



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

*Um fotômetro LED-NIR duplo feixe microcontrolado e portátil
para análise screening e quantitativa de medicamentos
injetáveis de forma não invasiva*

Fátima Aparecida Castriani Sanches

SAPIENTIA ÆDIFICAT

João Pessoa/PB - Brasil

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

*Um fotômetro LED-NIR duplo feixe microcontrolado e portátil
para análise screening e quantitativa de medicamentos
injetáveis de forma não invasiva*

Trabalho submetido ao programa de Pós-graduação em química, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal da Paraíba.

Aluna: Fátima Aparecida Castriani Sanches

Orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

Co-Orientador: Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva

Bolsista:



João Pessoa/PB - Setembro de 2013

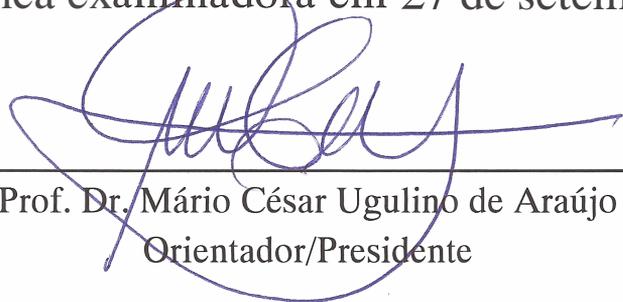
S211u Sanches, Fátima Aparecida Castriani.
Um fotômetro LED-NIR duplo feixe microcontrolado e portátil para análise screening e quantitativa de medicamentos injetáveis de forma não invasiva / Fátima Aparecida Castriani Sanches.-- João Pessoa, 2013.
126f. : il.
Orientador: Mário César Ugulino de Araújo
Coorientador: Edvan Cirino da Silva
Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN
1. Química. 2. Fotômetro LED-NIR duplo feixe. 3. Análise screening. 4. Medicamentos injetáveis. 5. Dipirona.

UFPB/BC

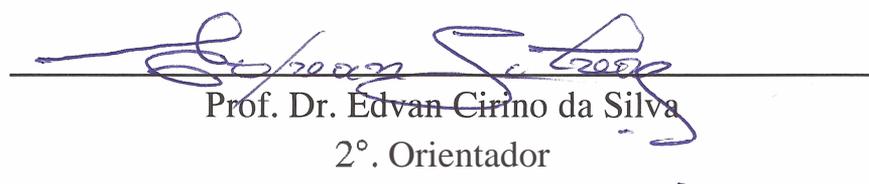
CDU: 54(043)

Um fotômetro dual LED-NIR duplo feixe microcontrolado e portátil para análise screening e quantitativa de medicamentos injetáveis de forma não invasiva.

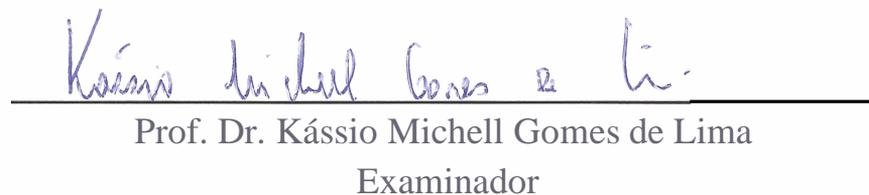
Tese de Doutorado de Fátima Aparecida Castriani Sanches aprovada pela banca examinadora em 27 de setembro de 2013:



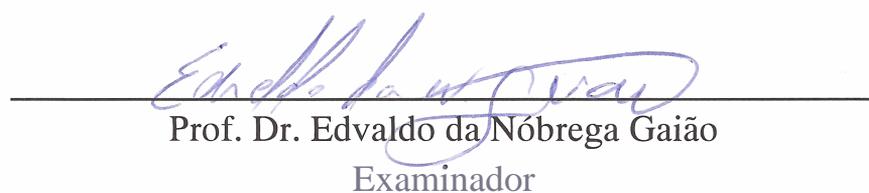
Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo
Orientador/Presidente



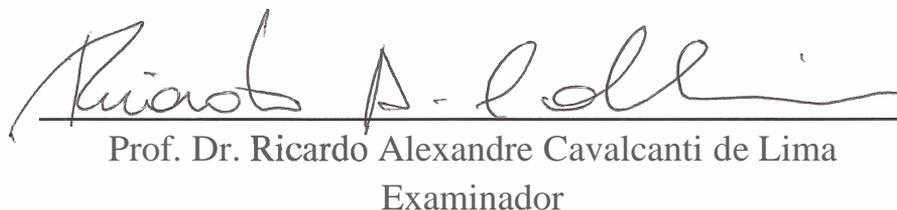
Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva
2º. Orientador



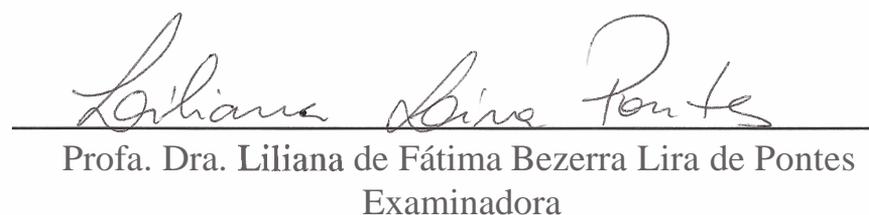
Prof. Dr. Kássio Michell Gomes de Lima
Examinador



Prof. Dr. Edvaldo da Nóbrega Gaião
Examinador



Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima
Examinador



Profa. Dra. Liliana de Fátima Bezerra Lira de Pontes
Examinadora

*Em Deus, cuja palavra louvo, ponho minha
confiança, minhas palavras e meu pensamento.*

*E, à minha querida família, principalmente
aos meus amados filhos, como incentivo,
com muito amor,
dedico .*

Quando se consegue chegar ao final do trabalho proposto, pode-se sentir o peso das contribuições dadas por pessoas que ao ajudarem, mesmo supondo serem contribuições simples, muitas vezes não avaliam o peso de suas atitudes para quem as recebeu. Minha profunda gratidão a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho e particularmente:

- Ao Professor Doutor Mário Cesar, pela orientação concedida, que possibilitou a execução deste trabalho; e também pela amizade e confiança demonstradas em todos esses anos de convivência e orientações científicas.

- Ao Professor Dr. Edvan Cirino pela co-orientação, pela grande ajuda prestada na correção deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, pelas conversas enriquecedoras, e pela amizade e respeito desenvolvidos.

- Aos queridos amigos: Flaviano Carvalho, Daniel Jackson, Stefani Yuri, Wellington Lira, David, e em especial ao grande amigo Carlos Xavier, pela ajuda, pelo incentivo, pelo companheirismo e solidariedade. A estes os meus humildes e sinceros agradecimentos.

- Aos professores Dr. Márcio Coelho e Dr. Ricardo Alexandre, pela enriquecedora contribuição concedida no exame de qualificação e, por iguais méritos, aos professores Doutores que compuseram a banca de avaliação final deste trabalho.

- À CAPES, pela bolsa concedida que possibilitou a realização desta tese.

- À indústria químico-farmacêutica Farmace, em especial ao Gerente Industrial Sr. Willian, que tão prontamente e eficientemente colaborou com o desenvolvimento desta pesquisa científica.

- Aos professores e amigos do Departamento de Farmácia, Departamento de Química e da Pós Graduação, pelos conhecimentos ministrados. E aos amigos de outros laboratórios de pesquisa.

- Aos amigos do LAQA, do CTBio (LTF), da UFPB, da UFPE, da EMBRAPA, da UFCG, da UEPB, da UNICAMP e do IFPB.

- Aos meus pais, em especial à minha querida mãe, uma mulher guerreira, por quem sinto muito respeito, admiração e orgulho. À minha irmã e querida amiga Madalena e sua família.

- Ao meu esposo Valter Adriano, pelo incentivo, amor e compreensão.

- Aos meus queridos e tão amados filhos: George Lucas, Eyder Gabriel e Caio Fábio, verdadeira fonte de minha inspiração.

Não existe o “melhor método” em termos absolutos, senão o “método mais adequado” para a resolução de um problema concreto.

M. Pistonesi

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I	
1.0. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Apresentação do trabalho desenvolvido	4
1.2. OBJETIVOS.....	5
1.2.1 Objetivo Geral	5
1.2.2. Objetivo Específicos	5
CAPÍTULO II	
2.0. FUNDAMETAÇÃO TEÓRICA.....	8
2.1. Instrumentação em Química Analítica.....	8
2.2. Espectrometria Molecular na região do Infravermelho Próximo.....	9
2.2.1. Origem do sinal analítico na região NIR.....	11
2.2.2. Uso do sinal NIR para fins analíticos	15
2.3. Instrumentação NIR.....	18
2.4. Instrumentação a Base de LEDs	18
2.4.1. Diodos emissores de luz - LED	23
2.4.2 Detectores e/ou Fototransdutores	25
2.4.3 Microcontroladores PIC	27
2.4.4 Módulo LCD do Tipo Alfanumérico.....	28
2.5. Medicamentos.....	29
2.5.1. Medicamentos injetáveis ou parenterais	30
2.5.2. Dipirona sódica injetável	32
2.5.2.1. Métodos de análise do teor de dipirona sódica em medicamentos.....	34
2.5.2.1a. Metodologia Oficial.....	35
2.5.2.1b. Metodologias alternativas descritas na literatura	36
2.5.3. Estabilidade de medicamentos injetáveis	39
2.6. Análises do tipo Screening	42
2.7. Parâmetros de Validação da Curva Analítica.....	48

2.7a. Especificidade/Seletividade	49
2.7b. Função da resposta (gráfico analítico).....	49
2.7c. Intervalo de trabalho	50
2.7d. Linearidade.....	50
2.7e. Sensibilidade.....	51
2.7f. Exatidão.....	51
2.7g. Precisão.....	52
2.7h. Limite de detecção.....	53
2.7i. Limite de quantificação	54
2.7j. Robustez.....	55
2.8 Tratamento Estatístico da Curva Analítica da dipirona sódica injetável	55

CAPÍTULO III

3.0. FOTÔMETRO LED-NIR DUPLO FEIXE.....	58
3.1. Descrição do Fotômetro LED-NIR duplo feixe	58
3.1.1. Suporte para Cella de Medidas	59
3.1.2. Fonte de Radiação.....	59
3.1.3. Fototransdutor.....	61
3.1.4. Microcontrolador	62
3.2. Eletrônica do Fotômetro NIR desenvolvido	64
3.2.1. Fonte de Alimentação.....	66
3.2.2. Módulos de Amplificação e Detecção	66
3.2.3. Módulo Demodulador	68
3.2.4. Amplificação final	68
3.2.5. Módulo de Processamento e Controle	68
3.2.6. Módulo USB	69
3.2.7. Módulo LCD.....	69
3.3. Descrição Painel de controle do fotômetro duplo canal.....	71
3.3.1. Painel frontal.....	71
3.3.2. Painel posterior ou trazeiro	73
3.4. Software de controle do fotômetro desenvolvido	74

CAPÍTULO IV

4.0. EXPERIMENTAL	80
4.1. Experimental utilizando espectrômetro NIR comercial	80
4.1.1. Aquisição de amostras e preparo de soluções sintéticas	80
4.1.2. Aquisição dos espectros na região NIR.....	80
4.2. Experimental utilizando fotômetro LED-NIR desenvolvido.....	81
4.2.1. Aquisição de novas amostras comerciais e produção de novos padrões sintéticos	82
4.2.2. Materiais e equipamentos.....	83
4.2.3. Procedimento de calibração do fotômetro LED-NIR.....	83
4.2.4. Análise tipo screening usando o fotômetro LED-NIR.....	84
4.2.5. Curva analítica usando o fotômetro LED-NIR	84
CAPÍTULO V	
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.1. Resultados do estudo com o espectrofômetro NIR comercial	87
5.1.3. Estudo e Seleção da Região Espectral NIR.....	87
5.1.4. Tratamento estatístico para a escolha dos LEDs.....	91
5.2. Resultados do estudo com o espectrofômetro NIR comercial	96
5.1 Avaliação de desempenho do fotômetro NIR na análise Screening.....	96
5.2 Avaliação de desempenho do fotômetro NIR na análise quantitativa	101
CAPÍTULO VI	
6.0 CONCLUSÕES.....	109
6.1 Propostas futuras.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
ANEXOS	127

Figura 1	Curvas de energia potencial para uma molécula diatômica heteronuclear - Modelo do oscilado harmônico (a) e anarmônico (b).....	12
Figura 2	Espectros de emissão de 9 LEDs na região do infravermelho próximo (800-1600nm).....	24
Figura 3	Fórmula estrutural da dipirona sódica.....	32
Figura 4	Mecanismo de ação dos AINEs.....	33
Figura 5	Curvas de probabilidade de respostas positivas P(x) versus concentração x de uma <i>screening</i> real.....	44
Figura 6	Regiões de confiabilidade e de não confiabilidade de um sistema <i>screening</i>	45
Figura 7	Relação entre a zona de especificação e a zona de conformidade. Onde LIE representa o limite inferior e LSE o limite superior de calibração e U a região de incerteza de medição (que inclui os falsos positivos e os falsos negativos)	46
Figura 8	Regiões de confiabilidade e de não confiabilidade de um sistema <i>screening</i> , com dois pontos de corte representados por C e D.....	47
Figura 9	Vista frontal do fotômetro LED-NIR microcontrolado.....	58
Figura 10	Vista posterior do fotômetro LED-NIR microcontrolado.....	58
Figura 11	Vista frontal ilustrando o suporte para celas e ampolas na lateral do fotômetro.....	59
Figura 12	LEDs-NIR de InGaAsP utilizados no FDNIR.....	60
Figura 13	Dimensionamento do exterior dos LEDs utilizados, unidade em mm	60
Figura 14	Espectro de emissão de um LED com comprimento de onda nominal em 1050 nm.....	60
Figura 15	Sensor de Radiação utilizado no Fotômetro NIR	61
Figura 16	Dimensionamento do exterior do sensor de radiação utilizado no fotômetro, unidade em mm.....	61

Figura 17 Resposta típica relativa do fototransdutor de InGaAs (LAPD-2-09-17-TO39). Em (a) Responsividade em voltagem contínua, e em (b) Resposta espacial.....	61
Figura 18 Microcontrolador PIC18F4550.....	62
Figura 19 Pinagem do microcontrolador PIC18F4550.....	63
Figura 20 Diagrama de auto nível (top level) dos circuitos eletrônicos do fotômetro LED- NIR proposto, desenvolvido em plataforma Altium	65
Figura 21 Módulo LCD 20x2	70
Figura 22 Vista frontal do painel de controle do fotômetro.....	71
Figura 23 Vista posterior (traseira) do painel de controle do fotômetro.....	73
Figura 24 Vista da tela inicial do software de controle do fotômetro LED- NIR.....	75
Figura 25 Tela do software ilustrando as opções de escolha de calibração do instrumento para o método screening.....	76
Figura 26 Vista da tela do software de controle do fotômetro LED-NIR ilustrando a sessão Calibração.....	77
Figura 27 Tela do software ilustrando as opções de escolha de calibração do instrumento para a curva analítica.....	78
Figura 28 Instrumentação usada para o registro dos espectros NIR, ilustrando as ampolas no suporte de Teflon dentro do Espectrômetro FT-IR.....	81
Figura 29 Espectros brutos das amostras e dos padrões na região NIR entre 4000 a 14000 cm ⁻¹	87
Figura 30 Espectros brutos das amostras e padrões na região NIR entre 7500 a 10450 cm ⁻¹	88
Figura 31 Espectros de absorbância das amostras (espectros coloridos de menor intensidade) sobrepostos pelo espectro da água (espectro, em azul, de maior intensidade) na	

região NIR entre 7500 a 14000 cm^{-1}	88
Figura 32 Espectros de absorvância das amostras (espectros coloridos de menor intensidade) sobrepostos pelo espectro da água (espectro, em azul, de maior intensidade) na região NIR entre 7500 a 14000 cm^{-1}	89
Figura 33 Espectros brutos das amostras e padrões na região NIR entre 8200 a 9110 cm^{-1}	89
Figura 34 Atribuições de bandas NIR de sobretons e combinações.....	90
Figura 35 Variação do RMSEV (% m/v) em função do número de variáveis selecionadas pelo SPA-MLR.....	92
Figura 36 Espectro NIR de uma amostra de dipirona sódica, indicando as variáveis selecionadas pelo SPA-MLR.....	93
Figura 37 Variação do RMSECV (% m/v) em função do número de fatores PLS global	93
Figura 38 Variáveis selecionadas pelo algoritmo <i>i</i> SPA-PLS usando 2 variáveis latentes	94
Figura 39 Valores de referência versus os valores preditos pelo modelo <i>i</i> SPA-PLS usando 2 variáveis latentes.....	95
Figura 40 Intervalo selecionado pelo algoritmo <i>i</i> SPA-PLS usando 1 variável latente	96
Figura 41 Curva de desempenho de dipirona para o limite de corte 47,5% m/v.....	99
Figura 42 Curva de desempenho de dipirona para o limite de corte 55% m/v.....	99
Figura 43 Gráfico de dispersão dos valores médios das medidas (n = 10) das 14 amostras para o método <i>screening</i>	100
Figura 44 Gráfico de dispersão dos valores médios das medidas (n = 10) das 14 amostras para o método <i>screening</i> , com as regiões de confiabilidade das análises.....	100
Figura 45 Curva analítica usando os LEDs de 1050 nm.....	110
Figura 46 Gráfico dos resíduos da primeira curva analítica.....	103
Figura 47 Dispersão entre as contrações dos lotes analisados, onde: ■ ilustra o maior valor encontrado, e ◆ representa o menor valor encontrado pelo fotômetro.	107

Tabela 1. Regiões espectrais do Infravermelho.....	10
Tabela 2. Especificações com valores aproximados de respostas para detectores NIR.....	26
Tabela 3. Tipos de módulos LCD mais comuns.....	29
Tabela 4. Equações para a análise de variância de dados experimentais adaptados a modelos lineares determinados pelo método dos mínimos quadrados.....	55
Tabela 5. Descrição dos pinos do módulo LCD 20x2 usado no fotômetro desenvolvido.....	70
Tabela 6 - Respostas positivas e negativas obtidas pela análise <i>screening</i> , onde N representa amostra não conforme, e conf. representa amostra conforme.....	97
Tabela 7 - Número e taxa de respostas positivas e negativas obtidas em sete níveis de concentração ao redor do limite de corte inferior (47,5 % m/v).....	98
Tabela 8 - Número e taxa de respostas positivas e negativas obtidas em sete níveis de concentração ao redor do limite de corte superior (55 % m/v).	98
Tabela 9 - Análise de variância para o ajuste do modelo linear, usando LEDs de 1050 nm.	102
Tabela 10 - Lotes, validade e quantidade das amostras comerciais adquiridas para análise.	104
Tabela 11 - Dados obtidos da análise amostral dos lotes de dipirona sódica analisadas com o fotômetro, e com método de referência, juntamente com os valores de análise fornecidos pela indústria farmacêutica.....	105
Tabela 12 - Apresentação dos maiores e dos menores valores obtidos na análise dos lotes de dipirona sódica injetável pelo fotômetro LED-NIR	106

