sinal que é interpretado na forma de um cromatograma, sendo feita normalmente uma relação da área do pico com a concentração do analito (JIN *et al.*, 2008). O detector mais usado é UV, mas também podem ser

---

<sup>1</sup> <http://pfarma.com.br/farmacutico-industrial/130-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia-.html>

empregados detectores de fluorescência, índice de refração, eletroquímicos, etc. (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998).

Figura 11: Esquema de funcionamento do HPLC



Fonte: Adaptado de LIMA *et al.*, 2010

Ainda que a técnica seja utilizada como referência para diversos tipos de análise, tendo assim uma larga aplicação, a técnica possui algumas desvantagens tais como o fato de o equipamento ser extremamente sofisticado e caro, além do fato da sua manutenção gerar despesas contínuas. Há ainda a problemática da fase móvel, normalmente solventes orgânicos, como metanol e/ou acetonitrila que em termos ambientais não são desejáveis (ANAZAWA, 1996).

## 2.4. Quimiometria

A quimiometria normalmente é definida como sendo a área que aplica métodos estatísticos e matemáticos na área da química. Dessa forma, a quimiometria faz uso da matemática, estatística e lógica formal para selecionar

procedimentos experimentais e também para extração da maior quantidade possível de informação realmente importante a partir da análise de dados químicos, sendo a química analítica a área da química que mais se beneficia com a quimiometria (LEITÃO, 2005).

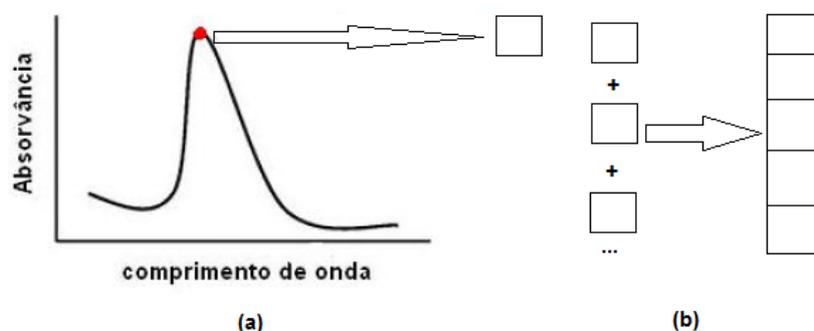
As principais vantagens do uso da quimiometria abrangem: redução do ruído, manipulação de interferentes, análise exploratória e possibilidade de controle ou detecção de *outliers* (BRO, 2003).

As técnicas de calibração usadas em química analítica podem ser classificadas em função da ordem dos dados: univariadas ou multivariadas, como podem ser observadas a seguir.

#### 2.4.1. Calibração univariada

A calibração univariada ou de ordem zero é usada para tratar de dados univariados, ou seja, dados gerados, por exemplo, por eletrodos de íons seletivos, medidas de pH, colorímetros, medidas de intensidade em um único comprimento de onda. Assim sendo, a resposta medida é um escalar (Figura 12a) enquanto que o conjunto de medidas gera um vetor de dados (Figura 12b). A seletividade é um fator importante, dessa forma, tal calibração não pode ser usada quando há presença de interferentes (BROOKSH; KOWALSKI, 1994).

Figura 12: Representação de medidas em calibração univariada



Legenda: (a) um escalar (b) um vetor de dados.

Fonte: Adaptado de COSTA, 2009.

Nesse tipo de calibração, se tem uma relação entre variáveis, por exemplo: concentração (variável independente) e medição do sinal do analito (variável dependente) (GIRÓN, 2007). A resposta instrumental do analito (R) é função da concentração (C) onde também se leva em conta o erro experimental associado (e), o que pode ser observado na equação 4.

$$R = f(C) + e \quad (4)$$

A equação do modelo obtida é um polinômio de primeiro grau, onde os coeficientes normalmente são calculados pelo método de regressão dos mínimos quadrados, visando à minimização do erro, como pode ser observado na equação 5 a seguir (LEITÃO, 2005).

$$\sum_i^N e_i^2 = \sum_i^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (5)$$

onde  $e_i$  é o erro do modelo,  $y_i$  é o valor medido da variável resposta enquanto  $\hat{y}_i$  é o valor predito da variável resposta.

Levando-se em consideração, de acordo com a equação 6, que:

$$y = b_0 + b_1 x \quad (6)$$

onde  $y$  é a variável dependente,  $b_0$  o coeficiente linear,  $b_1$  o coeficiente angular e  $x$  a variável independente.

Substituindo a equação 6 em 5, se obtém a equação 7:

$$\sum_{i=1}^n (y_i - b_0 - b_1 x_i)^2 \quad (7)$$

Derivando a equação 7 em relação à  $b_0$  e depois em relação à  $b_1$  e igualando ambas a zero, se obtém as expressões para o cálculo de  $b_0$  e  $b_1$  (equações 8 e 9).

$$\sum_{i=1}^n y_i = b_0 n + b_1 \sum_{i=1}^n x_i \quad (8)$$

$$\sum_{i=1}^n x_i y_i = b_0 \sum_{i=1}^n x_i + b_1 \sum_{i=1}^n x_i^2 \quad (9)$$

Rearranjando as equações 8 e 9 se obtém  $b_0$  e  $b_1$  (equações 10 e 11).

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (10)$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x} \quad (11)$$

Normalmente o método de regressão pelos mínimos quadrados é o mais usado em calibração univariada, mas nem sempre o mesmo deve ser aplicado, levando-se em consideração que nesse tipo de regressão considera-se que o erro no eixo  $y$  é muito maior que no eixo  $x$  (que é considerado como desprezível). Em determinadas situações deve-se considerar que há erro em ambos os eixos e nesse caso uma regressão linear simples do tipo I não é mais aplicável (OLIVEIRA; AGUIAR, 2013).

Quando se desenvolve um novo método analítico, o mesmo é frequentemente comparado com o método de referência de análise. Nesse caso, não seria possível fazer uma regressão linear do tipo I para comparar as técnicas, visto que há variação de ambas as variáveis (método proposto e método de referência). Dessa forma, para se comparar técnicas diferentes para avaliar a concordância entre elas, deve-se recorrer à regressão linear do tipo II, mais precisamente a regressão da distância ortogonal. As expressões para  $b_0$  e  $b_1$  podem ser observadas nas equações 12 e 13 a seguir (OLIVEIRA; AGUIAR, 2013).

$$b_1 = \left[ s_y^2 - s_x^2 + \sqrt{(s_y^2 - s_x^2)^2 + 4(\text{cov}(y,x))^2} \right] / [2\text{cov}(y,x)] \quad (12)$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x} \quad (13)$$

onde  $b_1$  é o coeficiente angular e  $b_0$  é o coeficiente linear; Já  $s_y^2$  e  $s_x^2$  são as variâncias de  $y$  e  $x$  respectivamente enquanto que  $\text{cov}(y,x)$  é a covariância.

As expressões matemáticas da variância (equações 14 e 15) e covariância (equação 16) podem ser observadas a seguir.

$$s_x^2 = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (14)$$

$$s_y^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (15)$$

$$\text{cov}(y, x) = \sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \quad (16)$$

As variâncias dos coeficientes linear e angular são exibidas nas equações 17 e 18, respectivamente, enquanto que os limites de confiança para os dois coeficientes podem ser observados nas equações 19 e 20, respectivamente.

$$s_0^2 = s_e^2 \frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (17)$$

$$s_1^2 = \frac{s_e^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (18)$$

$$\beta_0 = b_0 \pm t s_0 \quad (19)$$

$$\beta_1 = b_1 \pm t s_1 \quad (20)$$

onde  $s_e^2$  = variância do erro experimental;  $s_0^2$  = variância para coeficiente linear;  $s_1^2$  = variância para coeficiente angular;  $t$  = valor de  $t$  para teste  $t$  - Student para um nível de confiança  $\alpha$  e  $n - 2$  graus de liberdade.

#### 2.4.2. Calibração multivariada

A quimiometria forneceu aos espectroscopistas diferentes formas de resolver o problema da calibração para análises de dados espectrais. Modelos clássicos de quantificação, tal como o de regressão linear simples, se tornaram insuficientes para sistemas complexos, frente à quantidade de dados que podem ser obtidos a partir de um espectro. Para que estes modelos apresentem bons resultados é necessário que sejam utilizadas apenas amostras simples: substâncias puras ou misturas binárias e que a banda espectral selecionada não sofra outra influência, a não ser do próprio analito, garantindo uma relação linear entre a concentração e o sinal. Portanto, o uso de modelos de calibração multivariada para a obtenção de dados quantitativos apresenta uma série de vantagens, pois podem ser utilizados em sistemas complexos apresentando bons resultados (OLIVEIRA, 2006).

A pesquisa contínua, o desenvolvimento e a verificação de métodos continuam a enfatizar o potencial significativo da quimiometria na prática da química moderna e em análises farmacêuticas (NI; QI; KOKOT, 2006).

O uso da calibração multivariada para resolução de sinais superpostos de misturas de fármacos fluorescentes também tem sido empregada. São relatados desde os métodos multivariados como PLS (*Partial Least Squares*), PARAFAC (*Parallel Factor Analysis*) e BLLS (*Bilinear Least Squares*), até mesmo o uso de redes neurais mais sofisticadas como as redes de *Kohonen*, cujo objetivo é conferir maior seletividade à metodologia, visando determinação dos fármacos em amostras complexas, como soro e urina (SOTOMAYOR *et al.*, 2008).

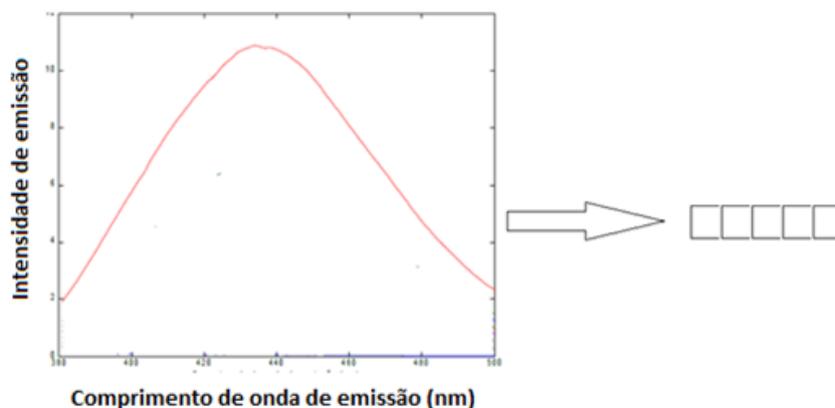
O processo geral de calibração consiste de duas etapas: modelagem, que estabelece uma relação matemática entre as matrizes X (normalmente referente ao espectro) e Y (geralmente referente ao sinal analítico), durante a calibração, e a validação do modelo (FERREIRA *et al.*, 1999).

Habitualmente, na fase de calibração, o sinal instrumental é obtido para um determinado número de amostras (padrões), em que a concentração do analito é conhecida e o modelo matemático relaciona a quantidade física medida com a correspondente quantidade química. Em seguida, na fase de previsão, o sinal instrumental da amostra de concentração desconhecida é obtido e, através do modelo matemático definido na fase de calibração, é calculada a correspondente quantidade química (LEITÃO, 2005).

#### 2.4.2.1. Calibração multivariada de primeira ordem

Nesse tipo de calibração, a resposta consiste em um vetor de dados (Figura 13) para cada amostra, como por exemplo, um espectro com comprimento de onda de excitação fixo e  $J$  comprimentos de onda de emissão (GIRÓN, 2007).

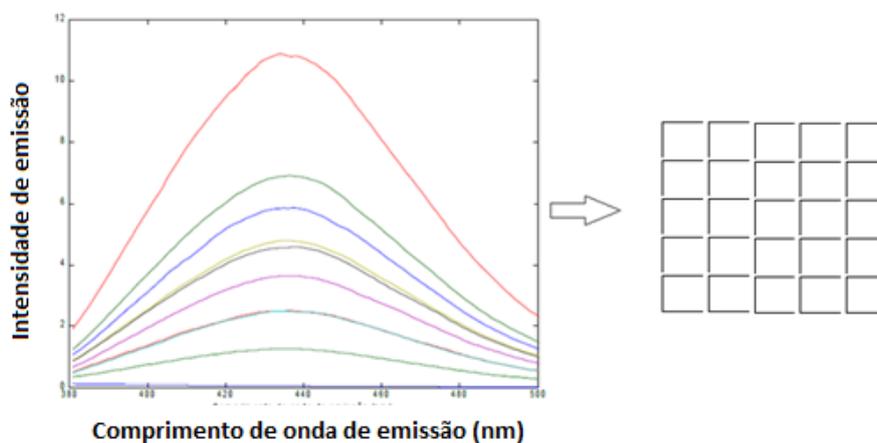
Figura 13: Representação de uma única amostra em calibração multivariada de primeira ordem.



Fonte: Adaptado de PINHO, 2012.

O conjunto de calibração é uma matriz ( $n \times J$ ) (Figura 14).

Figura 14: Representação de um conjunto de amostras que gera uma matriz com dados de primeira ordem.



Fonte: Adaptado de PINHO, 2012.

Nesse caso, já é possível fazer a validação na presença de interferentes, desde que os mesmos também estejam presentes no conjunto de calibração que foi usado para construir o modelo (BOOKSH *et al.*, 1995).

O PLS é, provavelmente, o método quimiométrico, de calibração multivariada de primeira ordem, mais utilizado na química analítica (NADLER, COIFMAN, 2005). É um método de regressão linear no qual dois conjuntos de dados são trabalhados: X e Y, onde geralmente a matriz X, do tipo  $m \times n$ ,

contém os dados espectrais (variável independente) e a matriz  $Y$ , do tipo  $p \times n$ , contém os dados físico-químicos associados (variáveis dependentes) (RAVN, 2009), como mostram as equações 21 e 22, respectivamente:

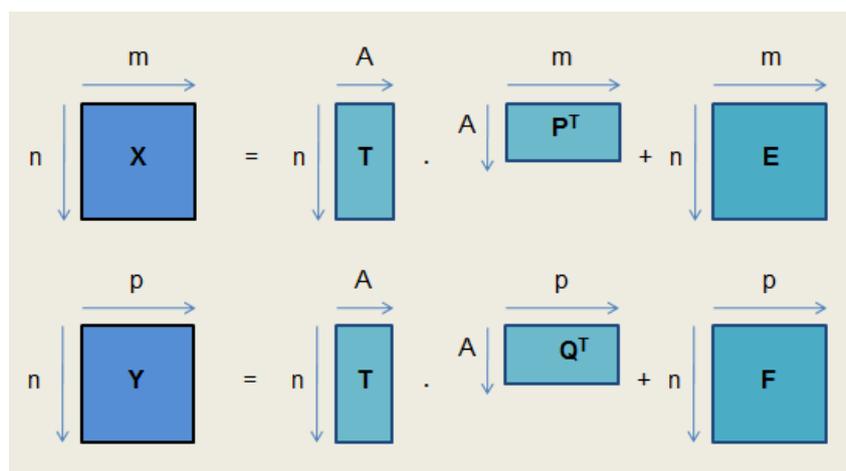
$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (21)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{TQ}^T + \mathbf{F} \quad (22)$$

onde  $T$  é a matriz de escores e  $P^T$  e  $Q^T$  são as matrizes de pesos;  $E$  e  $F$  são as matrizes de resíduos de  $X$  e  $Y$ , respectivamente.

A representação do PLS está representada através da Figura 15:

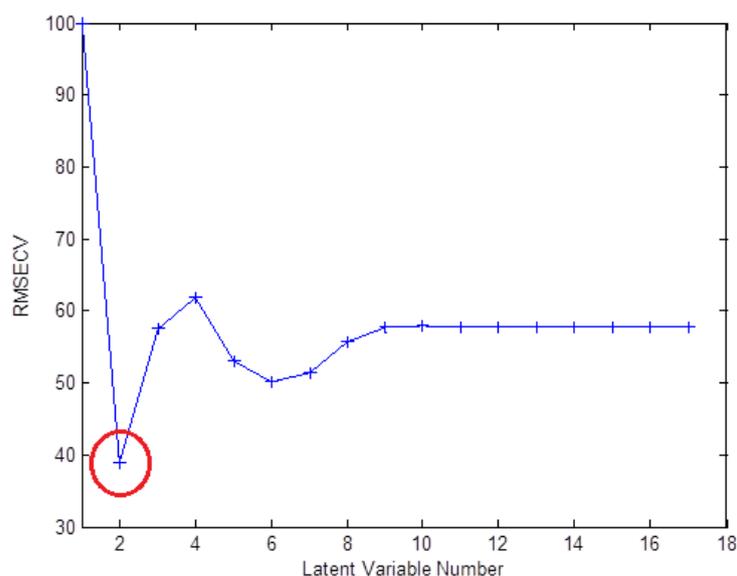
Figura 15: Decomposição da matriz de dados pelo PLS



Fonte: LIMA, 2011.

Nesse processo, há a necessidade de achar o melhor número de variáveis latentes, o que normalmente é feito usando um procedimento chamado validação cruzada (*cross validation*). Um dos métodos é o “deixar um de fora” (*leave one out*) que consiste em retirar uma amostra de cada vez do conjunto de dados e fazer a modelagem, visando no qual o erro mínimo de previsão é determinado (RMSECV – *Root Mean Error of Cross Validation*). A escolha desse melhor número pode ser auxiliada na análise gráfica (Figura 16) (BRERETON, 2003).

Figura 16: Análise gráfica para escolha do número de variáveis latentes



Fonte: O autor, 2016.

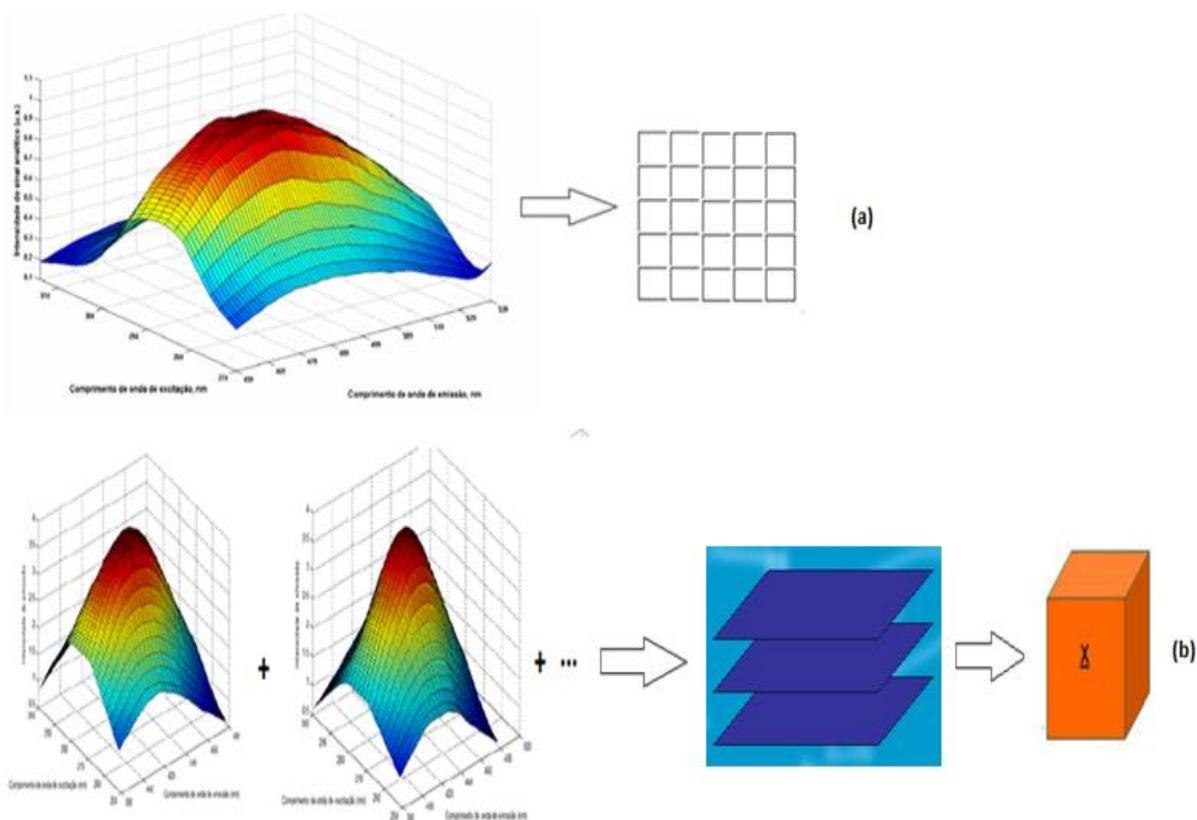
A área circulada na figura anterior mostra o número adequado de variáveis latentes, visto que é o que fornece o menor RMSECV. Caso fosse escolhido um número de variáveis latentes inferior ao circulado haveria falta de ajuste no modelo e caso fosse escolhido um número maior tem-se o sobreajuste do modelo, o que também não é adequado (BRERETON, 2003).

Deve-se mencionar a diferenciação entre PLS1 e PLS2. No primeiro método, a regressão é feita para uma variável dependente de cada vez (a matriz Y é um vetor coluna), já na segunda, todas as variáveis dependentes são calculadas simultaneamente (COSTA, 2009).

#### 2.4.2.2. Calibração multivariada de segunda ordem

Os dados gerados por instrumentos que fornecem como resposta uma matriz (Figura 17a) de dados para cada amostra. Um conjunto de amostras gera um tensor de dados (Figura 17b).

Figura 17: Representação de dados de segunda ordem.



Legenda: (a) dados de uma única amostra (b) dados de um conjunto de amostras

Fonte: Adaptado de PINHO, 2012.

Alguns exemplos do uso de calibração multivariada de segunda ordem são as técnicas hífenadas, tais como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC – MS) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC – DAD), além da espectrofluorimetria, análise de injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica ou análise de imagens (BOOKSH *et al.*, 1995).

Uma das vantagens da calibração multivariada de segunda ordem é a possibilidade de obtenção de espectros puros de cada componente do sistema, tendo também a possibilidade de validação, na presença de interferentes desconhecidos que não precisam estar presentes no conjunto de calibração (BOOKSH *et al.*, 1995).

Quando se trabalha com fluorescência molecular, um problema que se tem é a sobreposição espectral, principalmente quando se tem matrizes biológicas, visto que as mesmas apresentam um rico espectro natural de fluorescência de fundo. Assim, é necessário se recorrer a ferramentas

quimiométricas de calibração multivariada de segunda ordem para que possa ser desenvolvido um modelo adequado (TREVISAN, 2003).

Em muitos casos, a separação química e/ou pré-concentração é o procedimento mais adequado para execução de determinados tipos de análises, por mais simples que essas sejam. No entanto, ao se combinar métodos quimiométricos de ordem superior com determinadas técnicas analíticas, algumas destas etapas podem vir a ser reduzidas ou até mesmo eliminadas. Isso ocorre quando se emprega os métodos de calibração multivariada, onde várias espécies em um único sistema podem ser identificadas e até mesmo quantificadas sem que haja de fato uma separação química (TREVISAN, 2003).

Um dos métodos de calibração multivariada de segunda ordem é o PARAFAC que foi proposto de forma independente em 1970 por Harshamn, Carroll e Chang, os quais nomearam esse modelo como Decomposição Canônica. Inicialmente surgiu como um método de análise multivariada no campo da psicometria. É um método de decomposição que pode ser comparado com o modelo PCA (GIL, 2005). Para  $I$  amostras de tamanho  $J \times K$  (comprimentos de ondas de emissão e excitação, respectivamente, tomando como exemplo a matriz de excitação-emissão da fluorescência) cada, são agrupadas, gerando um tensor (ou cubo de dados) de tamanho  $I \times J \times K$  (ARANCIBIA *et al.*, 2006).

Os principais objetivos das aplicações em química são a resolução de curvas (deconvolução de espectros para identificação de um ou mais analitos de interesse) e a calibração multivariada. O uso dessa técnica para calibração segue uma estratégia semelhante à regressão em componentes principais (SENA; TREVISAN; POPPI, 2005). No modelo de PARAFAC se define um elemento genérico  $X_{ijk}$  para o tensor  $\underline{X}$  como (Equação 23) (GIRÓN, 2007):

$$\underline{X}_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{ni} b_{nj} c_{nk} + \underline{E}_{ijk} \quad (23)$$

onde  $N$  é o número total de componentes químicos que produz a resposta ou sinal;  $E_{ijk}$ , é um elemento de erro residual do tensor  $\underline{E}$  (com as mesmas dimensões que  $\underline{X}$ ),  $a_{ni}$ ,  $b_{nj}$  e  $c_{nk}$  são os elementos dos vetores coluna  $a_n$ ,  $b_n$  e  $c_n$ . Os quais correspondem a: concentrações relativas ( $I \times 1$ ), os perfis de

excitação ( $J \times 1$ ) e os perfis de emissão ( $K \times 1$ ), para cada um dos  $N$  componentes, respectivamente. Os vetores coluna  $a_n$ ,  $b_n$  e  $c_n$  se recorrem na matriz dos escores  $\mathbf{A}$  (contendo as concentrações relativas dos componentes) e as matrizes dos pesos  $\mathbf{B}$  e  $\mathbf{C}$  (com as colunas normalizadas a uma unidade) (GIRÓN, 2007).

Na execução do PARAFAC ocorre a decomposição simultânea das amostras de concentração conhecidas e desconhecidas. Os escores são especificamente obtidos para o componente de interesse na amostra desconhecida e, por fim, são relacionados com as concentrações conhecidas do conjunto de calibração através de uma regressão linear (SENA; TREVISAN; POPPI, 2005). No lugar de um vetor peso e um escore, como no PCA, há uma matriz de escores e duas matrizes de pesos (Figura 18) (GIRÓN, 2007).

Figura 18: Representação geométrica do modelo PARAFAC - decomposição de um arranjo de dados tridimensionais em tríades de vetores peso.

O diagrama ilustra a decomposição de um arranjo de dados tridimensional  $\mathbf{X}$  em tríades de vetores peso e uma matriz de escores  $\mathbf{E}$ . À esquerda, um cubo representa o arranjo  $\mathbf{X}$  com eixos  $i$ ,  $j$  e  $k$ . À direita, a decomposição é mostrada como a soma de  $F$  tríades de vetores peso, cada uma formada por um vetor coluna  $a_n$ , um vetor linha  $b_n^T$  e um vetor linha  $c_n^T$ , mais uma matriz de erro  $\mathbf{E}$ . A primeira tríade é explicitamente mostrada com  $a_1$ ,  $b_1^T$  e  $c_1^T$ . Abaixo, a decomposição é representada como a soma de uma matriz  $\mathbf{A}$  (vetores  $a_n$  empilhados), uma matriz  $\mathbf{B}^T$  (vetores  $b_n^T$  empilhados) e uma matriz  $\mathbf{C}^T$  (vetores  $c_n^T$  empilhados), mais a matriz de erro  $\mathbf{E}$ .

$$\mathbf{X} = \underbrace{\begin{matrix} c_1^T \\ b_1^T \\ a_1 \end{matrix}}_{\text{Triade}} + \begin{matrix} c_2^T \\ b_2^T \\ a_2 \end{matrix} \dots + \begin{matrix} c_F^T \\ b_F^T \\ a_F \end{matrix} + \mathbf{E}$$

$$= \begin{matrix} \mathbf{C}^T \\ \mathbf{B}^T \\ \mathbf{A} \end{matrix} + \mathbf{E}$$

Fonte: BERNARDES, 2009.

O PARAFAC pode construir o modelo de calibração utilizando restrições, tais como a não negatividade. Como os pesos podem conter valores positivos e/ou negativos, faz-se necessário a utilização de restrições (GIRÓN, 2007). Neste trabalho, a restrição utilizada foi a de não negatividade para os três modos (matriz das concentrações – escores e matrizes dos pesos – referentes

aos espectros de excitação e emissão dos analitos), pois estas não podem ser negativas.

Um dos métodos para se seleccionar o número adequado de componentes no PARAFAC é denominado *diagnóstico da consistência do modelo* ou como é mais conhecido *Core Consistency* (CC). A expressão desse parâmetro (Equação 24) (GIRÓN, 2007).

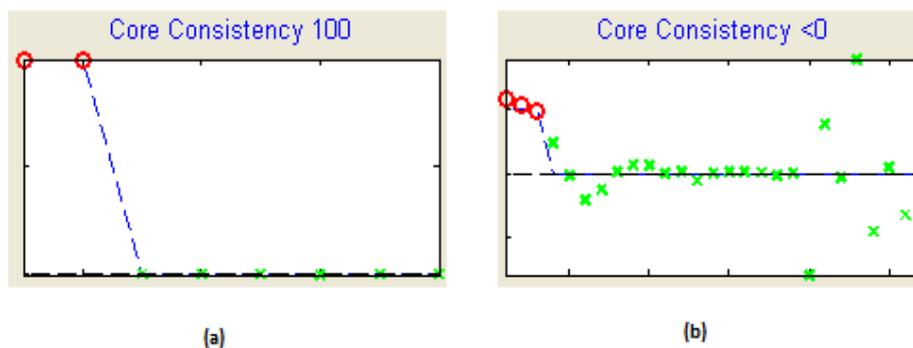
$$CC = 100 \times \left[ 1 - \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K (c_{ijk} - s_{ijk})^2}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K (c_{ijk})^2} \right] \quad (24)$$

onde  $c_{i,j,k}$  é o elemento da matriz e  $\mathbf{S}$  é a matriz superdiagonal contendo valores igual a unidade na diagonal e zero nas demais posições para ajuste do PARAFAC.

Quando o resultado do CC está entre 90% e 100%, há um indicativo de que o número de fatores escolhidos é o mais adequado; um valor em torno de 50% (ou inferior) indica que o modelo não é adequado, pois pode apresentar perda da trilinearidade; e por fim, um resultado próximo de zero ou ainda negativo indica um modelo inválido, pois o espaço coberto pelas matrizes de componentes não descreve uma variação trilinear (LIMA, 2011).

O CONCORDIA (Figura 19) é uma ferramenta para detectar *overfitting* em um modelo PARAFAC, mas não *underfitting*. O valor de CONCORDIA para um modelo estimado com um número de componentes menor que o real estará próximo a 100%, porque a estrutura de tal modelo será trilinear. Então, o modelo adequado será aquele com maior número de componentes e que ainda preserve a estrutura trilinear. Quando se tem um Core Consistency inferior a zero, significa que não há uma estrutura trilinear para aquele número de componentes, portanto, o modelo não será adequado (SENA; TREVISAN; POPPI, 2005).

Figura 19: Representação do uso do CONCORDIA



Legenda: (a) CC de 100%; (b) CC < 0

Fonte: O autor, 2016.

O PARAFAC apresenta em sua estruturação a chamada “vantagem de segunda ordem”, pois como já foi dito anteriormente, pode quantificar analitos que não estavam presentes na fase de construção do modelo. Se o modelo é corretamente especificado com o número certo de componentes, e a estrutura trilinear é válida, o PARAFAC fornecerá estimativas dos parâmetros fundamentais, analisando cada informação dos componentes separadamente, ou seja, o sinal do analito é separado daquele que é um potencial interferente, sendo esta a razão pela qual a vantagem está intrinsecamente ligada ao modelo (ARANCIBIA *et al.*, 2006; PICCIRILLI; ESCANDAR, 2010).