<i>AINES</i>	Antiinflamatórios Não Esteroidais
<i>ANVISA</i>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>CLAE</i>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>UV-VIS</i>	Ultravioleta e Visível
<i>FT-IR</i>	Infravermelho-Transformada de <i>Fourier</i>
<i>MIR</i>	Infravermelho Médio
<i>NIR</i>	Infravermelho Próximo
<i>FAR</i>	Infravermelho Distante
<i>LED</i>	Diodos Emissores de Luz
<i>LCD</i>	Tela de Cristal Líquido
<i>ICP-OES</i>	Espectroscopia de Emissão Ótica por Plasma Indutivamente Acoplado
<i>PCA</i>	Análise de Componentes Principais
<i>MLR</i>	Regressão Linear Múltipla
<i>PLS</i>	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais
<i>SPXY</i>	Partição do Conjunto de Amostras Baseado nas Distancias Conjuntas X-y
<i>SPA</i>	Algoritmo das Projeções sucessivas
<i>iPLS</i>	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais por Intervalo
<i>RMSEV</i>	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Validação
<i>RMSEP</i>	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Previsão
<i>CCD</i>	Dispositivo de Carga Acoplada

RESUMO

Título: *Um fotômetro LED-NIR duplo feixe microcontrolado e portátil para análise screening e quantitativa de medicamentos injetáveis de forma não invasiva.*

Autor: Fátima Aparecida Castriani Sanches

1º Orientador (a): Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

2º Orientador (a): Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva

Neste trabalho foi desenvolvido um fotômetro LED-NIR duplo feixe microcontrolado e portátil para análise *screening* e quantitativa de medicamentos injetáveis de forma não destrutiva/não invasiva, visando investigar a conformidade desses com os valores estabelecidos na Farmacopéia Brasileira. O medicamento analisado foi a dipirona sódica injetável 1g/2mL, comercializados em ampolas de coloração âmbar. Foram realizados inicialmente estudos espectroscópicos empregando um espectrofotômetro comercial para avaliar quais as melhores regiões do espectro NIR que poderiam ser empregadas para a determinação da espécie de interesse. O instrumento desenvolvido utiliza dois LEDs-NIR com emissão de radiação nominal em 1050 ± 50 nm gêmeos (de mesmas especificações técnicas), dois fotodiodos de InGaAs também idênticos e um microcontrolador PIC18F455. Como dispositivos de saída do instrumento foram empregados o microcontrolador PIC acoplado a um display de cristal líquido 20x2, o qual também se comunica com um microcomputador portátil por comunicação USB 2.0. O instrumento foi avaliado com amostras comerciais de dipirona sódica injetável por medidas de absorbância efetuadas diretamente nas ampolas dos medicamentos injetáveis. O fotômetro foi calibrado com soluções padrão de dipirona e seu desempenho foi avaliado na análise de 620 amostras comerciais de dipirona injetável, das quais 320 apresentavam prazo de validade expirado. O instrumento obteve elevado índice de acerto para a análise *screening* (91%). Para determinação quantitativa do princípio ativo dipirona, uma resposta linear foi obtida [$R^2 = 0,9964$, $A = 0,0068 + 0,0043 C$ (% m/v)] na faixa de concentração de: 5 a 60 % m/v. Também foi obtido um baixo erro relativo conjunto (0,40 %) e boa precisão nas análises (desvio padrão relativo conjunto = 2,13%).

Palavras Chaves: Fotômetro *LED-NIR* duplo feixe, análise *screening*, medicamentos injetáveis, dipirona.

ABSTRACT

Title: *A micro-processor controlled and portable dual-beam LED-NIR photometer for non-invasive quantitative and screen analyses of injectable drugs.*

Author: Fátima Aparecida Castriani Sanches

1st Supervisor (a): Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

2nd Supervisor (a): Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva

In this work, a portable LED - NIR double beam micro-processor controlled photometer for non-destructive/non-invasive screening and quantitative analysis of injectable medicines was developed to assess conformity with values established by the Brazilian Pharmacopoeia. The product analyzed was injectable dipyron (1g/2 mL) sold in amber colored vials of 1.1 cm outer diameter, and 6 cm in height. Initially, spectroscopic studies were carried out employing a commercial spectrophotometer to assess the best NIR spectrum regions that might be used. The instrument developed used two twin LEDs with NIR radiation emissions rated at 1050 ± 50 nm. Two InGaAs photodiodes (also identical), and a PIC18F455 microcontroller were used as well. The output of the instrument used a PIC microcontroller coupled to a 20x2 liquid crystal display which communicated with a PC by USB 2.0 for communication. The instrument evaluated commercial dipyron injection samples using absorbance measurements made directly from ampoules of the injectable medicines. The photometer was calibrated with standard solutions of dipyron, and its performance was evaluated by an analysis of 620 of the commercial dipyron injection samples, where 320 were expired. The instrument had a high success rate for screening analysis (91%). For quantitative determination of the active dipyron, a linear response was obtained [$R^2 = 0.9964$, $A = 0.0068 + 0.0043 C$ (% w/v)] in the concentration range of 5 to 60% m/v. We also obtained a low relative error of 0.40%, and good accuracy in the analyses with a relative standard deviation of 2.13%.

Key words: dual-beam LED-NIR photometer, screening analysis, injectable drugs, dipyron.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

A administração segura e precisa de medicamentos é uma das mais importantes responsabilidades dos profissionais de saúde, sendo a eficiência na administração de medicamentos uma das habilidades mais relevantes que estes profissionais procuram levar ao leito do paciente. Entretanto, de nada vale se a qualidade e a integridade das formulações farmacêuticas estiverem comprometidas.

A qualidade dos medicamentos é um atributo de caráter não apenas comercial, mas também legal e moral. Embora a maioria das indústrias farmacêuticas operem com padrões de qualidade estabelecidos internacionalmente, muitos dos medicamentos produzidos ainda chegam ao mercado consumidor fora desses padrões^[1]. Além disso, sabe-se que em muitos setores de saúde no Brasil as condições de transporte e armazenamento dos medicamentos (por exemplo, exposição à luz e umidade) estão longe das ideais preconizadas pelos fabricantes e órgãos de fiscalização^[2]. Este problema acarreta graves conseqüências na qualidade do medicamento, mesmo que este esteja dentro do prazo de validade^[3].

O Brasil produz, distribui e comercializa anualmente mais de 1 bilhão de remédios e o segmento nacional ocupa a nona colocação no mercado mundial^[4]. Não obstante, devido às falhas na aplicação da legislação vigente, o número de apreensões de medicamentos fora das especificações sanitárias, somente nos anos de 2008 e 2009, aumentou 730%^[4]. Quando o medicamento administrado não é autêntico, devidamente registrado e conservado corretamente, os sintomas da doença em tratamento podem ser agravados ou mesmo haver ineficácia terapêutica. Em situações mais graves, pode haver risco de intoxicações severas que coloquem em risco a vida do usuário (paciente/consumidor) podendo levá-lo a óbito^[5]. No caso de medicamentos injetáveis, como a medicação uma vez administrada é sempre disponibilizada diretamente na corrente sanguínea do paciente, é praticamente impossível retirá-la. Desse modo, os riscos à saúde são fortemente potencializados e o risco de morte é eminente^[6].

Para se determinar todos os parâmetros de qualidade dos medicamentos injetáveis em um processo industrial, precisa-se normalmente de um grande número de análises. Atualmente, a maioria das análises quantitativas é realizada empregando-se métodos instrumentais, sendo as metodologias mais comumente utilizadas no controle de qualidade de fármacos: a espectrometria na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)^[7]. Como as análises são sempre realizadas na forma de amostragem, tanto nas etapas de produção (doseamento e produto final) como na fiscalização, não se tem um acompanhamento integral da vida útil do medicamento, desde a sua produção até o momento imediatamente anterior à sua

administração no paciente. É justamente nesse meio tempo que os medicamentos estão sujeitos à decomposição e à degradação do seu princípio ativo, o que leva à perda de suas propriedades terapêuticas^[8]. Todos os procedimentos de referência adotados pela Farmacopéia Brasileira^[9,10] para a análise de medicamentos injetáveis, além de necessitarem de muita atenção e manipulação analítica, exigem a violação das embalagens (ampolas ou frascos) e o consumo dos medicamentos durante a análise. Como as amostras são violadas fisicamente, consumidas e na maioria das vezes contaminadas (ou seja, perdem sua inviolabilidade) muitas vezes este fato impede que as mesmas possam ser utilizadas como contraprova para fins jurídicos. Isso dificulta o trabalho da fiscalização, e, muitas vezes, chega a impedir a punição dos responsáveis. Ademais os métodos de referência, que empregam usualmente equipamentos de médio e grande porte, não permitem a realização de análises preliminares *in situ* dificultando a ação fiscalizadora.

Uma boa alternativa para a análise química de medicamentos e para auxiliar o trabalho de fiscalização é a utilização de fotômetros. Os fotômetros são instrumentos simples, portáteis e relativamente baratos para a determinação analíticas de diversos analitos^[11]. Um fotômetro consiste de uma fonte de radiação, filtro (quando necessário), e um transdutor fotoelétrico, bem como de um processador de sinal e de um dispositivo de saída. Pesquisadores e fabricantes de instrumentos referem-se aos fotômetros como colorímetros e colorímetros fotoelétricos^[11], quando esses aparelhos operam apenas na região do espectro visível. Os fotômetros são muitas vezes mais robustos e mais fáceis de manipular que os espectrofotômetros mais sofisticados. Mais ainda, os fotômetros apresentam, de forma característica, fonte de radiação com potencia considerável e, portanto, boa relação sinal-ruído com transdutores e circuitos relativamente simples e baratos^[11,12]. Nos casos em que alta pureza espectral não é importante para o método, as análises quantitativas podem ser realizadas usando um fotômetro com confiabilidade similar à obtida com uma instrumentação mais complexa. Alguns fotômetros desenvolvidos utilizam filtro único ou não dispersivos, e outros usam filtros tipo cunha no lugar de um elemento dispersivo de seleção de comprimento de onda^[11]. Porém, com o avanço da tecnologia, observou-se na química analítica a tendência de diminuir as dimensões físicas não só da instrumentação analítica, como também dos dispositivos eletrônicos, tornando-se comum a produção e o uso de dispositivos eletrônicos com dimensões cada vez menores. O avanço tecnológico permitiu ainda que as fontes de radiação se tornassem menores e com largura de banda de emissão bastante estreitas, como é o caso dos Diodos Emissores de Luz (*Light Emission Diodes*, LEDs)^[12-14]. Esses dispositivos são estáveis, apresentam alta potência de emissão e longa durabilidade, apresentando-se como uma boa alternativa para a confecção de instrumentos analíticos modernos^[11].

Uma região espectral com enorme potencial para análises quantitativas é a região de Infravermelho Próximo (*Near infrared*, NIR)^[15]. Devido a suas características intrínsecas, essa região tem ganhado espaço na química analítica moderna para análises diversas na cadeia produtiva industrial, desde a análise de matéria prima bruta até a análise de produtos acabados. Ao combinar as vantagens da técnica NIR com fotômetros portáteis, baseados em LEDs-NIR e fototransdutores específicos, encontra-se a junção perfeita para análises delicadas, que requerem pouca manipulação analítica, e que garantam a integridade física e química da amostra antes, durante e após sua análise. O desenvolvimento e construção de instrumentos com essas características apresentam uma vasta aplicabilidade comercial, e poderá atender futuramente a demanda das análises de medicamentos injetáveis, de modo a manter sua integridade e garantir sua qualidade.

1.1. Apresentação do trabalho

De acordo com a literatura^[16-21], os fotômetros desenvolvidos empregando LED-NIR como fonte de radiação, desenvolvidos até o presente momento, não foram explorados para análises qualitativas, nem para análises quantitativas de medicamentos. Além disso, não aproveitaram a característica mais destacada dos fotômetros NIR que é a possibilidade de realizar as medições de amostras diretamente em sua embalagem de origem.

Nessa linha de raciocínio e pelo aumento da demanda por análises químicas rápidas e de baixo custo, torna-se necessário desenvolver instrumentos que permitam realizar medidas rápidas e com a mesma confiabilidade proporcionada pelos instrumentos comerciais.

Face ao exposto, propõe-se, neste trabalho, o desenvolvimento de um fotômetro duplo feixe a base de LED na região do NIR, para a análise quantitativa de fármacos em medicamentos injetáveis.

O instrumento proposto apresenta dois LEDs-NIR idênticos, como fonte de radiação, e dois fotodiodos de InGaAs, como fototransdutor. A radiação proveniente do LED é direcionada diretamente para a ampola do medicamento em análise, para a realização das medidas de absorvância. O gerenciamento e controle do instrumento, e a aquisição e transferência de dados para um computador pessoal, são realizados pelo circuito eletrônico baseado em um microcontrolador. O armazenamento e tratamento dos dados são realizados por um *software* desenvolvido em ambiente *Labiew* v10.0.

O medicamento escolhido para as análises foi a dipirona sódica injetável 1g/2mL (500 mg/mL), comercializada em frasco ampola de 2 mL de coloração âmbar. Esse medicamento foi selecionado em virtude de sua importância terapêutica e elevado consumo em clínica

médico/hospitalar. Adicionalmente, esse medicamento apresenta baixo custo de comercialização e tem ampla disponibilidade no mercado brasileiro.

Devido à característica da análise focalizada, foi possível desenvolver um fotômetro de baixo custo, microcontrolado, leve, de fácil portabilidade, simplicidade de acesso, e facilidade de uso e manipulação pelos analistas. O instrumento foi desenvolvido de modo a poder realizar análises de medicamentos injetáveis diretamente em suas ampolas, sem qualquer violação física ou química das amostras evitando a destruição, o consumo e a contaminação das mesmas. A análise realizada por este instrumento deve permitir a identificação de possíveis produtos fora das especificações quantitativas esperadas para o fármaco em análise, ou seja, não conformes com os valores fornecidos pelas indústrias farmacêuticas produtoras.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo central desenvolver e construir um fotômetro duplo feixe a base de LEDs-NIR, microcontrolado, dedicado, portátil e de baixo custo visando à implementação de metodologias para verificação da conformidade e/ou determinação quantitativa do teor de fármacos em soluções injetáveis, diretamente em seus recipientes de origem (suas ampolas), sem violá-los.

1.2.2. Objetivo Específicos

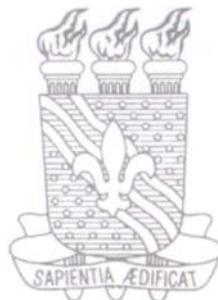
- i. Explorar técnicas de seleção de variáveis para selecionar o(s) melhor(es) comprimento(s) de onda para o desenvolvimento e montagem de um fotômetro NIR dedicado à identificação e/ou determinação do parâmetro de interesse para o controle de qualidade de um medicamento injetável.
- ii. Explorar o uso de LEDs que emitem na região NIR para desenvolver e construir o fotômetro microcontrolado, portátil, usando tecnologia nacional;
- iii. Desenvolver metodologias para determinação qualitativa e/ou quantitativa de dipirona sódica injetável empregando o fotômetro NIR desenvolvido;
- iv. Possibilitar o controle de qualidade de dipirona sódica comercializada em ampola de 2 mL de uma maneira não-destrutiva, não-invasiva, econômica e confiável.

Para que os objetivos estabelecidos fossem atingidos foi necessário:

-
-
- Adquirir amostras comerciais de um medicamento injetável utilizado na clínica médico/hospitalar (o medicamento escolhido foi a dipirona sódica injetável na concentração de 1g/2mL ou 50 % m/V);
 - Aplicar a técnica desenvolvida para aquisição de espectros *NIR* diretamente nas ampolas dos medicamentos injetáveis^[22];
 - Elaborar modelos quimiométricos de calibração multivariada a partir dos espectros *NIR* registrados com um instrumento comercial, de modo a selecionar a região mais informativa, para a escolha do LED a ser utilizado no fotômetro proposto;
 - Desenvolver e construir um fotômetro a base de LEDs-*NIR* microcontrolado, portátil e de baixo custo, usando tecnologia nacional, aplicado à análise de medicamento injetável;
 - Desenvolver uma metodologia para a verificação de conformidade (ou análise preliminar para nortear uma posterior quantificação) de dipirona sódica em soluções injetáveis por intermédio de análise *screening*, empregando o fotômetro proposto;
 - Possibilitar o controle ou inspeção da dipirona injetável mediante análise *screening in situ* de maneira rápida, não-destrutiva e não-invasiva, econômica e confiável.
 - Possibilitar a quantificação da dipirona injetável, mediante uma curva analítica empregando o fotômetro desenvolvido.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA



2.0. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Instrumentação em Química Analítica

A Química Analítica, de um modo geral, compreende o conjunto de técnicas e métodos que visam caracterizar a natureza e determinar a composição de amostras de diferentes origens, em termos de elementos, espécies ou agrupamentos de átomos ou moléculas^[23]. O desenvolvimento de métodos analíticos depende do aparecimento de novos instrumentos de medida e da eletrônica. Porém, os princípios básicos que norteiam as determinações analíticas instrumentais continuam basicamente os mesmos de anos atrás. Devido à necessidade de determinação de concentrações extremamente baixas de diferentes espécies químicas, com rapidez, a análise química encontra-se dependente da disponibilidade de equipamentos modernos o que, em muitos casos, permite a automação das análises^[24].

No início do século XX, os químicos passaram a explorar outros fenômenos distintos daqueles observados nos métodos clássicos para resolver problemas analíticos^[25]. Com isso, medidas de propriedades físicas dos analitos tais como a condutividade elétrica, absorção ou emissão de luz passaram a ser utilizadas na análise quantitativa de uma grande variedade de analitos inorgânicos, orgânicos e biológicos. Novas técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência, espectroscopia e técnicas eletroanalíticas passaram a ser utilizadas para a realização de análises cada vez mais sofisticadas^[26]. Esses novos métodos de separação e determinação de espécies químicas passaram a ser conhecidos como métodos instrumentais de análise. Seu crescimento foi favorecido pelo avanço tecnológico dos dispositivos eletrônicos e dos computadores. A maioria dos equipamentos analíticos modernos possuem ou estão conectados a um ou mais dispositivos eletrônicos sofisticados capazes de detectar e registrar dados relativos aos analitos. Esses dispositivos podem ser amplificadores, circuitos integrados, microprocessadores ou mesmo computadores. De fato existem máquinas que apresentam uma imensa complexidade enquanto outras são mais simples. O cientista deve definir o problema e então decidir o método mais apropriado para solucioná-lo de acordo com suas condições^[11].