#### 2.4.2.2.1. Método da adição de padrão de segunda ordem

Em 1979, Saxberg e Kowalski propuseram uma extensão do método de adição de padrão a dados multivariados, o método da adição de padrão generalizada (GSAM – *Generalized Standard Addition Method*). Já em 1995, Booksh *et al.* propuseram uma extensão do método da adição de padrão só que para dados multidimensionais que ficou conhecido como método da adição de padrão de segunda ordem (*Second Order Standard Addition Method - SOSAM*). Tal método usa a decomposição direta trilinear (*direct trilinear decomposition - DTD*) como meio de decompor os dados.

Os métodos de adição de padrão são particularmente úteis na análise de amostras complexas, nas quais a probabilidade de efeitos de matriz é alta. O método da adição de padrão pode ser feito de diversas formas, uma delas, conhecida como enriquecimento (*spiking*), de uma ou mais soluções padrão a

alíquotas da amostra de mesmo volume. Deve ser observado que, quando a quantidade de amostra é limitada, podem-se fazer as adições por sucessivos enriquecimentos com padrão a um único volume medido da amostra (SENA, TREVISAN, POPPI, 2005).

### 2.4.3. Testes estatísticos para comparação entre metodologias

#### 2.4.3.1. Uso do teste F para igualdade entre duas variâncias

Se for considerado que uma das populações é distribuída segundo uma distribuição normal, então a fração  $S_1^2/S_2^2$  segue a distribuição F. O valor de F é calculado a partir da equação 25, onde  $S_1^2$  e  $S_2^2$  são as variâncias das duas populações ( $S_1^2$  é a maior variância e  $S_2^2$  é a menor variância) (LEVINE *et al.*, 2014).

$$F_{\text{calculado}} = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (25)$$

A estatística do teste F segue uma distribuição F, com  $n_1 - 1$  graus de liberdade no numerador e  $n_2 - 1$  graus de liberdade no denominador. Com base no número de graus de liberdade do numerador e denominador e do nível de confiança estipulado, se tem o valor de  $F_{\text{TABELADO}}$  (LEVINE *et al.*, 2014).

A hipótese nula nesse caso (considerando-se um teste bilateral) pode ser estabelecida por (equação 26):

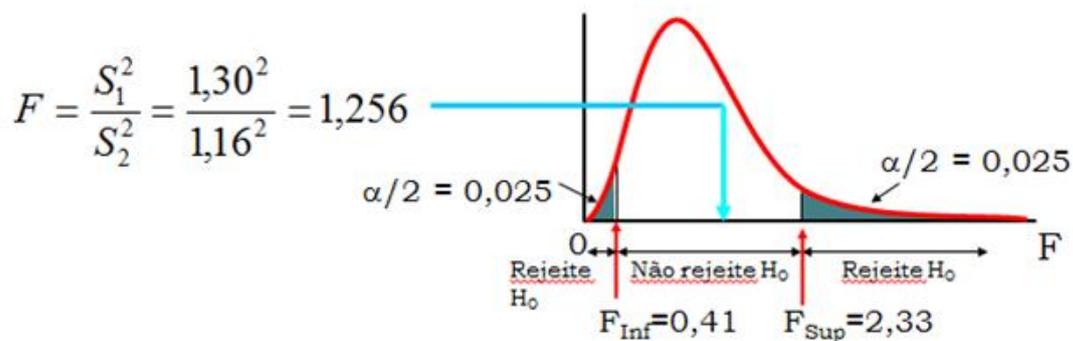
$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 \quad (26)$$

Enquanto que a hipótese alternativa é estabelecida por (equação 27):

$$H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2 \quad (27)$$

Se o  $F_{\text{calculado}}$  estiver na região de não rejeição, no caso entre o  $F_{\text{inferior}}$  e  $F_{\text{superior}}$ , a hipótese nula é considerada como verdadeira, caso contrário, toma-se a alternativa como verdadeira (Figura 20) (LEVINE *et al.*, 2014).

Figura 20: Representação da região de aceitação para o teste F bilateral



Fonte: LEVINE, 2014.

#### 2.4.4. Validação da metodologia

Cada vez mais se reconhece a necessidade da qualidade em medições químicas através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, uma vez que dados analíticos não confiáveis ou resultados distorcidos podem acarretar em decisões desastrosas e prejuízos financeiros consideráveis (RIBANI *et al.*, 2004).

Toda vez que um método analítico é proposto ou desenvolvido, deve-se investigar se o mesmo apresenta desempenho adequado para as condições nas quais será aplicado. Tal processo de verificação é chamado de validação. A validação estabelece por estudos sistemáticos realizados em laboratório, que o método atende ao seu propósito e as normas estabelecidas por agências reguladoras nacionais e internacionais tais como ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), UPS (*United States Pharmacopeia*), ICH (*International Conference on Harmonization's*), ISO (*International Standard Organization*) e ASTM (*American Society for Testing and Materials*). A validação de um método analítico é avaliada a partir da determinação dos parâmetros de mérito (sensibilidade, seletividade, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão, etc.) (VALDERRAMA, BRAGA, POPPI, 2009).

#### 2.4.4.1. Parâmetros de Mérito para Calibração Univariada

##### 2.4.4.1.1. Coeficiente de correlação e determinação

O coeficiente de determinação pode ser determinado de acordo com a equação 28 a seguir (GEMPERLINE, 2006). Ele indica qual a porcentagem da variação explicada pela regressão representa a variação total (GIACOMELLO, 2015)<sup>2</sup>.

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} = \frac{(SS_{tot} - SS_{res})}{SS_{tot}} \quad (28)$$

onde  $SS_{tot}$  é a soma quadrática total do modelo e  $SS_{resid}$  é a soma quadrática dos resíduos. Já  $\hat{y}$  é referente ao valor predito enquanto que  $\bar{y}$  é referente ao valor médio e  $y_i$  é referente ao valor medido.

O valor de  $R^2$  pode variar de zero a um dependendo do modelo, sendo que a magnitude do mesmo indica a proporção da variação total em  $y$  explicada pelo modelo de calibração. Quando o coeficiente é igual a 1, indica que há uma perfeita correlação e os erros residuais são igual a zero. Já quando o mesmo é igual a zero, significa que o modelo não é capaz de prever  $y$ . A raiz quadrada do coeficiente de determinação fornece o coeficiente de correlação ( $R$ ) (GEMPERLINE, 2006).

O coeficiente de correlação  $r$  de Pearson mede o grau de associação linear entre duas variáveis, possuindo duas propriedades importantes: o sinal que quando é positivo indica correlação linear positiva, o que significa que à medida que uma variável cresce a outra também. Já o sinal negativo indica uma correlação linear negativa, ou seja, à medida que uma variável aumenta a outra diminui; é a grandeza que indica o quão próximo da reta estão os pontos individuais caso fosse ajustada uma reta de regressão. O valor do coeficiente varia entre -1 e 1 (GIACOMELLO, 2015)<sup>2</sup>.

<sup>2</sup> <http://pt.scribd.com/doc/17910359/36/Coeficiente-de-determinacao>

#### 2.4.4.1.2. Linearidade

É o intervalo no qual os sinais instrumentais e a concentração do analito são relacionadas entre si de modo diretamente proporcional em um intervalo de concentrações onde o método será aplicado. É recomendado que seja determinada pela análise de pelo menos cinco concentrações diferentes (ANVISA, 2003)<sup>3</sup>. Normalmente, a linearidade pode ser inferida pela observação de parâmetros que podem ser observados na equação 29 assim como o coeficiente de correlação, que de acordo com a ANVISA recomenda um  $R = 0,99$  enquanto que o INMETRO um valor de  $R \geq 0,90$  (FINETE, 2005; VALDERRAMA, 2009; BRAGA, POPPI, 2009).

$$y = b_0 + b_1x \quad (29)$$

onde  $y$  é a resposta instrumental,  $b_1$  é o coeficiente angular,  $b_0$  é o coeficiente linear e  $x$  é a variável independente (normalmente a concentração).

#### 2.4.4.1.3. Precisão

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas para uma mesma amostra. Para determinar os níveis de precisão é necessário testar a: repetibilidade (precisão intracorrída) que avalia a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e instrumentação, verificando no mínimo nove determinações. (três concentrações em triplicata) ou pelo menos seis determinações de uma única amostra; a precisão intermediária que é a concordância dos resultados do mesmo laboratório obtidos em dias diferentes (ANVISA, 2003)<sup>4</sup>.

Pode ser expressa em termos de desvio padrão ou desvio padrão relativo de uma série de medidas (VALDERRAMA, BRAGA, POPPI, 2009). A equação 30 demonstra o cálculo do desvio padrão já à equação 31 do desvio padrão relativo (DPR).

---

<sup>3</sup> [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)

<sup>4</sup> [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (30)$$

$$DPR = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (31)$$

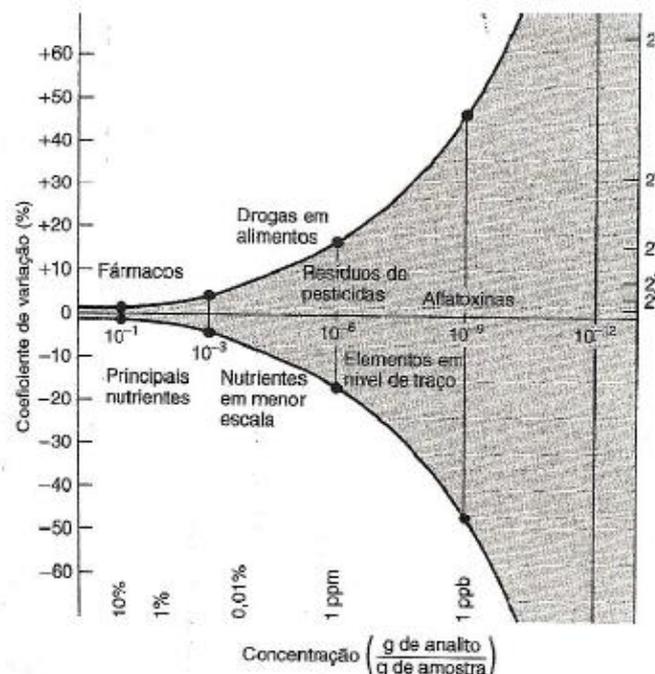
onde  $x_i$  é o valor estimado de  $x$ ,  $\bar{x}$  é o valor médio de  $x$ ,  $n$  é o número de amostras,  $S$  é o desvio padrão.

Para avaliar se o DPR está adequado, pode-se fazer uso da curva de Horwitz, que estabelece uma relação matemática entre o valor de DPR e a concentração substância (equação 32). A curva de Horwitz pode ser observada na Figura 21 (BOYER *et al.*, 1985).

$$DPR = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (32)$$

onde  $\log C = \log$  da Concentração da espécie; DPR = desvio padrão relativo.

Figura 21: Representação da Curva de Horwitz.



Fonte: BOYER *et al.*, 1985

#### 2.4.4.1.4. Exatidão

A exatidão indica o quanto um valor estimado e o valor tido como de referência (ou verdadeiro) concordam entre si (equações 33 e 34).

$$E_a = x_i - x_v \quad (33)$$

$$E_r = \frac{|E_a|}{x_v} \times 100\% \quad (34)$$

onde  $E_a$  é o erro absoluto;  $x_i$  é o valor avaliado e  $x_v$  é o valor de referência;  $E_r$  é o erro relativo (em porcentagem).

A exatidão pode ser avaliada a partir de materiais de referência, comparação entre métodos, ensaios de recuperação (**equação 35**) e adição de padrão, sendo a faixa de recuperação aceitável entre 70 – 120% de acordo com critérios da ANVISA (VALDERRAMA, BRAGA, POPPI, 2009).

$$R(\%) = \frac{CE}{CP} \times 100\% \quad (35)$$

onde  $R(\%)$  é a recuperação; CE é a concentração estimada (recuperada); CP é a concentração predita (adicionada)

#### 2.4.4.1.5. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Na ISO 11843-1 (1997) foi introduzido o termo de concentração mínima detectável (equivalente ao limite detecção, LD). Esse termo se refere à concentração ou quantidade verdadeira do analito na amostra que será analisada, com uma probabilidade  $(1 - \beta)$  de que tal concentração (ou quantidade) seja maior do que a da solução branco.

A IUPAC (1995) em um documento preliminar forneceu uma definição parecida, adotando o termo valor mínimo detectável como sendo equivalente ao LD.

A decisão de se um analito está ou não presente em uma determinada amostra se baseia na concentração predita do analito com um nível crítico ( $L_c$ ), definido de acordo com a equação 36 (LUNA, PINHO 2009).

$$L_C = z_{1-\alpha}\sigma_0 \quad (36)$$

onde  $z_{1-\alpha}$  é o valor da distribuição normal de uma cauda para  $y$  em um nível de significância alfa ( $\alpha$ ) e  $\sigma_0$  é o desvio padrão da concentração do analito quando o mesmo não está presente na amostra.

O  $L_C$  assinala um valor mínimo, a partir do qual uma concentração predita é considerada como do analito. Dessa forma, há um risco  $\alpha$  de se cometer o erro do tipo I (o falso positivo), mas se desejamos manter um risco (chamado de  $\beta$ ) de cometer o erro do tipo II (falso negativo), o limite de detecção do método deve ser maior. Levando-se em consideração as duas probabilidades de erro (equação 37) (LUNA, PINHO, 2009).

$$LD = z_{1-\alpha}\sigma_0 + z_{1-\beta}\sigma_D \quad (37)$$

onde  $z_{1-\beta}$  é o valor da distribuição normal de uma cauda para  $y$  para um nível de significância  $\beta$  e  $\sigma_D$  é o desvio padrão da concentração do analito quando está presente na amostra no nível do LD.

Tanto na equação 36 quanto na equação 37 parte-se do pressuposto que as concentrações seguem uma distribuição normal e a variância é conhecida. Usando-se  $\alpha = \beta = 0,05$  e assumindo-se uma variância constante para  $c = 0$  e  $c = LD$ , a equação 37 culmina na equação 38 (LUNA, PINHO 2009).

$$LD = 3,3\sigma_0 \quad (38)$$

onde  $\sigma_0$  é o desvio padrão.

No caso das variâncias serem desconhecidas e estimadas a partir das replicatas, os valores de  $\sigma_0$  e  $\sigma_D$  devem ser substituídos pelos seus estimadores  $s_0$  e  $s_D$ . Nesse caso ao invés da distribuição normal  $Z$  se usa a distribuição  $t$  – *Student*. Assumindo mais uma vez que  $\alpha = \beta$ , as expressões para  $L_C$  e  $L_D$  (admitindo-se a variância constante), se tem a equação 39 (LUNA, PINHO 2009).

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad (39)$$

onde  $s$  é o desvio padrão e  $S$  é o coeficiente angular da curva analítica.

O LQ (equação 40) equivale a menor concentração que pode ser quantificada do analito de interesse com uma incerteza máxima de 10% (VALDERRAMA, BRAGA, POPPI, 2009).

$$LQ = 10 \frac{s}{S} \quad (40)$$

onde  $s$  é o desvio padrão e  $S$  é o coeficiente angular da curva analítica.

#### 2.4.4.1.6. Sensibilidade e sensibilidade analítica

A sensibilidade do método é a inclinação da reta, que normalmente corresponde à razão entre a variação da resposta instrumental e a variação correspondente da concentração (equação 41) (FERREIRA, 2015).

$$SEN_{UNIV} = \hat{b}_1 = \frac{\Delta S}{\Delta C} \quad (41)$$

onde  $SEN_{univ}$  é a sensibilidade do método univariado;  $\hat{b}_1$  é o coeficiente angular da reta;  $\Delta S$  é a variação do sinal instrumental;  $\Delta C$  é a variação da concentração.

Outro parâmetro é a sensibilidade analítica (equação 42), que é a razão entre a sensibilidade e o ruído instrumental, que é fornecido pelo desvio padrão do branco. Esse parâmetro tem a vantagem de ser independente do equipamento e da escala utilizada (FERREIRA, 2015).

$$SEN_{A(univ)} = \frac{SEN}{s_b} \quad (42)$$

onde  $SEN_{A(univ)}$  é a sensibilidade analítica do método univariado;  $s_b$  é o desvio padrão do branco.

#### 2.4.4.1.7. Teste F para significância do modelo

Uma estatística útil para testar a significância do modelo é o teste F (equação 43) (FERREIRA, 2015).

$$F = \frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}} \quad (43)$$

onde  $MQ_{reg}$  é a média quadrática da regressão e  $MQ_{res}$  é a média quadrática dos resíduos.

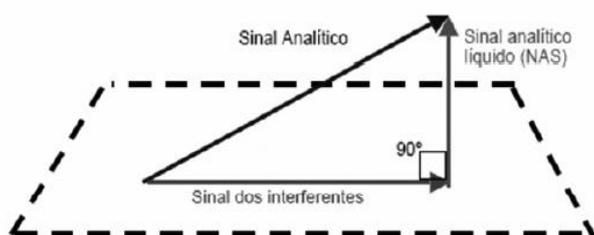
A razão F compara a variância explicada pelo modelo ( $MQ_{reg}$ ) e a variância devida aos erros ( $MQ_{res}$ ). O valor calculado na equação 41 é comparado com o valor de F tabelado para o nível de confiança previamente estipulado, para verificar se uma variância é maior que a outra e não se elas são diferentes entre si. Pode-se fazer uma analogia da razão do teste F com a relação entre sinal e ruído (S/R), visto que ela comparada a variância explicada (o sinal) e a variância devida aos erros (o ruído), ou seja, quanto maior a razão de F, melhor será a relação S/R (FERREIRA, 2015).

#### 2.4.5. Parâmetros de Mérito para calibração multivariada

##### 2.4.5.1. Sinal Analítico Líquido (*Net Analytical Signal – NAS*)

O conceito de NAS pode ser usado na determinação de algumas figuras de mérito para calibrações multivariadas, tais como cálculo de seletividade e razão sinal/ruído requer o cálculo do NAS de interesse, que é a fração do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos demais compostos que estão presentes na amostra (Figura 22) (LORBER, 1986).

Figura 22: Representação geométrica da propriedade de ortogonalidade do NAS.



Fonte: VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009.

Para calcular o NAS podem ser usados diferentes algoritmos de regressão de modo que o NAS seja proporcional à concentração do analito de interesse. Levando-se em conta que o NAS é a única parte do espectro que é utilizada para previsão, nenhuma informação é perdida ao transformar o vetor NAS em um escalar (Equação 44) (OLIVIERI, 2006; OLIVIERI; FABER, 2009).

$$NAS = \|X_{NAS}\| \quad (44)$$

onde  $X_{NAS}$  corresponde ao vetor NAS do analito de interesse X e  $\|.\|$  representa a norma Euclidiana.

O método original proposto por Lorber em 1986 foi desenvolvido para modelos de calibração direta ou baseada em mínimos quadrados clássicos (*Classical Least Squares* - CLS) (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). Já em 1997, Wentzel, Andrews e Kowalski propuseram um método para calcular o NAS que implicava no conhecimento do espectro puro do analito de interesse tendo, portanto uma aplicabilidade não muito boa.

O NAS para dados de segunda ordem é análogo ao de dados de primeira ordem, no sentido de que buscam informação da parte do sinal que é relacionado à propriedade de interesse; porém o cálculo é diferente. Para métodos multivariados, por meio do NAS, pode se obter a sensibilidade, a seletividade, o limite de detecção e a sensibilidade analítica (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

#### 2.4.5.2. Sensibilidade, sensibilidade analítica líquida e seletividade para dados multivariados.

A sensibilidade corresponde à fração do sinal responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração à propriedade de interesse. A equação 45 mostra o cálculo para dados multivariados de primeira ordem (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). Olivieri e Faber (2009) propuseram uma equação geral (Equação 46), para que fosse possível calcular a sensibilidade de modelos de calibração de segunda ordem, independentemente do método utilizado para calcular o NAS.

$$SEN = \frac{1}{\|b_k\|} \quad (45)$$

$$SEN_{k,OF} = k_k \{[(\mathbf{B}^T \mathbf{P}_{b,unx} \mathbf{B}) \chi (\mathbf{C}^T \mathbf{P}_{c,unx} \mathbf{C})]^{-1}\}^{-1/2} \quad (46)$$

onde  $b_k$  é vetor dos coeficientes de regressão para a espécie de interesse  $k$  estimados pelo modelo de calibração multivariada;  $\mathbf{B}$  e  $\mathbf{C}$  são matrizes que possuem nas colunas o perfil para todos os componentes na primeira e segunda dimensão respectivamente;  $k_k$  é o sinal total para o componente  $k$ ;  $\| \cdot \|$  representa a norma;  $\mathbf{P}_{b,unx}$  e  $\mathbf{P}_{c,unx}$  são matrizes identidade;  $\mathbf{B}^T$  e  $\mathbf{C}^T$  são as matrizes transpostas.

Já a sensibilidade analítica apresenta a sensibilidade do método em termos de unidade de concentração que é utilizada, sendo definida como a razão entre a sensibilidade e o desvio padrão do sinal de referência de acordo com a Equação 47. (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

$$\gamma = \frac{SEN}{\|\delta x\|} \quad (47)$$

onde  $\delta x$  é referente ao desvio padrão do sinal de referência estimado

Já o inverso desse parâmetro permite estabelecer a menor diferença de concentração entre amostras, que pode ser distinguida pelo método (ROCHA, 2007).

A seletividade é a medida do grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e os interferentes presentes na amostra indicando, também, a parte do sinal que é perdida por essa sobreposição, podendo ser definida pela Equação 48 (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

$$SEL = \frac{nas_{k,i}}{\|x_{k,i}\|} \quad (48)$$

onde  $nas_{k,i}$  é o valor escalar do sinal analítico líquido para a amostra  $i$ , enquanto que  $x_{k,i}$  é o vetor de resposta instrumental para a amostra  $i$ .

#### 2.4.5.3. Exatidão para dados multivariados

A exatidão indica o quanto um valor estimado ou medido e o valor de referência concordam (Equação 49). Comumente aplicada em calibração multivariada, é calculada como a raiz quadrática do erro médio quadrático de predição (RMSEP) (BRAGA; POPPI, 2004).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (49)$$

onde  $y$  é o valor estimado e  $\hat{y}_i$  é o valor predito e  $n$  é o número de amostras de validação.

#### 2.4.5.4. Precisão para dados multivariados

Da mesma forma que na calibração univariada, os ensaios de precisão (equação 50) podem ser realizados em três níveis: repetibilidade (repetições em um curto período de tempo de três amostras de concentrações diferentes em triplicata ou pelo menos seis repetições de uma única amostra), precisão intermediária e reprodutibilidade (realizada com base em determinações interlaboratoriais) (SENA *et al*, 2007).

$$Prec = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (\hat{y}_{ij} - \hat{y}_i)^2}{n(m-1)}} \quad (50)$$

onde  $n$  é o número de amostras utilizadas no cálculo da precisão;  $m$  é o número de replicatas de  $n$ .

#### 2.4.5.5. Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) para dados multivariados

Da mesma forma que para dados univariados, o LD é menor concentração detectada enquanto que o LQ é a menor concentração que pode ser quantificada. O cálculo desses limites pode ser observado nas equações 51 (para calibração de primeira ordem), 52 (para calibração de segunda ordem) e 53 a seguir (VALDERRAMA, BRAGA, POPPI, 2009):

$$LD = 3,3\delta x \|b_k\| = 3,3\delta x \frac{1}{SEN} \quad (51)$$

$$LD_{WBKGT} = \frac{c}{\|NAS\|_F / 3\|E\|_{F-1}} \quad (52)$$

$$LQ = 10\delta X \|b\|_k = 10\delta X \frac{1}{SEN} \quad (53)$$

onde  $\delta x$  é o desvio padrão do sinal de referência estimado através do desvio padrão do NAS; SEN é a sensibilidade;  $\| \cdot \|_F$  representa a norma da matriz.

## 2.5. Pré - tratamento dos dados

Após organizar os dados em matrizes, os mesmos devem ser, caso necessário, pré – tratados antes das análises. É um procedimento muito importante antes de se fazer a análise quimiométrica (FERREIRA, 2015).

O objetivo é reduzir variações indesejáveis para que as mesmas não influenciem de forma negativa na etapa da análise. Mesmo na etapa de pré – tratamento deve-se haver cuidado para não distorcer ou até mesmo inutilizar os dados. O pré – tratamento pode ser feito nas amostras (também chamado de transformação de dados) ou nas variáveis (FERREIRA, 2015).

### 2.5.1. Transformação dos dados

Existem várias técnicas matemáticas que podem ser empregadas com o objetivo de reduzir variações tanto aleatórias quanto sistemáticas. Variações aleatórias (ruído experimental) podem ser reduzidas por meio técnicas de alisamento. Já as variações sistemáticas podem ser eliminadas ou reduzidas a partir da correção da linha de base ou outros tipos de transformações (FERREIRA, 2015).

#### 2.5.1.1. Técnicas de alisamento

O alisamento pode ser feito pelo próprio instrumento com o auxílio de métodos matemáticos durante a etapa de coleta de dados ou na etapa de análise dos dados (FERREIRA, 2015).

### 2.5.1.1.1. Alisamento pela média

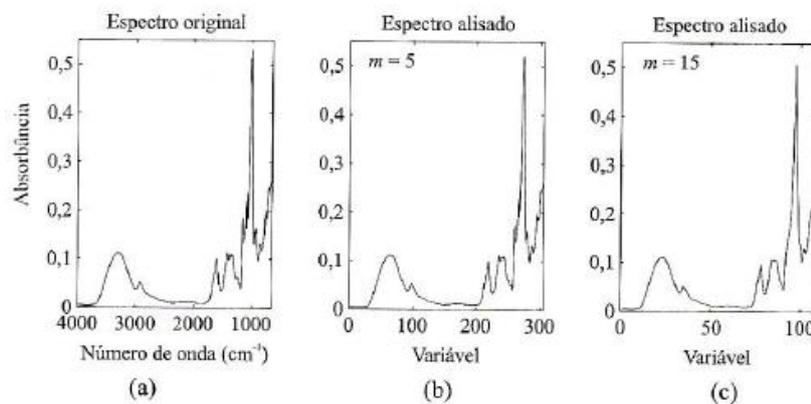
Esse tipo de alisamento é usado quando se deseja aumentar a relação sinal – ruído (S/R) e comprimir os dados. O processo envolve a seleção e deslocamento de uma janela móvel ao longo de todo o espectro. A resposta alisada ( $x_{alis}$ ) será atribuída ao centro dessa janela e é uma média aritmética das respostas das  $(2m + 1)$  variáveis da respectiva janela, como pode ser observado na equação 54 e 55 a seguir (FERREIRA, 2015).

$$x_{alis} = \sum_{k=-m}^{+m} c_k x_k = \frac{1}{(2m+1)} \sum_{k=-m}^m x_k \quad (54)$$

$$c_k = \frac{1}{2m+1} \quad (55)$$

O processo é repetido para a janela seguinte, que contém as variáveis que vão de  $2m + 2$  até  $4m + 2$  e assim por diante, até que todo o espectro tenha sido alisado. Na Figura 23 tem um exemplo desse tipo de alisamento (FERREIRA, 2015).

Figura 23: Comparação entre um espectro original e após alisamento pela média.



Legenda: (a) Espectro original (b) Espectro alisado com uma janela de 11 pontos (c) Espectro alisado com uma janela de 31 pontos.

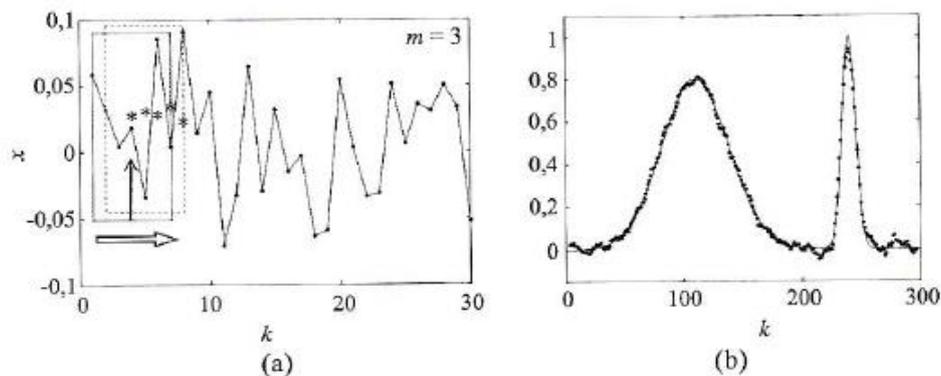
Fonte: FERREIRA, 2015.

### 2.5.1.1.2. Alisamento pela média móvel

Nesse alisamento uma janela móvel percorre todo o espectro e o valor central da janela é substituído pela resposta média. A diferença para o método da média é que a janela se desloca de uma em uma variável, percorrendo o

espectro inteiro. A cada deslocamento, a intensidade à esquerda é excluída e uma nova à direita é incluída. Um exemplo desse tipo de alisamento pode ser observado na Figura 24 a seguir (FERREIRA, 2015).

Figura 24: Alisamento pela média móvel



Legenda: (a) Primeiras 30 variáveis do sinal original indicando as duas primeiras janelas móveis e os respectivos pontos alisados (b) Sinal alisado

Fonte: FERREIRA, 2015.

A diferença para o método anterior é que o espectro alisado contém o mesmo número de variáveis que o espectro original, ou seja, não há compressão dos dados. Esta metodologia não permite que o alisamento seja feito no início e no final do espectro, pois as respostas alisadas são alocadas no centro da janela (FERREIRA, 2015).

#### 2.5.1.1.3. Alisamento pelo método de Savitzky – Golay (*Savgol*)

Esse método consiste no uso da média ponderada, no qual os pesos são obtidos por um ajuste polinomial. Um polinômio de grau  $n$  é ajustado às respostas da primeira janela que contém  $2m + 1$  pontos. Em seguida, a resposta no ponto central da janela é substituída pelo valor do polinômio ajustado. A janela se move da mesma forma que no método da média móvel, e o valor do polinômio é calculado no novo centro. O processo é repetido até que todas as janelas tenham sido alisadas (FERREIRA, 2015).

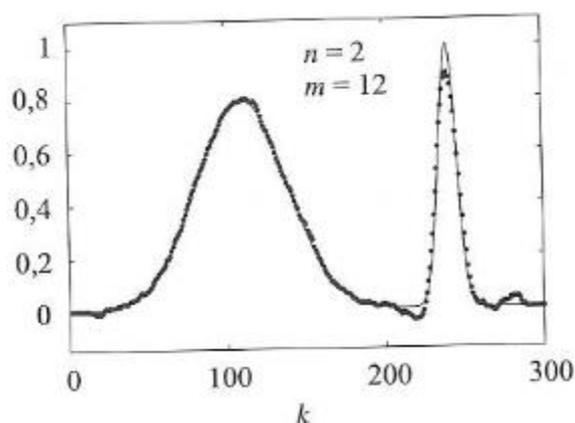
O filtro de *Savgol* é dependente de dois parâmetros: número de pontos da janela ( $m$  à esquerda e  $m$  à direita do centro) e grau do polinômio ajustado,

$n$ . O polinômio de grau  $n$  a ser ajustado aos dados da primeira janela tem a expressão conforme a equação 56 a seguir (FERREIRA, 2015).

$$x_k = a_0 + a_1k + a_2k^2 + \dots + a_nk^n \quad k = -m, \dots, 0, \dots, m \quad (56)$$

Na Figura 25 pode-se observar um exemplo do uso desse tipo de alisamento.