A Química Analítica Instrumental, devido ao nível de desenvolvimento alcançado e consequente complexidade adquirida, pode ser dividida de acordo com os métodos de análise utilizados na identificação e quantificação do analito^[27]. Os métodos de análise química estão divididos em: **Métodos Instrumentais Elétricos** (envolvem a medição de sinais de natureza elétrica, como corrente, voltagem, ou resistência elétrica, em função da concentração de uma certa espécie em solução); **Métodos Instrumentais Ópticos** (envolvem a medição da quantidade de energia radiante de um certo comprimento de onda que é absorvida pela amostra (métodos de

absorção), ou a medição da quantidade de energia radiante emitida em um certo comprimento de onda por uma determinada amostra (métodos de emissão); e **Métodos Instrumentais de Separação** (envolvem processos de separação empregados para separar determinadas substâncias de um mistura)^[27].

Diversas características específicas das espécies químicas são exploradas na Química Analítica. Os métodos Espectrométricos, por exemplo, utilizam conhecimentos relacionados com a interação entre a luz e a matéria. Dentre os métodos espectrométricos conhecidos, destaca-se a Espectrometria de Absorção Molecular na Região do Infravermelho Próximo (*Near Infrared*, NIR), em virtude de suas características favoráveis como: técnica analítica rápida, não destrutiva, não invasiva e que permite a análise de vários parâmetros, com pouco ou nenhum preparo da amostra^[15]. Entretanto, pouca atenção tem sido dada à região espectral de sobretons, a qual também pode ser útil na construção de instrumentos de baixo custo para controle de qualidade de medicamentos.

2.2. Espectrometria Molecular na Região do Infravermelho Próximo

A radiação na região do infravermelho foi descoberta por William Herschel, um astrônomo inglês que, em 1800, estava investigando qual cor da radiação solar produzia calor^[28,29]. Ele empregou um prisma de vidro, transparente à radiação, para decompor a luz branca do sol em seus comprimentos de onda visíveis e, com o auxílio de um termômetro com um bulbo enegrecido, pôde verificar a temperatura produzida por cada cor. Surpreendentemente, a mais intensa variação de temperatura foi observada quando o termômetro foi colocado logo acima da região vermelha do espectro. Herschel^[29] chamou esta radiação de “raios caloríficos”, que mais tarde foi denominada Infravermelho. A radiação infravermelha é uma radiação não ionizante na porção invisível do espectro eletromagnético que está adjacente aos comprimentos de onda longos, ou final vermelho do espectro da luz visível.

A espectroscopia no infravermelho^[30] trata das variações de energia molecular associadas às transições vibracionais devido à absorção ou emissão de um fóton, que não é suficientemente energético para causar uma transição eletrônica. A energia de um fóton envolvido neste fenômeno é dada por:

$$E = h \cdot \nu \quad (1)$$

onde h é a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J s) e ν é a frequência de transição. Como a radiação eletromagnética pode ser tratada como uma onda, a energia envolvida neste tipo de transição pode ser também expressa por:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (2)$$

onde c é a velocidade da luz no vácuo ($2,998 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$).

A região espectral do infravermelho^[11] compreende a radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 12800 a 10 cm^{-1} ou comprimentos de onda de 780 a 10^6 nm .

Do ponto de vista de aplicação, como também de instrumentação, o espectro no infravermelho é convenientemente dividido em infravermelho próximo (*Near Infrared*, NIR, de 780 a 2500 nm), médio (*Mid Infrared*, MIR, de 2500 a 50000 nm) e distante (*Far Infrared*, FAR, de 50000 a 10^6 nm). A **Tabela 1** apresenta maiores detalhes sobre essas regiões espectrais.

Tabela 1 - Regiões espectrais do Infravermelho.

Região	Intervalos das regiões		
	Comprimentos de Onda (μm)	Números de Onda (cm^{-1})	Frequência (Hz)
<i>NIR</i>	0,78 a 2,5	12.800 a 4.000	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
<i>MIR</i>	2,5 a 50	4.000 a 200	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
<i>FAR</i>	50 a 1000	200 a 10	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$

A região espectral NIR é o segmento do espectro eletromagnético mais próximo do vermelho da região visível, sendo difícil distinguir onde exatamente termina uma e começa a outra região^[31].

Os espectros NIR se caracterizam por apresentar bandas mais largas e intensidades menores que as observadas na região MIR. O alargamento se deve às sobreposições entre bandas e a menor intensidade decorre, principalmente, da menor probabilidade das transições vibracionais^[32]. Por essa razão, o uso da espectrometria NIR para fins de análise quantitativa foi impulsionada, sobretudo, pelo desenvolvimento de instrumentação com fototransdutor de alta sensibilidade e pela aplicação de métodos quimiométricos multivariados^[33].

Os métodos analíticos baseados em NIR, sobretudo os quantitativos, apresentam várias características vantajosas que incluem a possibilidade de análises não-destrutivas e não-invasivas com maior rapidez e simplicidade^[33]. Sua principal desvantagem é provavelmente a baixa sensibilidade para constituintes minoritários.

2.2.1. Origem do sinal analítico na região NIR

Uma molécula diatômica é a espécie mais simples que pode sofrer uma transição vibracional na região do infravermelho, absorvendo ou emitindo um fóton de energia com frequência “ ν ”. Entretanto, o fóton é absorvido (ou emitido) apenas quando ocorre uma variação no momento de dipolo da molécula devido à sua vibração, porque, nesta condição, o campo elétrico da radiação eletromagnética pode interagir com aquele proveniente da vibração da molécula, aumentando a amplitude do movimento vibracional^[33].

Na verdade, a radiação eletromagnética é absorvida quando sua frequência é idêntica à da vibração molecular. Em uma linguagem mais técnica, poder-se-ia dizer que a absorção ou emissão de um fóton só ocorrerá se a molécula tiver um dipolo elétrico oscilando (de modo permanente ou transiente) na mesma frequência “ ν ” do campo eletromagnético da radiação^[11,33].

O cloreto de hidrogênio (HCl) possui uma distribuição de carga assimétrica, uma vez que o cloro é mais eletronegativo que o hidrogênio. Como consequência, o momento de dipolo da molécula varia durante a vibração, o que resulta em absorção de energia na região do infravermelho. Por outro lado, as moléculas diatômicas homonucleares como hidrogênio (H₂), nitrogênio (N₂) e cloro (Cl₂) não absorvem energia nesta região do espectro, uma vez que o momento de dipolo de transição associado às ligações destas moléculas não varia com a vibração^[11,30].

O tratamento mecânico-quântico^[30-34], baseado no modelo do oscilador harmônico, mostra que para moléculas diatômicas os níveis de energia vibracionais permitidos (E_{ν}) são dados por

$$E_{\nu} = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \cdot h \cdot \nu_m \quad (3)$$

onde ν é o número quântico vibracional que assume os valores $\nu = 0, 1, 2, \dots$; h é a constante de Plank e ν_m é a frequência vibracional clássica ou natural.

A frequência vibracional clássica (ν_n), encontrada pelo modelo do oscilador mecânico, é dada pela **Equação (4)**.

$$\nu_n = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (4)$$

onde k denota a constante de força da ligação e μ simboliza a massa molecular reduzida.

De acordo com o modelo do oscilador harmônico^[11-34], as transições permitidas envolvem uma variação do número quântico vibracional (ν) de ± 1 (sendo “+ 1” quando ocorre absorção de fóton e “-1” para a emissão). Neste caso, os níveis de energia adjacentes são igualmente espaçados, como pode ser visto na **Figura 1.a**.

Dado que a maioria moléculas encontra-se no nível vibracional $\nu = 0$ na temperatura ambiente, a transição $\nu = 0 \rightarrow \nu = 1$ (fundamental) leva às bandas mais intensas que formam os espectros de absorção na região MIR. Se as moléculas vibrassem apenas conforme descrito pelo oscilador harmônico, não haveria formação dos espectros na região NIR.

Todavia, observa-se que os espectros NIR são normalmente obtidos para moléculas de compostos orgânicos, o que evidencia que o modelo do oscilador harmônico não é suficiente (ou inadequado) para descrever as vibrações moleculares.

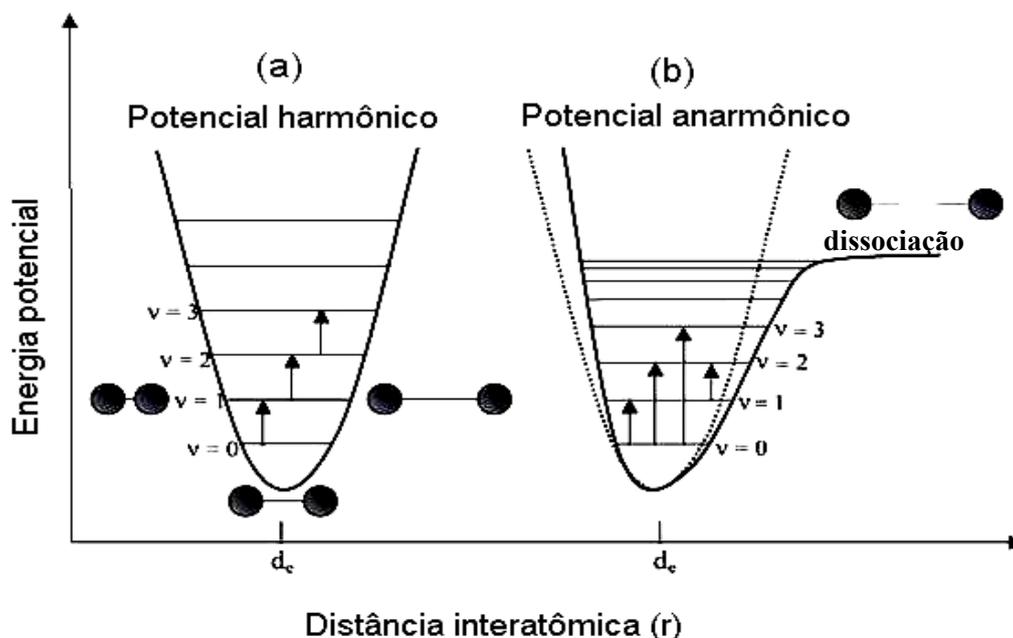


Figura 1 – Curvas de energia potencial para uma molécula diatômica heteronuclear - Modelo do oscilado harmônico (a) e anarmônico (b). Adaptado da referência^[11].

O modelo do oscilador não-harmônico ou anarmônico^[11-34] permite descrever as transições vibracionais que originam os sinais na região NIR, conforme ilustrado na **Figura 1.b**. Segundo esse modelo, a não-harmonicidade (ou anarmonicidade) resulta de dois efeitos, a saber: (i) anarmonicidade mecânica que surge das diferenças de massas entre os átomos envolvidos na ligação (sobretudo, entre o H e átomos como o C, O, N, etc) e a (ii) não-anarmonicidade elétrica que decorre das interações coulômbicas durante a vibração da ligação. Quando os átomos se aproximam um do outro, a repulsão entre os núcleos gera uma força que atua no mesmo sentido que

a força restauradora da ligação. Neste caso, a energia potencial aumenta mais rapidamente que o previsto pela aproximação do modelo harmônico. No extremo oposto da vibração, ocorre um decréscimo mais rápido da energia potencial à medida que a distância internuclear se aproxima da correspondente à dissociação molecular.

Na presença de anarmonicidade, o tratamento mecânico-quântico pode ser realizado com base na função de Morse que descreve a energia potencial da molécula usando a equação^[11]:

$$V = D_e \cdot [1 - e^{-a(r-r_e)}]^2 \quad (5)$$

onde ‘ D_e ’ é a energia de dissociação (profundidade do mínimo ou poço de potencial), ‘ a ’ é uma constante para uma dada molécula, ‘ r_e ’ é a distância de equilíbrio entre os átomos e ‘ r ’ é uma distância interatômica qualquer instante^[11].

A resolução da equação de Schrödinger, baseada na função de Morse, permite obter a **Equação (6)** que descreve as energias vibracionais quantizadas.

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2}\right) \cdot h \cdot \nu_m - \left(v + \frac{1}{2}\right)^2 X_e \cdot h \cdot \nu_m \quad (6)$$

na qual X_e é a constante de anarmonicidade da vibração cujo valor encontra-se entre 0,005 e 0,05.

Como visto, o modelo mecânico-quântico, baseado no oscilador anarmônico considera tanto os efeitos das forças de atração e repulsão de Coulomb como os efeitos das distâncias interatômicas sobre as forças da ligação em moléculas reais, porém, também impõe algumas restrições quanto aos estados de energias vibracionais e transições permitidas para as moléculas. Uma vez que, os principais efeitos da anarmonicidade dos movimentos de vibração moleculares são a diminuição das distâncias energéticas entre níveis vibracionais adjacentes com o aumento do número quântico vibracional (v), e a não obediência das regras de seleção, de modo que transições vibracionais com $\Delta v = \pm 2, \pm 3, \pm 4$, etc, denominados harmônicos superiores, são observadas.

Essas transições vibracionais postuladas pelo modelo estão associadas aos sobretons e a ocorrência de bandas de combinação entre ligações, que constituem os tipos de ocorrências mais comuns na região espectral NIR. A **Figura 1.b** ilustra como a separação entre dois níveis de energia adjacentes diminui à medida que o número quântico vibracional aumenta.

Como nas moléculas os elétrons sofrem efeitos de átomos ou grupos vizinhos, influenciando o estiramento, o comprimento da ligação, o ângulo de ligação e, portanto, a frequência de vibração das ligações químicas, as diferenças específicas geradas por estas interações possibilitam que cada substância tenha um espectro característico^[30].

Como visto pelas regras de seleção da teoria quântica, a transição vibracional de um estado de energia 0 para 1 ou 2 para 3 (ou seja, variação dos níveis vibracionais, Δv , seja ± 1) é considerada uma transição fundamental. Essas transições são intensas e responsáveis pelos belos espectros obtidos na região do infravermelho médio. A aplicação do MIR na identificação de compostos orgânicos é amplamente reconhecida e isso se deve, principalmente, ao fato de nessa região ocorrerem, essencialmente, transições fundamentais e à existência de uma faixa espectral conhecida como região de impressão digital. Na região de impressão digital, pequenas alterações na estrutura e na constituição de uma molécula resultam em mudanças significativas na distribuição dos picos de absorção do espectro, que são relacionados com a estrutura da molécula^[11,30].

Por sua vez, os sinais observados na região do infravermelho próximo ocorrem em frequências aproximadamente duas ou três vezes maiores que as de uma transição fundamental, isto é, $\Delta v = \pm 2$ ou ± 3 , sendo esse tipo de transição conhecida como sobretom (overtone). A maioria dos sinais do tipo sobretom ocorre na região do NIR, com intensidades cerca de 10 a 1000 vezes menores que as observadas para as transições fundamentais (este fato é inconsistente com a teoria quântica, uma vez que esta prevê que tais transições seriam proibidas). Outras bandas que aparecem na região do NIR são provenientes das bandas de combinações, que ocorrem quando um fóton excita simultaneamente dois estados vibracionais diferentes. A frequência da banda de combinação é aproximadamente igual à soma ou à diferença entre as duas frequências das bandas fundamentais que interagem para a sua formação^[30-34].

As bandas de absorção de sobretons ocorrem principalmente entre 12800 e 5500 cm^{-1} (780 a 1820 nm) e bandas de combinação entre 5500 e 4000 cm^{-1} (1820 a 2500 nm). Logo, os sinais observados no NIR são essencialmente devidos a esses dois fenômenos, sendo estas absorções correspondentes a sobretons e a bandas de combinação de estiramentos e deformações angulares de transições fundamentais de ligações X-H, onde X pode ser diferentes elementos químicos ou grupos funcionais, como, por exemplo, oxigênio, nitrogênio, carbono e grupos aromáticos. Outros grupos funcionais importantes incluem estiramentos carbono-oxigênio e grupos carbonila, estiramentos de ligações carbono-nitrogênio, estiramentos de ligações carbono-carbono, dentre outras^[33,34].

Algumas vezes, absorções que ocorrem no NIR são capazes de caracterizar e identificar compostos, como no caso da caracterização de aminas primárias, secundárias e terciárias. Contudo,

uma atribuição precisa de bandas na região do NIR é difícil devido ao fato que uma simples banda pode ser atribuída a uma combinação de sobretons e bandas de combinação, todas severamente sobrepostas^[35].

De forma geral, as medidas feitas na região do NIR possibilitam o estudo de amostras que podem se encontrar na fase sólida, líquida ou gasosa. Na grande maioria das vezes, não requer grande preparo da amostra ^[11].

2.2.2. Uso do sinal NIR para fins analíticos

Os espectros NIR podem ser relacionados tanto as propriedades químicas qualitativas^[36-38] e quantitativas^[36-40] (especialmente de compostos cujas estruturas moleculares contenham ligações envolvendo o hidrogênio a exemplo do O-H), como as propriedades físicas^[11,36] (viscosidade, densidade, índice de refração, brix, entre outras).

A espectroscopia NIR tem sido potencialmente aplicada à solução de diversos problemas analíticos, sendo uma realidade nos mais variados setores da cadeia produtiva. Por exemplo, o Canadá certifica o teor de proteína totais dos grãos de cereais exportados utilizando medidas de espectros NIR diretamente nos grãos^[41] e calibração multivariada, em um procedimento que não requer mais do que alguns minutos para ser efetuado. O método *Kjehldal* usa digestão ácida drástica da amostra empregando mercúrio ou selênio como catalisador, seguida de destilação e a titulação da amônia produzida.

Comparando este método com o método de referência usado para a mesma finalidade, o Método de *Kjehldal*^[42], fica evidente a importância de se desenvolver metodologias analítica, simples, baratas, que não destruam a amostra e não produzam resíduos químicos prejudiciais ao homem e ao meio-ambiente^[43].

Esta técnica também vem sendo empregada na indústria de fármacos^[11,32], polímeros^[11,32] e produtos petroquímicos^[32,44], e produtos agrícolas em geral^[32,44-46].

No contexto da análise de medicamentos, a maioria dos trabalhos publicados é com formas farmacêuticas sólidas^[32]. A popularidade da técnica cresceu muito a partir de 1986^[32], ano em que Ciurczak e Maldacker^[47] publicaram o uso NIR na análise de misturas de formulação de comprimidos de aspirina, butalbital e cafeína, com suas concentrações variando num intervalo de 0% (ausência de principio ativo) e de 90 a 110%. Neste experimento, espectros de placebos eram subtraídos do espectro da composição completa, gerando espectros muito próximos aos das drogas omitidas.

Em 1997, Candolfi et al.^[48] estudaram as fontes de variação na medição NIR de comprimidos e cápsulas. As fontes de variação estudadas foram a repetibilidade de medição, o posicionamento da amostra, variabilidade do dia-a-dia, objetos de variabilidade dentro de um lote, e de modo contínuo avaliaram a variabilidade dos lotes. Este trabalho deu um dos primeiros indícios da importância do posicionamento da amostra.

O primeiro trabalho publicado sobre análise de comprimidos diretamente em suas embalagens foi o de Dempster et al. (em 1993)^[49] onde foram utilizadas três configurações de amostragem para investigar a classificação da droga presente. Na primeira configuração era necessária a remoção do comprimido do blister, na segunda abordagem, os comprimidos foram analisados através da embalagem de plástico usando a janela espectrômetro, e no terceiro arranjo, os comprimidos foram analisados através da embalagem blister de plástico com uma sonda de fibra óptica.

Em 2000, Moffat et al.^[50] demonstraram que o método de análise NIR preenche os critérios estabelecidos pela ICH-Q2^[51,52]. Critérios como: exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, intervalo, robustez e adequação do sistema de teste, demonstraram ser adequados para uso em testes de rotina. Este trabalho foi o ponto de partida para a validação de metodologias baseada em NIR para análise de medicamentos^[32].

Atualmente, métodos analíticos baseados na espectroscopia NIR estão sendo empregados como método de referência na Europa e em alguns países, onde já estão sendo incorporados à farmacopeia oficial^[34]. O que mostra que a espectroscopia NIR já está fortemente consolidada, e sendo aplicada em diversos segmentos da indústria farmacêutica^[32,36]. Mas sua expansão não se deve apenas a técnica NIR (pois os sinais obtidos são de baixa intensidade, ocorre alta sobreposição espectral, a quantidade de dados gerados é enorme tornando seu estudo bastante complexo), e sim devido à utilização de ferramentas estatísticas adequadas (quimiometria) para o tratamento dos dados^[53-55].

A quimiometria é uma área que se refere à aplicação de métodos estatísticos e matemáticos, assim como aqueles baseados em lógica matemática, a problemas de origem química. É utilizada para a elaboração de planejamentos experimentais robustos, otimização de experimentos e realização de calibração multivariada. A quimiometria é uma ferramenta valiosa utilizada no pré-tratamento dos dados, na seleção de variáveis, na identificação e classificação de compostos ou amostras complexas, na quantificação através da análise multivariada, sendo de vital importância em procedimentos de transferência de calibração entre instrumentos^[53-55].

Muita ênfase tem sido dada aos sistemas multivariados, nos quais se pode medir muitas variáveis simultaneamente, ao se analisar uma amostra qualquer. Nesses sistemas, a conversão da resposta instrumental no dado químico de interesse, requer a utilização de técnicas de estatística multivariada, álgebra matricial e análise numérica. Essas técnicas se constituem no momento na melhor alternativa para a interpretação de dados e para a aquisição do máximo de informação sobre o sistema^[56]. A organização do conjunto de dados em análises multivariada são geralmente apresentados em uma matriz, onde as linhas desta matriz representam o conjunto das amostras e as colunas, das variáveis medidas. A matriz pode ser representada graficamente num espaço multidimensional, onde cada variável medida corresponde a uma dimensão do espaço e cada amostra um ponto no espaço^[55,56].

Pode-se dizer que a calibração multivariada tem como princípio básico a utilização simultânea de muitas variáveis independentes X_1, X_2, \dots, X_n (ex: valores de absorvância a vários comprimentos de onda), para quantificar alguma variável dependente y (ex: concentração). O processo geral de calibração^[57,58] é obtido em duas etapas:

- i) modelagem, em que estabelece uma relação matemática entre a matriz X (variáveis independentes) e a matriz Y (resposta) no conjunto de calibração e da validação, que otimiza a relação no sentido de uma melhor descrição do analito(s) de interesse;
- ii) previsão, que utiliza a modelagem estabelecida na etapa anterior para estimar propriedades desconhecidas de amostras de interesse a partir do seu sinal analítico.

Os métodos mais usados são o MLR (*Multiple Linear Regression*), o PCR (*Principal Component Regression*) e o método PLS (*Partial Least-Square*)^[59,60]. Entre estes, destaca-se o método MLR^[61] que, ao contrário do PCR e PLS, realiza a regressão no domínio dos dados originais e levam a obtenção de modelos simples que permitem uma interpretação física direta. Todavia, os modelos MLR são sensíveis a problemas de multicolinearidade. Esse problema pode ser superado mediante a seleção das variáveis minimamente redundantes e mais informativas para os modelos de calibração multivariada, por isso geralmente a construção de modelos MLR está associado a um método de seleção de variáveis, como o Algoritmo das Projeções Sucessivas (SPA)^[61,62]. O SPA é uma técnica de seleção de variáveis que utiliza operações simples num espaço vetorial para minimizar problemas de colinearidade.

A combinação da espectroscopia *NIR* com técnicas quimiométricas de análise multivariada, tem possibilitado o desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de medicamentos injetáveis^[6], entre outros motivos, por determinar tanto as propriedades químicas

(qualitativas e quantitativas), como as propriedades físicas das amostras, e também por possibilitar uma análise rápida, e sem necessidade de tratamento químico das amostras^[15,53].

2.3. Instrumentação NIR

Para a realização de análises químicas baseadas na espectroscopia NIR, dois tipos básicos de equipamentos podem ser utilizados: espectrômetros ou fotômetros^[11]. Os espectrômetros NIR são equipamentos normalmente grandes, utilizados para registrar espectros de uma amostra em toda a faixa espectral do NIR. Por conta dessa característica, são equipamentos caros utilizados por centros de pesquisa ou por laboratórios de indústrias de grande porte financeiro. Logo, não são equipamentos desenvolvidos para a análise de campo. Por sua vez, os fotômetros NIR são equipamentos muito mais baratos, porém eles são construídos para se trabalhar com um número discreto de pequenas regiões espectrais (os comprimentos de onda) distribuídas ao longo da faixa do NIR. Estes comprimentos de onda são isolados empregando filtros ópticos, cuja banda espectral passante isolada é em geral muito larga, o que prejudica a precisão e a qualidade dos fotômetros NIR. Fotômetros NIR de boa qualidade e muito mais simples podem ser construídos usando diodos emissores de luz (*Light Emitting Diode, LED*)^[63,64].

Dispõe-se, atualmente, de um grande número de espectrômetros que operam na faixa do infravermelho próximo. A complexidade pode variar desde os mais simples, que empregam filtros de interferência na seleção de poucos comprimentos de onda, até os mais sofisticados, que empregam a transformada de *Fourier*. Os instrumentos que empregam filtros óptico-acústicos sintonizáveis têm se tornado populares devido, principalmente, à sua robustez, que possibilita o uso do espectrofotômetro para monitoração em linha nos processos industriais^[11]. Os detectores mais empregados são os de sulfeto de chumbo que apresentam desempenho adequado nesta faixa de comprimento de onda, principalmente quando resfriados com o uso de elementos tipo *Peltier*. Os detectores de InAs e GaInAs têm sido bastante empregados nos instrumentos de varredura mais modernos, devido à exigência de respostas rápidas para permitir varreduras de amplas regiões espectrais a taxas tão elevadas quanto 500 nm.s^{-1} ^[11,30].

2.4. Instrumentação a Base de LEDs-NIR

O emprego de LEDs que emitem uma radiação de potência considerável, minimiza os custos associados à construção de instrumentos comerciais^[12]. Os instrumentos construídos a base de LEDs são utilizados para análises dedicadas, as quais exploram regiões espectrais onde ocorrem absorção específicas do analito. Por não apresentarem partes móveis, serem baratos e compactos,

estes equipamentos são simples e robustos o suficiente para serem utilizados como instrumentos portáteis em análises de rotina^[11,13]. Diversos fotômetros que utilizam LEDs nas regiões ultravioleta, visível para distintas aplicações foram desenvolvidos^[12,13]. Entretanto a aplicação de LEDs-NIR no desenvolvimento de fotômetros pode ser considerada incipiente, fato constatado pelo baixo número de publicações relatadas na literatura^[16-21].

Santos^[16] desenvolveu um fotômetro de fluxo a base de diodo emissor de luz (LED) e de fotodiodo, que utiliza a região de comprimentos de onda mais curtos do infravermelho próximo (SW-NIR), foi desenvolvido com o objetivo de realizar a verificação de adulteração por excesso de etanol na gasolina tipo C, e por adição de água em AEHC. O Fotômetro SW-NIR desenvolvido utiliza como único parâmetro para a verificação da não conformidade dos combustíveis, a absorção da radiação com comprimento de onda de 1200nm, normalmente não explorada na análise de etanol, componente comum aos dois combustíveis. A utilização de um microcontrolador PIC16F877 torna possível a minimização do número de componentes eletrônicos utilizados para operações de filtração de sinais e controle de dispositivos. O controle de leitura dos sinais analíticos, o regime de radiação pulsada a 92Hz com ciclos de trabalho de 5,5% (600ms) para controlar a deriva térmica do LED, a aquisição e tratamento dos sinais analíticos, e a apresentação dos resultados em tela de display líquido são operações definidas num programa gravado no microcontrolador. Para o controle da influência da temperatura sobre os sinais analíticos, um sensor térmico a base de um transistor bipolar 2N2221 foi utilizado. As temperaturas fornecidas por este dispositivo foram utilizadas para a calibração dos sinais analíticos esperados para os combustíveis analisados, de modo a serem estabelecidos limites de confiabilidade para os resultados apresentados. Amostras de gasolina tipo C e de AEHC, adquiridas em postos de distribuição da cidade de João Pessoa, foram analisadas pelo fotômetro desenvolvido. A análise de gasolina não forneceu resultados satisfatórios, com limites de detecção de 29,1% v/v para o etanol, valor este bem acima do limite de especificação máximo de 26% v/v, estabelecido pela ANP. Os resultados para o etanol foram satisfatórios. A concentração para o limite de decisão foi determinada em 89,9% m/m. Este limite se encontra um pouco abaixo do limite mínimo estabelecido pela ANP para a análise de etanol, que é 92,6% m/m. Assim, amostras analisadas no Fotômetro SW-NIR são consideradas adulteradas quando o teor de etanol se encontrar inferior ao limite de 89,9% em massa, com 95% de confiança. Estes limites foram determinados analisando-se as amostras em fluxo de 1ml/min.

Chagas^[17] desenvolveu um fotômetro NIR portátil para determinar o teor de água em álcool hidratado combustível (AEHC) e o teor de etanol (Álcool etílico anidro carburente) em gasolina. No

desenvolvimento do instrumento foram avaliados detectores baseados em um foto-resistor de PbS e um fotodiodo de InGaAs. Dentre os detectores empregados o que apresentou melhores resultados foi o detector de InGaAs. Foram construídos diversos fotômetros sendo que aqueles que apresentaram os melhores desempenhos utilizaram filtro de interferência em 1480 nm e celas cilíndricas com caminho óptico de 2 mm e 5 mm. Para o caminho óptico de 2 mm, foi utilizada como fonte de radiação uma lâmpada de 6 watts, enquanto que para a cela com 5 mm foi utilizada uma lâmpada de tungstênio de 20 watts e uma lente colimadora. Em ambos os casos, a fonte de radiação foi pulsada a uma frequência de 25 Hz. Como transdutores de saída do instrumento foram empregados um microcontrolador acoplado a um *display* de cristal líquido e também dois LEDs (vermelho e verde) indicando se o combustível estava dentro ou fora da especificação. O instrumento foi avaliado com amostras comerciais de álcool combustível e gasolina. Para a determinação do teor alcoólico em álcool combustível, a resposta foi linear na faixa de concentração de 88 a 98% m/m, com um erro médio de 3,6 % para um total de 30 amostras analisadas, quando comparada ao seu respectivo método de referência. Na análise de amostras de gasolina foi obtida uma resposta linear para o teor de etanol entre 20 % e 30 %, com um erro médio de 3,0% para um total de 40 amostras analisadas.

Gaião et al.^[18] desenvolveram um fotômetro microcontrolado, portátil e de baixo custo para análise *screening* de gasolinas tipo C para verificar adulteração por adição de solvente ou querosene. O instrumento desenvolvido possui um diodo emissor de luz do infravermelho próximo com emissão em 1550 nm como fonte de radiação, um fotoresistor PbSe como detector e um microcontrolador PIC como unidade de controle. O detector utilizado possui um sistema com um termoresistor de arrefecimento termoelétrico para controlar a temperatura do detector e manter o ruído em níveis baixos. Por ser portátil e microcontrolado, o fotômetro desenvolvido também permite a realização de análises químicas de campo. Para calibrar o fotômetro, amostras de gasolinas tipo C puras e adulteradas foram registradas pelo fotômetro e as concentrações de corte para o solvente e para o querosene foram calculadas baseadas no limite de quantificação para classificar as amostras como adulteradas ou não. Para determinar os limites de incerteza associadas a estas medidas, curvas de performance foram elaboradas. A partir destas curvas, os limites de decisão de 5,1% (v/v) de solvente e de 5,9% (v/v) de querosene foram determinados para um nível de confiança de 95%. Quando aplicado a análises *screening* de gasolinas tipo C, o fotômetro apresentou índice de acertos de 100% para gasolinas adulteradas nestes níveis de concentração. O fotômetro mostrou ser uma alternativa econômica e viável para análises *screening* de gasolinas tipo C para verificar adulteração por solvente ou querosene, acima dos níveis pré-estabelecidos em lei.

Teerasong et al.^[19] desenvolveram um sistema de análise por injeção sequencial (SIA) acoplado a um módulo para monitoramento simultâneo e em tempo real de três parâmetros para a indústria de bebidas: teor de açúcar (medida em Brix), cor e CO₂ dissolvido. A detecção por reflexão de luz na interface do líquido (efeito *schlieren*), foi utilizada para a medição de teor de sacarose. Um diodo emissor de luz no infravermelho próximo (890 ± 40 nm) foi utilizado como fonte de radiação. A faixa de calibração para a sacarose foi linear no intervalo de 3,1 a 46,5 brix. Já para a medição da cor, utilizou-se um LED RGB como fonte de radiação (a fim de tornar este módulo aplicável a uma vasta gama de amostras de cor) e a amostra foi segmentada com bolhas de ar para evitar sua dispersão. E para a análise de CO₂ dissolvido, o sistema possui uma sessão onde o CO₂ sofria vaporização da fase líquida e posteriormente era novamente dissolvido numa corrente de água que flui num “aceitador”. O sistema aceitador sofria alteração da condutividade, que era detectada por meio de um detector de condutividade acoplado ao sistema. A unidade de vaporização, usada para a liberação do CO₂ foi usada para remover os gases da bebida antes das medições de sacarose e de cor dentro do sistema. O método apresentou bons resultados, compatíveis com os métodos tradicionais de análise.

Silva, et. al.^[20] desenvolveram um sensor por fibra óptica para a determinação de compostos orgânicos voláteis (etano, pentano, heptano, octano, decano, benzeno, tolueno e estireno) na respiração humana para diagnóstico clínico. Basicamente o sensor trabalha com comprimento de onda fixado em 1550 nm, usando um dispositivo de InGaAs para detecção. O sistema analítico desenvolvido mostrou um alto desempenho para análise da respiração, inferida pela análise limites de intensidade de sinal e a estabilidade, a faixa linear, e detecção de 0,8 pmol de L⁻¹ para o heptano, e 9,5 pmol de L⁻¹ para o decano. A faixa de calibração foi de 100 a 500 pmol.L⁻¹ para o etano, 50 a 450 pmol.L⁻¹ para o pentano, 5 a 25 pmol.L⁻¹ para o heptano, 2 a 62 pmol.L⁻¹ para o octano, 5 a 425 pmol.L⁻¹ para o decano, 10 a 130 pmol.L⁻¹ para o benzeno, 30 a 150 pmol.L⁻¹ para o tolueno, e 2 a 82 pmol.L⁻¹ para o estireno. Os coeficientes de correlação (R^2) obtidos foram: 0.9997 ($p < 3.11 \times 10^{-33}$) para o etano, 0.9998 ($p < 7.13 \times 10^{-35}$) para o pentano, 0.9925 ($p < 1.40 \times 10^{-20}$) para o heptano, 0.9988 ($p < 8.26 \times 10^{-28}$) para o octano, 0.9999 ($p < 5.91 \times 10^{-36}$) para o decano, 0.9995 ($p < 6.74 \times 10^{-31}$) para o benzeno, 0.9991 ($p < 1.05 \times 10^{-28}$) para o tolueno e 0.9981 ($p < 5.50 \times 10^{-26}$) para o estireno. O sensor também apresentou características vantajosas apresentar repostas em tempo real, baixo custo para produção dos instrumentos, além de demonstrar um desempenho analítico equivalente a análise da respiração por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS), utilizado como método de referência.

Lima^[21] desenvolveu um fotômetro portátil baseado em LED para a determinação de hidrocarbonetos aromáticos totais em água contaminada com gasolina. Dois LEDs foram utilizados como fonte de luz, com emissão máxima a 1300 nm e 1689 nm. A radiação de cada LED foi coletada com pacotes de 24 fibras ópticas de sílica, que foram reunidas em um único pacote apontado para a cela de detecção. Um fotodiodo de InGaAs estava diretamente ligado à célula de medição. O software utilizado foi escrito em VisualBasic.NET para controlar o fotômetro através de uma interface USB e para a aquisição de dados. A determinação de hidrocarbonetos aromáticos totais foi realizada utilizando uma fase de detecção de silicone (de 5 mm de comprimento e 3,2 mm de diâmetro), foi utilizada para extrair os compostos aromáticos a serem analisados a partir da água contaminada. A extração (de 60 minutos sob agitação constante) foi realizada num frasco de 100 mL cheio com a amostra diluída em água com 2,0 mol.L⁻¹ de NaCl. A repetibilidade de 1,8 % e 1,3% (expressa como o desvio padrão relativo de 10 medidas) foi obtida em 1300 nm e 1689 nm, respectivamente. Os valores de absorvância foram calculados considerando-se o sinal em 1300 nm como referência porque hidrocarbonetos não absorvem neste comprimento de onda. Curvas analíticas até 200 mg.L⁻¹ e 400 mg.L⁻¹ foram construídas para o benzeno e tolueno, proporcionando limites de detecção de 1,2 mg.L⁻¹ e 1,7 mg.L⁻¹, respectivamente. A sensibilidade foi semelhante àqueles obtidos com um espectrofotômetro FT -NIR Bomem MB 160 no mesmo comprimento de onda. O fotômetro foi aplicado para a determinação do total de hidrocarbonetos em águas contaminadas por gasolina. Uma curva analítica (50-300 mg.L⁻¹) foi construída a partir de soluções de referência contendo benzeno e tolueno, na proporção de 3:7, que é a proporção geralmente encontrado na gasolina brasileira. Os resultados fornecidos pelo fotômetro foram comparados com os obtidos com o espectrofotômetro comercial e não apresentaram diferenças significativas a um nível de confiança de 95 %.