Figura 25: Alisamento pelo método *Savgol*



Legenda: Espectro alisado pelo método *Savgol* com um polinômio de segundo grau ( $n = 2$ ) e janela de 12 pontos ( $m = 12$ ).

Fonte: WEHRENS, 2011.

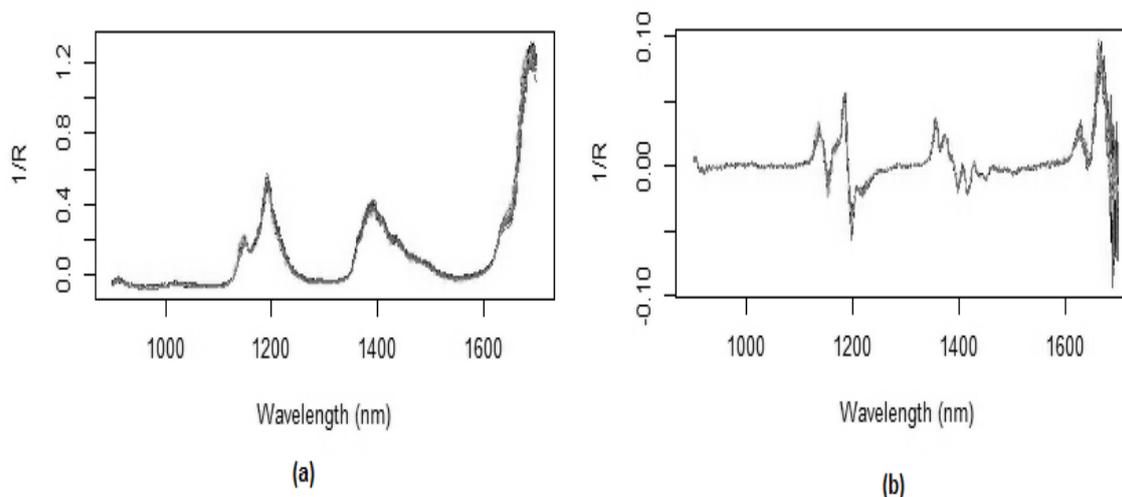
## 2.5.1.2. Técnicas da correção da linha de base

### 2.5.1.2.1. Derivadas

Um problema instrumental ou de amostragem pode ser capaz de deslocar o espectro, de um valo constante positivo ou negativo em relação ao zero de absorvância, podendo haver um deslocamento constante da linha de base. Tal deslocamento pode ser corrigido tomando-se a primeira derivada do espectro. Levando-se em consideração que a primeira derivada de uma constante é zero, após a correção o espectro resultante estará deslocado para o zero da absorvância. No caso do espectro apresentar uma inclinação da linha de base à medida que decresce o número de onda, essa variação sistemática pode ser corrigida por meio da segunda derivada. O método de *Savgol*, que já foi apresentado anteriormente, é o mais popular para o cálculo de derivadas de

um sinal. Na Figura 26 se tem um exemplo aplicação do método da derivada usando o filtro de *Savgol* (FERREIRA, 2015).

Figura 26: Uso de derivadas para correção da linha de base em espectros



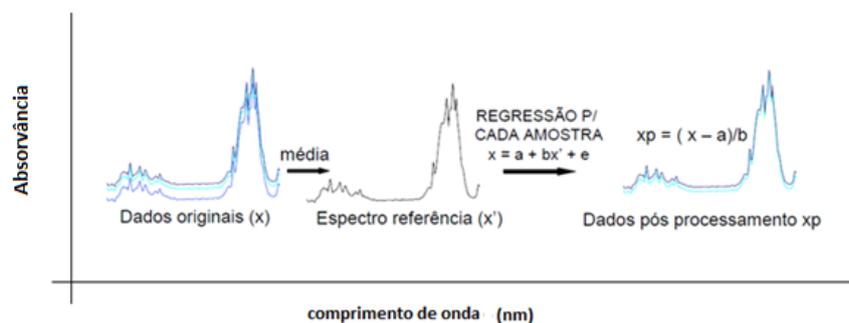
Legenda: (a) Espectro original (b) Espectro alisado com a primeira derivada.

Fonte: WEHRENS, 2011.

#### 2.5.1.2.2. Correção do sinal multiplicativo (MSC – *Multiplicative Signal Correction*)

Originalmente, foi desenvolvida para corrigir as variações do espalhamento de luz para medidas de reflectância difusa no NIR. Em termos matemáticos, a correção é feita da seguinte forma: a partir do conjunto total de espectros de reflectância difusa, calcula-se o espectro médio; posteriormente, faz-se a regressão linear para cada um dos espectros do conjunto total de espectros. O método MSC, quando é bem aplicado é capaz de reduzir de forma significativa os efeitos relativos ao espalhamento de luz (ZEAITER; RUTLEDGE, 2009; GURGEL, 2006). Na Figura 27 pode ser observado um esquema representativo da aplicação do MSC em espectros NIR.

Figura 27: Aplicação do MSC em espectros NIR



Fonte: SAUER, 2007.

### 2.5.1.2.3. Correção do sinal ortogonal (OSC – *Orthogonal Signal Correction*)

Este tratamento é aplicado aos dados quando a matriz X contém variações sistemáticas não relacionadas às respostas Y. Uma espécie de filtro (função matemática) remove da matriz X a parte não relacionada às respostas (CORGOZINHO, 2009). Isto é feito garantindo-se que a parte removida é matematicamente ortogonal a Y e dessa forma simplificando o modelo. (HONORATO *et al.*, 2007).

### 2.5.2. Pré – processamento dos dados

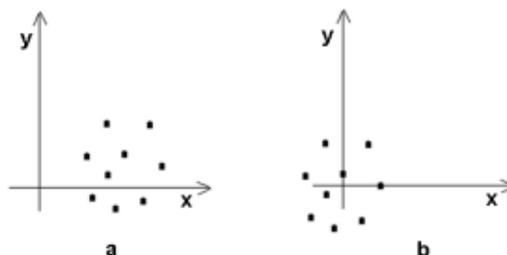
Nesse caso, o pré - processamento é aplicado nas colunas da matriz de dados, diferentemente do pré – processamento das amostras que é aplicado nas linhas da matriz de dados. Esse procedimento também é importante em análise quimiométrica (FERREIRA, 2015).

#### 2.5.2.1. Centralização na média (MC – *Mean centering*)

A centralização dos dados na média consiste em subtrair o valor de cada elemento da coluna pelo seu respectivo valor médio, permitindo que as variáveis sejam centradas e os efeitos indesejados oriundos, por exemplo, de variações de intensidade devido a efeitos instrumentais, sejam removidos. O objetivo deste pré – processamento é revelar as flutuações dos dados em torno do valor médio. A seguir é possível observar um esquema representativo da

aplicação da centralização na média em espectros NIR (Figura 28). (FREITAS, 2006; SANTOS, 2007).

Figura 28: Comparação entre dados originais e centrados na média.



Legenda: (a) dados originais (b) dados centrados na média

Fonte: CORGOZINHO, 2009

### 2.5.2.2. Escalamento pela variância

Nos métodos de escalamento, os dados são divididos por um fator de escala que é uma medida da dispersão de dados. Na equação 57, os elementos de cada uma das variáveis são divididos pelo fator de escala que é o seu respectivo desvio padrão. Nesse tipo de pré – processamento, os dados se tornam adimensionais (FERREIRA, 2015).

$$x_{ij(v)} = \frac{x_{ij}}{s_j} \quad (57)$$

onde  $x_{ij}$  é o valor a ser padronizado e  $s_j$  é o desvio padrão.

### 2.5.2.3. Autoescalamento (*Autoscale*)

Esse tipo de pré – processamento implica em subtrair, de cada elemento de uma coluna de matriz de dados, o valor médio da respectiva coluna e dividir essa diferença pelo desvio padrão da coluna, ou seja, cada coluna da matriz é centrada na média e escalada pelo desvio padrão, conforme pode ser observado na equação 58 a seguir. Da mesma forma que no escalamento pela variância, os dados também se tornam adimensionais (FERREIRA, 2015).

$$x_{ij(a)} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j} \quad (58)$$

onde  $x_{ij}$  é o valor a ser padronizado;  $s_j$  é o desvio padrão e  $\bar{x}_j$  é a média.

## 2.6. Técnicas quimiométricas

### 2.6.1. Aprendizagem Não Supervisionada

Não existe supervisão nas técnicas, já que não se conhecem a priori a que classes pertencem os objetos (ou pelo menos essa informação não é usada na construção do modelo). É a situação mais comum em Quimiometria. Exemplos: Análise de Componente Principal (PCA) e Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) (BRERETON, 2003).

#### 2.6.1.1. Análise do Componente Principal

A análise exploratória é baseada em métodos de reconhecimento de padrões visando evidenciar similaridades ou diferenças entre amostras de um determinado conjunto de dados. A análise do componente principal (*Principal Component Analysis* – PCA) é a base principal de diversos métodos de análise multivariada e seu grande objetivo é comprimir a quantidade de informação de um conjunto de dados iniciais para um novo sistema de eixos, denominados componentes principais (*Principal Component* - PC). Estes PCs representam as amostras, possibilitando visualizar características multivariadas dos dados em poucas dimensões, através de uma projeção de dados sobre um subespaço dimensional menor maximizando a variância, sem perda de informação relevante (BORTOLETO, 2007). É comum obter em apenas dois ou três dos primeiros componentes principais mais que 90% da informação (NETO; MOITA, 1998).

Um PC é definido por um par de pesos (*loadings*) e escores (*scores*) (Figura 29). Os PCs descrevem o máximo da variância e são calculados em ordem de importância (NETO; MOITA, 1998).

Figura 29: Matrizes do PCA

$$\boxed{X} = \begin{bmatrix} p_1^T \\ t_1 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} p_2^T \\ t_2 \end{bmatrix} + \dots + \begin{bmatrix} p_A^T \\ t_A \end{bmatrix} + \boxed{E}$$

Fonte: LIMA, 2011

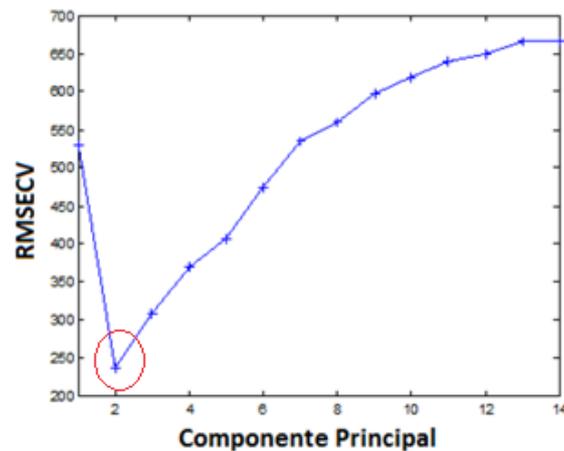
Normalmente após o PCA, o tamanho de cada componente pode ser medido. Essa medida é frequentemente chamada de autovalor (*eigenvalue*) e nesse caso quanto mais significativo for o componente maior é o seu tamanho. Frequentemente esses autovalores são apresentados na forma de porcentagem. A porcentagem acumulativa é frequentemente usada para determinar aproximadamente a proporção dos dados modelados pelo PCA. Quanto mais próximo de 100% melhor é o modelo. Essa porcentagem pode ser colocada em um gráfico contra o número de autovalores no modelo. Usando o tamanho dos autovalores pode-se estimar o número de componentes significantes no conjunto de dados. Uma regra que às vezes é considerada é rejeitar um determinado número de componentes principais (PCs) quando a porcentagem acumulada dos autovalores for inferior a 5% (BRERETON, 2003).

Quanto maior a correlação entre as medidas, maior será a parcela de variação explicada pelos primeiros eixos<sup>5</sup>. Uma série de métodos para determinar o número de fatores significantes é baseada na validação cruzada que é uma ferramenta quimiométrica muito importante. Um dos métodos da validação cruzada é a opção deixar um de fora (*leave one out*) que consiste em retirar uma das amostras do conjunto de dados e fazer a modelagem com as demais amostras e tal procedimento é repetido em função do número total de amostras do conjunto. (BRERETON, 2003)

Ao se trabalhar com validação cruzada um dos métodos para se avaliar o número de componentes significantes em um modelo é através da raiz quadrada do erro médio quadrático da validação cruzada (*Root Mean Square Error of Cross Validation – RMSECV*) (Figura 30), que serve para fornecer a incerteza na estimativa da concentração dos analitos nas amostras do conjunto de validação cruzada (equação 59) (BRERETON, 2003).

<sup>5</sup> <http://www.cfh.ufsc.br/gcn3506/documents/Aula6PCA.pdf>

Figura 30: Avaliação da escolha do número de PCs.

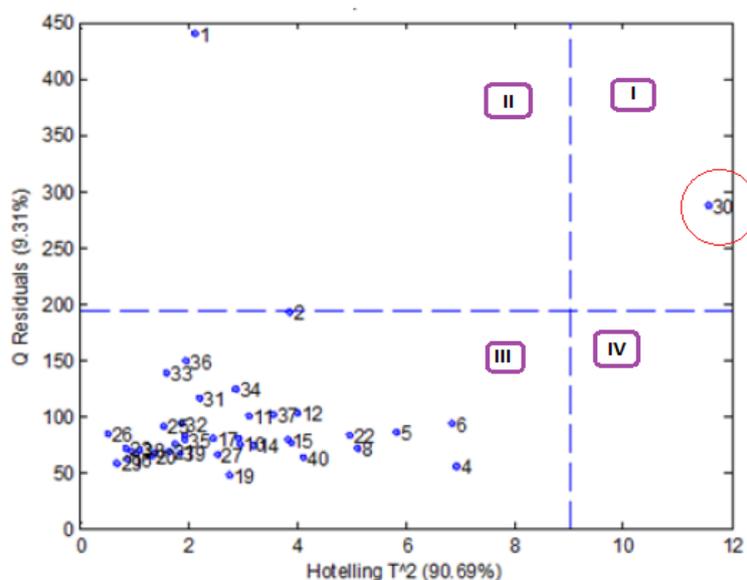


Fonte: PINHO, 2012

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (59)$$

Onde  $y_i$  é um dos valores da variável Y;  $\hat{y}_i$  é o valor de  $y$  correspondente ao valor de  $y$  predito;  $n$  é o número de objetos no conjunto de dados.

Após efetuar o PCA, um método para se avaliar se há amostras discrepantes no modelo é fazer uso do teste Hotelling  $T^2$  (Figura 31) que é usado para testar a igualdade dos vetores médios de duas populações multivariadas. Trata-se nada mais do que um teste derivado a partir do princípio geral de construção de procedimentos de teste denominado Método da Razão de Verossimilhança e é apropriado para comparar duas populações representadas por amostras independentes (STEINER, 1995).

Figura 31: Teste Hotelling  $T^2$ 

Fonte: PINHO, 2012.

A avaliação da figura anterior mostra que a amostra de número 30 localizada no primeiro quadrante (I) possui um alto *leverage* e também um resíduo alto, sendo então o mais adequado retirar essa amostra do conjunto de dados. Amostras localizadas no primeiro quadrante possuem uma alta influência no modelo, mas possuem também um alto resíduo, sendo, portanto o mais indicado retirar a amostra do conjunto de dados para não ter influência negativa no modelo construído posteriormente. Amostras localizadas no segundo quadrante (II), embora tenham um alto valor de resíduo possuem um baixo valor de Hotelling  $T^2$ , o que faz com que não tenham uma influência negativa no modelo. As amostras localizadas no terceiro quadrante (III) possuem um baixo valor de resíduo e Hotelling  $T^2$  não tendo também influência negativa do modelo.

A análise de componentes principais é um método de análise de dados multivariado para exploração de dados, sendo também usado para reduzir a dimensionalidade dos dados originais em subespaços de baixa dimensionalidade definida por poucos componentes principais (FERRER – RIQUELME, 2009).

Em outras palavras, a análise de componentes principais é usada para reduzir a dimensionalidade dos dados originais de uma dada matriz  $X$ , no qual

a maior parte da variabilidade dos dados é explicada por componentes principais, como mostra a equação 60:

$$\mathbf{X} = \sum_{a=1}^A t_a p_a^T + \mathbf{E} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (60)$$

onde  $\mathbf{P}$  ( $K \times A$ ) é a matriz contendo os vetores  $p_a$  de pesos ou componentes principais;  $\mathbf{T}$  é a matriz de escores que contém a localização da projeção ortogonal das observações originais em subespaço latente,  $t_a$  são os vetores da matriz de escores  $\mathbf{T}$  que representam os novos componentes principais com variâncias dadas pelos seus respectivos autovalores ( $\lambda_a$ ) e a matriz  $\mathbf{E}$  ( $m \times K$ ) contém os resíduos, ou seja, a parte não explicada pelo modelo (ESBENSEN; GELADI, 2009).

### 2.6.2. Aprendizagem Supervisionada

Os métodos supervisionados são usados quando o objetivo é construir um modelo que seja capaz de classificar amostras futuras. É feito uso de um conjunto de amostras de classificação conhecida (conjunto ou grupo de treinamento) para que o programa utilizado seja capaz de distinguir as classes das amostras. A informação sobre a que classes pertencem os objetos está disponível e é usada na construção do modelo (BRERETON, 2003).

Alguns exemplos são: Modelagem Independente Flexível por Analogia de Classe (*Soft Independent Modeling Class Analogy – SIMCA*), Análise Discriminante por Máquina de Vetor Suporte (*Support Vector Machine – Discriminant Analysis, SVM - DA*), Análise Discriminante por regressão dos mínimos quadrados parciais (*Partial Least Square – Discriminant Analysis, PLS - DA*), K-ésimo vizinho ( $K$  – nearest neighbour, KNN), Análise Discriminante Linear (*Linear Discriminant Analysis - LDA*) e Análise Discriminante Quadrática (*Quadratic Discriminant Analysis – QDA*) (BRERETON, 2003).

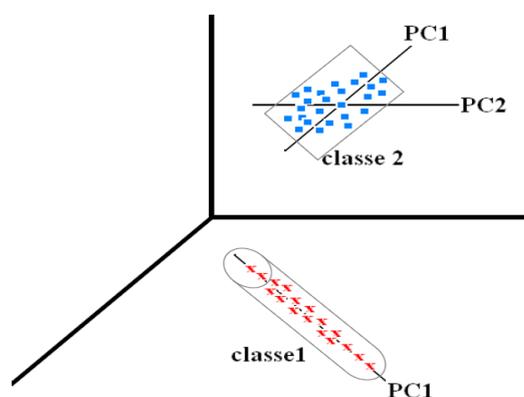
#### 2.6.2.1. SIMCA

Proposto originalmente por Wold e Sjöström em 1979, é um método onde as amostras de calibração são divididas por classes, visando à

classificação de amostras desconhecidas nestas classes. Um modelo de análise de componentes principais é executado em cada classe, delimitando as fronteiras entre estas, criando assim hipercaixas contendo as amostras. A técnica usa o PCA para modelar a forma e a posição do objeto formado pelas amostras no espaço linha para definição de uma classe (SANCHES, 2009). Para um dado modelo, a resposta entre as classes pode ser uma linha (para apenas um PC), um plano (para dois PC) ou ainda um hiperplano (TOMINAGA, 1999; FERREIRA, 2002; HOPKE, 2003).

Para modelar ou delimitar as fronteiras onde estão localizadas as amostras, é utilizado um conjunto de treinamento contendo amostras de todas as classes e cuja identidade de cada amostra deste conjunto é conhecida a priori. As fronteiras de cada classe são modeladas ou delimitadas usando apenas amostras daquela classe conhecida no conjunto de treinamento. Uma vez definidas as hipercaixas é importante verificar se existem classes com sobreposição. A Figura 32 apresenta uma simples exemplificação de modelos SIMCA hipotéticos, para duas classes de amostras distintas (SANCHES, 2009).

Figura 32: Modelo SIMCA



Fonte: SANCHES, 2009

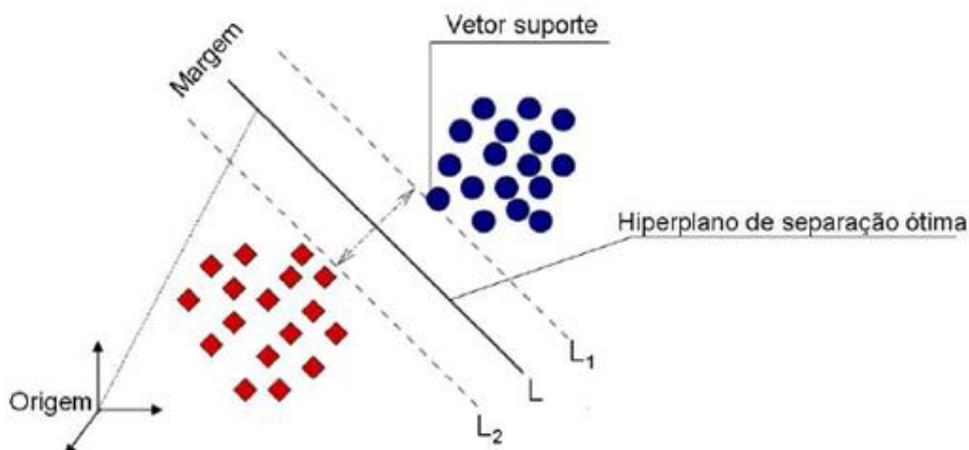
O poder de discriminação dos modelos SIMCA se baseia na não existência de sobreposição entre duas classes diferentes, bem como na maior distância interclasses possível. Se uma amostra é classificada em mais de uma classe, as medidas ou os modelos SIMCA não são potencialmente discriminantes. As amostras anômalas podem ocorrer devido a um erro nas

medidas, ou devido ao surgimento de uma ou mais amostras que sofreram um fenômeno químico anômalo ou desconhecido (SANCHES, 2009).

#### 2.6.2.2. SVM – DA

A técnica é usada para classificação binária (duas classes), mas que também suporta a regressão e problemas de classificação de múltiplas classes. De uma maneira geral, o funcionamento da técnica consiste no fato de que dadas duas classes e um conjunto de pontos pertencentes a essas classes, a técnica determina o hiperplano (Figura 33) que separa os pontos de forma a colocar o maior número possível de pontos da mesma classe do mesmo lado e ao mesmo tempo maximiza a distância de cada classe a esse hiperplano (ALMEIDA, 2007).

Figura 33: Esquema de classificação por meio do SVM



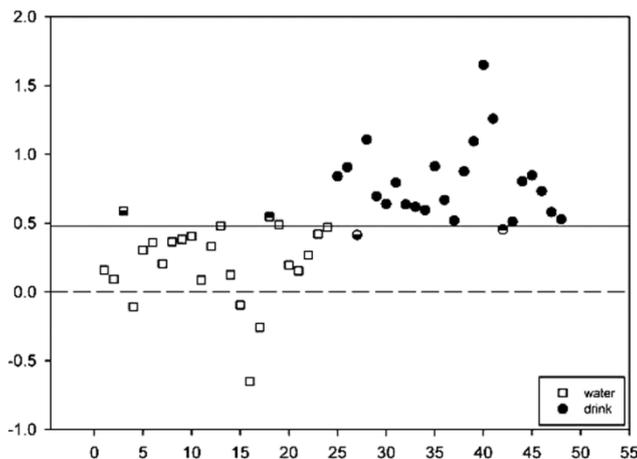
Fonte: NASCIMENTO *et al*, 2009

#### 2.6.2.3. PLS – DA

A técnica é uma regressão PLS de uma matriz binária  $Y$  que descreve categorias (ou classes) para uma matriz  $X$  (PÉREZ – ENCISO; TENENHAUS, 2003). Essa técnica serve para melhorar a separação entre dois grupos de

amostras (Figura 34), de modo que se tenha a maior separação possível, entre elas (CAMO, 2015)<sup>6</sup>.

Figura 34: Exemplo de classificação usando PLS-DA



Fonte: MICCHELI *et al*, 2009

A predição de um modelo pelo PLS - DA, normalmente, pode ser um valor nominal normalmente de zero ou um. Desse modo, um valor próximo ao zero indica que a amostra não está em uma determinada classe, enquanto que um valor de um indica que determinada amostra está modelada em uma classe (EIGENVECTOR, 2014)<sup>7</sup>.

Este método de classificação supervisionada que usa o modelo de regressão PLS para classificação de amostras, relaciona a matriz  $\mathbf{X}$  de espectros com uma matriz  $\mathbf{Y}$  de classes, sendo a classe observada por meio da equação 61 (LIMA, 2011).

$$\hat{\mathbf{C}} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{q} \quad (61)$$

Onde  $\mathbf{T}$  é a matriz de escores do modelo PLS obtidos a partir dos dados originais,  $\mathbf{q}$  é o vetor de comprimento dos componentes significantes do PLS e  $\hat{\mathbf{C}}$  é a classe predita (LIMA, 2011).

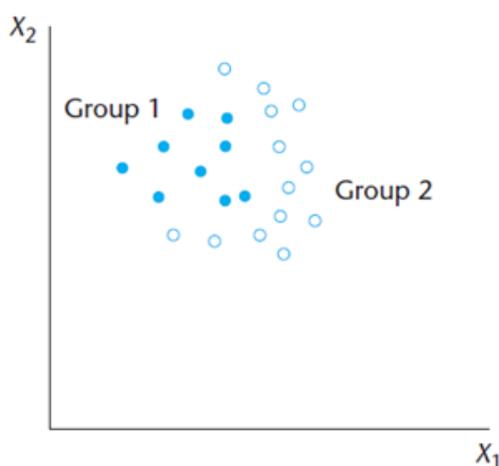
<sup>6</sup> <http://www.camo.com/resources/pls-da.html>

<sup>7</sup> <http://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Plsda>

#### 2.6.2.4. KNN

O método KNN tem sido usado pelos químicos por mais de trinta anos. É um método simples para decidir como classificar uma amostra desconhecida quando há dois ou mais grupos de classes conhecidas. É usada quando os grupos não podem ser separados por um plano como ilustrado na Figura 35 (MILLER, J.N.; MILLER, J.C., 2005, BRERETON, 2003).

Figura 35: Representação do KNN



Fonte: MILLER, J.N; MILLER, J.C, 2005.

O método faz a classificação de acordo com a similaridade que a amostra desconhecida apresenta em relação as amostras do conjunto de treinamento. A distância euclidiana entre as amostras é calculada em  $n$  dimensões de acordo com a equação 62 (MILLER, J.N.; MILLER, J.C., 2005).

$$D = \sqrt{(\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2)} \quad (62)$$

onde  $x_i$  e  $y_i$  são as coordenadas das amostras  $x$  e  $y$  na  $i$  - ésima dimensão do espaço – linha.

Para classificar uma amostra, é calculada a distância entre a amostra e o conjunto de amostras de classe conhecida do conjunto de treinamento. As  $K$  – amostras mais próximas são usadas para fazer a classificação (MILLER, J.N.; MILLER, J.C., 2005).

Para fazer a seleção dos K – vizinhos ótimos faz-se uso do procedimento de validação cruzada nas amostras de classe conhecida do conjunto de treinamento. Cada amostra desse conjunto é tratada como desconhecida e sua classificação feita usando-se o conjunto de treinamento das amostras remanescentes. O processo é, então, repetido usando diferentes números de vizinhos mais próximos na classificação (MILLER, J.N.; MILLER, J.C., 2005).

#### 2.6.2.5. LDA e QDA

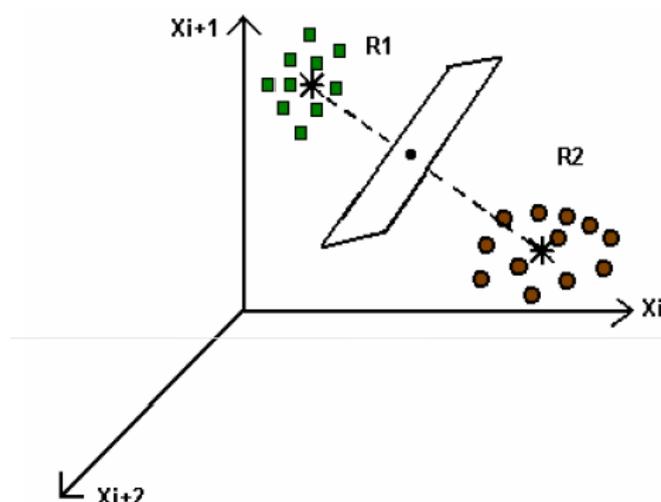
Caso a distribuição não tenha formas similares, então uma modificação do LDA conhecida como QDA pode ser usada. No LDA, o método leva em consideração que os grupos possuem uma distribuição normal multivariada e mesma variância, enquanto que no QDA, o método assume que os dois grupos possuem distribuição normal multivariada, mas com diferentes variâncias (MILLER, J.N.; MILLER, J.C., 2005).

O princípio da técnica é achar uma função linear discriminante (*Linear Discriminant Function* - LDF)  $Y$ , a qual é uma combinação linear das variáveis originais ( $X_1, X_2$ , etc) (equação 63) (MILLER, J.N.; MILLER, J.C., 2005).

$$y = \sum_{i=1}^n (a_i x_i) \quad (63)$$

As  $n$  medidas originais para cada amostra são combinadas em um único valor de  $Y$ . Dessa forma, os dados são reduzidos de  $n$  dimensões para uma única dimensão. Os coeficientes são escolhidos de forma que o  $Y$  reflita a maior diferença possível entre os grupos: amostras em um mesmo grupo têm um valor similar de  $Y$ . Assim sendo, a LDF fornece um meio de discriminação entre dois grupos (MILLER, J.N.; MILLER, J.C., 2005) (Figura 36).

Figura 36: Representação do LDA



Fonte: LUNA, 2012.

Os centros de gravidade dos grupos definidos por círculos e quadrados são determinados e em seguida se traça o plano de decisão perpendicularmente a linha que une os centros de gravidade. O espaço fica dividido em duas regiões R1 e R2 (MILLER, J.N.; MILLER, J.C., 2005).

Se um ponto qualquer aparece na região R1 é classificada como pertencente à categoria 1 e classificada na categoria 2 se aparecer na região R2. Vale frisar que em uma análise discriminante, as amostras são sempre classificadas como pertencente a uma ou outra categoria e, portanto, não contempla a possibilidade da amostra pertencer a uma categoria não definida (MILLER, J.N.; MILLER, J.C., 2005).

Ao considerar as análises espectroscópicas em diversos tipos de análises qualitativas se constate que, atualmente, a grande maioria emprega métodos de reconhecimento de padrões. Visando aumentar a capacidade preditiva dos modelos que usam tais métodos, pode-se recorrer ao uso da seleção de variáveis, que visa eliminar variáveis não informativas e reter aquelas que resultam apenas na exatidão máxima (MILLER, J.N.; MILLER, J.C., 2005).

O sucesso do LDA em alocar corretamente uma amostra em uma determinada categoria pode ser testado de várias formas. Pode ser feita uma divisão do conjunto de dados originais em dois grupos escolhidos de forma aleatória. O primeiro grupo conhecido como grupo de treinamento que é usado para achar a LDF e o segundo grupo que é o grupo de teste, no qual as

amostras são classificadas usando a LDF calculada previamente (MILLER, J.N.; MILLER, J.C., 2005).