O desenvolvimento de instrumentos mais simples, que fazem uso de acessórios eletrônicos tais como os microcontroladores e os módulos de cristal líquidos, geralmente apresentam dimensões físicas bem menores que os espectrômetros comerciais, o que viabiliza a sua portabilidade, e permite seu uso em pesquisas de campo^[11]. Obviamente os custos relacionado a sua produção e manutenção também são reduzidos, o que incentiva ainda mais o desenvolvimento de fotômetros para análises dedicadas.

Na construção dos fotômetros, alguns componentes eletrônicos são bastantes utilizados. A seguir serão descritas algumas especificações dos quatro dispositivos mais utilizados na construção de fotômetros: LED, fototransdutor, microcontrolador e módulo de cristal líquido.

2.4.1. Diodos emissores de luz - LED

LED é a sigla em inglês para *Light Emitting Diode*, ou diodo emissor de luz. O LED é um diodo semicondutor, constituído por uma ponte metálica em contato com um cristal semicondutor no qual existe uma junção P-N, que quando energizado emite luz visível por isso LED (Diodo Emissor de Luz). O processo de emissão de luz pela aplicação de uma fonte elétrica de energia é chamado eletroluminescência^[65].

Uma junção P-N consiste numa junção entre dois semicondutores (sendo os mais comuns Ge ou Si), um tipo P e outro tipo N, obtidos pela adição de pequenas quantidades de impurezas. As impurezas tipo P são átomos de elementos que apresentam menos elétrons na sua camada externa (Al, Ga, In, Tl) com relação ao semicondutor, e as tipo N são aquelas que apresentam mais elétrons na camada de valência (As, Sb) quando comparadas com o semicondutor.

Uma dopagem tipo N é, então, aquela feita com impurezas “doadoras” (elétron livre de uma região N) e uma dopagem tipo P é, então, aquela feita com impurezas “aceitadoras” (uma lacuna da região P). Em qualquer junção P-N polarizada diretamente ocorrem recombinações de lacunas e elétrons. Essa recombinação exige que a energia possuída por esse elétron, que até então era livre, seja liberada, o que ocorre na forma de calor ou de fótons de luz. Deste modo, um LED emite luz quando polarizado no sentido de condução^[65,66].

A mobilidade dos portadores é a facilidade com que cargas n e p (elétrons e lacunas) atravessam a estrutura cristalina do material sem colidir com a vibração da estrutura. Quanto maior a mobilidade dos portadores, menor será a perda de energia, portanto mais baixa será a resistividade. Na região de contato das áreas, elétrons e lacunas se recombinaem, criando uma fina camada praticamente isenta de portadores de carga, a chamada barreira de potencial, onde temos apenas os íons “doadores” da região N e os íons “aceitadores” da região P, que por não apresentarem portadores de carga “isolam” as demais lacunas do material P dos outros elétrons livres do material N. Um elétron livre ou uma lacuna só pode atravessar a barreira de potencial mediante a aplicação de energia externa (polarização direta da junção)^[66].

A luz emitida não é monocromática, mas a banda colorida é relativamente estreita. A cor, portanto, depende do cristal e da impureza de dopagem com que o componente é fabricado.

O LED que utiliza o arseneto de gálio emite radiações infravermelhas. Dopando-se com fósforo, a emissão pode ser vermelha ou amarela, de acordo com a concentração. Utilizando-se fosfeto de gálio com dopagem de nitrogênio, a luz emitida pode ser verde ou amarela.

Hoje em dia, com o uso de outros materiais, consegue-se fabricar LEDs que emitem luz azul, violeta e até ultra-violeta. Existem também os LEDs brancos, mas esses são geralmente LEDs

emissores de cor azul, revestidos com uma camada de fósforo do mesmo tipo usado nas lâmpadas fluorescentes, que absorve a luz azul e emite a luz branca^[66].

Esse tipo de emissor é a fonte de luz padrão para a maioria dos sensores. São comercialmente disponíveis no mercado desde a década de sessenta, possuem baixo valor comercial (cerca de R\$ 1,50) e podem ser encontrados numa grande variedade de formas (retangular, semiesférico, cilíndrico, entre outras), de tamanhos (3,0; 5,0; 10,0 mm, entre outros) e de tipos (UV, bicolor, tricolor, branco, azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, IR, entre outros)^[65,66].

As radiações emitidas pelos diferentes LEDs cobrem toda a região do espectro visível e parte do infravermelho. A **Figura 2** ilustra o espectro de emissão de nove LEDs na região do infravermelho próximo.

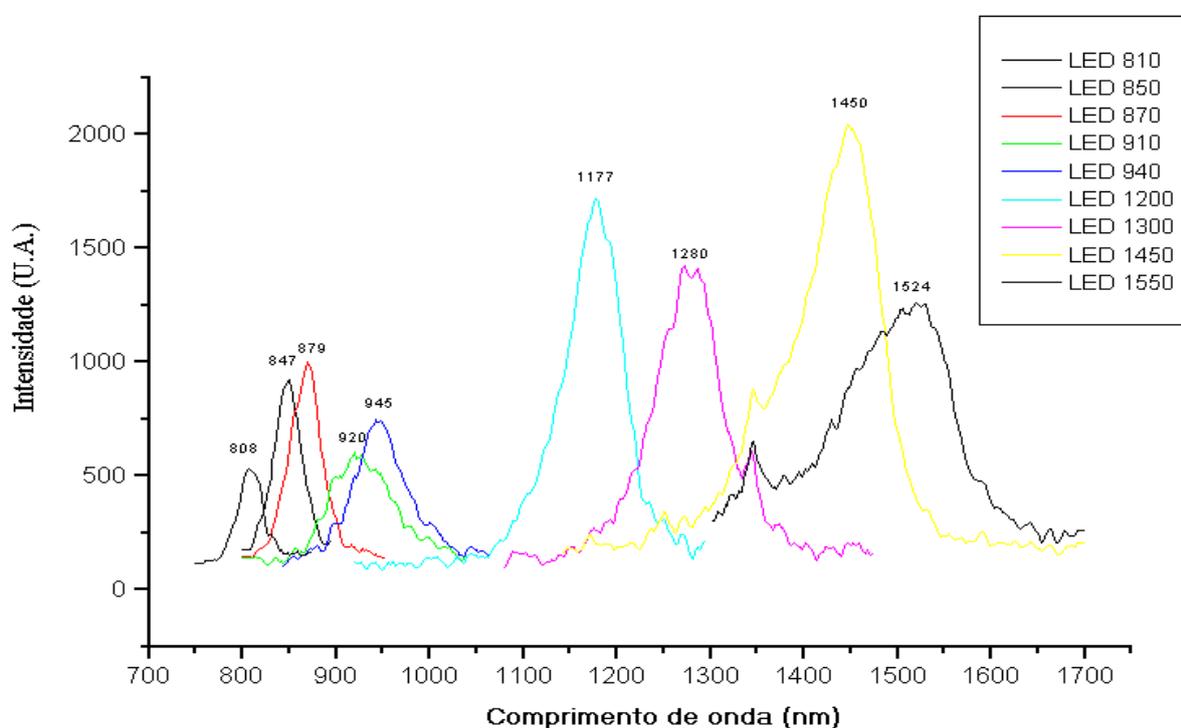


Figura 2. Espectros de emissão de 9 LEDs na região do infravermelho próximo (800-1600nm)^[16].

Os LEDs, ao se tornarem acessíveis comercialmente, com a conseqüente diminuição de seus custos de produção e elevação dos níveis de eficiência luminosa, começaram a ser utilizados em instrumentação analítica, principalmente em instrumentos espectrométricos, como os fotômetros. Porém, o campo de aplicação dos LEDs não se limitou ao uso restrito em fotômetros, expandindo-se para outras técnicas como eletroforese capilar, sistemas de extração líquido-líquido, fluorescência e eletroquímica, entre outras^[12,13]. As principais características que permitiram que os LEDs alcançassem esse largo espectro de atuação foram^[67]: compactabilidade; robustez; tempo de vida elevado; baixo consumo de energia; baixo custo; potência elevada; largura efetiva de banda

estreita; ruído associado baixo; e facilidade de aquisição. Apesar das diferentes técnicas instrumentais em que os LEDs podem atuar como fonte de radiação, o uso desses dispositivos em instrumentação NIR ainda constitui o principal campo de aplicações a ser desenvolvido.

2.4.2. Detectores e/ou Fototransdutores

Os detectores^[68] são dispositivo cuja finalidade é a de assinalar a presença de fótons, de substâncias, de corpos em determinado meio ambiente ou instrumentos inteiros usados para detectar e registrar, por exemplo, analitos eluídos em cromatografia. Em outras palavras, é um dispositivo que muda de estado na presença de um elemento ou de uma situação para o qual foi especificamente concebido. No caso de fototransdutores, são dispositivos sensíveis à luz, que executam determinadas funções na presença da mesma. Existem basicamente dois tipos de fototransdutores: Fotodiodos e fototransistors.

Um fotodiodo^[68] é um componente eletrônico e um tipo de fotodetector. É uma junção P-N designada para responder a uma entrada ótica. Fotodiodos possuem uma "janela" ou uma conexão de fibra ótica, responsável por deixar a luz passar e incidir na parte sensível do dispositivo. Também pode ser usado sem a "janela" para detectar raios ultravioleta ou raios-X.

Fotodiodos podem ser usados tanto na polarização reversa quanto na polarização direta. Na polarização direta, a luz que incide sobre o fotodiodo faz a corrente transcorrer através do dispositivo, levando-a a ir para o sentido frontal. Isso é conhecido como o efeito fotoelétrico, e é a base das células de captação de energia solar - aliás, uma célula de captação de energia solar é apenas um monte de grandes e baratos fotodiodos. Diodos geralmente possuem uma altíssima resistência quando a polaridade é revertida. Essa resistência é reduzida quando a luz, em uma apropriada frequência, brilha na junção. De fato, um diodo de polaridade reversa pode ser usado como um detector, monitorando a corrente que passa por ele. Circuitos baseados nesse efeito são mais sensíveis à luz que outros baseados no efeito fotovoltaico.

Um fototransistor^[68] é, essencialmente, nada mais que um transistor bipolar que está encapsulado em uma capa transparente para que a luz possa atingir a base coletora da junção. O fototransistor funciona como um fotodiodo, mas com uma sensibilidade muito maior à luz, pois os elétrons que são gerados pelos fótons na junção da base-coletora são aplicados dentro da base, a sua corrente é então amplificada pela operação do transistor. Entretanto, o fotodiodo tem um tempo de resposta menor do que o fototransistor. Os fototransdutores mais comumente utilizados para a detecção da radiação na região NIR são: Dispositivo de Carga Acoplada ou CCD (*Charge-Coupled Device*) que são adequados para a extremidade mais curta da região NIR (750-1000 nm), mas não

são suficientemente sensíveis sobre a maior parte da região (acima de 1000 nm); e dispositivos de InGaAs e PbS, que são mais adequados, embora menos sensíveis do que os CCD.

Normalmente detectores fotocondutores de PbS não são caracterizados pela eficiência quântica, porque, teoricamente, eles são completamente eficiente (100% QE), ao contrário de detectores fotovoltaicos de InGaAs^[69]. A melhor maneira de comparar matrizes de PbS e InGaAs é com detectividade (D^*), que é realmente sinal normalizado-ruído. Geralmente, detectores de PbS tem detectividade ligeiramente melhor do que detectores de InGaAs prolongados na faixa (InGaAs-extendido). No entanto, para comprimentos de onda mais curtos (<1700 nm), um InGaAs padrão tende a ter um valor maior D^* do que PbS.

Detectividade (D^*) é definida como a relação sinal-ruído do detector normalizada pela área do detector. À medida que a temperatura do detector diminui, a detectividade aumenta. A **Tabela 2** fornece algumas especificações para uma comparação entre detectores PbS, PbSe (detector PbS com a janela de faixa estendida) com InGaAs padrão e estendida (InGaAs-extendido). Onde: λ **faixa** indica a faixa de resposta do detector; λ **pk** é comprimento onda onde o detector apresenta resposta máxima; **t** é o tempo de resposta do detector, $D^*\lambda$ **pk** é a detectividade máxima do sensor; **PV** indica que o detector é do tipo fotovoltaico, e **PC** indica que o detector é um fotocondutor.

Tabela 2. Especificações com valores aproximados de respostas para detectores NIR^[69].

		InGaAs (padrão)	InGaAs (extendido)	PbS	PbSe
300 ° K					
	Δ faixa (μm)	0,7-1,7	1,2-2,6	1,0-3,0	1,0-5,0
	Δ pk (μm)	1,5	2,3	2,2	3,8
	T (μS)	0,1	0,1	200	3
	$D^*\lambda$ pk ($\text{cm}\sqrt{\text{Hz/w}}$)	5×10^{12}	5×10^{10}	1×10^{11}	3×10^9
	Modo	PV	PV	PC	PC
243 ° K					
	Δ faixa (μm)	0,7-1,7	1,2-2,6	0,8-3,5	1,0-5,5
	Δ pk (μm)	1,5	2,3	2,5	4,0
	T (μS)	0,01	0,01	1000	10
	$D^*\lambda$ pk ($\text{cm}\sqrt{\text{Hz/w}}$)	3×10^{13}	2×10^{11}	$2,5 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{10}$
	Modo	PV	PV	PC	PC

Outro fator importante é a influencia da temperatura sobre os dispositivos. A temperatura do elemento nominal máxima para detectores de PbS é 65°C, isto se refere aos limites de temperatura reais que a superfície do detector pode chegar, não de temperatura que se irradia para o detector^[69]. Já a temperatura do elemento nominal máxima para detectores de InGaAs vai de 85 a 110°C. Portanto os detectores de PbS são muito mais sensíveis à temperatura.

2.4.3. Microcontroladores PIC

Um microcontrolador^[70] é um sistema computacional completo, no qual estão incluídos uma Unidade Central de Processamento - CPU (*Central Processor Unit*); memória para armazenamento de instruções e para manipulação de dados e programas; um sistema de clock para dar seqüência às atividades da CPU; portas de I/O (*Input/Output*) para interiorizar na CPU informações do mundo externo e exteriorizar informações processadas pela CPU para o mundo externo; programa (*firmware*) para definir um objetivo ao sistema; além de outros possíveis periféricos, tais como, módulos de temporização e conversores A/D, entre outros, integrados em um mesmo componente^[70].

De um modo geral, os microcontroladores são usados com programas muito específicos na área de controle, principalmente na indústria. Entre as vantagens do microcontrolador podemos citar que:

- São extremamente pequenos, simplificando muito o tamanho da placa de circuito;
- Podem substituir com grande eficiência parte ou até mesmo circuitos inteiros;
- São dispositivos de baixa potência, por isso o consumo de energia é baixíssimo;
- São extremamente flexíveis já que o programa está escrito em uma memória, podendo ser mudado, e não na placa do circuito;
- Os programas podem ser alterados facilmente não sendo necessária a criação de um circuito novo.

O uso de microcontroladores possibilita a introdução ou alteração de funcionalidades do instrumento sem a necessidade de re-configuração do *hardware*, bem como o controle de dispositivos externos, operações de aquisição e tratamento de dados sem a necessidade de um microcomputador^[70].

Um microcontrolador PIC apresenta todos os dispositivos necessários para o controle de dispositivos externos e operações de aquisição e tratamento de dados, necessárias ao desenvolvimento de instrumentos analíticos simples.

Como os microcontroladores não apresentam dispositivos para apresentação dos resultados das análises, uma interface externa com este propósito deve ser adaptada aos instrumentos microcontrolados. Os módulos LCD (*Liquid Cristal Display*) são os dispositivos mais utilizados para este fim.

2.4.4. Módulo LCD do Tipo Alfanumérico

Um display de cristal líquido, acrônimo de LCD (em inglês, *Liquid Cristal Display*) ^[71], consiste em um painel fino usado para exibir informações por via eletrônica, como texto, imagens e vídeos. É um dispositivo eletrônico-óptico modulado, composto por um determinado número de pixels, preenchidos com cristais líquidos e dispostos em frente a uma fonte de luz para produzir imagens em cores ou preto e branco. Seu uso inclui monitores para computadores, televisores, painéis de instrumentos e outros dispositivos, que vão desde *cockpit* de aeronaves, *displays* em computadores de bordo de automóveis, a dispositivos de utilização diárias, tais como leitores de vídeo, dispositivos de jogos, relógios, calculadoras e telefones.

Um LCD consiste de um líquido polarizador da luz, eletricamente controlado, que se encontra comprimido dentro de celas entre duas lâminas transparentes polarizadoras. Os eixos polarizadores das duas lâminas estão alinhados perpendicularmente entre si, o que reduz a rotação da polarização da luz incidente e o dispositivo aparece cinza^[71]. Cada cela é provida de contatos elétricos que permitem que um campo elétrico possa ser aplicado ao líquido no interior. Se a tensão aplicada à superfície é suficientemente grande, as moléculas de cristal líquido no centro da camada assumem quase completamente forma helicoidal, e a polarização da luz incidente não roda à medida que passa através da camada de cristal líquido; esta luz será, então, principalmente polarizada perpendicular ao segundo filtro, e, portanto, aparecerá o pixel preto. Ao controlar a tensão aplicada em toda a camada de cristal líquido em cada pixel, a luz pode ser autorizada a passar em quantidades variadas constituindo diferentes níveis de cinza^[71,72].

Entre as suas principais características de um módulo LCD está a sua leveza, sua portabilidade, e sua capacidade de poder ser produzido em larga escala. Seu baixo consumo de energia elétrica lhe permite ser utilizado em equipamentos portáteis, alimentados por bateria eletrônica. Os módulos LCD gráficos são encontrados com resoluções de 122 x 32, 128 x 64, 240 x 64 e 240 x 128 (*dots x pixel*), e geralmente estão disponíveis com 20 pinos para conexão. Os LCD comuns (tipo caractere) são especificados em número de linhas por colunas e são encontrados conformes as configurações previstas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Tipos de módulos LCD mais comuns.

Número de Colunas	Número de Linhas	Quantidade de pinos
8	2	14
12	2	14/15
16	1	14/16
16	2	14/16
16	4	14/16
20	1	14/16
20	2	14/16
20	4	14/16
24	2	14/16
24	4	14/16
40	2	16
40	4	16

Os módulos de LCD podem ser encontrados com LED *backlight* (com iluminação de fundo) para facilitar as leituras durante a noite. A alimentação deste LED é feita normalmente pelos pinos 15 e 16 para os módulos comuns e 19 e 20 para os módulos gráficos. Os pinos 15 e 19 são usados para ligação ao anodo e os pinos 16 e 20 para o catodo. A corrente de alimentação do LED varia de 100 a 200mA, dependendo do modelo.

Em determinados casos, as informações geradas em um instrumento portátil podem ser demasiadas para serem apresentadas, de modo claro e conciso, no dispositivo LCD; como também, os microcontroladores são limitados em termos de espaço de memória com relação aos microcomputadores, portanto os *softwares* desenvolvidos devem ser simples para evitar a necessidade de aquisição de dispositivos de memória externos.

2.5. Medicamentos

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)^[73], medicamentos são produtos especiais elaborados com a finalidade de diagnosticar, prevenir, curar doenças ou aliviar seus sintomas, sendo produzidos com rigoroso controle técnico para atender às especificações legais de segurança, eficácia e qualidade^[73]. O efeito alcançado por um medicamento se deve a presença de uma ou mais substâncias ativas com propriedades terapêuticas reconhecidas cientificamente, que fazem parte da composição do produto^[73].

Os medicamentos seguem a normas rígidas para poderem ser utilizados, desde a sua

pesquisa e desenvolvimento, até a sua produção e comercialização. Os medicamentos podem servir para as seguintes finalidades^[74]: alívio de sintomas; cura de doenças; correção de uma função corporal deficiente (suplementos vitamínicos); prevenção de doenças; diagnóstico; e podem ainda ajudar na avaliação do funcionamento de órgãos (contrastes radiológicos).

Os medicamentos são produzidos sob diferentes formas farmacêuticas. As formas farmacêuticas são as diferentes formas físicas, nas quais os medicamentos podem ser apresentados para possibilitar o seu uso pelo paciente^[75]. As formas farmacêuticas mais usuais são: comprimidos; cápsulas, pós e granulados; xaropes; soluções (gotas, nasais, colírios, bochechos e gargarejos e injetáveis); supositórios, óvulos e cápsulas ginecológicas; aerossóis; pomadas e suspensões^[75].

As diferentes formas farmacêuticas são elaboradas seja para facilitar a administração do fármaco, garantir a precisão da dose, proteger a substância durante o percurso pelo organismo, garantir a presença no local de ação, ou ainda para facilitar a ingestão da substância ativa^[76]. Em alguns casos, as formas farmacêuticas servem para facilitar a administração de medicamentos por pacientes de faixas etárias diferentes ou em condições especiais^[73].

Cada forma farmacêutica é indicada de acordo com a via de administração que se pretende empregar. A via de administração é a maneira como o medicamento entra em contato com o organismo, é sua porta de entrada, podendo ser via oral (boca), retal (ânus), parenteral (injetável), dermatológica (pele), nasal (nariz), oftálmica (olhos), sublingual (embaixo da língua), dentre outras^[74]. Cada via é indicada para uma situação específica, e apresenta vantagens e desvantagens^[74]. Uma injeção, por exemplo, é sempre incômoda e muitas vezes dolorosa, mas, por outro lado, apresenta efeito imediato^[73].

2.5.1. Medicamentos injetáveis ou parenterais

Prista e colaboradores^[77] definem preparações injetáveis como as soluções, suspensões e emulsões estéreis de substâncias medicamentosas em veículos aquosos, oleosos ou outros apropriados para serem administrados por via parentérica. O termo parenteral provém do grego “para” (ao lado) e “enteros”(tubo digestivo), significando a administração de medicamentos “ao lado do tubo digestivo” ou sem utilizar o trato gastrointestinal.

Essa forma de administração de fármacos é muito eficiente, pois disponibiliza o princípio ativo diretamente na corrente sanguínea proporcionando uma ação terapêutica mais rápida e eficaz^[74]. A via parentérica é indicada para administração de medicamentos a pacientes inconscientes, com distúrbios gastrointestinais e nos pacientes impossibilitados de engolir. É indicada ainda quando se espera uma ação mais rápida da droga e na administração de

medicamentos que se tornam ineficientes em contato com o suco digestivo^[78]. A administração parenteral de medicamentos faz parte da rotina hospitalar, clínica, e das unidades de saúde. Este tipo de formulação tem grande importância e extrema indispensabilidade vinculada ao pronto atendimento de urgência/emergência de usuários dos serviços destes estabelecimentos de saúde. Em 1998, estimou-se que cerca de 40% de todos os medicamentos dispensados nos hospitais eram injetáveis^[79], atualmente acredita-se que este índice deva ser ainda maior.

Compreende-se que a produção de injetáveis impõe condições rigorosas de controle, cuja dupla finalidade é a verificação da sua perfeita tolerância para os tecidos e inocuidade total no organismo^[80]. Naturalmente que a primeira propriedade que todas as preparações injetáveis devem apresentar é a de serem estéreis^[77,80]. Além desta característica, há, consoante o tipo de injetável e a via de administração, outras qualidades extremamente importantes. Assim, as preparações em veículo aquoso (soluções, dispersões coloidais, suspensões e emulsões de fase aquosa externa) devem ser isotônicas, apresentar pH próximo da neutralidade e ser apirogênicas, enquanto que as que são feitas utilizando um veículo oleoso deverão ser preparadas com óleos isentos de acidez^[75,77,80].

Para detectar os potenciais problemas, a indústria farmacêutica realiza testes sobre a preparação, reconstituição ou estabilidade dos medicamentos injetáveis, para o controle de qualidade dos medicamentos, para assegurar uma formulação correta e eficaz^[76]. Entre os testes realizados, encontramos: o de esterilidade (contagem microbiológica e pesquisa de patógenos), doseamento, determinação da massa média, dureza, determinação do volume médio, friabilidade, pH, teste de pirogênios, teste de desintegração, teste de dissolução, toxicidade aguda, uniformidade de doses unitárias, umidade, viscosidade e identificação da substância ativa^[75,77,80]. O uso destas informações é a chave que assegura a integridade da dosagem das formas farmacêuticas.

Quando se prepara medicamentos injetáveis é de particular importância a escolha de recipiente adequado que irá contê-los. Como é sabido, as ampolas ou frascos que se empregam são geralmente de vidro, eventualmente substituído por diversos materiais plásticos, como o polietileno ou o cloreto de polivinila^[77,80]. Os recipientes de vidro utilizados podem ser incolores ou corados. O vidro corado destina-se a proteger os medicamentos da ação da luz, sendo indicado quando o medicamento se altera nessas circunstâncias. A coloração é conferida aos vidros pela junção de diversos metais (cromo – que confere a cor verde, e o ferro e manganês – que originam cores que vão do âmbar ao amarelo). Nas modernas farmacopéias e formulários indica-se o vidro de cor âmbar, desde que este satisfaça os ensaios de transparência^[75,80].

Qualquer que seja o material utilizado para a confecção dos recipientes de acondicionamento, não deve reagir com os líquidos medicamentosos neles contidos. Isto significa que esses materiais, além de outras qualidades, devem apresentar alta resistência aos líquidos medicamentosos o que, na maioria dos casos, traduz-se por uma elevada resistência hidrolítica. Deve-se, ainda, considerar o seu tapamento que, geralmente, é feito por fusão, quando se trata de vidro, podendo ainda ser realizado mediante rolhas de borracha, de teflon, de elastômeros, etc^[75,77,80].

2.5.2. Dipirona sódica injetável

A Dipirona Sódica, também conhecida na Europa pelo nome de Metamizol, é um fármaco sintético extraído do alcatrão (anilina), pertencente ao grupo da pirazolona (antipirina, aminopirina, fenilbutazona, oxfenbutazona)^[76]. É classificada como analgésico-antiinflamatório não esteroidal, dotada de efeitos diversos em função da dose empregada. Para doses baixas (menores que 10 mg.kg⁻¹) exerce ação antipirética; para doses medianas (entre 15 a 30 mg.kg⁻¹) exerce ação analgésica e para doses altas (maiores que 50 mg.kg⁻¹) exerce as ações antiinflamatória e antiespasmódica^[76,81-83]. Sua fórmula molecular é C₁₃H₁₆N₃O₄SNa.H₂O, sua Massa Molar é 351,35 g.mol⁻¹, e seu nome químico é [(2,3-dihidro-1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-1H-pirazol-4-il) metilamino] metanosulfonato de sódio. A sua fórmula estrutural está ilustrada na **Figura 3**.

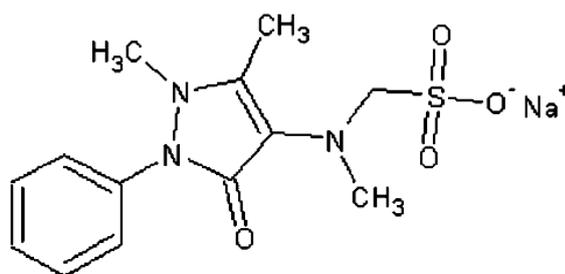


Figura 3 – Fórmula estrutural da dipirona sódica.

O seu mecanismo de ação é semelhante ao de outros AINE atuando como bloqueadores da biosíntese das prostaglandinas^[84] e, conseqüentemente, evitando a dor e a inflamação^[85-87]. As prostaglandinas são hormônios locais responsáveis por uma série de funções patológicas e fisiológicas, entre elas a transmissão da dor. São formadas a partir do ácido araquidônico pela ação da enzima ciclooxigenase; duas formas desta enzima foram descobertas e são conhecidas como COX-1 e COX-2^[88] (**Figura 4**). Ambas convertem o ácido araquidônico a prostaglandinas, mas elas diferem na biodistribuição e ações fisiológicas. A COX-1 é a forma predominante da enzima, é

expressa em todo o corpo e exerce várias funções fisiológicas homeostáticas, como a manutenção da mucosa gástrica, o fluxo sanguíneo e a agregação de plaquetas. Por outro lado, a COX-2 é expressa como resposta a estímulos inflamatórios, estando envolvida na produção de prostaglandinas que medeia a dor e a inflamação^[88,89].

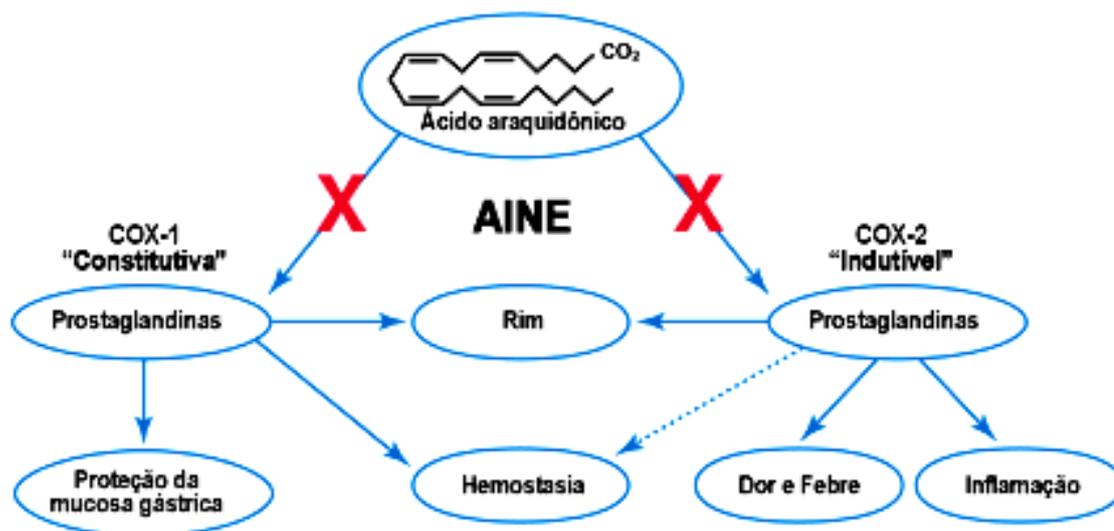


Figura 4 – Mecanismo de ação dos AINEs^[89].

Todos os AINE clássicos inibem tanto a COX-1 como a COX-2, sem seletividade. Embora os efeitos analgésico e antiinflamatório (em função da inibição da COX-2) sejam atingidos, a inibição da COX-1 pode gerar problemas gastrointestinais e diminuir a capacidade de coagulação do sangue^[86-87]. Além deste mecanismo de ação, atribuído basicamente a sua ação antiinflamatória, diversos estudos foram efetuados na tentativa de se atribuir uma explicação para a ação analgésica da dipirona^[90-93]. Estes trabalhos evidenciaram ações da dipirona em regiões periféricas e centrais, em diferentes níveis de processamento da informação dolorosa, levando a outros possíveis mecanismos de ação atribuídos ao uso da dipirona^[90-93], demonstrando que o principal mecanismo pelo qual a dipirona exerce sua ação analgésica permanece ainda não totalmente elucidado.

A dipirona foi introduzida no Brasil em 1922, sob o nome de *novalgina*®. Sua comercialização cresceu mundialmente até a década de 70, quando foram relatados graves casos de agranulocitose: uma condição clínica de deficiência imunológica potencialmente fatal (7 a 25%), que exigia suspensão do tratamento e atendimento médico de urgência com potentes antibióticos. A maioria dos países do Hemisfério Norte, Suécia (1974), EUA (1977), Austrália e Japão proscreram a dipirona do receituário a não ser no mercado veterinário, por haver disponibilidade no receituário médico de AINE substitutos menos tóxicos para tratamento da dor (paracetamol, salicilatos, ceterolac, clomifênio, etc.)^[94]. No entanto, o Brasil e diversos outros países não

suspenderam sua comercialização e mantiveram seu uso até os dias atuais. Atualmente, a incidência estimada da agranulocitose é aceitável, pois oscila entre 0,2 a 2 casos por milhão de pessoas por dia de uso. Além disso, há outras drogas com maior risco de provocar agranulocitose como o antipsicótico clozapina com incidência de 8 casos para cada 1000 pacientes após 6 meses de tratamento^[95-99]. Ela também continua sendo prescrita na Rússia, Índia e em muitos outros países sul-americanos, caribenhos, africanos e asiáticos.

A dipirona (*Hoechst & Merck*) é um dos principais analgésicos da terapêutica brasileira^[94]. Em 2006, estimou-se que a mesma ocupava 31,8% do mercado, vindo o paracetamol em segunda colocação com 29,7%, e o ácido acetilsalicílico em terceira com 27,1%^[94]. Hoje em dia, acredita-se que sua comercialização tenha aumentado em relação aos seus concorrentes, uma vez que as prescrições do ácido acetilsalicílico sofreram fortes quedas em função da alta difusão e incidência da dengue no país (nesta situação, o uso deste fármaco pode levar a quadros hemorrágicos graves)^[100]. A comercialização do paracetamol também tem reduzido em função do aumento do índice de incidência de problemas hepáticos atribuídos ao uso constante deste fármaco^[101].

A dipirona é o analgésico de preferência em 50% dos usuários de hospitais públicos em São Paulo^[102]. Esse medicamento é de elevada importância terapêutica e é altamente consumido na clínica médico/hospitalar, sendo o medicamento de primeira escolha em períodos pós-operatório. Além disso, é um medicamento de baixo custo de comercialização e tem ampla e ubíqua disponibilidade no mercado brasileiro. Por ser hidrossolúvel, pode ser administrada parentalmente em grandes doses, o que constitui vantagem e, provavelmente, contribui para o abuso deste fármaco, que é o analgésico e antipirético mais vendido no Brasil sob dezenas de nomes comerciais, principalmente como constituinte de associações medicamentosas^[103]. A maior parte das vendas (em torno de 80%) ocorre sem prescrição médica, representando um papel importante na condenável auto-medicação, apesar da ANVISA incluí-la na lista de tarja vermelha (venda sob prescrição médica)^[102,104].

2.5.2.1. Métodos de análise do teor de dipirona sódica em medicamentos

Com relação aos métodos descritos na literatura para determinação de dipirona sódica, além da metodologia oficial (método farmacopeico)^[9,10], várias metodologias alternativas encontram-se disponíveis na literatura^[105-151]. Muitos dos métodos propostos possibilitam não apenas a análise de dipirona sódica em formulação injetável, como também podem ser aplicados em outros tipos de formulações, como comprimidos e/ou gotas.

2.5.2.1a. Metodologia Oficial

O método oficial de análise do teor de dipirona injetável é o método clássico de titulação iodométrica, descrito na Farmacopéia Brasileira^[9,10]. Esta metodologia é idêntica a metodologia descrita na farmacopéia britânica^[152].

O método titulométrico preconizado é a iodimetria, tratando-se de um método direto de titulações por uma solução padrão de iodo. Devido a dificuldade de solubilização do iodo ressublimado e da instabilidade da solução de iodo formada, a solução precisa ser frequentemente padronizada com uma solução padrão de um agente redutor, geralmente faz-se uso do tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃)^[153].

O indicador usado na iodimetria é uma suspensão de amido que em presença de iodo adquire uma coloração azul intensa. Na realidade esta cor é devido à adsorção de íons triiodeto (I₃⁻) pelas macromoléculas do amido^[153,154].

A titulação iodométrica da dipirona está baseada na oxidação, em meio ácido, do grupo metanossulfônico a sulfato^[155], de acordo com a reação:



Neste método, a reação química se processa lentamente e a análise torna-se trabalhosa porque há a necessidade de se manter uma temperatura abaixo de 15°C (banho de gelo), e a solução de iodo apresenta um problema de instabilidade por exposição ao ar livre.

Procedimento Analítico

O procedimento analítico do método descrito na Farmacopéia Brasileira^[9,10] para a dipirona sódica injetável recomenda:

-Transferência de um volume da solução injetável correspondente a 5 g de dipirona sódica para um balão volumétrico de 200 ml, completando-se o volume com água destilada e homogeniza-se a solução. Depois, transfere-se 10 ml da solução para um erlenmeyer, adiciona-se 50 ml de água destilada, 5 ml de ácido acético glacial e homogeniza-se. Titula-se com iodo 0,05 mol.L⁻¹, utilizando amido 1% m/v como indicador, sendo este adicionado próximo ao ponto final da titulação. Neste procedimento analítico, cada 1 ml de iodo 0,05 mol.L⁻¹ equivale a 17,57 mg de dipirona.

2.5.2.1b. Metodologias alternativas descritas na literatura

Em levantamento bibliográfico realizado até agosto de 2013 na base de dados do *Chemical Abstracts* (versão on-line) da *Web of Science* [v.5.6]^[156], e do *SciFinder43*^[157], foram encontrados diversos procedimentos descritos na literatura para determinação de dipirona.