## 2.7. Algoritmos para seleção de dados ou variáveis

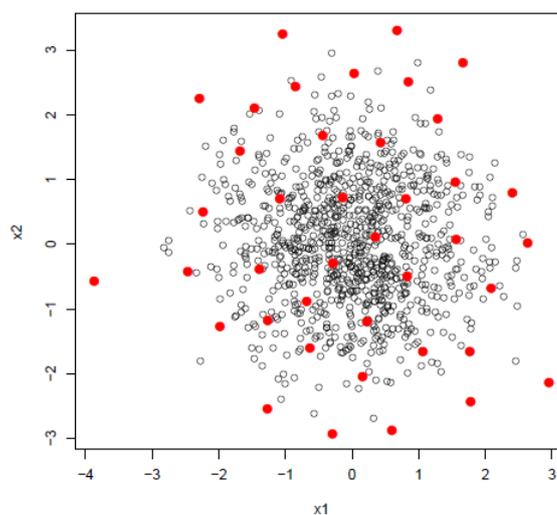
Modelos de calibração são usualmente desenvolvidos sobre uma porção representativa do conjunto de dados (conjunto de treinamento) e validados por meio das amostras restantes (conjunto de validação/teste). Há diversas soluções para seleção dos dados para composição dos grupos de treinamento e teste: seleção aleatória, amostra aleatória estratificada em percentis de resposta  $y$ , uso de dados espectrais. Para selecionar amostras representativas, nesse último caso, podem ser usados alguns dos seguintes algoritmos: Kennard Stone (KS), duplex e shenkWest (STEVENS, RAMIREZ - LOPEZ, 2014).

### 2.7.1. Algoritmo KS

Busca selecionar um subconjunto significativo em um conjunto de  $N$  amostras. Para assegurar a uniformidade de distribuição de cada subconjunto ao longo do espaço de dados  $X$  (respostas instrumentais), o algoritmo segue o procedimento por etapas de modo que uma nova seleção é feita nas regiões do espaço longe das amostras já selecionadas. Para este propósito, o algoritmo emprega a distância Euclidiana (SANCHES, 2009)

A seleção começa tomando o par  $(a_1, a_2)$  de amostras nas quais a distância  $d_x(a_1, a_2)$  é maior. Subsequentemente, o algoritmo seleciona a amostra que exibe a maior distância em relação a uma amostra já selecionada. O procedimento é repetido até que o número de amostras requerido seja encontrado (SANCHES, 2009). Na Figura 37 se tem a representação da seleção dos dados (pontos em vermelho) usando algoritmo KS.

Figura 37: Representação da seleção do algoritmo KS

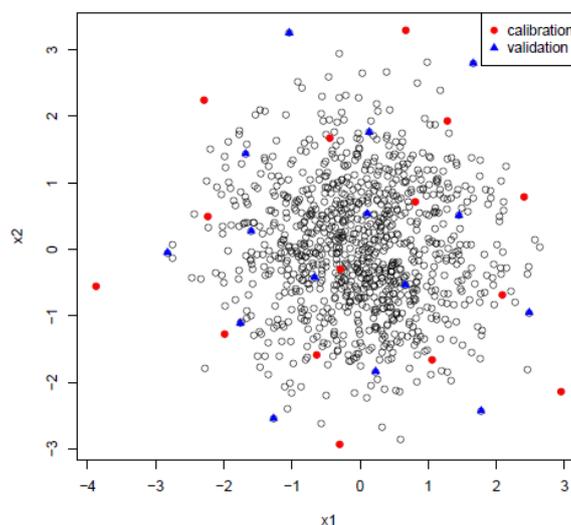


Fonte: STEVENS; RAMIREZ – LOPEZ, 2014.

### 2.7.2. Algoritmo Duplex

Enquanto o algoritmo KS seleciona amostras para o conjunto de treinamento apenas, o duplex, que é uma versão modificada do KS, separa as amostras nos dois conjuntos: teste e treinamento. O algoritmo seleciona as amostras de forma similar ao KS, pela distância entre elas. A representação da seleção de dados desse algoritmo pode ser representada na **Figura 38** a seguir (STEVENS, RAMIREZ – LOPES, 2014).

Figura 38: Representação da seleção de dados pelo algoritmo duplex.

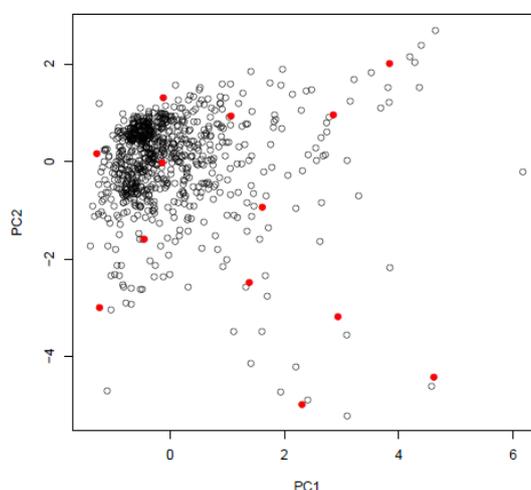


Fonte: STEVENS; RAMIREZ – LOPEZ, 2014.

### 2.7.3. Algoritmo Select (ShenkWest)

Esse algoritmo é um procedimento iterativo o qual seleciona a amostra que tem o máximo de amostras vizinhas a uma dada distância e remove as amostras vizinhas dessa amostra selecionada da lista de pontos. A distância métrica usada é a distância de Mahalanobis dividida pelo número de dimensões (número de componentes) usado para computar a distância. A seleção de amostras (pontos vermelhos) por esse algoritmo pode ser observada na Figura 39 a seguir (STEVENS, RAMIREZ - LOPEZ, 2014).

Figura 39: Representação da seleção de dados pelo algoritmo shenWest.



Fonte: STEVENS; RAMIREZ – LOPEZ, 2014.

## 2.8. Parâmetros de Mérito para Métodos de Discriminação

Quando uma metodologia é desenvolvida é importante que sejam determinados parâmetros de mérito para que seja considerada como confiável. Alguns autores obtêm tais parâmetros através do que chamam de matriz de confusão, na qual são avaliadas as classificações corretas assim como os falsos positivos e falsos negativos. A partir dessa avaliação é possível determinar parâmetros tais como: sensibilidade (SEN) – total de amostras positivas classificadas corretamente dentre as amostras positivas; especificidade (ESPEC) – total de amostras negativas classificadas corretamente dentre as amostras negativas; precisão (PREC) – total de

amostras positivas classificadas corretamente dentre as amostras classificadas como positivas; exatidão (EXAT) – porcentagem de amostras negativas e positivas classificadas corretamente dentre o total de amostras. O cálculo de tais parâmetros pode ser observado nas equações 64, 65, 66 e 67 a seguir (Luna *et al.*, 2015):

$$SENS = \frac{TP}{TP+FN} \quad (64)$$

$$ESPEC = \frac{TN}{TN+FP} \quad (65)$$

$$PREC = \frac{TP}{TP+FP} \quad (66)$$

$$EXAT = \frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN} \quad (67)$$

onde TP = total de casos positivos que foram discriminados corretamente, FP = total de falsos positivos, TN = total de casos negativos que foram classificados corretamente, FN = total de falsos negativos.

### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1. Determinação de Ibuprofeno e Paracetamol

##### 3.1.1. Materiais e métodos

###### 3.1.1.1. Para determinação por espectrofluorescência

Os padrões de PAR e IBU usados no trabalho são da Sigma – Aldrich. Os medicamentos usados foram *Sonridor*® (500 mg de Paracetamol), *Tylenol*® (750 mg de Paracetamol), *Ibupril*® (600 mg de Ibuprofeno) e *Advil*® (200 mg de Ibuprofeno). Para todos os ensaios onde foi necessário usou-se água purificada (Gehaka – osmose reversa). Para dissolver tanto o padrão quanto o medicamento foi necessário usar metanol HPLC/Grau Espectroscópio (Tedia) visto que a solubilidade do Ibuprofeno é baixa em água e também em etanol. Para fazer a medição da massa tanto para preparar a solução estoque do padrão quanto para pesagem do medicamento se usou uma balança analítica (Mettler Toledo AL204).

Para o preparo da solução tampão foram usados os seguintes reagentes: cloreto de amônio e solução de hidróxido de amônio (Sigma Aldrich). Para melhor dissolução dos analitos das soluções estoque foi feito uso do ultrassom (Ultrasonic Clear Branson 2000) e para proteger a solução da luz, revestiu-se o balão volumétrico com papel alumínio. No caso dos medicamentos, devido aos excipientes dos mesmos foi necessário filtrar a solução sendo usado para tal um filtro Millipore de acetato de celulose 0,75 µm.

Para os ensaios com urina foram usadas amostras de quatro pessoas (de ambos os sexos) saudáveis e que não faziam uso de quaisquer medicamentos.

Para efetuar as análises dos padrões aquosos, medicamentos e também da urina foi usado um espectrofluorímetro modelo Fluorat 02 da Panorama (Lumex, Rússia), tendo sido a solução a ser analisada colocada em uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm.

### 3.1.1.2. Para determinação por HPLC

Para efetuar as análises das amostras de padrões aquosos, medicamentos e também de urina foi usado um cromatógrafo modelo HPLC *Agilent Technologies 1260 Infinity*. A coluna usada foi uma modelo C18 250 x 4,6 mm (5  $\mu\text{m}$ ) – *Microsorb 100*. A fase móvel era constituída de uma mistura 65:35 de acetonitrila e ácido acético 0,5% v/v. A vazão da fase móvel foi de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e o volume de injeção de 15  $\mu\text{L}$ . A temperatura usada para efetuar todas as análises foi de 25°C ( $\pm 2$ ). Todas as soluções foram filtradas antes de serem usadas, empregando-se um filtro para solvente aquoso (nitrato de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$ , *Sartorius Stedim Biotech*) ou um filtro para solvente orgânico (Durapore PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro – hidrofóbica) com auxílio de uma bomba de vácuo (modelo *Quimis*) e, posteriormente, foram submetidas ao ultrassom (*Ultrasonic Clear Branson 2000*). A detecção foi feita no UV em dois valores diferentes de comprimento de onda: foi utilizado o comprimento de onda de 252 nm até 3,7 min para detecção do paracetamol; posteriormente, o comprimento de onda foi mudado para 223 nm para detecção do Ibuprofeno.

### 3.1.2. Testes preliminares para determinação de PAR e IBU por espectrofluorescência.

Para preparar a solução estoque de PAR de 1000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  foi feita medição de 100 mg na balança analítica. Posteriormente, essa massa foi solubilizada em metanol (100,00 mL). Para isso foi necessário usar o ultrassom. A partir dessa solução foi feita uma diluição com água purificada (Gehaka – osmose reversa) para se obter uma solução de concentração igual a 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . O mesmo procedimento foi feito para IBU.

Para testar a faixa de concentração a ser trabalhada foram feitas inicialmente, determinações somente dos padrões de PAR e IBU e posteriormente das misturas. Foi usada uma faixa de concentração de 10 a 20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para o IBU e de 2 a 8  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para o PAR (Tabela 1) sendo que todas as concentrações foram preparadas em triplicata. As soluções foram preparadas por meio de diluições a partir da solução de 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  também com água purificada e tamponadas em pH = 10.

Tabela 1: Concentração de PAR e IBU em padrões aquosos

<b>[PAR]</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	<b>[IBU]</b> (mg.L <sup>-1</sup> )
10,00	2,00
12,00	4,00
16,00	6,00
20,00	8,00

Fonte: O autor, 2016.

Também foi estudada inicialmente a faixa de comprimento de onda (de excitação e emissão) que poderia ser usada. Assim sendo, inicialmente, trabalhou-se com um faixa de 200 a 260 (com um intervalo de 2 nm) para a excitação e com uma faixa de 270 a 400 nm (com um intervalo de 1 nm) para a emissão, obtendo-se assim uma matriz de dimensão 31 x 131.

Após se realizar esses estudos com os analitos separados, foram realizados testes preliminares com as misturas (Tabela 2), na mesma faixa de concentração, a fim de verificar como seriam os espectros obtidos e também se seria possível separar PAR e IBU usando ferramentas quimiométricas (calibração multivariada de segunda ordem).

Tabela 2: Concentração de PAR e IBU nas misturas sintéticas de padrões aquosos

<b>AMOSTRA</b>	<b>[PAR]</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	<b>[IBU]</b> (mg.L <sup>-1</sup> )
A	10,00	2,00
B	12,00	4,00
C	16,00	6,00
D	20,00	8,00

Fonte: O autor, 2016.

### 3.1.3. Determinação de PAR e IBU em padrões aquosos

#### 3.1.3.1. Por espectrofluorescência

Para evitar problemas de sobreposição espectral se escolheu trabalhar com pH = 10, visto que com base em dados da literatura em valores de pH

menores que esse haveria uma sobreposição maior de um pico de menor intensidade do IBU com relação ao PAR. A faixa de concentração trabalhada foi de 2 a 7 mg.L<sup>-1</sup> de IBU e 10 a 20 mg.L<sup>-1</sup> de PAR (determinações em triplicata), sendo adicionado a todas as soluções 1 mL da solução tampão (pH = 10). No final todas as soluções foram avolumadas para 10,00 mL com água purificada. A solução branco utilizada foi o tampão (1 mL) avolumado com água purificada.

A faixa de comprimento de onda trabalhada foi reajustada para 220 – a 248 nm (com intervalo de 2 nm) para excitação e 280 a 376 nm (com intervalo de 2 nm) para emissão. Utilizou-se o espectrofluorímetro com a sensibilidade média, devido à intensidade do sinal do PAR ser baixa.

#### 3.1.3.2. Por HPLC

A faixa de concentração utilizada para IBU e PAR foi de 2 a 7 e 10 a 20 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os comprimentos de onda utilizados foram os mesmos que do teste preliminar.

#### 3.1.4. Determinação de PAR e IBU em medicamentos

##### 3.1.4.1. Por espectrofluorescência

Para preparar a solução estoque de medicamento foram pesados 10 comprimidos de IBU e calculada a massa média. Em seguida, esses comprimidos foram triturados, a fim de garantir a homogeneidade, sendo então medida uma massa equivalente à massa média dos comprimidos, sendo a mesma solubilizada em metanol. O mesmo procedimento foi feito para o PAR.

Levando em consideração que o teor de PAR nos medicamentos (500 ou 750 mg) e que o volume final da solução preparada foi de 100 mL, a concentração da solução estoque era de 5000 ou 7500 mg. L<sup>-1</sup>. Já o teor de IBU no medicamento é de 200 ou 600 mg, sendo o volume final da solução preparada também foi de 100,00 mL. Dessa forma, a concentração final das soluções estoque eram de 2000 ou 6000 mg. L<sup>-1</sup> respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Teor em miligramas dos medicamentos e concentração teórica do princípio ativo ([P.A.]) na solução estoque.

<b>PRINCÍPIO ATIVO</b>	<b>MEDICAMENTO (nome)</b>	<b>TEOR (mg)</b>	<b>[P.A.] mg/L</b>
<i>PARACETAMOL</i>	SONRIDOR	500	5000
	TYLENOL	750	7500
<i>IBUPROFENO</i>	ADVIL	200	2000
	IBUPROFENO	600	6000

Fonte: O autor, 2016.

Dessa forma, com as diluições apropriadas com água purificada, foram preparadas soluções de cada analito separadamente de concentração iguais a: 2, 3, 4, 5, 6 e 7 mg. L<sup>-1</sup> para o IBU e 10, 12, 14, 16, 18 e 20 mg. L<sup>-1</sup> para o PAR e também de misturas (Tabela 4), sendo também usada uma solução tampão para pH = 10 (1 mL) e avolumadas para 10,00 mL, sendo feita a análise das soluções no espectrofluorímetro. As demais condições (comprimentos de onda de excitação e emissão, assim como a sensibilidade do equipamento foram as mesmas que para padrões aquosos).

Tabela 4: Concentrações das misturas sintéticas de medicamentos

<b>AMOSTRA</b>	<b>[PAR] (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>[IBU] (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
A	10,00	2,00
B	12,00	3,00
C	14,00	4,00
D	16,00	5,00
E	18,00	6,00
F	20,00	7,00

Fonte: O autor, 2016.

#### 3.1.4.2. Por HPLC

O preparo da solução estoque de medicamento e faixa de concentração dos analitos (misturas sintéticas) foi igual ao da determinação por espectrofluorescência molecular. Novamente, a detecção foi feita em dois

valores diferentes de comprimento de onda, tendo sido primeiramente utilizado o comprimento de onda de 252 nm até 3,7 min para detecção do paracetamol e, posteriormente, o comprimento de onda foi mudado para 223 nm para detecção do Ibuprofeno e se manteve constante até o final da corrida cromatográfica.

### 3.1.5. Determinação de PAR e IBU em urina

#### 3.1.5.1. Por espectrofluorescência

Após a determinação de PAR e IBU em padrão aquoso e medicamentos foi realizado um procedimento para determinação dos mesmos em fluidos biológicos (urina). Para realizar tal procedimento, foram coletadas quatro amostras de urina (de ambos os sexos) de pessoas saudáveis e que não faziam uso de quaisquer medicamentos. Usando o método da adição de padrão cada amostra foi enriquecida com diferentes teores de PAR e IBU simultaneamente, sendo que as concentrações trabalhadas foram de 12, 14, 16 e 18 mg. L<sup>-1</sup> para o PAR e 3, 4, 5 e 6 mg. L<sup>-1</sup> para o IBU (Tabela 5). Todas as medidas foram feitas em triplicata, inclusive a medida do branco.

Tabela 5: Amostras de urina enriquecidas com PAR e IBU

<b>AMOSTRA</b>	<b>[PAR] (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>[IBU] (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
A	12,00	3,00
B	14,00	4,00
C	16,00	5,00
D	18,00	6,00

Fonte: O autor, 2016.

Antes de receber o enriquecimento desses analitos foi feito um estudo preliminar de qual seria o fator mais adequado de diluição da urina para se trabalhar. Dessa forma foi feito um teste inicial com três níveis de diluição: 100, 500 e 1000 vezes, fazendo um enriquecimento de 5 mg. L<sup>-1</sup> de IBU e 10 mg. L<sup>-1</sup> de PAR a amostra de urina já diluída. Após a escolha do melhor fator de diluição a partir das matrizes EEM obtidas foram feitos os ensaios com urina.

Além da urina diluída e do enriquecimento com os analitos estudados, também foi adicionado a cada amostra 1 mL da solução tampão (pH = 10) e a solução foi avolumada para 10,00 mL com água purificada. As análises foram realizadas na mesma faixa de comprimento de onda usado para padrão aquoso e medicamento e o branco nesse caso foi a amostra de urina diluída acrescida do tampão, porém sem o enriquecimento com PAR e IBU. Também se escolheu trabalhar com a sensibilidade média do equipamento nesse estudo.

#### 3.1.5.2. Por HPLC

Após a determinação de PAR e IBU em padrão aquoso e medicamentos foi realizado um procedimento para determinação dos mesmos em fluídos biológicos (urina) por HPLC. Foram coletadas quatro amostras de urina (de ambos os sexos) de pessoas saudáveis (das mesmas pessoas que forneceram amostras para determinação por espectrofluorescência) e que não faziam uso de quaisquer medicamentos. Da mesma forma que na determinação espectrofluorimétrica antes das análises foi testado o fator de diluição da urina (100, 500 e 1000 vezes). Posteriormente, foi usado o método da adição de padrão e cada amostra foi enriquecida com diferentes teores de PAR e IBU, sendo que as concentrações trabalhadas foram 12, 14, 16 e 18 mg. L<sup>-1</sup> para o PAR e 3, 4, 5 e 6 mg. L<sup>-1</sup> para o IBU. Todas as medidas foram feitas em triplicata, inclusive a medida do branco. As medidas foram feitas da mesma forma que no padrão aquoso e medicamento.

### 3.2. Determinação da adulteração no leite UHT

#### 3.2.1. Análise por Espectroscopia NIR

Para a discriminação das amostras adulteradas foram adicionados às amostras de leite UHT (seis marcas, quatro tipos: integral, integral fortificado, desnatado e semidesnatado e quinze lotes, totalizando quinze amostras) diferentes teores de água, formol (VETEC) e ureia (Sigma – Aldrich), variando o nível de adulteração. Todas as amostras foram preparadas em balão

volumétrico de 10,00 mL. Ao todo foram quinze amostras de leite que foram adulteradas em todos os níveis exibidos na Tabela 6.

Tabela 6: Adulterantes utilizados

<b>ADULTERANTE ADICIONADO</b>	<b>NÍVEIS DE ADULTERAÇÃO</b>
Água	0, 5, 10, 20, 30, 40% v/v
Formol	0, 1, 2, 3, 4, 5 g.L <sup>-1</sup>
Ureia	0, 1, 2, 3, 4, 5 g.L <sup>-1</sup>

Fonte: O autor, 2016.

As amostras sem e com adulteração foram analisadas por meio do instrumento Spectrum Frontier FT-IR/NIR Spectrometer 400, Perkin-Elmer, USA. As medidas de reflectância foram realizadas na faixa de 1100 – 2500 nm (com resolução nominal de 1 nm). Para cada replicata foram feitas três aquisições de espectros. O porta – amostra é de PEAD (polietileno de alta densidade) e o caminho ótico era de 0,5 mm. Foram feitas medidas para cada adulterante utilizado nos níveis de adulteração descritos na Tabela 6.

Após as análises das amostras, os arquivos dos espectros gerados foram importados no formato ASCII para o software Matlab 7.7.0. (R2008b). Os espectros foram alisados por meio do método *Savgol* e se trabalhou com o espectro médio de cada amostra. Por meio do PLS Toolbox, versão 8.0.2, Eigenvectors Research, USA foram realizadas as técnicas quimiométricas de análise exploratória (PCA) e classificação das amostras (SIMCA, SVM – DA e PLS – DA).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

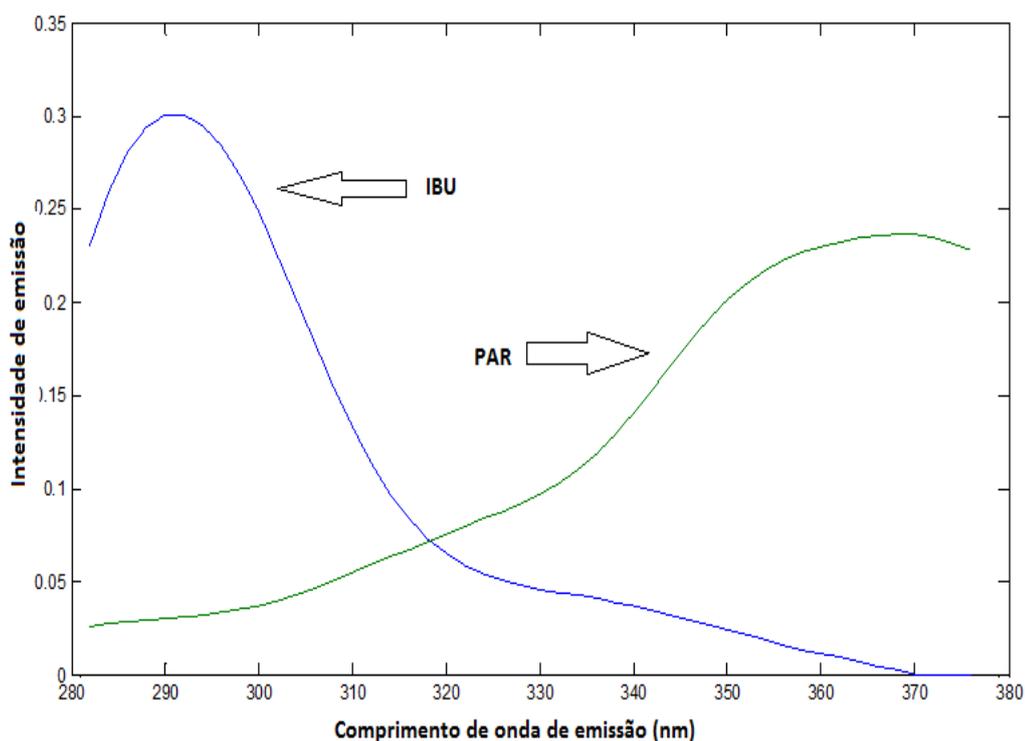
### 4.1. Determinação de Ibuprofeno e Paracetamol

#### 4.1.1. Testes preliminares para determinação de PAR e IBU em padrões aquosos por espectrofluorescência

Os espectros e as técnicas de calibração multivariada foram feitas a partir do PLS Toolbox 8.0.2, no software *Matlab 7.7.0* (R2008b).

Com base nos espectros obtidos (Figura 40) é possível se visualizar um pico de emissão máxima em 288 nm (excitação fixada em 230 nm) e outro em 366 nm (excitação fixada em 246 nm) que correspondem ao IBU e PAR, respectivamente.

Figura 40: Espectro de emissão de fluorescência do IBU e do PAR



Legenda:  $\lambda_{\text{EXCITAÇÃO}} = 230 \text{ nm}$  (IBU);  $\lambda_{\text{EMIÇÃO}} = 246 \text{ nm}$  (PAR)

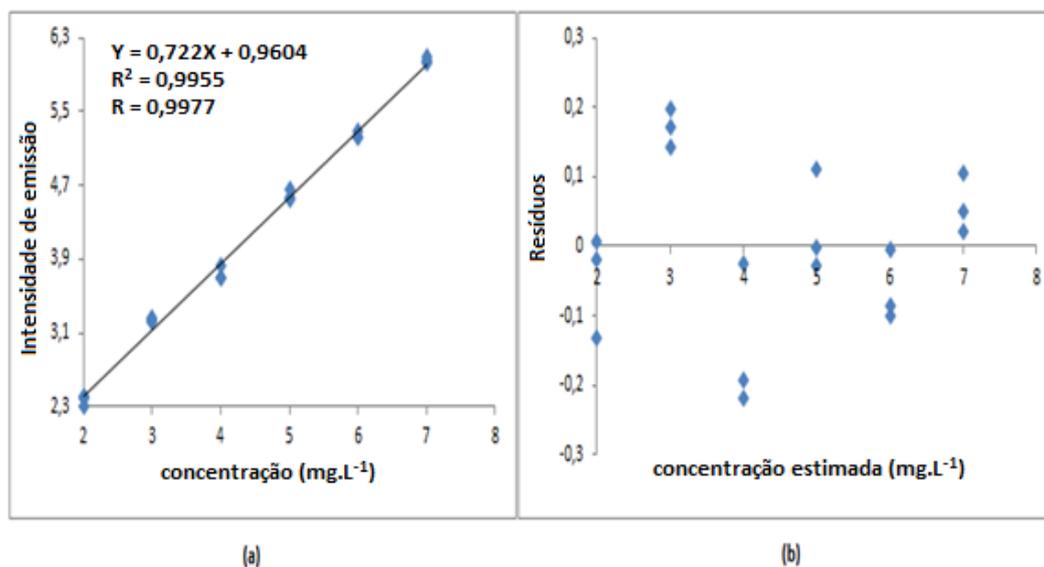
Fonte: O autor, 2016.

#### 4.1.2. Quantificação de IBU e PAR em padrão aquoso

##### 4.1.2.1. Por espectrofluorescência

Tanto para o IBU quanto para o PAR à medida que a concentração dos analitos aumentou teve-se um aumento da intensidade de emissão. Com base nesses resultados obtidos, foi usada a calibração de ordem zero (univariada), para construir a curva analítica (relacionando a intensidade máxima de emissão com a concentração do padrão de IBU) e a partir do modelo construído foi possível calcular os resíduos e construir o respectivo gráfico (Figura 41).

Figura 41: Modelo para padrão aquoso de IBU por espectrofluorescência

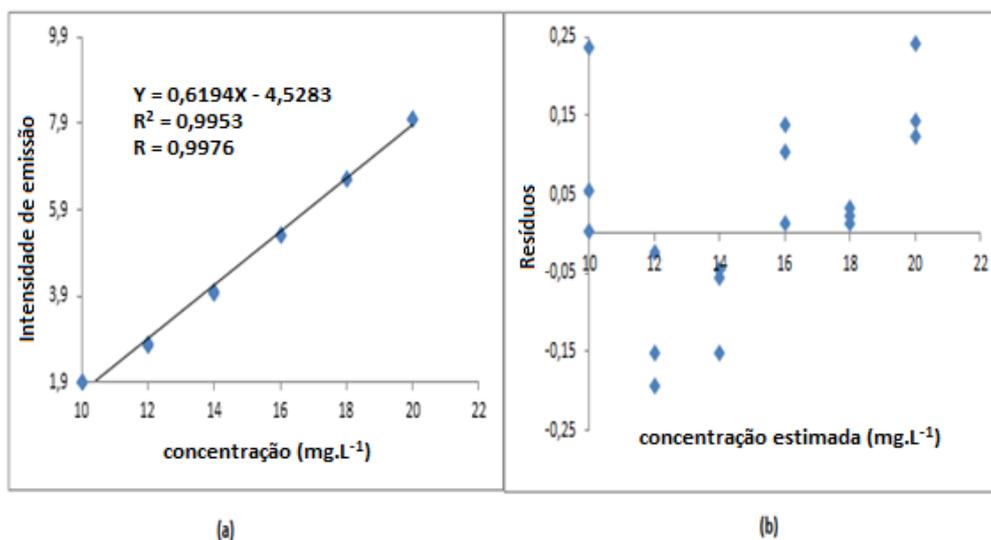


Legenda: (a) Curva analítica para o IBU (b) Gráfico de resíduos para o IBU

Fonte: O autor, 2016.

Da mesma forma que para o IBU, foi construída uma curva analítica e um gráfico de resíduos para o PAR (Figura 42).

Figura 42: Modelo para padrão aquoso de PAR por espectrofluorescência



Legenda: (a) Curva analítica para o PAR (b) Gráfico de resíduos para o PAR

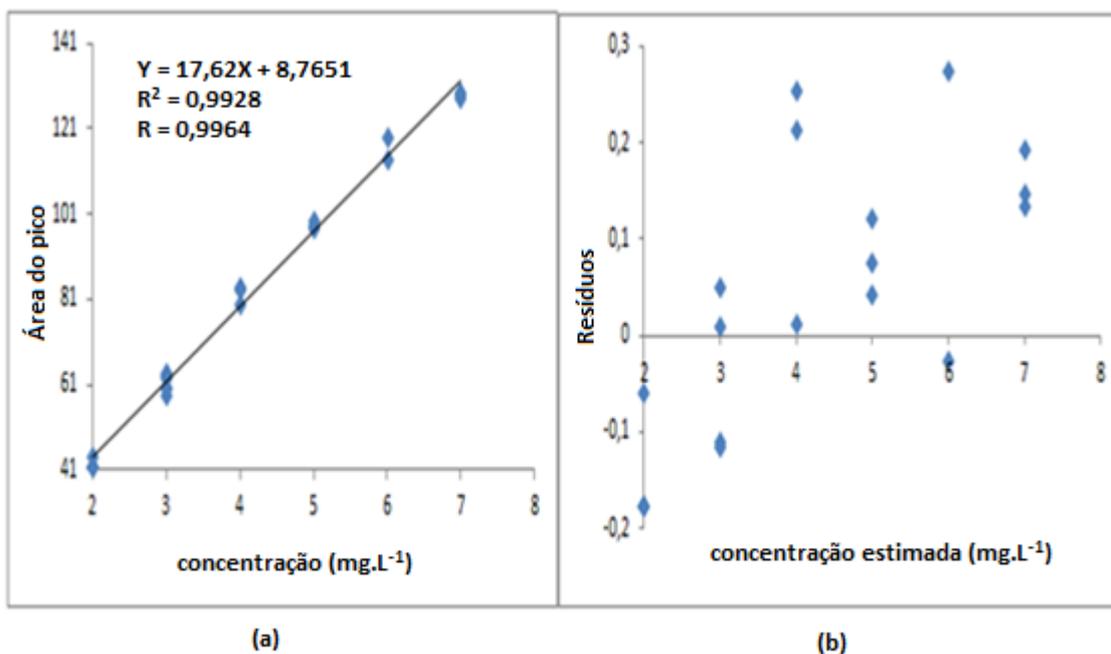
Fonte: O autor, 2016.