Dentre os métodos alternativos propostos, tem-se métodos que utilizam a Espectrofotometria na região Ultravioleta^[105-111] e na região Visível^[112-117], técnicas Eletroquímicas^[118-123], Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)^[124-127], Eletroforese capilar^[128], Métodos Automáticos de Análise por Injeção em Fluxo (FIA)^[129- 84 -149], Técnicas de Análise por Imagem digital^[150] e mais recentemente Espectrometria no Infravermelho Próximo (NIR)^[151].

Dentre os trabalhos, Erk e Onur^[107] propuseram dois métodos para a determinação simultânea de dipirona e cloridrato de lidocaína em soluções injetáveis, utilizando espectrofotometria UV e métodos derivativos. No primeiro método o valor de $dA/d\lambda$ para a dipirona foi medido em 291,8 nm e um coeficiente de variação de 0,23% foi encontrado. No segundo método os fármacos foram extraídos com clorofórmio na presença de nitrato de cobalto e tiocianato de potássio, e a dosagem de dipirona foi realizada pela aplicação da primeira derivada do espectro da camada de clorofórmio com valor de $dA/d\lambda$ em 290,0 nm. O coeficiente de variação encontrado para a dipirona foi de 1,20 %.

Pezza et al.^[112] desenvolveram um método baseado na oxidação seletiva da dipirona na presença de ácido sulfúrico, promovendo a formação de formaldeído, que reage com o ácido cromotrópico produzindo um composto violeta, monitorado espectrofotometricamente em 575 nm. Neste trabalho, esta reação foi utilizada como “*spot test*” (ensaio de cor) para a determinação qualitativa de dipirona, mostrando-se bastante seletivo. Sakiara et al.^[113] utilizaram a mesma reação para o desenvolvimento de um procedimento para determinação quantitativa de dipirona. A lei de Beer foi obedecida no intervalo de concentração de 0,57 a 5,7 mg.L⁻¹ ($1,6 \times 10^{-6}$ a $1,6 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹) de dipirona, a qual foi monitorada em 575 nm. O procedimento apresentou precisão e seletividade na determinação de dipirona em medicamentos, com excelente coeficiente de correlação linear de ($r = 0,9997$). Neste método não foi observada a interferência pelos excipientes comuns nas formulações farmacêuticas. E as recuperações se apresentaram dentro de 98,7-101,2%, com desvios padrão variando de 0,2 a 1,7%. Porém, para que haja a formação do composto violeta, são necessárias condições muito drásticas como uso de ácido sulfúrico 11,2 mol.L⁻¹ e aquecimento a 100 °C durante 25 minutos.

Vassileva-Alexandrova e Shishmanov^[114] propuseram a determinação espectrofotométrica de dipirona baseando-se na reação de complexação do fármaco com o reagente cloreto de

neotetrazólio em meio alcalino (pH 11-12), sendo termostaticado por 20 minutos a 70°C, e solubilizado com a mistura de etanol-HCl. O complexo amarelo formado apresentou absorção máxima em 400 nm. O método apresentou boa sensibilidade, possibilitando a determinação quantitativa de dipirona em medicamentos no intervalo de 4,0 a 20 µg.

Qureshi et al.^[115] propuseram o uso de uma reação colorimétrica indireta para a determinação espectrofotométrica de dipirona. O método é simples e reprodutível, apresentando um desvio padrão relativo de 0,2%. Nesse método, a dipirona foi determinada por meio da sua reação com o iodato de potássio em HCl 1,0 mol.L⁻¹. A mistura reacional precisa ficar em repouso por 5 minutos para que se forme o complexo de cor vermelho-amarelado, com a absorbância monitorada em 460 nm. A lei de Beer é obedecida no intervalo de 1 a 10 mg do fármaco.

Posteriormente outro trabalho da mesma equipe foi publicado (Qureshi et al.^[116]) propondo a determinação espectrofotométrica indireta de dipirona baseados na redução de ferro (III) a ferro (II) por ação da dipirona. A quantificação do íon Fe²⁺ produzido é efetuada através da reação de complexação com 1,10-fenantrolina. A concentração de dipirona é diretamente proporcional às de íons Fe²⁺ formados. A lei de Beer é obedecida no intervalo de concentração de dipirona de 1,0 a 7,0 µg.mL⁻¹. Apesar de sensível, o método apresenta uma série de inconvenientes. São necessários 30 minutos de espera para que a reação se processe completamente, o complexo Fe²⁺—1,10-fenantrolina é sensível à luz, sendo recomendado adicionar ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), para mascarar o excesso de íons férricos presentes no meio reacional após o desenvolvimento da cor e prevenir a foto redução do complexo formado.

Eddine et al.^[127] propuseram o uso da CLAE para a separação e quantificação de dipirona e de três produtos de degradação, utilizando uma coluna de fase reversa, os reagentes metanol-água-trietilamina na proporção de 50:50:0,025 (v/v/v) e detecção ultravioleta. As absorbâncias foram monitoradas em 228 nm no caso da dipirona e em 244 e 254 para os demais metabólitos. O método foi aplicado na análise de comprimidos e injeções, apresentando linearidade nas faixas de concentração de 1,5 a 6,0 µg.mL⁻¹. O método mostrou-se bastante sensível, com limite de detecção de 3 a 5 ng, com tempo de eluição de 12 min.

Pereira et al.^[129] propuseram a determinação espectrofotométrica de dipirona em formulações farmacêuticas por injeção de fluxo com geração de triiodeto. O sistema baseia-se na reação entre a dipirona e triiodeto gerado, no sistema de mistura, por iodato e iodeto na presença de amido. A absorbância do complexo triiodeto-amido foi monitorizada a 580 nm. Os picos inversos causados por amostras de dipirona foram medidos apresentando uma relação direta entre

absorbância e a concentração, sendo esta analisada na faixa de $1,4 \times 10^{-4}$ a $7,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹. O desvio padrão relativo (RSD) encontrado foi 0,45% e o limite de detecção foi de $6,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹.

Marcolino *et al.*^[139], propuseram a determinação de dipirona em formulações farmacêuticas empregando procedimento FIA com detecção turbidimétrica usando uma reação em fase sólida. O procedimento baseia-se na inserção de um reator em fase sólida contendo AgCl imobilizado e por ação da dipirona, os íons Ag⁺ são reduzidos a prata metálica a qual é detectada turbidimetricamente em 425 nm. A faixa de concentração de trabalho para dipirona foi de $5,0 \times 10^{-4}$ – $2,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, com LD de $1,3 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ e frequência analítica de 45 amostras por hora. As recuperações de dipirona obtidas na análise de formulações farmacêuticas variaram de 96 a 102%. Neste método, a presença de altas concentrações de bissulfito de sódio interfere nas análises.

Lyra *et al.*^[150] propuseram um método indireto para determinação de diclofenaco de sódio, dipirona sódica e gluconato de cálcio em medicamentos injetáveis usando o método espectrofotométrico por emissão em chama com detecção por imagem digital (método DIB-FES). O método proposto utiliza imagens digitais obtidas a partir de uma *webcam*, com base no sistema RGB (*Red, Green, Blue* - Vermelho-verde-azul). Nesta metodologia as substâncias orgânicas foram quantificadas utilizando a radiação emitida pelos metais alcalinos e alcalinos-terrosos presentes em suas fórmulas e as curvas analíticas foram construídas com base na relação entre valores RGB e as concentrações das soluções de calibração. Os resultados não mostraram diferença estatística entre a proposta e o método de referência ao aplicar o teste *t* pareado com nível de confiança de 95%. O método DIB-FES apresentou um bom desempenho analítico, com LOD de 0,9 mg.L⁻¹, LOQ de 3,0 mg.L⁻¹, linearidade na faixa de calibração de 27,5 a 137,5 mg.L⁻¹ (1.8 a 9.0 mg.L⁻¹ em termos de sódio), e com recuperação variando entre 97 a 103% para a dipirona sódica injetável.

Dentre os métodos apresentados até então, encontramos métodos com certa simplicidade de execução, outros com custo relativamente reduzido e outros bastante sensíveis. Entretanto, a maioria dos procedimentos envolvem etapas analíticas múltiplas e árduas, com elevado custo de operação e manutenção, e requerem profissionais com boa capacitação para o seu desenvolvimento. Além disso, tanto o método de referência como qualquer outro método exigiam a violação da embalagem dos medicamentos injetáveis e o consumo deste durante a análise.

Já em 2012, uma metodologia para determinação de dipirona em formulações injetáveis sem violação da ampola usando espectrometria no infravermelho próximo (*Near Infrared, NIR*) foi proposta por Sanches *et al.*^[151]. Para este fim, métodos de calibração multivariada^[6] foram utilizados [a saber: Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares Regression, PLS*) e Regressão Linear Múltipla (*Multiple Linear Regression, MLR*) com seleção de variáveis realizada

pelo Algoritmo das Projeções Sucessivas (*Successive Projections Algorithm, SPA*)]. Nenhum erro sistemático foi observado e não foram encontradas diferenças significativas entre os valores preditos e os de referência, de acordo com um teste *t* emparelhado ao nível de confiança de 95%^[151]. Os valores de RMSEP obtidos foram de 0,39% m/v para o modelo PLS e 0,35% m/v para o modelo MLR-SPA, e os coeficientes de correlação obtidos foram de 0,9970 (PLS) e 0,9975 (MLR-SPA). Este método analítico desenvolvido, permite a realização de análises das amostras diretamente em suas embalagens (ampolas ou frascos), evitando a destruição das amostras e diminuindo drasticamente a sua manipulação pelos analistas^[151]. Esta metodologia pode ser inserida na linha de produção industrial, para um controle de qualidade relativamente rápido, simples, prático e muito mais efetivo dos medicamentos produzidos.

2.5.3. Estabilidade de medicamentos injetáveis

Estabilidade é a capacidade da forma farmacêutica se manter, dentro dos limites especificados e ao longo de todo o seu período de armazenamento e utilização, as mesmas propriedades e características que possuía no momento de seu fabrico^[158].

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem^[158]. Qualquer produto que apresente uma alteração (mudança de cor, precipitação, turvação) não deve ser comercializado nem consumido^[73].

A farmacopéia americana^[7] estabelece definições para cinco tipos gerais de estabilidade:

1. **Estabilidade Química:** a estabilidade química é a capacidade da forma farmacêutica em manter a identidade molecular do fármaco. Cada ingrediente ativo mantém sua integridade química e potência rotulada, dentro dos limites especificados. A estabilidade química dos excipientes também deve ser assegurada. A estabilidade química depende da: umidade, temperatura, luz e pH; e os principais mecanismos de degradação química são:
 - Hidrólise - Ocorre quebra da molécula de fármaco pela ação da água – a água é um reagente;
 - Oxidação - Reação que ocorre na presença de oxigênio, com o ganho de oxigênio ou perda de hidrogênio. É iniciada tanto pela luz como pela presença de metais. Caracteriza-se por uma série de reações em cadeia mediadas por radicais livres;

- Fotólise - A luz UV afeta as ligações químicas fornecendo energia para a separação dos elétrons compartilhados entre os dois átomos dessa ligação. Pode resultar em: formação de radicais livres no processo de oxidação; lise da molécula formando dois radicais; a molécula pode sofrer isomerização;
- Racemização - É a conversão de um isômero em outro, resultando em mistura de ambos, geralmente, acompanhada de perda de atividade. Ocorre com compostos que possuem C assimétricos. Seus isômeros são denominados de enantiômeros.

2. **Estabilidade Física:** a estabilidade física significa que o medicamento não sofreu alterações, durante seu armazenamento, que impliquem em mudança das características físicas: Aspecto, cor, odor, sabor, aparecimento de cristais em soluções, dureza ou friabilidade, separação de fases, etc.
3. **Estabilidade Terapêutica:** quando o efeito terapêutico permanece inalterado.
4. **Estabilidade Toxicológica:** quando não ocorre aumento significativo na toxicidade do medicamento.
5. **Estabilidade Microbiológica:** a esterilidade ou resistência ao crescimento bacteriano é mantida de acordo com os requisitos especificados. Os agentes antimicrobianos que estão presentes mantêm a sua eficácia dentro dos limites especificados. A estabilidade microbiológica: A contaminação microbiana acarreta em perda de estabilidade química e física (odor, cor e cheiro desagradável). Os agentes são: algas, bactérias e fungos. As formas particularmente susceptíveis são as preparações líquidas e semi-sólidas.

A decomposição dos fármacos, puros ou nos medicamentos, obriga aos fabricantes estipular a sua data ou prazo de validade. Esse prazo de validade é o tempo que os medicamentos podem ser armazenados, durante o qual a qualidade definida permanece aceitável, sob abrigo esperado (ou especificados) para as condições de distribuição, armazenamento e exibição^[73].

No caso de uso de um medicamento que tiver sofrido degradação, a concentração do fármaco geralmente apresenta-se bem abaixo do valor especificado, sua eficácia terapêutica torna-se comprometida, e logicamente o efeito desejado não será atingido. Além disso, durante o processo de degradação pode ocorrer a formação de subprodutos altamente tóxicos, nocivos à saúde do usuário, podendo levá-lo à morte imediatamente após a administração. Como a medicação injetável é disponibilizada diretamente na corrente sanguínea do paciente, uma vez administrada é praticamente impossível retirá-la, deste modo os riscos à saúde são fortemente potencializados^[6].

As formas farmacêuticas líquidas possuem maior susceptibilidade de serem degradadas devido à alta colisão entre as partículas, possuindo então, menor estabilidade física e química quando comparada as demais formulações orais. (GIL, 2010).

Um medicamento dipirona sódica é bastante conhecido por sua instabilidade à luz. Vários fatores extrínsecos como o calor, o meio aquoso, e a exposição à luz corroboram com a aceleração do processo de degradação do fármaco^[159,160] fórmulas farmacêuticas sólidas a dipirona sódica pode ser oxidada a 4-formilaminoantipirina, e em soluções ácida é transformada em 4-formilmetilaminoantipirina. Já em soluções neutras, como é o caso das soluções injetáveis, a dipirona alcança o equilíbrio com hidroximetanossulfonato de sódio e 4-metilaminoantipirina, que pode ser oxidado ou hidrolisado levando ao ácido metilrubazônico. Em casos de estocagem prolongada, pode ocorrer a formação de 4-hidroxiantipirina como composto de degradação, sendo esta também observada na degradação de soluções. (DIOGO, 2003).

Segundo a OMS, os produtos farmacêuticos devem ser produzidos e controlados de acordo com os padrões de qualidade estabelecidos para seu uso. (OMS, 2010). A qualidade dos medicamentos é um atributo de caráter não apenas comercial, mas também legal e moral, e deve ser preservada pelos setores produtores. E muito embora a maioria das indústrias farmacêuticas operem com padrões de qualidade estabelecidos internacionalmente, muitos dos medicamentos produzidos ainda chegam ao mercado consumidor fora desses padrões^[1]. De acordo com a RDC nº 17 de 16 de abril de 2010, que dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos, o controle de qualidade deve garantir que o armazenamento dos medicamentos pelo fabricante, a distribuição e o manuseio subsequente assegurem que a qualidade do produto será mantida por todo o prazo de validade. (BRASIL, 2010). Entretanto, Knappmann e Melo (2011) relatam que entre os anos de 2000 a 2006, 18 lotes de dipirona foram recolhidos por estarem em desacordo com as especificações contidas em sua monografia na Farmacopéia Brasileira, sendo objeto de interdição após inspeções realizadas pela Anvisa. Desta forma, o controle de qualidade destes produtos deveria ser realizado com maior cautela e maior frequência. Esse controle pode ser otimizado quando feito de forma dedicada, com instrumentação adequada desenvolvida para esta finalidade.

Quando um produto está fora das condições preconizadas, seu comercio torna-se inviabilizado, e o prejuízo afeta tanto o produtor como o usuário final. A criação de instrumentos que auxiliem o controle de qualidade dos medicamentos injetáveis não se encaixa como uma mera pesquisa, e sim uma necessidade real e atual.

O método de análise adotado para a instrumentação também é algo muito relevante, uma vez que dependendo da técnica de análise adota para o instrumento, este pode gerar informações

demasiadas para serem armazenadas em microcontroladores, fazendo-se uso de memória adicional, ou do uso de microcomputadores para armazenar os dados gerados. Uma alternativa muito eficiente para se baixar o consumo de espaço de memória é a utilização de métodos *screening* de análises, que exigem um tratamento de dados menos rebuscado, gerando dados de saída muito mais simplificados, necessitando de *softwares* menos complexos do que aqueles necessários para métodos quantitativos de calibração multivariada.

2.6. Análises do Tipo *screening*

Há muitos casos em que a quantidade de informação dada por uma análise excede as necessidades do analista ou do cliente, e isso enfatiza a importância do desenvolvimento de simples dispositivos para *screening* de amostras^[161]. Não há diferença etimológica entre os termos “analisar” e “*screening*”, exceto pela subsequente ação discriminatória que a *screening* envolve^[162].

O termo “*screening*” foi definido de duas formas a partir do ponto de vista da análise:

- a) um termo que envolve métodos que indicam se os analitos vão se apresentar acima ou abaixo de um limite; e,
- b) a aquisição rápida de dados semi-quantitativos sobre todos componentes de uma determinada amostra.

Sistemas *screening* diminuem a interação do analista em uma ou mais etapas de um processo analítico auxiliando nas decisões (sim ou não, presente ou ausente, positivo ou negativo, continue ou pare, etc.)^[163]. É uma modalidade que tem ganho grande destaque na química analítica por poder ser incluída dentro do contexto de análise prévia de amostras^[161,164].

Em geral, os métodos *screening* têm algumas das seguintes características:

- Tendem a ter mais ênfase no qualitativo do que no quantitativo;
- Normalmente envolvem pouco ou nenhum tratamento da amostra;
- Eles são rápidos e a resposta é usada para tomada de decisões imediatas; e,
- A resposta obtida por vezes requer confirmação por um método convencional alternativo.

Os principais objetivos do exame da amostra por sistemas *screening* estão resumidos a seguir^[161]:

- 1) Para evitar a necessidade de processar um grande número de amostras, para tornar decisões oportunas, ou para obter medidas globais de substâncias tóxicas ou poluentes;
- 2) Para minimizar as operações preliminares no processo de uma análise convencional, que geralmente são tediosos, demorados, e são fontes de erros sistemáticos; e,

3) Para minimizar a necessidade de instrumentos de uso permanente de elevados custos de compra e manutenção.