De acordo com as curvas analíticas, pôde-se concluir que o modelo é linear na faixa de trabalho escolhida (2 a 7 mg. L<sup>-1</sup> para o IBU e 10 a 20 mg. L<sup>-1</sup> para o PAR). Os gráficos de resíduos de ambos os analitos também não mostraram quaisquer tipos de tendência, mostrando que o modelo adotado está adequado.

#### 4.1.2.2. Por HPLC

Com base nos resultados obtidos, foi possível construir uma curva analítica, relacionando a área do pico e a concentração do padrão usado. Com base no modelo construído, foi possível também construir o gráfico de resíduos (Figura 43).

Figura 43: Modelo para padrão aquoso de IBU por HPLC.

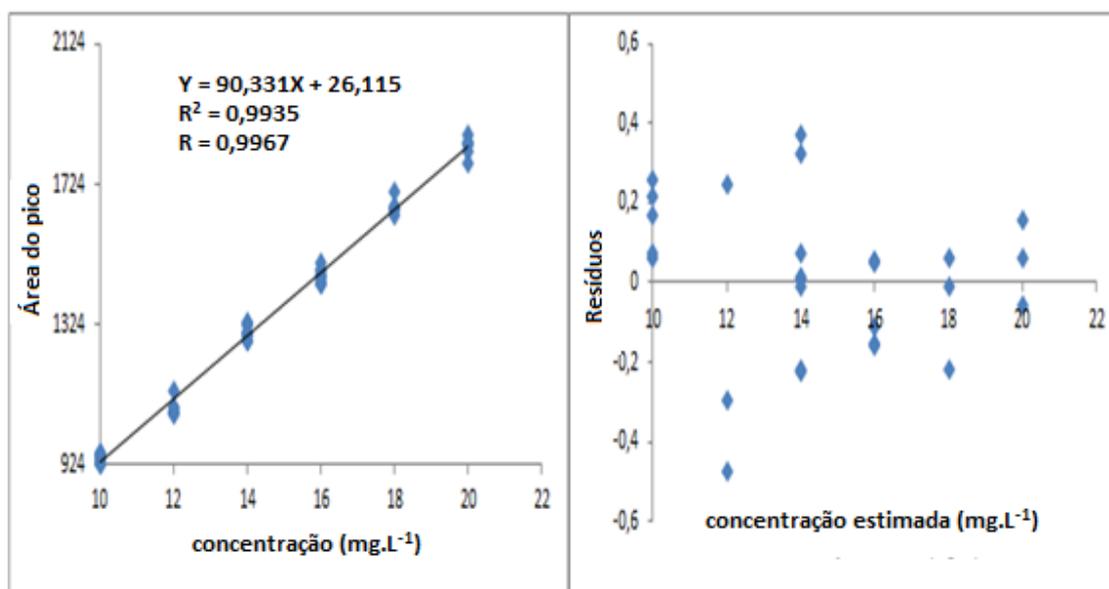


Legenda: (a) Curva analítica para o IBU (b) Gráfico de resíduos para o IBU

Fonte: O autor, 2016.

Da mesma forma que para o IBU, foi construída uma curva analítica para o PAR e o gráfico de resíduos (Figura 44).

Figura 44: Modelo para padrão aquoso de PAR por HPLC.



Legenda: (a) Curva analítica para o PAR (b) Gráfico de resíduos para o PAR

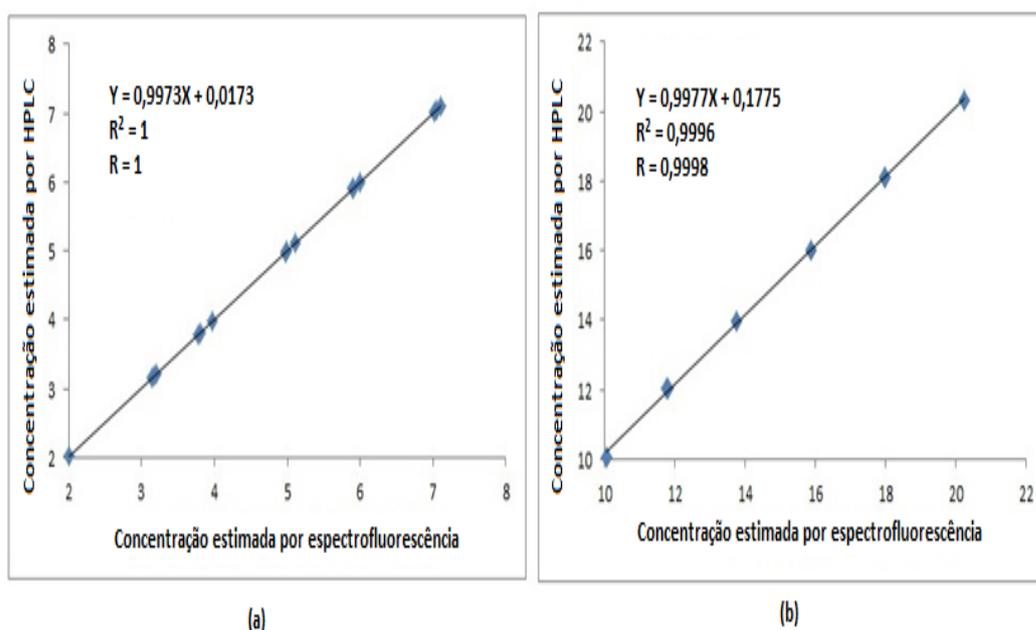
Fonte: O autor, 2016.

A faixa de concentração usada foi a mesma que por espectrofluorescência (2 a 7 mg.L<sup>-1</sup> para o IBU e 10 a 20 mg.L<sup>-1</sup> para o PAR), também se mostrando linear nessa faixa. Os gráficos de resíduos de ambos os analitos também não mostraram quaisquer tipos de tendência, mostrando que o modelo adotado está adequado.

#### 4.1.2.3. Comparação entre determinação de PAR e IBU em padrões aquosos por espectrofluorescência e por HPLC

Levando em consideração que ao se comparar graficamente os resultados das duas técnicas, há erro tanto no eixo x quanto no y, dessa forma é necessário usar o método da distância ortogonal para verificar a relação entre os resultados e avaliar se a concentração estimada pela metodologia alternativa (espectrofluorescência) e pela de referência (HPLC) são concordantes. Na Figura 45a se tem a relação entre as concentrações estimadas pelas duas técnicas para o IBU, enquanto que na Figura 45b se tem a relação para o PAR.

Figura 45: Relação entre concentração estimada por HPLC e por espectrofluorescência.



Legenda: (a) IBU (b) PAR.

Fonte: O autor, 2016.

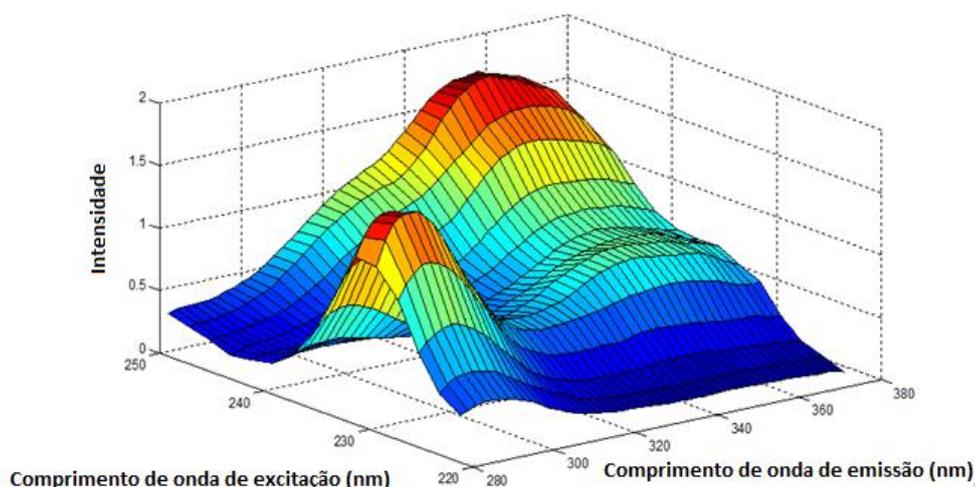
Para as análises realizadas para padrões aquosos é possível observar que os dados gerados por espectrofluorescência são satisfatórios ao serem comparados com os resultados gerados por HPLC, que é a técnica de referência, mostrando que o método proposto, inicialmente, fornece resultados concordantes.

#### 4.1.3. Determinação de PAR e IBU em medicamentos

##### 4.1.3.1. Por espectrofluorescência

A seguir é possível observar uma EEM (matriz de excitação-emissão) de uma mistura de medicamentos contendo PAR e IBU (Figura 46).

Figura 46: Reconstrução da matriz de emissão – excitação de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de PAR e  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de IBU em amostra de medicamento.

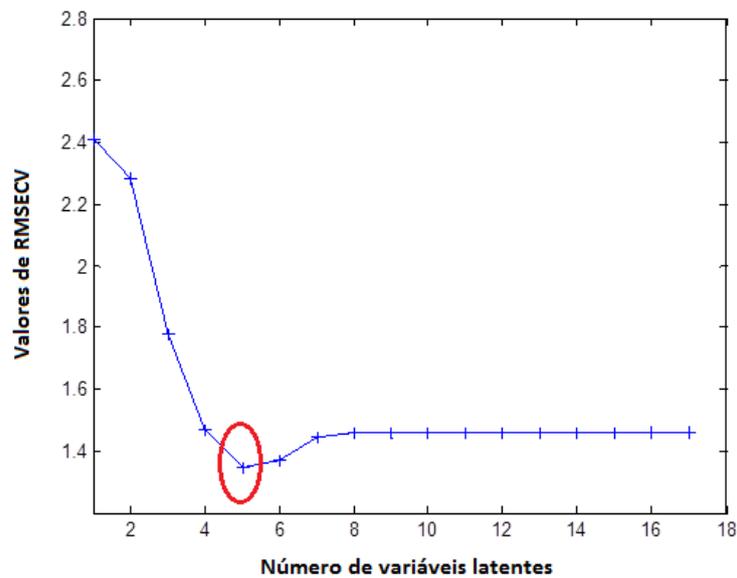


Fonte: O autor, 2016.

Para que fosse possível fazer a determinação simultânea de IBU e PAR após a obtenção dos dados, se recorreu ao PLS para fazer a separação dos mesmos e para posteriormente fazer a quantificação dos analitos nas amostras de diferentes medicamentos. Como os comprimentos de onda de excitação do PAR e IBU são diferentes é possível fixar o comprimento de onda do IBU, tendo-se então dados de primeira ordem e com esses dados executar o PLS e fazer o mesmo procedimento para o PAR. Assim sendo, foram escolhidos os

comprimentos de onda de excitação de 230 (IBU) e 246 (PAR) nm. Com base nos valores de RMSECV (Figura 47), se escolheu trabalhar com cinco variáveis latentes (VLs).

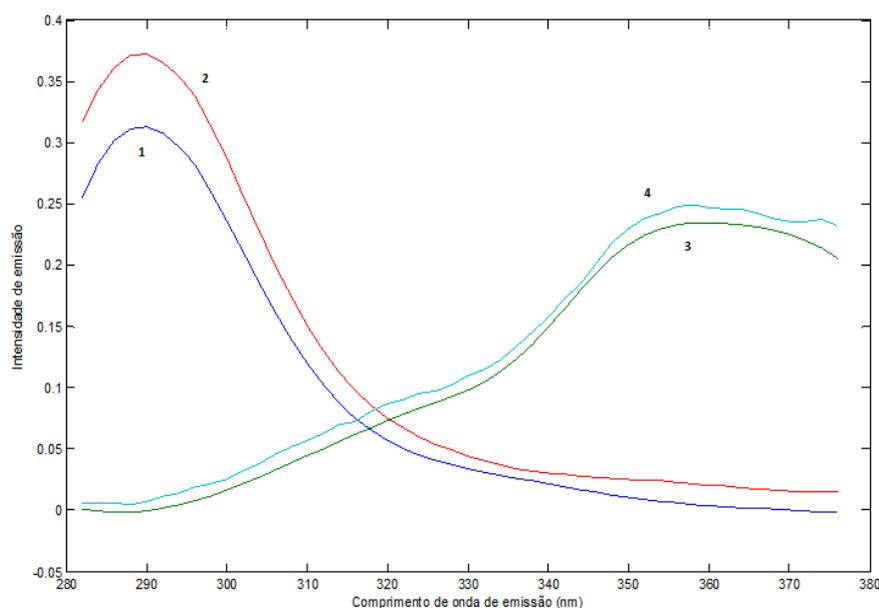
Figura 47: Gráfico de valores de RMSECV



Fonte: O autor, 2016.

Na Figura 48 é possível observar os pesos de emissão do IBU e PAR bem como as sobreposições para comprovação de que os pesos gerados pelo PLS pertenciam aos analitos em questão.

Figura 48: Sobreposição dos espectros de emissão IBU e PAR



Legenda: (1 – espectro de Emissão IBU; 2 – sobreposição espectro IBU; 3 – espectro de emissão PAR; 4 – sobreposição espectro PAR) com comprimento de onda de excitação fixado em 230 nm para o IBU e 246 nm para o PAR.

Fonte: O autor, 2016.

O IBU possui um pico de excitação máxima em 230 nm e um pico de emissão máxima em 288 nm, enquanto que o PAR possui um pico de excitação máxima em 246 nm e um pico de emissão máxima em 366 nm. A partir do PLS foi possível se obter as equações das curvas analíticas, sendo possível posteriormente a quantificação dos analitos nas amostras, levando-se em consideração o fator de diluição utilizado para o preparo das soluções de medicamentos.

Os teores esperados de IBU e PAR, assim como os teores médios encontrados com seus respectivos desvios – padrão, e DPR (%) podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7: Teor médio calculado nos medicamentos por espectrofluorescência molecular.

MED.	Teor calc. (Teor esp.) (mg)	DPR (%)
<i>Ibupril®</i>	600 ± 8 (600)	1,3
<i>Advil®</i>	201 ± 3 (200)	1,5
<i>Tylenol®</i>	751 ± 15 (750)	2,0
<i>Sonridor®</i>	503 ± 7 (500)	1,4

Legenda: Teor calc. = teor calculado; teor esp = teor esperado; DPR = desvio padrão relativo.

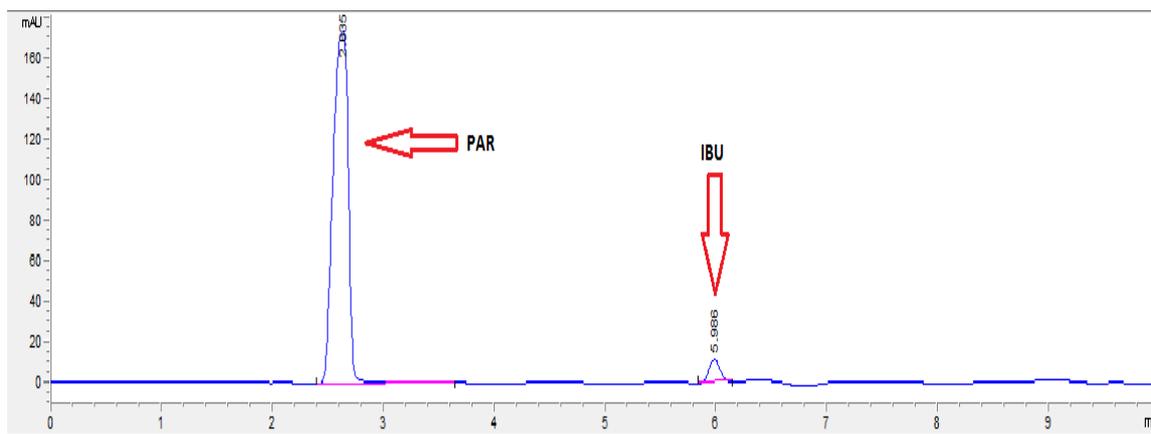
Fonte: O autor, 2016.

Dessa forma com base nos resultados, e obtendo-se de um modo geral um DPR inferior ou igual à 3%, o que pode ser considerado satisfatório. De acordo com com o preconizado pela curva de Horwitz, para todos os medicamentos, o DPR calculado está dentro do aceitável, para o nível de concentração estudado.

#### 4.1.3.2. Por HPLC

Na Figura 49 é possível observar um cromatograma teste de uma mistura sintética contendo PAR e IBU.

Figura 49: Cromatograma de uma mistura sintética de medicamento contendo PAR e IBU.



Fonte: O autor, 2016.

Da mesma forma que na determinação por espectrofluorescência molecular, a partir dos dados gerados por HPLC (área do pico em função da concentração), foi calculado o teor dos medicamentos, levando-se em conta o fator de diluição das soluções.

Os teores médios com seus respectivos desvios – padrão, assim como os teores esperados, para o IBU e PAR podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8: Teor médio calculado nos medicamentos por HPLC.

<b>MED.</b>	<b>Teor calc. (Teor esp.) (mg)</b>	<b>DPR (%)</b>
<i>Ibupril®</i>	601 ± 9 (600)	1,5
<i>Advil®</i>	199 ± 4 (200)	2,2
<i>Tylenol®</i>	750 ± 18 (750)	2,4
<i>Sonridor®</i>	500 ± 8 (500)	1,7

Legenda: Teor calc. = teor calculado; teor esp = teor esperado; DPR = desvio padrão relativo.

Fonte: O autor, 2016.

Dessa forma com base nos resultados, e obtendo-se de um modo geral erro relativo inferior a 3%, o que pode ser considerado satisfatório com o valor de DPR esperado de acordo com a curva de Horwitz. Os teores, de IBU e PAR, determinados nos medicamentos são concordantes com os teores esperados.

#### 4.1.4. Parâmetros de Mérito para PAR e IBU em medicamentos por espectrofluorescência

##### 4.1.4.1. Linearidade para determinação de PAR e IBU em medicamentos por espectrofluorescência

A linearidade do método pode ser comprovada por meio das curvas analíticas obtidas anteriormente que forneceram um  $R^2 > 0,90$  de acordo com o INMETRO. Com bases nos dados obtidos da curva analítica foi possível se calcular os limites de detecção (LD): 0,48 mg.L<sup>-1</sup> para IBU e 1,40 mg.L<sup>-1</sup> para PAR e quantificação (LQ): 1,54 mg.L<sup>-1</sup> para IBU e 4,20 mg.L<sup>-1</sup> para PAR.

#### 4.1.4.2. Precisão para determinação de PAR e IBU em medicamentos por espectrofluorescência

Os estudos de precisão foram realizados se trabalhando com três níveis diferentes de concentração tanto para o IBU quanto para o PAR. Na Tabela 9 é possível observar os resultados obtidos bem como o desvio padrão (DP) e o DPR (desvio padrão relativo). O valor médio foi obtido através de 10 medidas.

Tabela 9: Dados de precisão para espectrofluorescência para IBU e para PAR em medicamentos.

Analito	[analito]	$\bar{X} \pm DP$		DPR (%)	
		A	B	A	B
IBU	3	3,10 ± 0,03	3,00 ± 0,03	1,0	1,0
	4	3,90 ± 0,03	4,00 ± 0,01	0,8	0,2
	5	5,10 ± 0,01	5,10 ± 0,04	0,2	0,8
PAR	12	12,10 ± 0,09	12,10 ± 0,02	0,7	0,2
	14	13,80 ± 0,06	14,10 ± 0,04	0,4	0,3
	16	16,10 ± 0,04	16,00 ± 0,01	0,2	0,1

Legenda: A (IBU) = *Ibuprik*®; B = *Advi*®; A (PAR) = *Tylenol*®; B = *Sonridor*®; DP = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo.

Fonte: O autor, 2016.

Com base nos dados da Tabela 9 é possível ver que a metodologia empregada é precisa, visto que forneceu resultados bastante satisfatórios com valores de DPR inferiores ou igual a 1%. Para o IBU, o DPR considerado aceitável de acordo com a equação de Horwitz, no nível de concentração trabalhado, variava na faixa de - 1,7% até + 1,7%, aproximadamente, enquanto que para o PAR, o DPR considerado aceitável variava na faixa de - 1,4% até + 1,4%, aproximadamente. Em ambos os casos, os valores de DPR obtidos para cada nível de concentração, nos diferentes medicamentos ficou dentro dessa faixa de DPR aceitável, mostrando que a metodologia proposta pode ser considerada como precisa.

#### 4.1.4.3. Exatidão para determinação de PAR e IBU em medicamentos por espectrofluorescência

Para os estudos de exatidão foram preparadas soluções com a mesma concentração do medicamento (em triplicata) onde se variou apenas o teor de padrão de IBU e PAR adicionados à mesma, sendo posteriormente calculado o teor de IBU e PAR recuperado (Tabela 10 e 11).

Tabela 10: Dados do estudo de recuperação para o IBU em medicamentos por espectrofluorescência

CA	$\bar{X}$		RM (%)	
	A	B	A	B
2,00	2,00	2,00	99,5	99,5
3,00	3,04	2,99	101,2	99,6
4,00	4,05	4,05	101,2	101,2
5,00	4,91	4,98	98,2	99,5
6,00	6,05	6,07	100,8	101,2

Legenda: A = *Ibupri*®; B = *Advi*®; RM = recuperação média; CA = concentração adicionada.

Fonte: O autor, 2016.

Tabela 11: Dados do estudo de recuperação para o PAR em medicamentos por espectrofluorescência.

CA	$\bar{X}$		RM (%)	
	A	B	A	B
10,00	10,14	10,05	101,4	100,5
12,00	11,97	12,02	99,9	100,2
14,00	13,96	14,03	99,7	100,2
16,00	15,94	15,97	99,6	99,8
18,00	17,88	17,95	99,3	99,7

Legenda: A = *Tylenol*®; B = *Sonridor*®; RM = recuperação média; CA = concentração adicionada.

Fonte: O autor, 2016.

Todas as amostras de medicamento enriquecidas tanto com o padrão de IBU quanto com o padrão de PAR forneceram resultados satisfatórios de recuperação da quantidade adicionada de padrão, tendo uma porcentagem de 99,3 – 101,4% para PAR e 98,2 – 101,3% para IBU.

#### 4.1.5. Parâmetros de mérito para determinação de PAR e IBU em medicamentos por HPLC

##### 4.1.5.1. Linearidade para determinação de PAR e IBU em medicamentos por HPLC

O limite de detecção para a determinação por HPLC foi 0,61 mg.L<sup>-1</sup> para o IBU e 1,50 mg.L<sup>-1</sup> para o PAR. O limite de quantificação foi de 1,84 mg.L<sup>-1</sup> para o IBU e 4,50 mg.L<sup>-1</sup> de PAR.

#### 4.1.5.2. Precisão para determinação de PAR e IBU em medicamentos por HPLC

Os estudos de precisão foram realizados se trabalhando com três níveis diferentes de concentração tanto para o IBU quanto para o PAR. Na Tabela 12 é possível observar os resultados obtidos bem como o desvio padrão (DP) e o DPR (desvio padrão relativo). O valor médio foi obtido através de 10 medidas.

Tabela 12: Dados de precisão para HPLC para o IBU e para o PAR em medicamentos.

Analito	[analito]	$\bar{X} \pm DP$		DPR (%)	
		A	B	A	B
IBU	3	3,00 ± 0,02	3,00 ± 0,04	0,7	1,3
	4	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,03	0,2	0,8
	5	5,00 ± 0,03	5,00 ± 0,04	0,6	0,8
PAR	12	12,00 ± 0,03	12,00 ± 0,02	0,2	0,2
	14	14,00 ± 0,04	14,00 ± 0,06	0,3	0,4
	16	16,00 ± 0,04	16,00 ± 0,02	0,2	0,1

Legenda: A (IBU) = *Ibupril*®; B = *Advil*®; A (PAR) = *Tylenol*®; B = *Sonridor*®; DPR = desvio padrão relativo; DP = desvio padrão.

Fonte: O autor, 2016.

Com base nos dados da Tabela 16 é possível se concluir a precisão das medidas, visto que o DPR para todas as medidas foi menor que 1%, o que é considerado satisfatório de acordo com o esperado pela curva de Horwitz.

#### 4.1.5.3. Exatidão para determinação de PAR e IBU em medicamentos por HPLC

Para os estudos de exatidão foram preparadas soluções com a mesma concentração do medicamento (em triplicata) onde se variou apenas o teor de padrão de IBU e PAR adicionados à mesma, sendo posteriormente calculado o teor de IBU e PAR recuperado (Tabela 13 e 14).

Tabela 13: Dados do estudo de recuperação para o IBU em medicamentos por HPLC

CA	$\bar{x}$		RM (%)	
	A	B	A	B
2,00	1,97	2,00	98,5	99,8
3,00	3,02	3,01	100,8	100,2
4,00	4,08	4,03	101,9	100,8
5,00	4,98	4,99	99,5	99,7
6,00	5,98	5,98	99,7	99,7

Legenda: A = *Ibupri*®; B = *Advil*®; RM = recuperação média; CA = concentração adicionada  
 Fonte: O autor, 2016.

Tabela 14: Dados do estudo de recuperação para o PAR em medicamentos por HPLC

CA	$\bar{x}$		RM (%)	
	A	B	A	B
10,00	9,99	9,99	99,9	99,9
12,00	12,01	12,01	100,1	100,1
14,00	14,02	13,99	100,1	99,9
16,00	15,99	16,00	99,9	100,0
18,00	18,01	18,01	100,1	100,1

Legenda: A = *Tylenol*®; B = *Sonridor*®; RM = recuperação média; CA = concentração adicionada.

Fonte: O autor, 2016.

A faixa de recuperação média para o IBU foi de 98,5 – 101,9% e para o PAR foi 99,9 – 100,1%, o que pode ser considerado satisfatório de acordo com o preconizado pela ANVIISA.

#### 4.1.6. Comparação da determinação de PAR e IBU em medicamentos por espectrofluorescência e por HPLC

A partir dos dados da Tabela 15 é possível observar que os resultados encontrados para a metodologia proposta são satisfatórios ao serem comparados com os resultados obtidos pela técnica de referência.

Tabela 15: Comparação entre as metodologias na determinação do teor calculado nos medicamentos.

<b>MED.</b>	<b>TEOR (1)</b>	<b>TEOR (2)</b>	<b>TEOR ESP.</b>
<i>Ibupril®</i>	600 ± 8	601 ± 9	600
<i>Advil®</i>	201 ± 3	199 ± 4	200
<i>Tylenol®</i>	751 ± 15	750 ± 18	750
<i>Sonridor®</i>	503 ± 7	500 ± 8	500

Legenda: Teor (1) = teor calculado (mg) por espectrofluorescência; teor esp. = teor esperado (mg); Teor (2) = teor calculado (mg) por HPLC.

Fonte: O autor, 2016.

Para verificar se a metodologia proposta forneceu resultados que poderiam ser considerados concordantes com os da metodologia de referência, foi realizado o teste F para as variâncias. Considerou – se um teste bilateral, no caso a hipótese nula seria de as variâncias serem iguais, enquanto que a hipótese alternativa seria de as variâncias serem diferentes. Para cada medicamento foi calculado o valor de F e o mesmo foi comparado com o valor de  $F_{\text{Tabelado}}$  para verificar se a hipótese nula poderia ser considerada verdadeira ou não. Na Tabela 16 se tem os valores de  $F_{\text{Calculado}}$  e  $F_{\text{Tabelado}}$  para a comparação.

Tabela 16: Valores calculados para teste F para as variâncias.

<b>MED.</b>	<b>F<sub>calc</sub></b>	<b>F<sub>tab</sub></b>	<b>Decisão</b>
<i>Ibuprofen®</i>	1,27	0,35 (F <sub>inf</sub> ) 2,86 (F <sub>sup</sub> )	<i>Não rejeitar a hipótese nula</i>
<i>Advil®</i>	1,78		
<i>Tylenol®</i>	1,44		
<i>Sonridor®</i>	1,31		

Legenda: F<sub>calc.</sub> = valor de F calculado; F<sub>tab</sub> = valor de F tabelado; F<sub>inf</sub> = valor de F inferior; F<sub>sup</sub> = valor de F superior; nível de confiança de 95%.

Fonte: O autor, 2016.

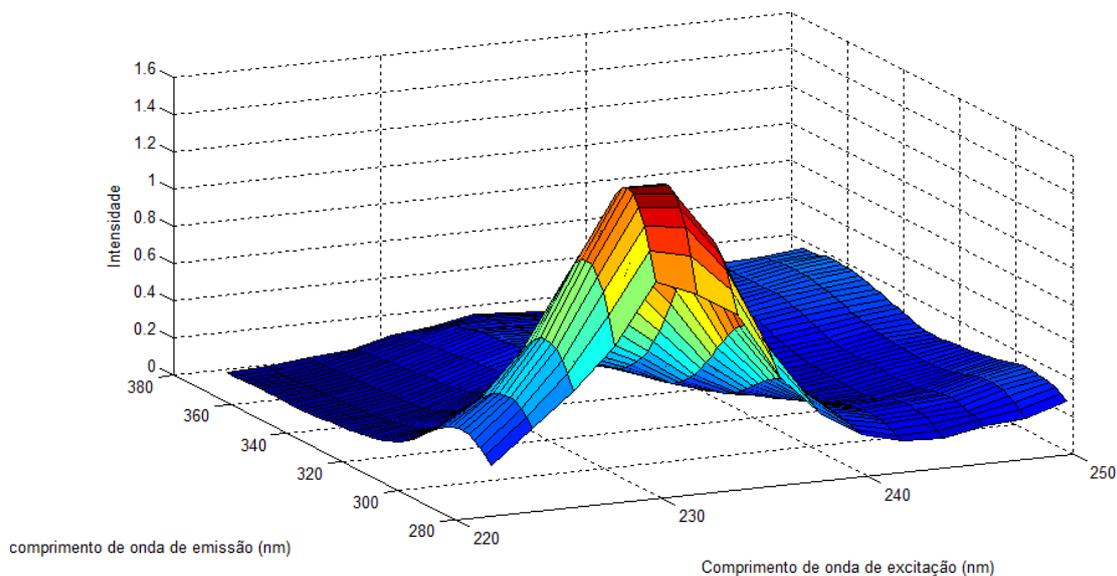
Como em todos os casos, o valor de F<sub>calculado</sub> estava dentro do intervalo dos valores de F (inferior – superior), a hipótese nula é tomada como verdadeira, ou seja, não há diferença entre as variâncias das duas metodologias comparadas, podendo – se considerar as variâncias iguais.

#### 4.1.7. Determinação de PAR e IBU em urina

##### 4.1.7.1. Por espectrofluorescência

Da mesma forma que para os medicamentos, para tratar os dados, foi usado o PLS Toolbox 8.0.2, no software Matlab 7.7.0 (R2008b). Pelo fato da urina ser uma matriz bastante complexa para se trabalhar foi necessário se recorrer ao uso de uma ferramenta quimiométrica que permitisse trabalhar com os dados obtidos. Visando diminuir o efeito de matriz da urina foi feita uma diluição da urina, tendo sido estudados três níveis diferentes (100, 500 e 1000 vezes) para verificar em qual nível os resultados seriam melhores no tocante à quantificação de PAR e IBU. A matriz de excitação e emissão (EEM – *excitation-emission matrix*) da urina diluída 1000 vezes (Figura 50), que foi o nível de diluição escolhido, visto que para essa diluição obteve-se um resultado melhor ao se realizar o incremento dos analitos.

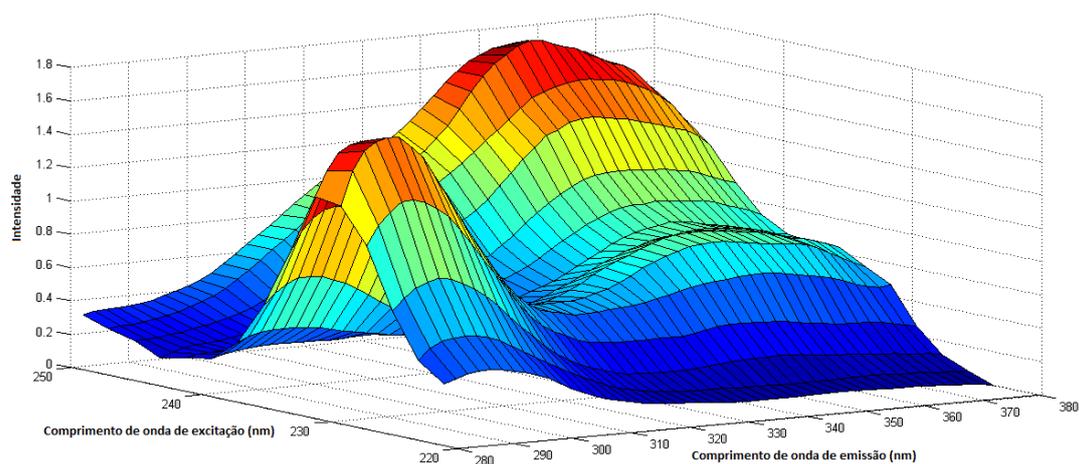
Figura 50: Reconstrução da EEM de urina diluída 1000x.



Fonte: O autor, 2016.

Na Figura 51 tem-se uma EEM de uma amostra de urina com a melhor diluição (1000 vezes) enriquecida com IBU e PAR.

Figura 51: Reconstrução da EEM de amostra de urina diluída 1000x enriquecida com  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  de IBU e  $12 \text{ mg.L}^{-1}$  de PAR



Fonte: O autor, 2016.

Foram recolhidas amostras de urina de quatro pessoas saudáveis (de ambos os sexos) e realizadas as medidas no espectrofluorímetro. Antes de se efetuar o PARAFAC, foi verificado se não havia a presença de espalhamentos

que deveriam ser removidos a fim de não interferir de forma negativa na construção do modelo.

Assim como foi feito para o medicamento, as EEM (incluindo EEM do branco: urina diluída sem adição de IBU e PAR) foram obtidas na faixa de comprimento de onda de excitação usada foi de 220 a 248 nm enquanto que a faixa de emissão trabalhada foi de 280 a 376 nm (ambos com intervalo de 2 nm). Dessa forma, foi gerada uma matriz para cada amostra com dimensões de 15 x 48. A partir de cada matriz foi criado um tensor para poder aplicar o PARAFAC e fazer a deconvolução dos espectros a fim de verificar se era possível separar o espectro do IBU e PAR mesmo em urina. Na Tabela 17 é possível observar os valores de Core Consistency para diferentes números de componentes no PARAFAC

Tabela 17: Número de componentes obtidos pelo PARAFAC

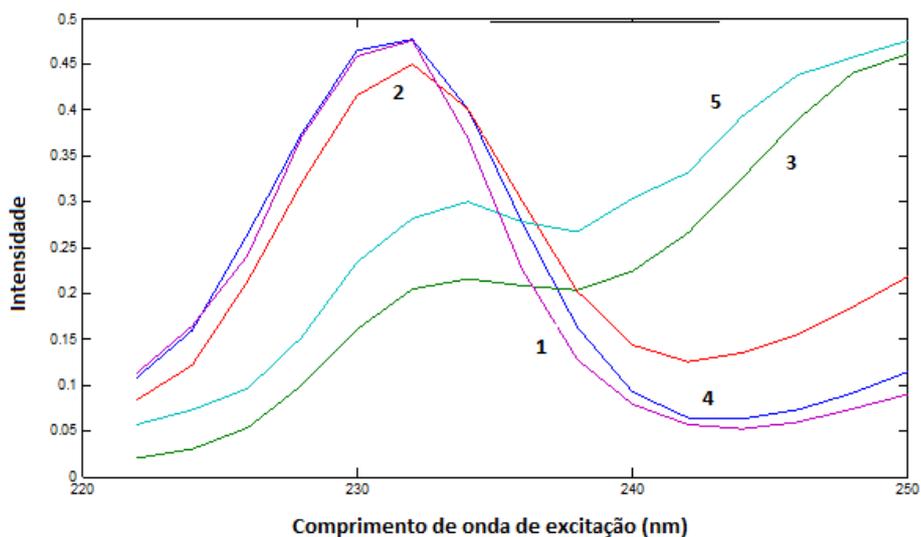
Nº de componentes	Variância explicada (%)	<i>Core Consistency</i>
1	99,46	100
2	99,66	99
<b>3</b>	<b>99,76</b>	<b>97</b>
4	99,83	< 0

Fonte: O autor, 2016.

Com base nos valores de Core Consistency foi escolhido se trabalhar com 3 (três) componentes, já que valores superiores a 50% de variância explicada fazem com o que modelo seja aceitável para ser trabalhado. Com quatro componentes foi se há um valor de *Core Consistency* inferior a 50% (nesse caso inferior à zero) o que faz com o modelo gerado nesse caso seja totalmente inapropriado devido a provável perda da trilinearidade.

Na Figura 52 é possível observar os pesos gerados pelo PARAFAC para excitação com as devidas sobreposições para identificação dos analitos.

Figura 52: Pesos de excitação.

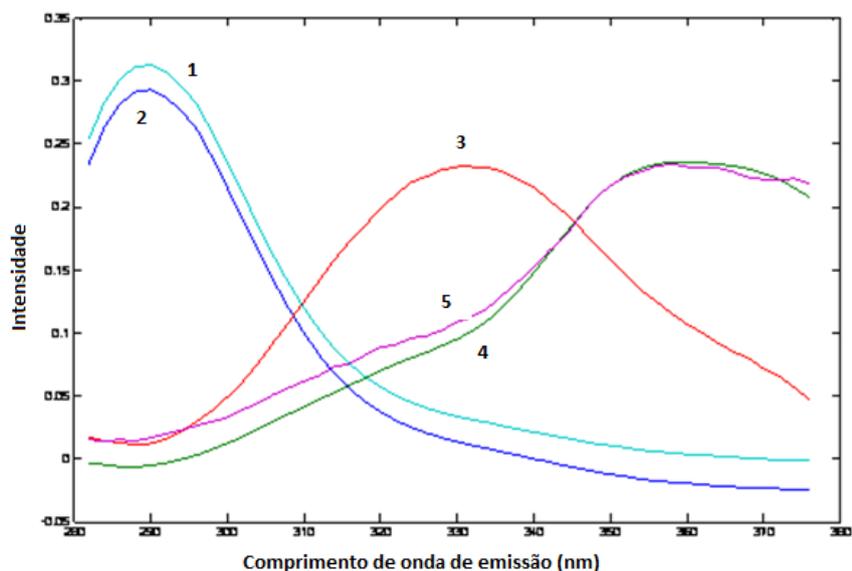


Legenda: (1,2,3 – espectros gerados pelo PARAFAC de IBU, PAR e componente desconhecido, respectivamente; 4 e 5 – espectros para sobreposição de padrões de IBU e PAR)

Fonte: O autor, 2016.

Na Figura 53 se tem os pesos gerados pelo PARAFAC para emissão com as devidas sobreposições para identificação dos analitos.

Figura 53: Pesos de emissão

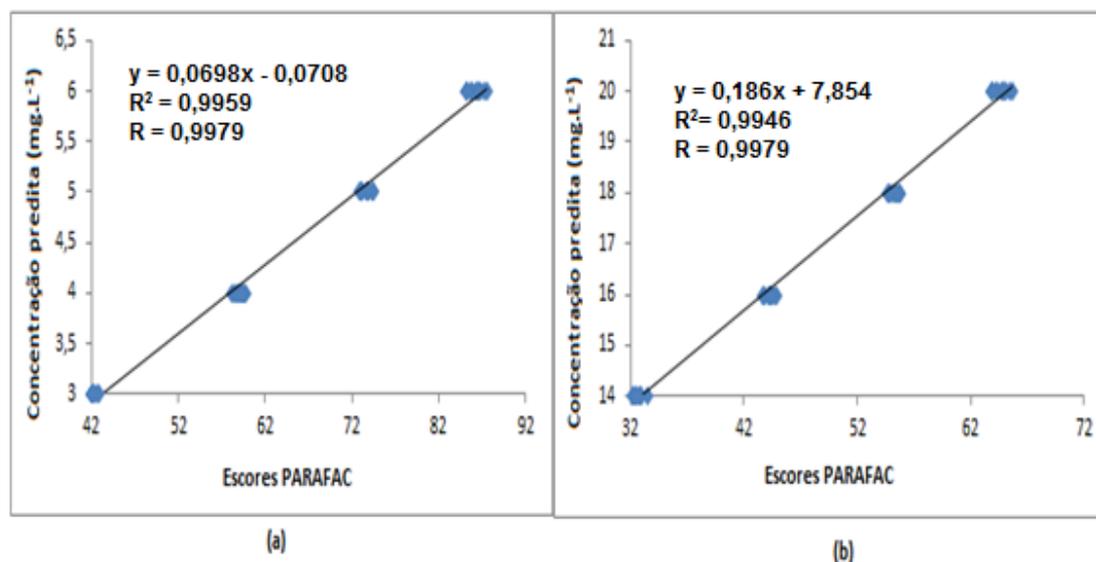


Legenda: (1,4,3 – espectros gerados pelo PARAFAC de IBU, PAR e componente desconhecido, respectivamente; 2 e 5 – espectros para sobreposição de padrões de IBU e PAR respectivamente)

Fonte: O autor, 2016.

A partir dos escores gerados pelo PARAFAC foi possível se relacionar os mesmos a concentração predita, com base nos enriquecimentos de IBU e PAR realizado (Figura 54). Pode – se observar que há uma relação entre as variáveis, tendo –se então uma regressão pseudo – univariada.

Figura 54: Relação entre a concentração predita x Escores PARAFAC.



Legenda: (a) IBU (b) PAR

Fonte: O autor, 2016.

A partir disso foi possível proceder-se um estudo da recuperação desses enriquecimentos (Tabelas 18 e 19).

Tabela 18: Dados do estudo de recuperação para o IBU em urina por espectrofluorescência.

CA	$\bar{x}$	RM (%)
3,00	3,02 ± 0,03	100,7
4,00	3,99 ± 0,04	99,8
5,00	5,06 ± 0,03	101,2
6,00	6,05 ± 0,03	100,9

Legenda: \*CA = concentração adicionada (mg.L<sup>-1</sup>);  $\bar{x}$  = concentração estimada média (mg.L<sup>-1</sup>); RM (%) = recuperação média

Fonte: O autor, 2016.

Tabela 19: Dados do estudo de recuperação para o PAR em urina por espectrofluorescência.

<b>CA</b>	$\bar{x}$	<b>RM (%)</b>
12,00	12,10 ± 0,08	100,8
14,00	14,09 ± 0,08	100,6
16,00	16,07 ± 0,07	100,4
18,00	18,04 ± 0,08	100,2

Legenda: \*CA = concentração adicionada (mg.L<sup>-1</sup>);  $\bar{x}$  = concentração estimada média (mg.L<sup>-1</sup>);  
RM (%) = recuperação média

Fonte: O autor, 2016.

Também foi possível se obter a partir dos dados parâmetros de mérito para metodologia desenvolvida, como pode ser observado na Tabela 20.

Tabela 20: Parâmetros de Mérito (PARAFAC) na determinação de IBU e PAR em urina.

<b>Parâmetros</b>	<b>IBU</b>	<b>PAR</b>
LD (mg.L <sup>-1</sup> )	0,54	0,83
LQ (mg.L <sup>-1</sup> )	1,65	2,48
SEN	0,04	0,12
SEL	0,16	0,12
REP (%)	12,90	14,30

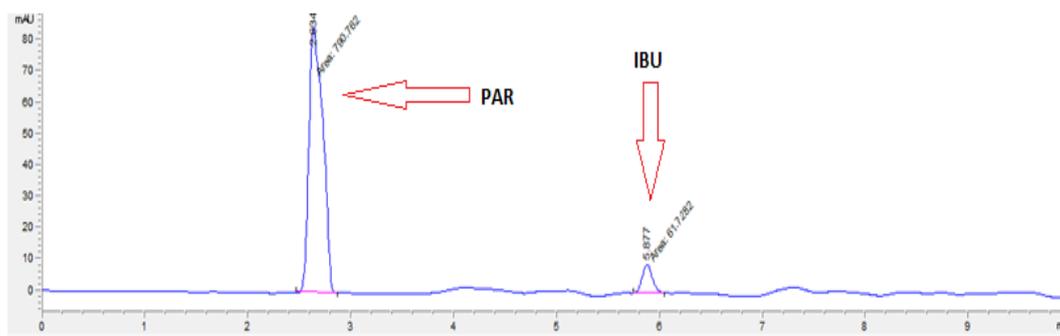
Fonte: O autor, 2016.

Pode-se observar na Tabela 20 que no caso do IBU a concentração encontrada para o LQ é ligeiramente inferior a menor concentração do IBU na curva analítica (2 mg.L<sup>-1</sup>). Já para o PAR a menor concentração estudada foi de 10 mg.L<sup>-1</sup> tendo sido encontrado um LQ de 2,48 mg.L<sup>-1</sup>, sendo nesse caso possível para o PAR diminuir a faixa de concentração trabalhada respeitando-se o valor de LQ. Já os valores de REP indicam o erro médio relativo de predição. Enquanto que SEN e SEL indicam a sensibilidade e seletividade para os analitos respectivamente na metodologia proposta.

#### 4.1.7.2. Por HPLC

Para realizar a determinação dos analitos em amostras de urina foi usada a mesma metodologia que se usou para determinação dos mesmos em padrão aquoso e medicamentos (composição e vazão da fase móvel, pH, temperatura, comprimento de onda). Na Figura 55 se tem o cromatograma de uma amostra de urina com a melhor diluição (1000 vezes) enriquecida com IBU e PAR.

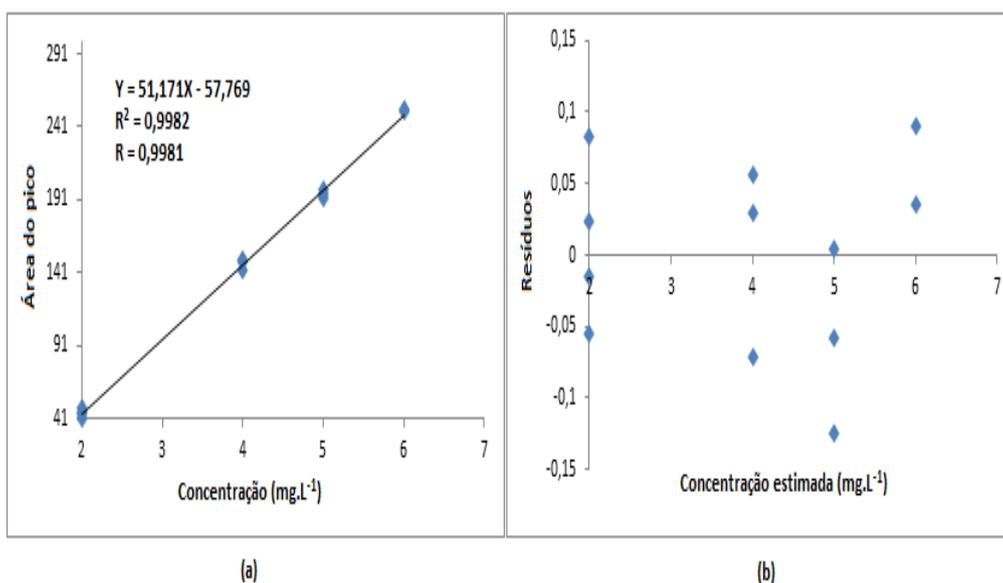
Figura 55: Cromatograma de amostra de urina diluída 1000x enriquecida com 2 mg.L<sup>-1</sup> de IBU e 10 mg.L<sup>-1</sup> de PAR



Fonte: O autor, 2016.

Assim como foi feito no medicamento, se tomou os valores das áreas dos picos gerados (IBU e PAR) e a partir dos mesmos foi calculado o quanto se recuperou dos enriquecimentos realizados à urina diluída. A área do pico foi relacionada com a concentração adicionada de IBU, para construir a curva analítica e a partir do modelo gerado foi construído o gráfico de resíduos (Figura 56).

Figura 56: Modelo de IBU em urina por HPLC.

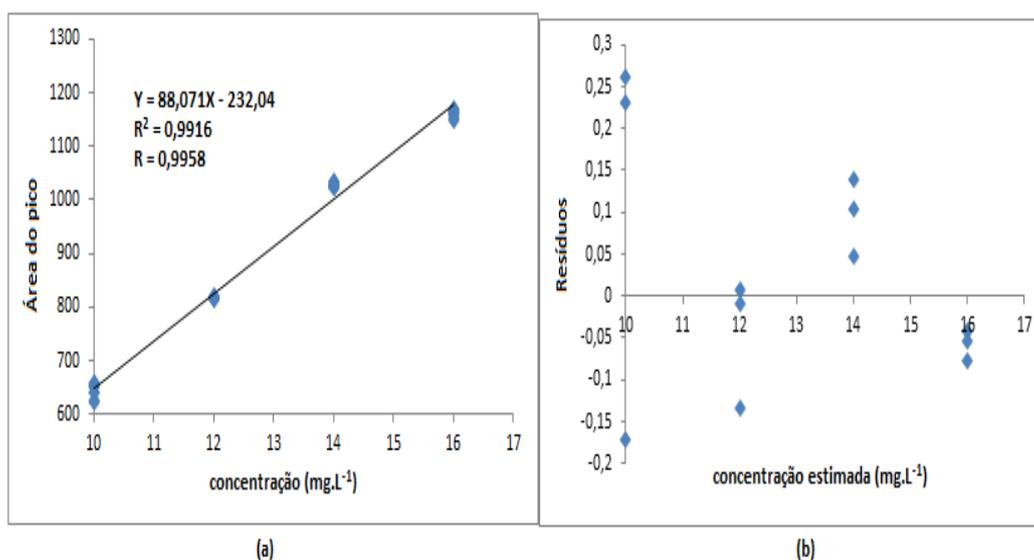


Legenda: (a) Curva analítica para o IBU (b) Gráfico de resíduos para o IBU

Fonte: O autor, 2016.

O mesmo foi feito para o PAR (Figura 57).

Figura 57: Modelo de PAR em urina por HPLC.



Legenda: (a) Curva analítica para o PAR (b) Gráfico de resíduos para o PAR

Fonte: O autor, 2016.

Os resultados do estudo da recuperação desses enriquecimentos são apresentados nas Tabelas 21 e 22.

Tabela 21: Dados do estudo de recuperação para o IBU em urina por HPLC.

CA	$\bar{x}$	RM (%)
2,00	2,02 ± 0,02	101,1
4,00	3,89 ± 0,02	97,3
5,00	4,94 ± 0,01	98,7
6,00	5,96 ± 0,02	99,3

Legenda: \*CA = concentração adicionada (mg.L<sup>-1</sup>);  $\bar{x}$  = concentração estimada média (mg.L<sup>-1</sup>);  
RM (%) = recuperação média

Fonte: O autor, 2016.

Tabela 22: Dados do estudo de recuperação para o PAR em urina por HPLC.

CA	$\bar{x}$	RM (%)
10,00	9,99 ± 0,16	100,0
12,00	11,98 ± 0,01	99,8
14,00	14,06 ± 0,10	100,4
16,00	15,97 ± 0,09	99,9

Legenda: \*CA = concentração adicionada (mg.L<sup>-1</sup>);  $\bar{x}$  = concentração estimada média (mg.L<sup>-1</sup>);  
RM (%) = recuperação média

Fonte: O autor, 2016.

Também foi feito um estudo de precisão das determinações por HPLC (Tabela 23).

Tabela 23: Estudo de precisão por HPLC para o IBU e PAR em urina

	C.E	$\bar{x} \pm DP$	DPR (%)
<i>IBU</i>	3,00	3,00 ± 0,02	0,7
	4,00	4,00 ± 0,03	0,8
	5,00	5,00 ± 0,04	0,8
<i>PAR</i>	12,00	12,00 ± 0,00	0,0
	14,00	14,10 ± 0,01	0,1
	16,00	15,90 ± 0,03	0,2

Fonte: O autor, 2016.

#### 4.1.7.3. Comparação entre as metodologias para determinação de PAR e IBU em urina

Assim como no medicamento, a metodologia proposta se mostrou bastante eficiente na quantificação dos analitos mesmo sendo a urina uma matriz tão complexa. A partir do uso de calibração multivariada de segunda ordem (PARAFAC) foi possível identificar os espectros de excitação e emissão de PAR e IBU nas amostras de urina (que possuem componentes que também exibem fluorescência). Assim como, foi possível realizar os estudos de recuperação a partir do método da adição de padrão, por meio dos escores gerados pelo PARAFAC, o que permitiu quantificar os enriquecimentos de PAR e IBU realizados as amostras de urina diluída. Dessa forma, a espectrofluorescência molecular acoplada a calibração multivariada de segunda ordem pode ser uma boa ferramenta como uma potencial substituta ao método clássico para este tipo de análise (HPLC).

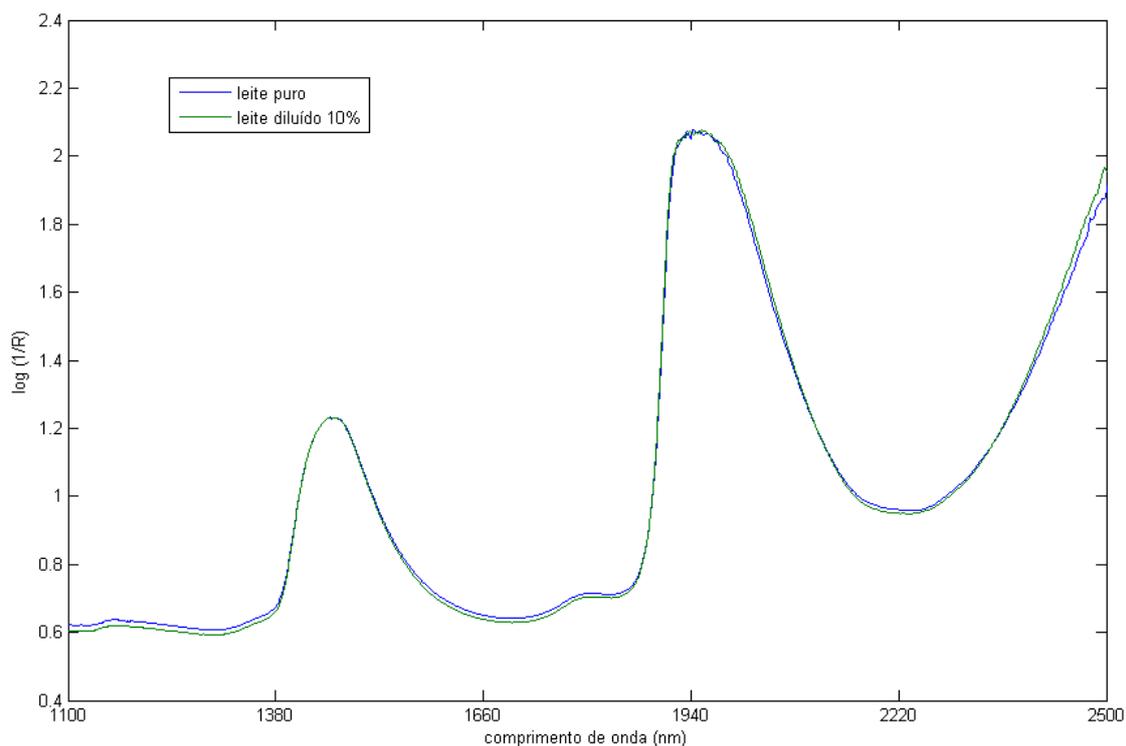
Para verificar se as metodologias possuíam a mesma variância foi realizado o teste F. Como o número de determinações foi o mesmo para ambas as técnicas, se tinha o mesmo número de graus de liberdade para ambas. O valor de  $F_{\text{calculado}} = 1,66$ . Como o valor de F calculado está na região de aceitação da hipótese nula (de que as variâncias não são diferentes), pode-se concluir que as metodologias possuíam a mesma variância para um nível de confiança de 95%.

## 4.2. Discriminação de Adulterantes no leite

### 4.2.1. Análise do Espectro

A seguir é possível observar um espectro de uma amostra de leite puro e adulterado 10% com água (Figura 58).

Figura 58: Espectro NIR de leite puro e leite adulterado com água.



Fonte: O autor, 2016.

Há dois picos de maior intensidade em torno de 1450 e 1940 nm. Na região de 1450 nm se tem combinação de bandas envolvendo estiramento simétrico e assimétrico da molécula de água. Já na região de 1940 nm, onde se tem o pico mais intenso, o mesmo é referente à combinação do estiramento assimétrico e torção da molécula de água. Vale ressaltar que na técnica utilizada, a presença de água na amostra gera picos intensos que podem se sobrepor à outras espécies presentes.

Algumas dessas bandas pouco ou não perceptíveis em função dos picos provenientes da presença de água são:

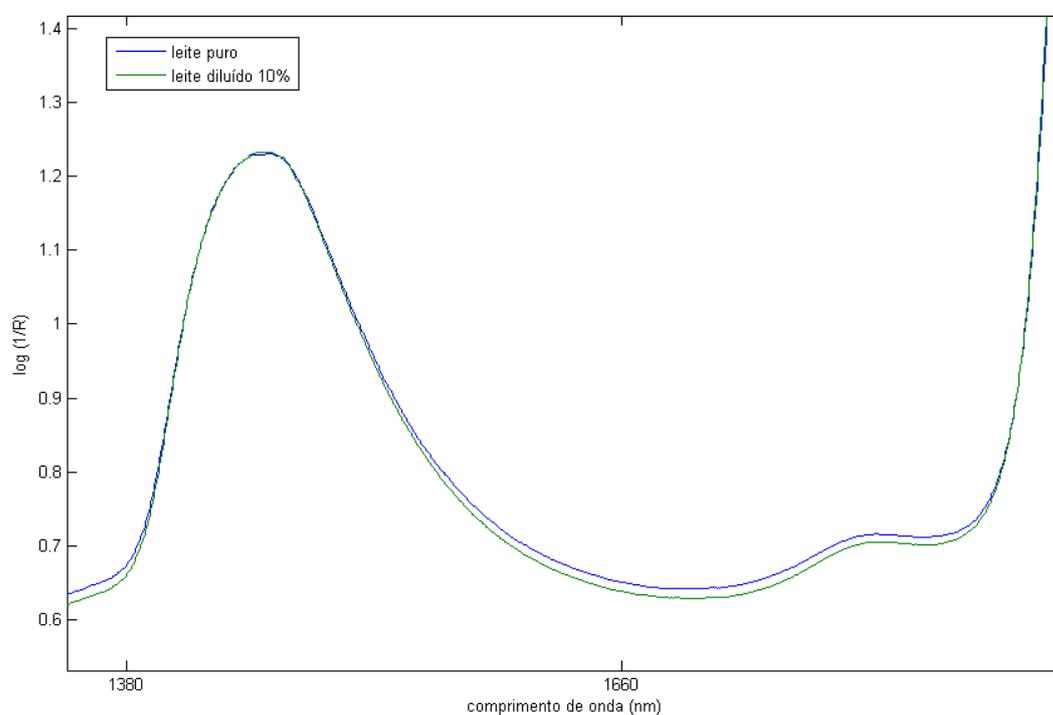
- a) Em 1200 nm: combinação do terceiro sobretom da ligação C – H.
- b) Em 1400 nm: sobretom do estiramento e deformação de ligação C – H.
- c) Em 1500 nm: segundo sobretom do estiramento da ligação N – H.
- d) Em 1720 nm: sobretom do estiramento assimétrico da ligação C – H.
- e) Em 2050 – 2060 nm: combinação de estiramentos da ligação N – H.
- f) Em 2130 nm se tem a combinação do estiramento das ligações C – O e O – H.

g) Em 2168 – 2180 nm: região associada com o segundo sobretom da ligação N – H; estiramento da ligação C = O; torção no plano da ligação N – H.

Nesse caso, as ligações pertinentes às proteínas no leite, por exemplo, não são passíveis de identificação no espectro da Figura 58, visto que estão sobrepostas pelo pico de água.

Na Figura 59, é possível observar uma porção do espectro da Figura 58, tendo sido feito um zoom na região entre 1380 – 1660 nm.

Figura 59: Porção (1380 – 1660 nm) aumentada do espectro NIR de leite puro e leite adulterado com água.



Fonte: O autor, 2016.

Mesmo na Figura 59, é possível ver que é pouco perceptível a diferença entre o espectro do leite puro e adulterado com água. Assim sendo, percebe-se uma necessidade de se recorrer às ferramentas quimiométricas para discriminar as amostras de leite, não apenas no tocante à adulteração, mas também quanto ao tipo de adulterante.

#### 4.2.2. Emprego do PCA

Antes de se partir para discriminação das amostras adulteradas, foi realizada uma análise exploratória (PCA) a fim de se verificar a presença de amostra (s) discrepante (s) que pudessem interferir de forma negativa no modelo a ser criado para etapa de discriminação. Para fazer o PCA foi usado o PLS Toolbox 8.0.2 no software *Matlab.7.7.0* (R2008b).

Foi construída uma matriz de dados com as quinze amostras de leite com adulteração e leite puro (Tabela 24).

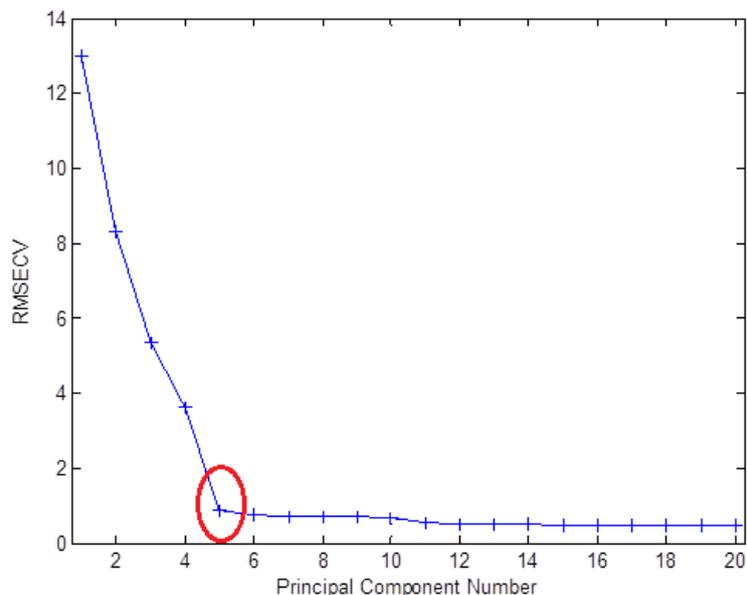
Tabela 24: Níveis de adulteração

Nível	Formol (g.L <sup>-1</sup> )	Ureia (g.L <sup>-1</sup> )	Água (% v/v)
1	1	1	5
2	2	2	10
3	3	3	20
4	4	4	30
5	5	5	40

Fonte: O autor, 2016.

Para cada nível, foram quarenta e cinco amostras adulteradas (quinze para cada adulterante) e quinze sem adulteração, gerando uma matriz de 60 x 2545 para cada nível. A partir do gráfico de RMSECV (Figura 60) foi possível fazer a escolha do número de PCs. Para cada nível o número de PCs variou entre três e cinco PCs.

Figura 60: Valores de RMSECV para amostras de leite para o quinto nível de adulteração.

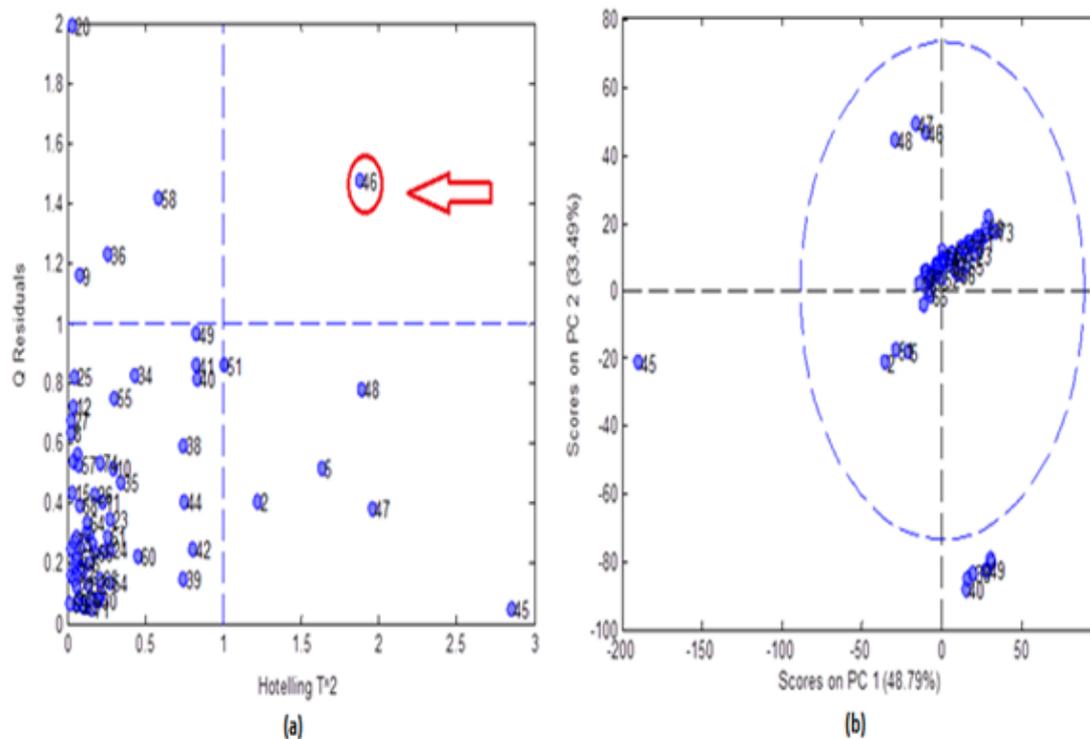


Fonte: O autor, 2016.

A região demarcada na Figura 60 denota a escolha do número de PCs. A partir de 5 PCs não há praticamente variação no valor de RMSECV, sendo esse o valor ideal para se trabalhar para se evitar problemas de subajuste ou sobreajuste do modelo.

A partir do número de PCs escolhido se avaliou se havia alguma amostra discrepante no conjunto de dados trabalhado. Independente do nível de adulteração, o gráfico de Resíduos x Hotelling  $T^2$ , o aspecto do gráfico foi o observado na Figura 61a (presença de uma amostra de formol, demarcada em vermelho, no primeiro quadrante).

Figura 61: Avaliação do modelo PCA para amostras de leite.



Legenda: (a) Gráfico Q Residuais x Hotelling T<sup>2</sup> (b) Gráfico de Scores

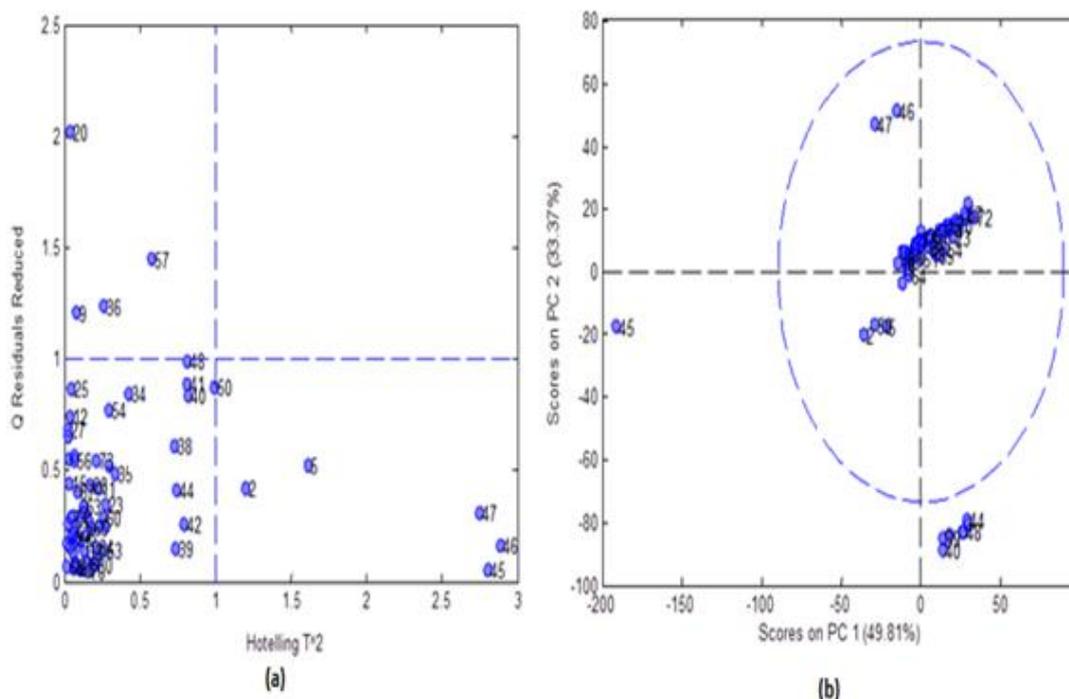
Fonte: O autor, 2016.

A amostra apontada pela seta na Figura 61a possui um valor alto de resíduo e Hotelling T<sup>2</sup>, por isso ela foi retirada do conjunto de dados, visto que por ter um resíduo alto e uma considerável influência no modelo, poderia atrapalhar na etapa de discriminação.

Na Figura 61b se tem o gráfico de Scores PC2 x Scores PC1, onde as amostras que se encontram dentro do círculo estão no intervalo de confiança, no nível de confiança estipulado, nesse caso de 95%. Apesar de haver algumas amostras fora dessa região, elas não foram retiradas do modelo, visto que não possuíam simultaneamente um valor de resíduo e Hotelling T<sup>2</sup> altos.

Após a retirada dessa amostra, foi feito novamente o PCA para o conjunto de dados restante (matriz 59 x 2545). A amostra retirada correspondia a uma amostra de leite adulterado com formol. Mais uma vez com base nos valores de RMSECV se escolheu trabalhar com cinco PCs. Como é possível observar na Figura 62 a seguir, não houve necessidade de se retirar nenhuma amostra.

Figura 62: Avaliação do novo modelo PCA após retirada de *outlier*.



Legenda: (a) Gráfico Q Residuals x Hotelling  $T^2$  (b) Gráfico de Scores

Fonte: O autor, 2016.

Embora mais uma vez se tenha amostras fora do círculo pontilhado na Figura 62b, nenhuma delas ficou na região onde se tem um valor alto de resíduo e Hotelling  $T^2$ , como pode ser observado na Figura 62a, não sendo necessário, portanto, retirar nenhuma amostra do modelo.

#### 4.2.3. Discriminação dos adulterantes.

Após a obtenção da matriz final no uso do PCA, partiu-se para o uso de diferentes técnicas de classificação (com diferentes tipos de pré-processamento dos dados) para discriminar o tipo de adulterante utilizado nas amostras de leite.

Para selecionar as amostras para a construção dos conjuntos de treinamento e teste foi usado o algoritmo de Kennard Stone (KS) para cada uma das classes. Como cada classe possuía 15 amostras, foram selecionadas 8 amostras para o conjunto de treinamento e 7 para o conjunto teste para todas as classes, exceto para classe do formol que possuía 14 amostras, sendo portanto 7 amostras para cada conjunto. Para todas as técnicas de

discriminação usadas foram estipuladas as classes, conforme Tabela 25 a seguir.

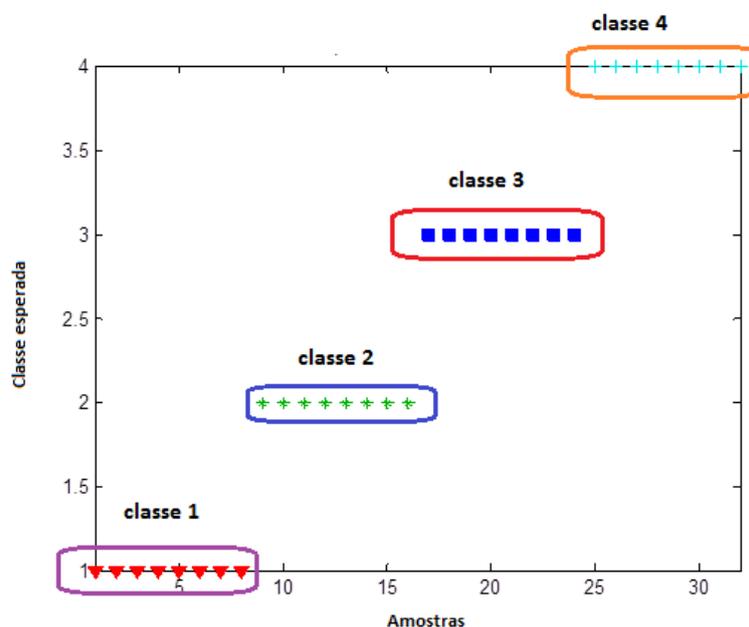
Tabela 25: Classes para discriminação.

Classe (nº)	Status
1	Leite com água
2	Leite com formol
3	Leite sem adulteração
4	Leite com ureia

Fonte: O autor, 2016.

Independente do nível de adulteração e da técnica de discriminação utilizada, a classificação esperada era de acordo com o representado na Figura 63.

Figura 63: Representação da classificação esperada



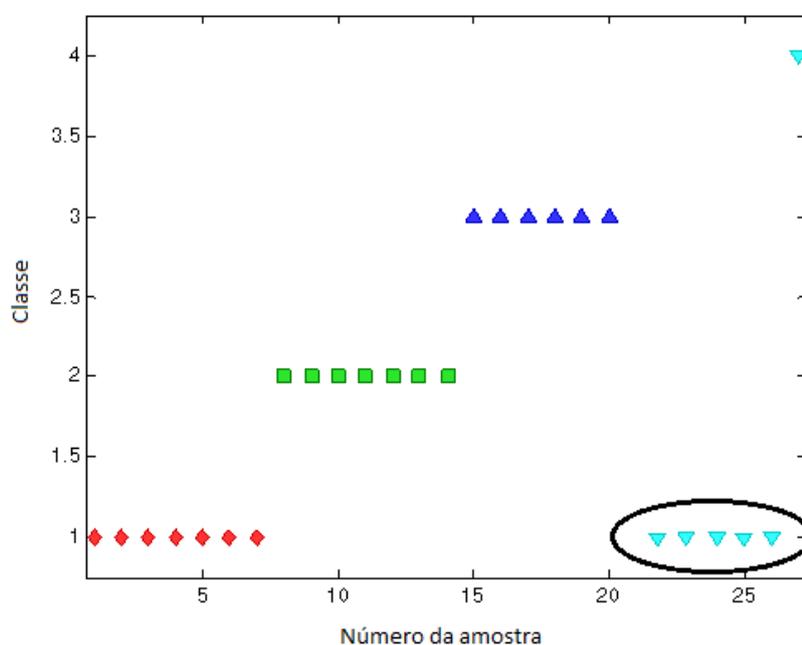
Legenda: Classe 1: Leite adulterado com água; Classe 2: Leite adulterado com formol; Classe 3: Leite puro; Classe 4: Leite adulterado com ureia.

Fonte: O autor, 2016.

#### 4.2.3.1. SIMCA

Para cada nível de adulteração usado foi feito um modelo SIMCA para verificar se era possível discriminar os adulterantes entre si. Todos os pré processamentos foram combinados com MC. Com base nos resultados obtidos, o método SIMCA não foi capaz de discriminar a ureia em nenhum dos pré - processamentos em nenhum dos níveis de adulteração usados (Figura 64).

Figura 64: Classificação obtida pelo SIMCA no grupo de teste



Fonte: O autor, 2016.

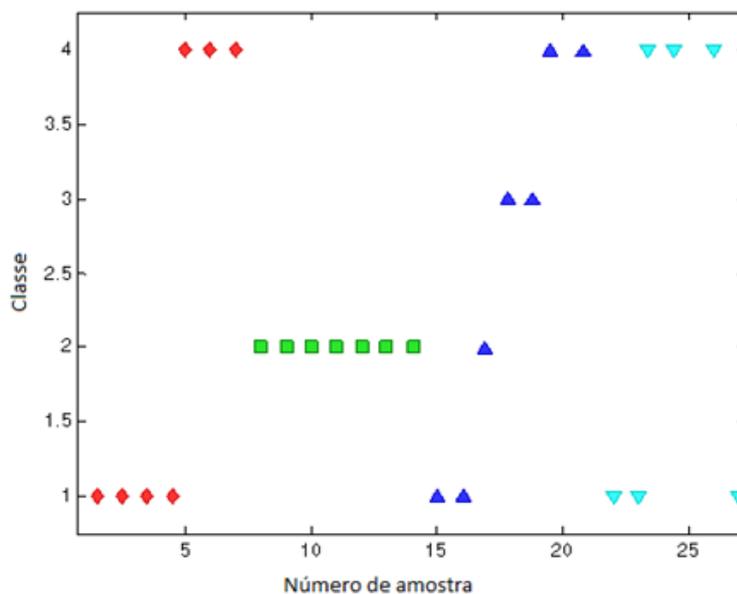
O grupo de amostras circulado indica as amostras de leite adulteradas com ureia que foram classificadas de forma equivocada. Apenas uma única amostra foi classificada corretamente como pertencente à classe quatro.

#### 4.2.3.2. SVM - DA.

Da mesma forma que no método SIMCA, todos os pré - processamentos foram combinados com MC.

Para o método SVM - DA, os parâmetros foram calculados para todos os níveis, considerando o pré - processamento que forneceu o melhor resultado (MC + MSC). Na Figura 65 se tem a classificação obtida para o grupo teste para o primeiro nível de adulteração.

Figura 65: Classificação obtida para o segundo nível de adulteração para SVM – DA no conjunto teste.



Fonte: O autor, 2016.

Na Tabela 26 se tem os parâmetros calculados para o conjunto teste, já que para o conjunto de treinamento se teve discriminação de 100% para todos os adulterantes.

Tabela 26: Parâmetros de mérito para a discriminação pelo método SVM - DA.

Nível	SEM			ESPEC		
	LA	LF	LU	LA	LF	LU
1	57%	100%	43%	62%	95%	71%
2	67%	100%	53%	76%	95%	76%
3	86%	100%	73%	80%	100%	81%
4	86%	100%	86%	100%	100%	90%
5	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Nível	PREC			EXAT		
	LA	LF	LU	LA	LF	LU
1	40%	88%	33%	71%	96%	64%
2	44%	88%	33%	71%	96%	64%
3	44%	100%	33%	78%	100%	64%
4	100%	100%	54%	86%	100%	78%
5	100%	100%	100%	100%	100%	96%

Legenda: LA = leite adulterado com água; LF = leite adulterado com formol; LU = leite adulterado com ureia.

Fonte: O autor, 2016.

A sensibilidade para discriminação das amostras de leite adulteradas com água das demais amostras (com outros adulterantes e se adulteração) variou de 57 para 67% nos dois primeiros níveis de adulteração, enquanto a especificidade variou de 62 para 76%. Já a precisão teve uma pequena variação do primeiro para o segundo nível (40 para 44%), enquanto que a exatidão se manteve a mesma (71%).

Esses resultados podem ser considerados satisfatórios, visto que nesses dois níveis a adulteração (5 e 10%) está abaixo do nível mínimo usualmente utilizado (20 a 25%), o que mostra que a metodologia proposta é capaz de discriminar os diferentes adulterantes usados, ainda que em níveis mais baixos. Vale ressaltar que a discriminação de apenas 5% de água usada na adulteração é algo extremamente satisfatório, para a técnica utilizada (NIR), na qual o espectro sofre grande influencia pela presença de água no leite “puro”. Ou seja, a técnica acoplada à quimiometria foi capaz de distinguir a água que foi adicionada a uma amostra que já possuía água naturalmente.

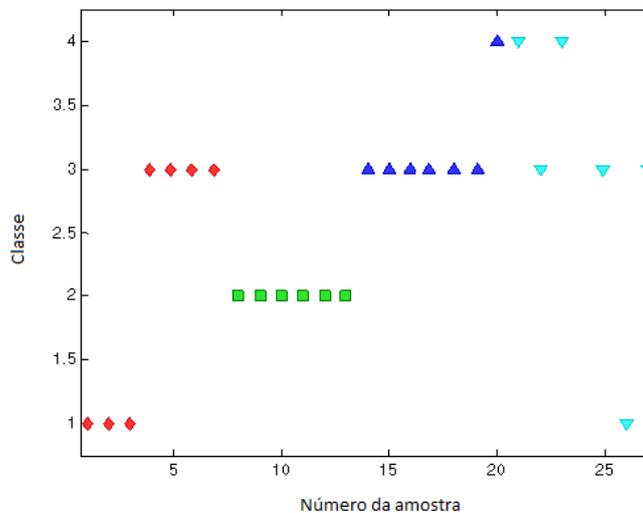
A sensibilidade para discriminação do formol foi de 100% em todos os níveis. Para os demais parâmetros, obteve-se 100% a partir do terceiro nível. A especificidade e exatidão podem ser consideradas satisfatórias mesmo nos dois primeiros níveis (95 e 96%, respectivamente). A precisão mesmo sendo de 88% nos dois primeiros níveis também pode ser considerada como satisfatórias.

A sensibilidade na discriminação da ureia teve uma pequena variação (de 10%) do primeiro para o segundo nível, passando de 70% a partir do nível três, o que pode ser considerado como satisfatório. A especificidade variou pouco de um nível para o outro até o terceiro nível, passando para 90% no quarto nível. Os resultados de precisão permaneceram constantes nos três primeiros níveis (abaixo de 35%), passando para um pouco acima de metade no nível quatro. Algo semelhante ocorreu com a exatidão (que não variou do nível um ao três), passando para quase 70% no nível quatro.

#### 4.2.3.3. PLS – DA

Da mesma forma que nos métodos SIMCA e SVM - DA, todos os pré - processamentos foram combinados com MC. Para o método SVM - DA, os parâmetros foram calculados para todos os níveis, considerando o pré - processamento que forneceu o melhor resultado (MC + MSC). Na Figura 66 se tem a classificação obtida para o primeiro nível de adulteração.

Figura 66: Classificação obtida para primeiro nível de adulteração do leite para o PLS no conjunto teste.



Fonte: O autor, 2016.

Na Tabela 27 se tem os parâmetros calculados para o conjunto teste, já que para o conjunto de treinamento se teve discriminação de 100%.

Tabela 27: Parâmetros de mérito para a discriminação pelo método PLS - DA.

Nível	SEN			ESPEC		
	LA	LF	LU	LA	LF	LU
1	43%	100%	14%	65%	100%	70%
2	49%	100%	57%	71%	100%	71%
3	70%	100%	78%	86%	100%	95%
4	86%	100%	86%	86%	100%	95%
5	100%	100%	100%	100%	100%	96%
Nível	PREC			EXAT		
	LA	LF	LU	LA	LF	LU
1	33%	100%	55%	60%	100%	70%
2	50%	100%	57%	67%	100%	75%
3	67%	100%	86%	75%	100%	75%
4	87%	100%	88%	89%	100%	83%
5	100%	100%	100%	100%	100%	92%

Legenda: LA = leite adulterado com água; LF = leite adulterado com formol; LU = leite adulterado com ureia.

Fonte: O autor, 2016.

A sensibilidade na discriminação da presença de água, nos dois primeiros níveis de adulteração, teve uma pequena variação de 43 para 49%, enquanto a especificidade variou de 65 para 71%. A exatidão teve uma pequena variação do primeiro para o segundo nível (60 para 67%). Já a precisão no primeiro nível foi baixa (apenas 33%), passando para 50% já no segundo nível de adulteração, onde o leite estava adulterado apenas com 10% de água, que conforme previamente mencionado é um valor abaixo do mínimo de diluição usual.

O PLS - DA foi capaz de discriminar a presença de formol em 100% dos casos (todos os níveis de adulteração), tendo assim 100% de sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão.

A ureia teve uma sensibilidade de discriminação de apenas 14% no primeiro nível de adulteração, passando para um pouco mais da metade (57%) no segundo nível. No terceiro e quarto nível a variação foi menor, enquanto que no último nível a sensibilidade foi de 100%. A precisão teve uma variação pouco perceptível do primeiro para o segundo nível (55 para 57%), mas aumentou significativamente no terceiro nível (86%), o que pode ser considerado satisfatório. A especificidade também variou muito pouco nos dois primeiros níveis, mas aumentou para 95% no terceiro nível. Os resultados de exatidão tiveram pequena variação de um nível para o outro, mas também com resultados satisfatórios.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No trabalho sobre a determinação de Ibuprofeno e Paracetamol, a proposta era quantificar ambos simultaneamente em misturas sintéticas de medicamentos, tendo sido escolhidos quatro medicamentos: dois contendo Paracetamol (Sonridor®, Tylenol®) e dois contendo Ibuprofeno (Ibupril® e Advil®). A metodologia proposta mostrou-se eficaz. O uso da calibração multivariada (PARAFAC) permitiu a determinação dos analitos em urina, a partir da deconvolução dos espectros das matrizes de excitação e emissão e, conseqüentemente, a determinação dos enriquecimentos realizados nas amostras de urina diluída (por meio dos escores). Vale ressaltar que a urina é uma matriz extremamente complexa, a qual possui componentes que também exibem fluorescência, tendo sido, nesse caso, necessário apenas a diluição da mesma.

Nas determinações preliminares de padrão aquoso de PAR e IBU por espectrofluorescência, a curva analítica obteve valores de R (de aproximadamente 0,995) que mostraram uma forte relação entre a intensidade do sinal e a concentração analítica dos analitos na faixa escolhida de 2 a 7 mg.L<sup>-1</sup> (IBU) e 10 a 20 mg.L<sup>-1</sup> (PAR). Para determinação em medicamentos, se obteve um limite de detecção de 0,48 mg.L<sup>-1</sup> e 1,40 mg.L<sup>-1</sup> (IBU e PAR, respectivamente) e um de quantificação de 1,54 mg.L<sup>-1</sup> e 4,20 mg.L<sup>-1</sup> (IBU e PAR, respectivamente). Nas determinações por HPLC, o limite de detecção para o IBU foi de 0,61 mg.L<sup>-1</sup> e para o PAR foi de 1,50 mg.L<sup>-1</sup>. O limite de quantificação foi de 1,80 mg.L<sup>-1</sup> e 4,40 mg.L<sup>-1</sup> para IBU e PAR respectivamente.

Os resultados dos ensaios de precisão mostraram um DPR variando entre 0,2 a 1,0% para o IBU e 0,1 a 0,7% para o PAR. Nos dois casos, os valores podem ser considerados como satisfatórios de acordo com o preconizado pela curva de Horwitz. Nos ensaios de recuperação para medicamentos se obteve um média de recuperação de 98 a 101% para o IBU e de 99 a 101% para o PAR, aproximadamente, ou seja metodologia proposta foi precisa e exata.

Os resultados dos ensaios de recuperação para urina também foram muito bons comparados com os resultados obtidos pelas determinações por

HPLC, mostrando uma faixa de recuperação, aproximadamente, de 100% a 101% para o IBU e de 100 a 101% para o PAR para espectrofluorescência. Por HPLC, a faixa de recuperação foi de 97 a 101% para o IBU e 99,8 a 100,4% para o PAR. A partir do PARAFAC se obtiveram os parâmetros de mérito para determinação de urina, obtendo-se um limite de detecção de  $0,54 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,83 \text{ mg.L}^{-1}$  para o IBU e PAR respectivamente e o de quantificação de  $1,65 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $2,48 \text{ mg.L}^{-1}$  para IBU e PAR respectivamente, mostrando mais uma vez que a metodologia proposta pode ser considerada satisfatória.

As metodologias foram comparadas por meio do método da distância ortogonal (para padrão aquoso), que mostrou concordância entre as mesmas. Para os medicamentos e urina, foi usado o teste F para variâncias, para um nível de confiança de 95%, que também mostrou que nos dois casos mencionados, as metodologias também eram concordantes.

Pode-se também ressaltar que a metodologia empregada não usa quantidades excessivas de solvente orgânico, o que ocorre ao se usar cromatografia. Além disso, o tempo, consideravelmente longo, necessário para condicionamento da coluna antes da análise e o tempo requerido para limpeza da mesma. Dessa forma, com base nessas vantagens da espectrofluorescência ao compará-la com o HPLC e com base nos resultados satisfatórios obtidos, a metodologia proposta se mostra uma boa substituta para a técnica de referencia, fornecendo também resultados confiáveis. Obviamente, para que tal metodologia fosse empregada em escala industrial seria necessário que se tivesse um analista experiente na técnica, que saiba interpretar os resultados obtidos e que tenha conhecimento do uso de quimiometria para tratar os dados obtidos.

Na determinação dos adulterantes no leite por espectroscopia NIR acoplada a técnicas quimiométricas de discriminação, antes de se efetuar a discriminação dos adulterantes (água, ureia e formol) no leite UHT foi efetuado o PCA que mostrou a necessidade da retirada de apenas uma amostra do conjunto de dados. A partir das amostras restantes foram efetuadas as técnicas de classificação, variando-se o pré - processamento utilizado. A partir do melhor resultado de pré - processamento foram efetuados os cálculos dos parâmetros de mérito.

Ao usar o SIMCA, o mesmo não forneceu resultados satisfatórios na discriminação de ureia e por isso não foram calculados parâmetros de mérito pra essa técnica, tendo sido calculados apenas para os resultados obtidos pelo PLS – DA e SVM – DA. No conjunto de treinamento, as duas últimas técnicas mencionadas tiveram 100% de precisão, especificidade, exatidão e sensibilidade na discriminação das classes (o que é esperado para esse conjunto). Já para o conjunto teste houveram variações desses parâmetros em função da técnica utilizada e do nível de adulteração trabalhado.

No tocante a sensibilidade na discriminação da água, o método SVM - DA foi melhor do que o PLS - DA de um modo geral, independente do nível de adulteração trabalhado. Já para a discriminação do formol, ao se usar o PLS – DA, todos os quatro parâmetros de mérito calculados foram iguais a 100%, diferentemente do SVM – DA, mas ainda assim este último ofereceu resultados satisfatórios. Para a ureia, a diferença entre as técnicas foi pequena, sendo, portanto, as duas adequadas.

Com base nos resultados analisados, SVM – DA e PLS - DA se mostraram satisfatórias no tocante a discriminação dos adulterantes no leite, mostrando que o método proposto atendeu ao objetivo inicial que era a discriminação dos adulterantes, algo que deve ser considerado, visto que em função do tipo de adulterante usado, o cuidado que se deve ter no tocante à saúde da população deve ser diferente. Por exemplo, adulteração com água apenas causará menos prejuízos a saúde a princípio do que adulteração por formol.

## **Sugestões futuras**

- Primeiro Estudo de Caso (Determinação de Ibuprofeno e Paracetamol):
  - Aplicar outras técnicas de calibração multivariada para determinação simultânea de fármacos em misturas naturais ou sintéticas e também em urina.
  - Determinação dos metabólitos em urina
  
- Segundo Estudo de Caso (Discriminação de adulterantes no leite UHT):
  - Discriminar outros adulterantes no leite UHT.
  - Adaptar a metodologia proposta para determinação de adulterantes em leite em pó.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F.F.M. *Support Vector Machine*. 2007. Universidade de Campina Grande, 2007. 16 p. Relatório Técnico.

ANAZAWA, T.A. *Preparação, caracterização e avaliação de diferentes fases estacionárias reversas, tipo C8, para CLAE*. 1996. 160 f. Tese (Doutorado em Química Analítica). Universidade de Campinas. 1996

ANVISA, 2003. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)> Acesso em: 26 dez. 2015.

ARANCIBIA, J. A.; OLIVIERI, A. C.; GIL, D. B.; MANSILLA, A. E.; DURÁN-MERÁS, I.; LA PEÑA, A. M. DE. Trilinear least-squares and unfolded-PLS coupled to residual trilinearization: new chemometric tools for the analysis of four-way instrumental data. *Chem. Intel. Lab. Sys*, v. 80, p. 77-86, Jan 2006.

BALABIN, R. M.; SMIRNOV, S. V. Melamine detection by mid- and near-infrared (mir/nir) spectroscopy: a quick and sensitive method for dairy products analysis including liquid milk, infant formula, and milk powder. *Talanta*, v. 85, p. 562-568, 2011

BASU, D.; MAHALANABIS, K. K.; ROY, B.; Application of least squares method in matrix form: simultaneous determination of ibuprofen and paracetamol in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 16, n.5, p. 809 – 812, Jan 1998.

BERNARDES, C. D. *Determinação direta de trans- Resveratrol em Plasma Humano usando espectrofluorimetria e Adição de padrão de 2ª ordem*. 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) – Universidade Estadual de Goiás, 2009.

BILENKO N.; TESSLER, O.; OKBE, R; PRESS, J.; GORODISCHER, R. Determinants of antipyretics of misuse in children up to 5 years of age: a cross sectional study. *Clin. Ther*, v. 28, n. 5, p. 783 - 793, Mai 2006.

BOOKSH, K.S.; HENSHAW, J.M.; BURGESS, L.W.; KOWALSKI, B.R. A second order standard addition method with application to calibration of a kinetics – spectroscopic sensor for quantitation of trichloroethylene. *J. Chem.*, v. 9, n.4, p. 263, Jul/Ago 1995.

BORTOLETO, G. G. *Desenvolvimento de métodos analíticos usando espectrometria de raios X e quimiometria*. 2007. 96 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), maio/2007.

BOSCH, M.E.; RUIZ SÁNCHEZ, A.J.; SÁNCHEZ ROJAS, F. Determination of paracetamol: historical evolution. *J. Pharm. Biom. Anal.*, v. 42. p. 291 - 321, Set 2006.

BOYER, K.W.; HORWITZ, W.; ALBERT, R. Interlaboratory variability in trace elements analysis. *Anal. Chem.*, v. 57, n.2, p. 454 – 459, 1985.

BRAGA, J.W.B., POPPI, R.J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. *Quím. Nova*, v. 27, p. 1004 – 1011, Dez 2004.

BRASIL. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472>>. Acesso em: 26 dez. 2015.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Disponível em: <[http://www.universidadedoleite.com.br/imagens/uploads/files/instru%C3%A7%C3%A3o\\_normativa\\_62.pdf](http://www.universidadedoleite.com.br/imagens/uploads/files/instru%C3%A7%C3%A3o_normativa_62.pdf)>. Acesso em: 26 dez.2015.

BRETERON, R. G. Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant. *John Wiley & Sons*. 2003. 497 f.

BRO, R. Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemist? *Anal. Chim. Acta* v. 50, p. 185 – 194, 2003.

BROOKSH, K.S.; KOWALSKY, B.R. Theory of analytical Chemistry, v. 66, 782A – 791 A, 1994.

CAMO, 2015. *PLS – DA*. Disponível em: < <http://www.camo.com/resources/pls-da.html>> Acesso em 26 dez. 2015.

CARVALHO, B.M.C.A. *Detecção de soro de queijo em leite por espectrofotometria no infravermelho médio*. 2007. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2007.

CASSOLI, L. D.; SARTORI, B.; ZAMPAR, A.; MACHADO, P. F. An assessment of Fourier Transform Infrared spectroscopy to identify adulterated raw milk in Brazil. *Int. J. Dairy Techn.*, v. 64, n. 4, p. 480-485, 2011.

CHENGHUI, L.; BINGREN, X.; GANG, H.; JIANPING, X.; ZHENGWU, W.; CHANGYUN, C. Rapid detection of melamine in milk powder by near infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.*, v. 17, n.2, p. 59 – 67.

COLLINS, C.H.; TONHI, E.; COLLINS, K.E.; JARDIM, I.C.S.F. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE – FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Quím. Nova*, v. 25 (4), p. 616 – 623, 2002.

CONCEIÇÃO, V. G. B. *Análise Quantitativa de paracetamol por espectroscopia Raman*. 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado em engenharia biomédica) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, 2009.

CORGOZINHO, C. N. C. *Utilização de técnicas espectrofluorimétricas e quimiométricas na análise de biodiesel e de suas misturas com óleo diesel*. 2009. 164 f. Dissertação (Mestrado em química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 2009.

COSTA, T. M. S. *Aplicação da calibração multivariada de ordem superior na resolução de espectros de fluorescência molecular para quantificação de levofloxacino*. 2009. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. *Quím. Nova*, v.7, p. 21 – 25, 1998

DOMINGO, E.; TIRELLI, A.A.; NUNES, C.A.; GUERREIRO, M.C.; PINTO, S.M. Melamine detection in milk using vibrational spectroscopy and chemometrics analysis: a review. *Food Res. Int.*, v. 60, p. 131 – 139, 2014.

DONATO, M. G.; BAEYENS, W.; VANDENBOSSCHE, W.; S., P.; The determination of non – steroidal antiinflammatory drugs in pharmaceuticals by capillary zone electrophoresis and micelar electrokinetic capillary chromatography. *J. Pharm.Biomed. Anal*, v. 12, n.1, p. 21 – 26, Jan 1994.

DOWNEY, G.; ROBERT, P.; BERTRAND, D.; KELLY, P. M.; Classification of commercial skim milk powders according to heat treatment using factorial discriminant analysis of Near Infrared Reflectance Spectra. *Appl. Spectrosc*, v.44, n. 1, p. 150 - 155, 1990.

EIGENVECTOR, 2014. *PLS – DA*. Disponível em: <<http://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Plsda>> Acesso em: 26 dez. 2015.

EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDET, J. M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 58, n.5, p. 932-939, 2006.

ELRAGEHY, N. A.; ABDELKAWY, M.; ELBAYOUMY, A.; Spectrophotometric Determination of Ibuprofen via its Copper (II) Complex. *Anal. Lett.*, v. 27, n.11, p.2127 - 2139, 1994.

ESBENSEN, K. H.; GELADI, P. Principal component analysis: concept, geometrical interpretation, mathematical background, algorithms, history, practice. *In: Comprehensive Chemometrics – Chemical and Biochemical Data Analysis*, v. 2, Elsevier, 2009.

FERRÃO, M.F., BORIN, A.; MELLO, C.; CORDI, L.; PATACA, L.C.M. DURÁN, N. POPPI, R.J. Quantification of lactobacillus in fermented milk by multivariate

image with least squares – support vector machine. *Anal. Bio. Chem*, v.387, n. 3, p.1105 - 1112, 2007.

FERREIRA, M. M. C. Multivariate QSAR. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.13, n.6, p. 742-753, Nov 2002

FERREIRA, M.M.C. Quimiometria. Conceitos, métodos e aplicações. Ed. UNICAMP. 2015. 496 f.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. *Quím. Nova*, v. 22, n.5, p. 724 – 731, Set 1999

FERRER – RIQUELME, A. J. Statistical control of measures and process. *In: Comprehensive Chemometrics – Chemical and Biochemical Data Analysis*, v. 1, Elsevier, 2009

FINETE, V.L.M. *Desenvolvimento de métodos espectrofluorimétricos para determinação de enritromicina e canamicina e aplicabilidade na vacina contra febre amarela*. 2005. 111 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. RJ. 2005

FRANETA, J. T.; AGBABA, D. D.; ERIC, S. M.; PAVKOV, S. P.; VLADIMIROV, S. D.; ALEKISIC, M. B.; Quantitative analysis of analgoantipyretics in dosage form using planar chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 24, n.5-6, p. 1169 – 1173, Mar 2001.

FREITAS, S. K. B. *Uma metodologia para screening analysis de sucos cítricos usando um analisador automático em fluxo batelada, espectrometria UV – VIS e técnicas quimiométricas*. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado em química analítica) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2006.

GEMPERLINE, P. *Practical Guide to Chemometrics*. 2. ed. Taylor & Francis Group. 2006.

GIACOMELLO, C.P. 2015. *Probabilidade e Estatística*. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/17910359/36/Coeficiente-de-determinacao>> Acesso em: 26 dez. 2015.

GIL, D. B. *Nuevos métodos de determinación de antibióticos y otros principios activos en alimentos, formulaciones zoosanitarias y fluidos biológicos*. 2005. 574 f. Tese (Doutorado em Ciências Químicas) – Universidade de Extremadura, Badajoz, 2005.

GILPIN, R. K.; PACHLA, L. A.; Pharmaceutical and Related Drugs. *Anal. Chem*, v.77, n.12, p. 3755 – 3770, Abril, 2005.

GIRÓN, A. M. J. *Aplicaciones analíticas de métodos basados em luminescencia molecular en combinación com metodologias dinamicas*. 2007.

556 f. Tese (Doutorado em química) – Universidad de Extremadura, Badajoz, 2007.

GURGEL, S. M. L. *O uso da espectroscopia Raman para diferenciar soja convencional de soja transgênica*. 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de Franca, SP, 2006.

HARRIS, D.C. *Análise química Quantitativa*. 8. ed. São Paulo: LTC. 2012. 899 f.

HERGERT, L. A.; ESCANDAR, G. M.; Spectrofluorimetric study of the  $\beta$  - cyclodextrin – ibuprofen complex in determination of ibuprofen in pharmaceutical preparations and serum. *Talanta*, v. 60, n.2 – 3, p. 235 – 246, jun 2003.

HONORATO, F. A.; NETO, B. B.; MARTINS, M. N.; GALVAO, R. K. H.; PIMENTEL, M. F. Transferência de Calibração em Métodos Multivariados. *Quím. Nova*, v. 30, n.5, p.1301 – 1312, Out 2007.

HOPKE, P. K. The evolution of chemometrics. *Anal. Chim. Acta*, v. 500, n. 1 – 2, p. 365 -377, Dez 2003.

HUSAIN, S.; KIFAYATULLAH, M.; SEKHAR, R.; Simultaneous determination of Ibuprofen and Acetaminophen in pharmaceutical preparations by proton magnetic resonance spectroscopy. *J. AOAC Int.*, v. 77, n.6, p. 1443 – 1446, 1994.

ILHARCO, L.M. Espectroscopia de Infravermelho. *Química*, v. 69, 1998.

ISO 11843-1. Capability of detection. Part 1: Terms and definitions. *ISO*, Genève, 1997.

IUPAC. Nomenclature in evaluation of Analytical Methods including detection and quantification capabilities. *Pure & Appl. Chem.*, v. 67, p. 1699 – 1723, 1995.

JAWAID S., TALPUR F.N., SHERAZI S.T., NIZAMANI, S.M. and KHASKHELI A.A. Rapid detection of melamine adulteration in dairy milk by SB – ATR Fourier Transform infrared spectroscopy. *Food Chem.*, v. 144, n. 3, p. 3066 – 3071.

JIN Y., XUE X., SHI H., XIAO Y., ZHANG F., LIANG X. HPLC and UPLC switch for TCM analysis. *Mode. Tradit. Chin. Med. Mater. Med.*, v.10, n. 1, p.80 - 84, 2008.

LEITÃO, J. M. M. *Técnicas quimiométricas de calibração acopladas a metodologias de análise espectrofotométrica de formulações farmacêuticas*. 2005. 500 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade de Coimbra, 2005.

LEVINE, D.M.; STEPHAN, D.F.; KREHBIEL, T.C.; BERENSON, M.L. Estatística: Teoria e Aplicações usando Microsoft Excel em Português. 6ª ed. LTC, 2012.

LIMA, I.C. de A. *Aplicação de métodos de classificação e calibração multivariada acopladas com técnicas espectrométricas em amostras ambientais e alimentos*. 2011. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), 2011.

LIMA, L.L.A.; SCHULER, A.; GUERRA, N.B.; PEREIRA, G.E.; LIMA, T.L.A.; ROCHA, H. Otimização e validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quím. Nova*. v. 33, n.5, 1186 – 1189, 2010.

LIU, F.; HE Y.; WANG, L.; GUANGMING, S. Detection of organic acids and pH fruits Vinegars using Near - Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration. *Food Bioprocess Technol.*, v.4, p.1331 – 1340, 2011.

LOHUMI, S.; LEE, S.; LEE, H.; CHO, B. A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration. *Trends in Food Scie. Technol.*, v. 46, p. 85 – 98, 2015.

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

LOURENÇÃO, B.C. *Determinação voltamétrica simultânea de paracetamol e cafeína e de ácido ascórbico e cafeína em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de diamante dopado com boro*. 2009. 140 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de São Carlos, São Carlos (SP), 2009.

LUNA, A.S.; PINHO, J.S.A. O limite de detecção em química analítica. *Analytica*, v. 38, p. 66 – 70, 2009.

LUNA, A.S.; SILVA, A.P.; PINHO, J.S.A.; FERRÉ, J.; BOQUÉ, R.. A novel approach to discriminate transgenic from non-transgenic soybean oil using FT-MIR and chemometrics. *Food Res. Int.*, v.67, p. 206-211, 2015.

MARKOS, 2006. *Automação livre para laboratórios de águas*. Disponível em: <<http://www.c2o.pro.br/automacao/x3361.html>> Acesso em: 27 março 2015.

MAUER, L.J.; CHERNYSHOVA, A.A.; HIATT, A.; DERING, A.; DAVIS, R. Melamine detection in infant formula powder using near and mid infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, v. 57, n.10, p. 3974 – 3980.

MICCHELI, A.; MARINI, F.; CAPUANI, G.; MICCHELI, A.T.; DELFINI, M.; COCCO, M.E.Di.; PUCETTI, C.; PACI, M.; RIZZO, M.; SPATARO, A. The influence of a sports drink on the post exercise metabolism of elite athletes as investigated by NMR based metabolomics. *J. Amer. Coll. Nutrit.* v 28, n.5, 553 – 564, 2009.

MILCH, G.; SZABO, E. Derivative Spectrophotometric assay of acetaminophen and Spectrofluorimetric determination of its main impurity. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v.9, n.10 – 12, 1107 – 1113, 1991.

MILLER, J.N.; MILLER, J.C. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 5 ed. Pearson Education Limited. 2005.

MOYNIHAN, H.A.; O'HARE, I.P. Spectroscopic determination of monoclinic and orthorhombic forms of paracetamol. *Int. J. Pharm.*, v. 247, p.179 - 185, 2002.

MUHLEN, C.V.; LANÇAS, F.M. Cromatografia unificada. *Quím. Nova*, v.27 (5), p. 747 – 753, 2004.

NADLER, B.; COIFMAN, R. R. Partial least squares, Beer's law and the net analyte signal: statistical modeling and analysis. *J. of Chemom.*, v. 19, p. 45–54, maio 2005.

NASCIMENTO, E.C. L. do. *Um fotômetro microcontrolado LED – NIR, portátil e de baixo custo para análise screening de gasolinas tipo C*. 2008. 110 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, abril/2008.

NASCIMENTO, R. F. F; ALCANTARA, E. H.; KAMPEL, M.; STECH, J. L.; NOVO, E. M. L. M.; FONSECA, L. M. G. *O algoritmo Support Vector Machine (SVM): avaliação da separação ótima de classes em imagens*. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO. XIV, 2009, Natal.

NETO, J.M.; MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Quím. Nova*, v.21, n.4, p. 467 – 469, 1998.

NI, Y.; QI, Z.; KOKOT, S. Simultaneous ultraviolet spectrophotometric determination of sulfonamides by multivariate calibration approaches. *Chemom. and Intell. Lab. Sys.*, v. 82, n.1 – 2, p. 241 – 247, mai 2006.

NOGUEIRA, N.M.; SOARES, B.T.M., ANDRADE, A.B.N.. SINGH, A.K. Méritos comparativos da Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência em escala convencional e miniaturizada. *Rev. Bras. Farm.*, v. 92, n.2, p.44-50, 2011.

NUNES, P. G. A. *Uma nova técnica para seleção de variáveis em calibração multivariada aplicada as espectrometrias UV/Vis e NIR*. 2008. 121 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, marco/2008.

OLIVIERI, A.C. Analytical Advantages of Multivariate Data Processing. One, Two, Three, Infinity? *Anal. Chem.*, v. 80, p. 5713 – 5720, 2006

OLIVIERI, A.C.; FABER, N.K.M. A closed – form expression for computing the sensitivity in second order calibration. *J. Chem.*,v.19, p.583, 2009.

OLIVEIRA, E.C.; AGUIAR, P.F. Least Squares Regression with errors in both variables: cases studies. *Quím. Nova*, v. 36 (6), p. 885 – 889, 2013.

OLIVEIRA, F.C.C. *Modelos de calibração multivariada associados à espectroscopia vibracional para análise de misturas diesel – óleos vegetais*. 2006. 120 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Brasília, 2006.

OLIVEIRA, K.S.; ALMEIDA, M.R.; STEPHANI, R.; OLIVEIRA, L.F.C. *Classificação de amostras de leite em pó empregando espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas*. 34<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2011. Disponível em: <<http://sec.sbq.org.br/cdrom/34ra/resumos/T0346-1.pdf>>. Acessado em: 23 dez. 2015.

PARREIRA, T.F. *Utilização de métodos quimiométricos em dados de natureza multivariada*. 2003. Dissertação (Mestrado em Química) – UNICAMP, Campinas, 2003.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. *Introdução a espectroscopia*. 4.ed. Cengage Learning, 2015.

PEREIRA, A. F. C. *Determinação simultânea de acidez, índice de refração e viscosidade em óleos vegetais usando espectrometria NIR, calibração multivariada e seleção de variáveis*. 2007. 75 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, PB, 2007.

ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO UV – VIS E ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

PEREIRA, T.P. 2013. *Espectroscopia de Absorção no UV – Vis e Espectroscopia de Fluorescência*. Disponível em: <<http://image.slidesharecdn.com/apresentao1-140625105856-phpapp01/95/espectroscopia-de-uvvis-e-fluorescncia-26-638.jpg?cb=1403694016>> Acesso em: 26 dez. 2015.

PFARMA, 2006. *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*. Disponível em: <<http://pfarma.com.br/farmaceutico-industrial/130-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia-.html>> Acesso em: 26 dez.2015.

PICCIRILLI, G. N.; ESCANDAR, G. M. Second-order advantage with excitation-emission fluorescence spectroscopy and a flow-through optosensing device. Simultaneous determination of thiabendazole and fuberidazole in the presence of uncalibrated interferences. *Analyst*, v. 135, p. 1299-1308, 2010

PINHO, J.S.A. *Aplicação de métodos quimiométricos e de técnicas analíticas em amostras alimentícias e farmacêuticas*. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Fev/2012.

RAMOS, M.L; TYSON, J.F.; CURRAN, D.J. Determination of acetaminophen by flow injection with on-line chemical derivatization: Investigations using visible and FTIR spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta* v. 364, n.1 – 3, 107 – 116, 1998.

RAMOS - MARTOS, N.; AGUIRRE - GOMEZ, F.; MOLINA - DIAZ, A.; CAPITAIN - VALLVEY, L. F. Application of Liquid Chromatography to the Simultaneous Determination of Acetylsalicylic Acid, Caffeine, Codeine, Paracetamol, Pyridoxine and Tiamine in Pharmaceutical Preparations. *J. AOAC Int.*, v.84, p.676, 2001.

RAVN, C. *Near-infrared chemical imaging in formulation development of solid dosage forms*. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de Copenhagen, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Quím. Nova*, v.27, n.5, p. 771 -780, 2004.

RIBEIRO, P. J. F. *Desenvolvimento de um sensor potenciométrico para o ibuprofeno*. Dissertação (Mestrado em química) – UNICAMP, São Paulo, 2006.

ROCHA, W.F. de C. *Utilização do sinal analítico líquido para validação de modelos de calibração multivariada através do calculo de figuras de mérito e de cartas de controle*. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), 2007.

SADECKA, J.; CAKRT, M.; HERCEGOVA, A.; POLONSKI, J.; SKACANI, I.. Determination of Ibuprofen and Naproxen in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.25, p.881, 2001.

SANCHES, F. A. C. *Desenvolvimento de uma metodologia para o controle de qualidade de medicamento injetável, sem violação da ampola, usando Espectroscopia NIR e Técnicas quimiométricas*. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, 2009

SANTOS, M. F. P. *Desenvolvimento e Validação de Métodos de Espectroscopia no Infravermelho Próximo e Médio para caracterização de lamas de ETAR para uso agrícola*. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) – Instituto Superior Técnico (Universidade Técnica de Lisboa), 2007

SASIC, S.; OZAKI, Y.; Short-Wave Near-Infrared Spectroscopy of Biological Fluids. 1. Quantitative Analysis of Fat, Protein, and Lactose in Raw Milk by Partial Least-Squares Regression and Band Assignment. *Anal. Chem.*, v.73, p.64, 2001.

SATO, T.; KAWANO, S.; Detection of Foreign Fat Adulteration of Milk Fat by Near Infrared Spectroscopic Method. *J. Dairy Sci.*, v.73, p. 3408, 1990

SAUER, E. *Desenvolvimento de metodologias multivariadas para análise de queijos por espectroscopia DRIFT*. 2007. 157 f. Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SAXBERG, B.E.H.; KOWALSKI, B.R. Generalized standard addition method. *Anal. Chem.*, v. 51, p. 1031, 1979

SENA M. M., TREVISAN M. G., POPPI R.J., PARAFAC: uma Ferramenta Químiométrica para Tratamento de Dados Multidimensionais, Aplicações na Determinação Direta de Fármacos em Plasma Humano por Espectrofluorimetria, *Quím. Nova*, v.28, p. 910-920, 2005.

SENA, M.M.; FREITAS, C.B.; SILVA, L.C.; PEREZ, C.N.; PAULA, Y.O. Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em formulações farmacêuticas usando calibração multivariada. *Quim. Nova*, v.30, n. 1, p.75 – 79, 2007.

SILVA, A. P. da. *Acoplamento de técnicas espectrométricas com métodos quimiométricos de classificação e calibração multivariada em alimentos*. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2011.

SORENSEN, L. K.; LUND, M.; JUUL, B.; Accuracy of Fourier Transform infrared spectrometry in determination of casein in dairy cows' milk. *J. Dairy Res.*, v. 70, n. 4, p. 445 – 452, 2003.

SOTOMAYOR, Maria D. P. T.; DIAS, Iara Lucia T.; LANZE, Marcos R. V.; MOREIRA, Altair B.; KUBOTA, Lauro T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Quim. Nova*, v.31, n.7, p. 1755 – 1774, 2008.

STEINER, Maria Teresinha Arns. *Uma metodologia para o reconhecimento de padrões multivariados com resposta dicotômica*. 1995. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina, 1995.

STEVENS, A.; RAMIREZ – LOPEZ, L. An introduction to the prospectr package. R package Vignette R package version 0.1.3. 2013.

STUART, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Ed. Wiley, 2004.

TOMINAGA, Y. Comparative study of class data analysis with PCA-LDA, SIMCA, PLS, ANNs, and KNN. *Chem. and Intell. Lab. Sys.*, v. 49, p. 105- 115, 1999.

TREVISAN, M. G. *Aplicação de métodos quimiométricos de ordem superior e fluorescência molecular na análise em matrizes biológicas*. 2003. 101 f. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), julho/2003.

VALDERRAMA, P., BRAGA, J.W., POPPI, R.J. Estudo da Arte de Figuras de Merito em Calibração Multivariada. *Quim. Nova*, v.32, p. 1278 – 1287, 2009.

VAN STADEN, J.F.; TSANWANI, M. Determination of Paracetamol in pharmaceutical formulations using a sequential injection system. *Talanta*. v. 58, n.6, 1095 – 1101, 2002.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, S. C.; Características do Leite. *Boletim Técnico*, UFES, 2007.

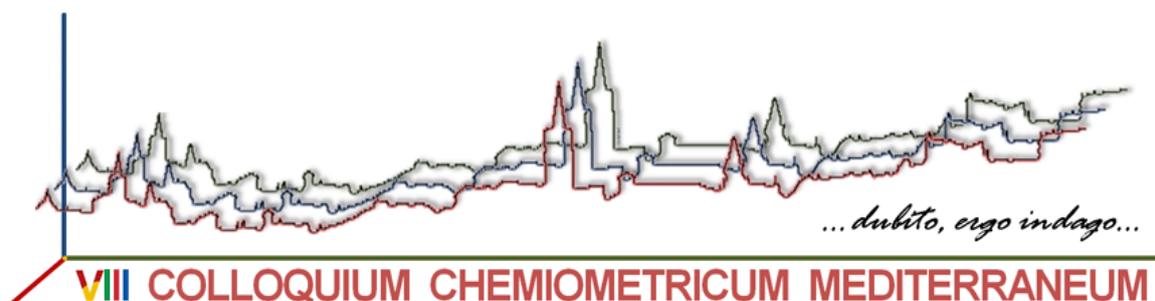
VIEIRA, I.C.; LUPETTI, K.O; FATIBELLO – FILHO, O. Determinação de Paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*). *Quím. Nova*, v. 26, p. 39 – 43, 2003.

WEHRENS, R. *Chemometrics with R - Multivariate Data Analysis in the Natural Sciences and Life Sciences*, Springer, Heidelberg, 2011.

WRIGHT, A.D.; LIEBELT, E.L. Alternating reduction in children: an unfounded practice passed down to parents from pediatricians. *Clin. Ped.*, v. 46, n. 2, p. 146 - 150, 2007.

ZEAITER, M. RUTLEDGE, D. Preprocessing Methods. *In: Comprehensive chemometrics – chemical and biochemical data analysis*, v. 3, Elsevier, 2009

**ANEXO A** - Resumo do trabalho aceito para apresentação na forma de pôster no VIII Colloquium Chemometricum Mediterraneum (CCM)



**Determination of Paracetamol and Ibuprofen in tablets and urine using spectrofluorimetric determination coupled with chemometrics**

*Aderval S. Luna\*, Jéssica S. A. Pinho*

*Rio de Janeiro State University – 524, Rua São Francisco Xavier – Maracanã – Rio de Janeiro – Brazil, 20550-013*

*E-mail [asluna@uerj.br](mailto:asluna@uerj.br)*

Paracetamol (PAR) and Ibuprofen (IBU) are among the most consumed drugs in the world. Many methods were used for individual determination of each one of these drugs in tablets, but official methods for determination of both species are based on HPLC with UV detection. The fact of PAR and IBU present overlap spectra in UV it is not possible to perform precise and simultaneous determinations. The objective of this research is developing a methodology to determinate IBU in aqueous standard, tablets and urine samples. The multivariate calibration was used to identify both of them in tablets and urine samples.

**ANEXO B** – Trabalho publicado em 18/06/2014 em *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*

**Austin Journal of Analytical and  
Pharmaceutical Chemistry**

 **Austin**  
Publishing Group

Open Access  
Full Text Article 

Research Article

## Determination of Paracetamol and Ibuprofen in Tablets and Urine Using Spectrofluorimetric Determination Coupled with Chemometric Tools

**Luna AS\* and Pinho JSA**

Department of Analytical Chemistry, Rio De Janeiro State University, Brazil

\***Corresponding author:** Luna AS, Department of Analytical Chemistry, Rio de Janeiro State University, 524, São Francisco Xavier St, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, Tel: +55 21 23340563; Fax: + 55 21 23340159; Email: asluna@uerj.br

**Received:** June 06, 2014; **Accepted:** June 17, 2014;

**Published:** June 18, 2014

### Abstract

It was developed a methodology for spectrofluorimetric determination of Paracetamol (PAR) and Ibuprofen (IBU) in tablets (synthetic mixtures) and biological fluids (urine) coupled with chemometrics. For tablet's determination, it was used PLS (*Partial Least Squares*) and for urine samples it was used PARAFAC (*Parallel Factor Analysis*). In both cases, it was possible to quantify both analytes in samples. The proposed methodology showed effectiveness and offered excellent results in the determination of PAR and IBU. Recovery study test was performed in urine samples, and it offered good results also. Figures of merit were established.

**Keywords:** Paracetamol; Ibuprofen; PARAFAC; Spectrofluorimetric determination; Urine, Drugs

**ANEXO C** – Capítulo de livro aceito e publicado em dezembro de 2015 pela *Nova Science Publishers, NY, USA*.

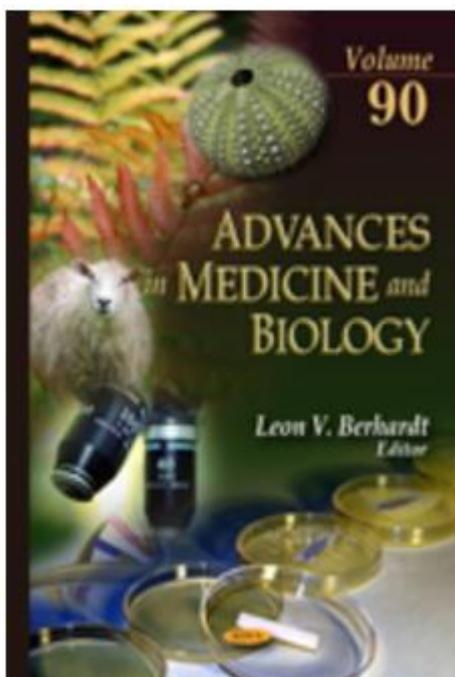


The screenshot shows the website interface for Nova Science Publishers. At the top, there are links for 'ACCOUNT' and 'VIEW CART'. The main navigation bar includes 'Home', 'Books', 'Series', 'Journals', 'Reference', 'eBooks', 'Information', 'Sales', 'Imprints', and 'for Authors'. Below this, there is a 'Medical General' category and links for 'My Account', 'Cart Contents', and 'Checkout'.

The main content area displays the book title 'Advances in Medicine and Biology, Volume 90'. The retail price is listed as \$190.00, and the current price after a 100% online discount is \$171.00. The editors are listed as Leon V. Berhardt.

**Book Description:**  
 In this next edition of "Advances in Medicine and Biology," chapters include research on the obesity prevention programs for elementary school-age children; foreign body ingestion in children; the use of fluorescent tracer retrograde labeling to identify somatosensory dorsal root ganglia neurons; the contribution of PGE2 induced nociceptor sensitization and potentiation to chronic pain conditions; ultrasounds for trigeminal neuralgia; postoperative monitoring after free tissue transfers; the mobilization, collection and transfusion of granulocytes; the defects of granulocytes and granulopoiesis; near infrared spectroscopy in neonatal clinical monitoring and in the food and pharmaceutical industries; and Sarco(end)Plasmic Reticulum Calcium-ATPases (SERCAs) and MicroRNAs. (Imprint: Nova Biomedical)

There is a small thumbnail image of the book cover with a 'Click to enlarge' link below it.



Chapter 10

Application of Near Infrared Spectroscopy in the Food and Pharmaceutical Industries

(Aderval S. Luna and Jéssica S. A. Pinho, Rio de Janeiro State University, Department of Analytical Chemistry, Maracanã - Rio de Janeiro, Brazil)

pp. 177-186

**Series:**

Advances in Medicine and Biology

**Binding:** Hardcover**Pub. Date:** 2015 - 4th Quarter**Pages:** 7x10 - (NBC-R)**ISBN:** 978-1-63483-643-2**ANEXO D** – Trabalho submetido em 03/02/2016 em *Analytical Methods***Analytical  
Methods****Discrimination of adulterants in UHT milk samples by NIRS  
coupled with supervision discrimination techniques.**

Article Type:	Paper
Date Submitted by the Author:	03-Feb-2016
Complete List of Authors:	Luna, Aderval S. ; Rio de Janeiro State University, Analytical Chemistry Pinho, Jessica; Universidade do Estado do Rio de Janeiro Machado, Luciana; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Analytical Chemistry

**ANEXO E** – Trabalho futuro (*Projeto em colaboração com o Prof. Dr. Wagner Felipe Pacheco – UFF*)

***Desenvolvimento e aplicação de metodologia analítica para confirmação da identidade das cervejas comercializadas nos bares do Rio de Janeiro***

**Resumo**

*O objetivo desse projeto de pesquisa é desenvolver um método de caracterização química que permita identificar as cervejas em função de sua marca. Essa caracterização química será feita por espectrofluorimetria com varredura sincronizada conjugada com métodos quimiométricos de classificação.*

**ANEXO F** – Orientações (*trabalho de conclusão de curso - monografia, iniciação científica - IC e estágio interno complementar - EIC*) realizadas durante o doutorado.

1. Jacqueline Alexandra Santos Leão. Uso da quimiometria na indústria de fármacos e alimentícia. Modalidade: IC – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 10/2015 – em andamento (co – orientadora).

2. Jéssica Paloma de Assis Barros. Determinação simultânea de ácido acetilsalicílico (AAS) e cafeína (CAF) em medicamentos e urina por espectrofluorescência molecular e calibração multivariada. Modalidade: EIC – Universidade do Estado do Rio Janeiro, 05/2015 – em andamento.

3. Joice Aparecida Ribeiro de Lima Damasceno. Educação Ambiental no processo de ensino – aprendizagem da química. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Licenciatura em Química) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2014.

4. Eron Simplicio. Uso da quimiometria na indústria de fármacos e alimentícia. Modalidade: IC – Universidade do Estado do Rio d3 Janeiro, 04/2014 – 10/2015 (co – orientadora).

5. Lenise Rodrigues da Silva. Atividades lúdicas no ensino de química: uma visão dos alunos do ensino médio. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Licenciatura em Química) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2013.

6. Andrezza de Oliveira Braga. Descarte de pilhas e baterias: um debate para conscientização ambiental em sala de aula. Trabalho de conclusão de curso

(Graduação em Licenciatura em Química) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2013.