De maneira geral, uma classificação em um sistema *screening* é feita de acordo com diferentes critérios^[165]:

- a) Com ou sem tratamento de amostra;
- b) Análise laboratorial de sistemas *in situ* - análise de campo de modo a facilitar a decisão a tomar de forma rápida e evitar a transferência de amostras de elevado potencial de deterioração, e para isso, os sensores são muito promissores;
- c) Resposta global ou discriminatórias;
- d) A complexidade da instrumentação empregada - há vários relatos de sistemas *screening* na análise sem utilização de cromatografia;
- e) A disponibilidade do kit comercial - alíquota de uma amostra é misturada com o reagente fornecido para o efeito da resposta analítica; estes kits são muito comuns em ensaios clínicos e toxicológicas, e,
- f) Área de alimentos, ambiental ou clínica.

A informação quantitativa necessária para estabelecer um método *screening* inclui: o limite de determinação (LD) da técnica utilizada e suas incertezas, o limite imposto pelo cliente ou pela legislação, e do nível de corte estabelecido pelo analista. Porém, na análise quantitativa, as respostas instrumentais a partir de um processo de medição envolvem erros aleatórios. Esses erros introduzem incertezas na resposta binária e na decisão a ser tomada^[166]. Por isso a confiança criada para o sistema *screening* deve levar em conta os erros provenientes de um sistema binário de resposta: falsos negativos e / ou falsos positivos.

Métodos como: tabelas de contingência, teorema de *Bayes*, uso de intervalos estatísticos e curvas de performance, são exemplos de métodos confiáveis do cálculo da probabilidade dos erros de decisão nas análises *screening*. Todos estes métodos têm por objetivo determinar as regiões de incerteza em torno dos limites de especificação para, a partir daí, serem tomadas decisões para análises subsequentes. Tabelas de Contingência foram utilizadas^[167] no campo de ensaios imunológicos, ensaios microbiológicos e clínicos. Ellison et al.^[168] apresentou o teorema de *Bayes* como uma estrutura para expressar a incerteza em análise qualitativa. Em contraste, *EURACHEM*^[169,170] propôs um processo para a avaliação das probabilidades de erros dos tipos I e II^[171], com base na análise de replicação de amostras em diferentes concentrações. Além desses métodos, outros relatórios introduziram o conceito de teste de hipóteses para avaliar essa

incerteza^[172-174], mas estes procedimentos não foram desenvolvidos para um nível prático no campo da química analítica.

Outra forma de quantificação da incerteza da resposta proporcionada por um sistema *screening* instrumental, porém para análise qualitativa, é pelo uso de curvas de performance^[175-177]. Embora os parâmetros de medidas pareçam semelhantes aos utilizados nos intervalos estatísticos, uma vez que se calcula as regiões de incerteza em torno dos limites de especificação usando probabilidades, as curvas de performance são gráficos estatísticos.

Curvas de performance são gráficos de probabilidade versus um parâmetro de interesse (por exemplo: concentração) utilizados para se determinar regiões de não confiabilidade dos resultados analíticos qualitativos^[175]. Nestes gráficos é representada a probabilidade de se obter um resultado positivo, $P(x)$, em função da concentração x . Um limite de corte C deve ser pré-estabelecido para que uma resposta binária (Positivo ou Negativo) seja produzida, ou seja, para se determinar se a concentração se encontra acima ou abaixo deste limite^[176,177]. O limite de corte deve ser escolhido com base nos limites de especificação para o produto analisado e no limite de detecção do método utilizado (**Figura 5**).

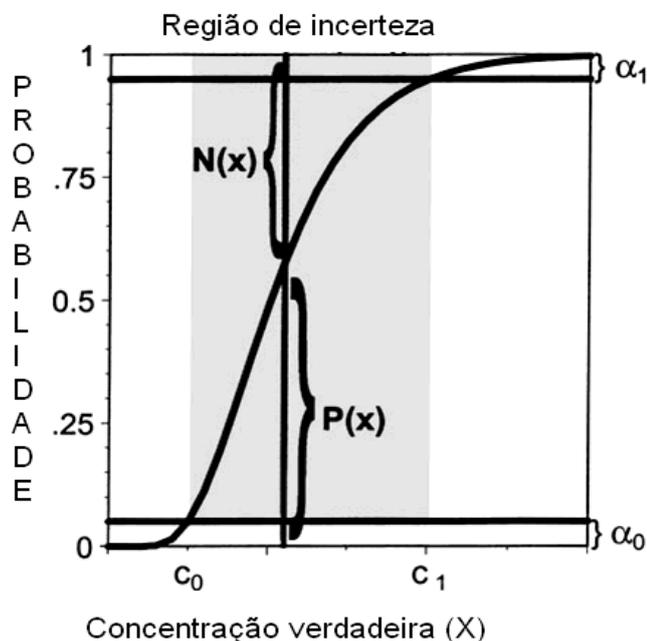


Figura 5. Curvas de probabilidade de respostas positivas $P(x)$ versus concentração x de uma *screening* real^[176].

Se α_0 é a taxa de falso-positivo e α_1 é a taxa de falso-negativo, o intervalo $[C_0, C_1]$, tal que $P(C_0) = \alpha_0$ e $P(C_1) = \alpha_1$ forma a região de não confiabilidade que corresponde à taxa de resposta falsa. Assim, é possível estabelecer as regiões de confiabilidade e de não confiabilidade das concentrações obtidas no método *screening*, como é mostrado na **Figura 6**.

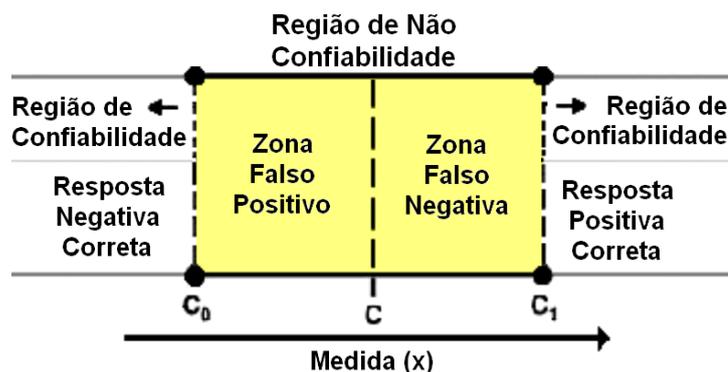


Figura 6. Regiões de confiabilidade e de não confiabilidade de um sistema *screening*^[177].

Com base na **Figura 6**, as regiões de confiabilidade e de não confiabilidade são definidas da seguinte forma:

- $x < C_0$: região de confiabilidade para respostas negativas;
- $C_0 < x < C_1$: região de não confiabilidade dos resultados;
- $x > C_1$: região de confiabilidade para resultados positivos.

Como os valores para $P(x) = 0\%$ e $P(x) = 100\%$ representam linhas assintóticas com respeito à curva experimental, α_0 e α_1 (geralmente iguais em valores absolutos) são, respectivamente, a porcentagem de falsos positivos e falsos negativos escolhidos (por exemplo, 5% por analogia ao nível de significância geralmente adotada em estatística Gaussiana). Eles podem ser representados por α (para $\alpha_0 = \alpha_1$) e, conseqüentemente, α representa o erro experimental aceito^[176,177].

Teoricamente, os princípios descritos acima constituem a base para desenvolver um procedimento simples para estimar a região de não confiabilidade de métodos *screening*. Entretanto, a curva de probabilidade versus concentração tem que ser definida matematicamente para um método teste particular. Assim, com a finalidade de se fazer um estudo qualitativo, verifica-se, portanto, que há a possibilidade de se aplicar o método *screening* para classificar os medicamentos injetáveis como conformes ou não conformes. Portanto, para se verificar a qualidade de medicamentos injetáveis seguindo a filosofia do sistema *screening*, é suficiente determinar as regiões de incerteza em torno dos sinais analíticos esperados para os teores do princípio ativo (no caso, dipirona sódica) nos limites preconizados pela farmacopéia^[9,10], e aceitos pela ANVISA.

Obviamente, além da calibração da faixa de conformidade, a determinação das regiões de incerteza deve ser calculada ao redor da faixa aceita para as regiões de falsos positivos e falsos negativos (**Figura 7**). Este estudo, obviamente, é dependente dos sinais analíticos referente às diferentes concentrações e da sensibilidade analítica do detector para os componentes analisados.

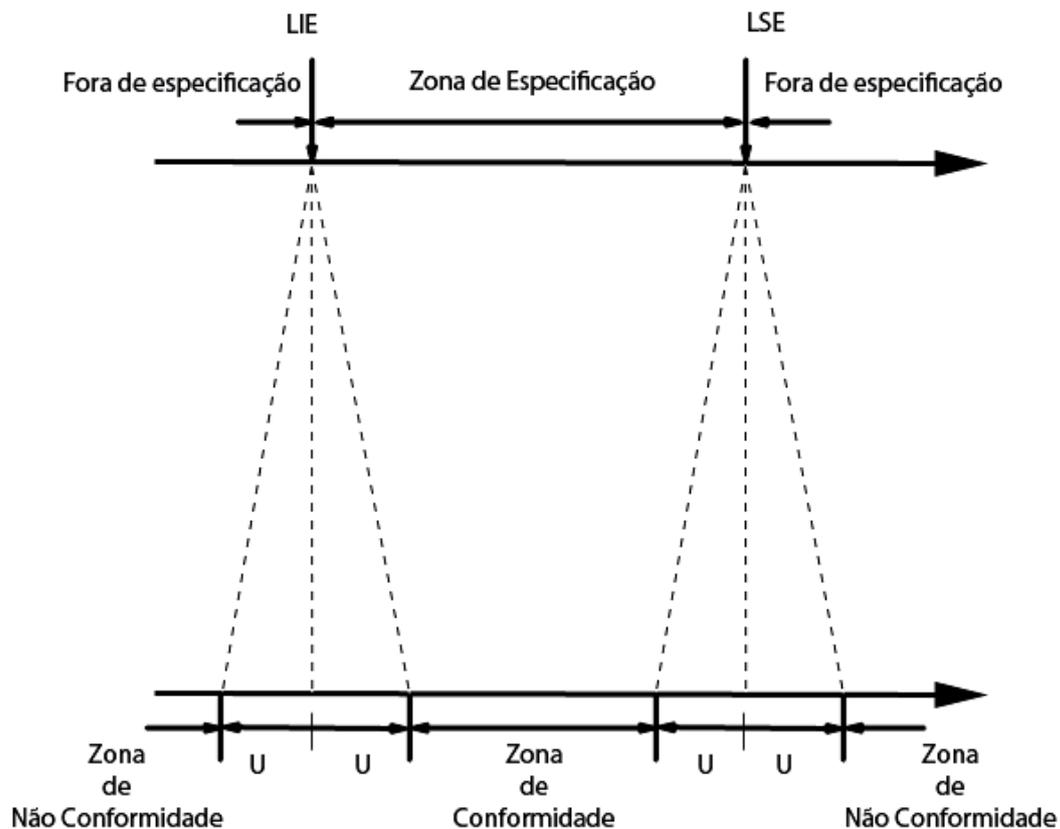


Figura 7: Relação entre a zona de especificação e a zona de conformidade. Onde LIE representa o limite inferior e LSE o limite superior de calibração e U a região de incerteza de medição (que inclui os falsos positivos e os falsos negativos).

A **Figura 7** mostra a relação entre a zona de especificação e a zona de conformidade. Se o "verdadeiro valor" do mensurando está dentro da zona de especificação, temos que a especificação é satisfeita, caso contrário, o mensurando está fora de especificação. No entanto, nunca podemos conhecer o "verdadeiro valor" do mensurando (em função da incerteza associada a medida) mas podemos ter um bom indicativo. Assim, a fim de indicar se o mensurando está ou não fora da especificação, temos que conhecer a incerteza no processo de medição. Isso é mostrado na parte inferior da linha horizontal na figura. Se o mensurando está na zona de conformidade, temos confiança de que o verdadeiro valor está dentro da especificação. Da mesma forma, se o mensurando está na zona de não conformidade, temos confiança de que o verdadeiro valor está fora de especificação. Para a região de incerteza, mostrado entre conformidade e não conformidade, não temos confiança suficiente para determinar se produto está conforme ou não.

Neste caso em particular, como ilustrados na **Figura 7**, a faixa se encontra dentro de duas regiões de incerteza a serem investigadas, uma envolvendo o limite inferior especificado (LIE) e outra envolvendo limite superior especificado (LSE) para calibração. Ou seja, apresenta dois pontos de corte (C e D), conforme ilustrado na **Figura 8**.

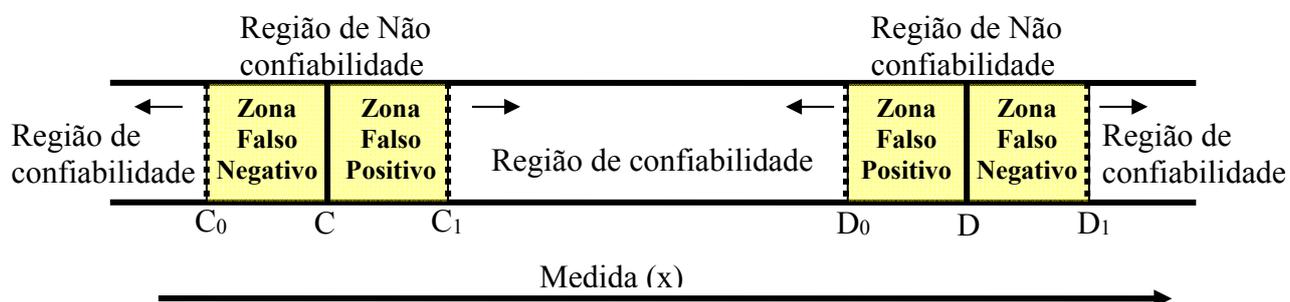


Figura 8. Regiões de confiabilidade e de não confiabilidade de um sistema *screening*, com dois pontos de corte representados por C e D.

Agora, com base na **Figura 8**, as regiões de confiabilidade e de não confiabilidade serão definidas da seguinte forma:

- $x < C_0$: região de confiabilidade para respostas positivas (ou seja, de adulteração ou de não conformidade);
- $C_0 < x < C_1$: região de não confiabilidade dos resultados;
- $x > C_1$: região de confiabilidade para resultados negativos (ou seja, de não adulteração ou de conformidade);
- $x < D_0$: região de confiabilidade para respostas negativas (ou seja, de não adulteração ou de conformidade);
- $D_0 < x < D_1$: região de não confiabilidade dos resultados;
- $x > D_1$: região de confiabilidade para resultados positivos (ou seja, de adulteração ou de não conformidade).

Posteriormente torna-se necessário encontrar os valores de α correspondentes às porcentagens de falsos positivos e falsos negativos, com base no nível de significância escolhido (95%), conforme descrito anteriormente.

Os métodos *screening* oferecem a possibilidade de reduzir-se a complexidade dos procedimentos analíticos aplicados, entretanto, embora seja o procedimento mais simples e mais rápido, é também o menos sensível para se afirmar, com mais rigor e confiabilidade, sobre a conformidade do medicamento. Então, nos caso em que esse rigor é exigido, a opção recai sobre o processo mais complexo, porém mais sensível, ou seja, sobre uma análise quantitativa usando uma curva analítica para calibração do instrumento.

Pelo exposto até aqui, entende-se que, para a determinação do analito de interesse é interessante reduzir-se a complexidade dos procedimentos analíticos aplicados. Assim, o instrumento desenvolvido deve determinar inicialmente o nível de concentração do analito pelo

procedimento mais simples e mais rápido, mas também menos sensível, ou seja, baseado na análise *screening* para designar a conformidade. E, somente para os casos em que a concentração da amostra apresentar não conformidade, ou for altamente suspeita, ou estiver fora do prazo de validade, a opção recairia sobre o processo mais complexo e mais sensível, ou seja, para uma análise quantitativa usando uma curva analítica.

2.7. Parâmetros de Validação de uma Curva Analítica

Para a análise quantitativa das amostras de dipirona sódica injetável foi elaborada uma curva analítica. Esse método consiste em se medir sinais instrumentais de soluções de referência (conhecido também como soluções padrão) de um analito e construir uma curva dos sinais analíticos versus concentração do analito das soluções de referência. Esta curva é depois usada para determinar a concentração do analito nas amostras usando a equação estimada empregando uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A construção da curva analítica requer a preparação de 4, 5, ou mais soluções de referência. Entretanto deve-se lembrar que não basta apenas “calibrar” o instrumento, uma vez que o desenvolvimento de um método analítico envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo costuma ser denominado de validação. Várias definições estão descritas na literatura para validação, tratando-se, portanto, de termo não-específico^[178].

Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos. Portanto, existe diferença entre a execução de experimentos que determinam os diversos parâmetros (coleta dos dados experimentais) e a validação. Essa deve avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder. O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito^[179]. A validação deve ser considerada quando se desenvolve ou efetua adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos.

A validação é essencial para definir se métodos desenvolvidos estão completamente adequados aos objetivos a que se destinam, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados. Desta forma, possibilita o conhecimento das limitações e da confiabilidade nas medidas realizadas nas análises.

Deve-se ressaltar que o método pode ser considerado validado, mesmo que alguns parâmetros não se enquadrem nos limites estabelecidos na literatura, mas que sejam criteriosamente conhecidos e, portanto, adequados aos objetivos do estudo a ser realizado. Os parâmetros de validação de métodos analíticos envolvem: Especificidade/Seletividade, Função da Resposta

(gráfico analítico), Intervalo de Trabalho, Linearidade, Sensibilidade, Exatidão, Precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutividade), Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ) e Robustez.

2.7a. Especificidade/Seletividade

O termo especificidade, muitas vezes utilizado como sinônimo de seletividade, define a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Já a seletividade refere-se à capacidade de detecção de substâncias^[180]. O processo para demonstrar a especificidade do método depende do seu objetivo. Em diversas técnicas analíticas esse parâmetro pode ser estabelecido pela comparação do resultado obtido com a combinação de vários fatores. Como substâncias diferentes podem apresentar respostas similares em dadas condições deve-se proceder à análise, seguida por outras técnicas comprobatórias. Outra maneira de avaliar a especificidade envolve a adição de padrão analítico ou a comparação com padrão externo^[181].

2.7b. Função da resposta (gráfico analítico)

O gráfico analítico deve apresentar os dados estatísticos de intersecção, a equação da regressão linear, o coeficiente de correlação ou de determinação e a concentração estimada dos calibradores (soluções-padrão). Assim, torna-se necessário o uso de número suficiente de soluções-padrão para definir adequadamente a relação entre a concentração e a resposta. O gráfico analítico pode ser construído usando-se, no mínimo, cinco valores de concentração enquadrados no intervalo definido^[181-183].

A suposição clássica do gráfico de calibração é que a resposta instrumental y está linearmente relacionada com a concentração do padrão x , tal como:

$$y = F(x) + e_y \quad (7)$$

Na qual: e_y é o erro randômico ou indeterminado (distribuição normal); y é o sinal analítico (ou resposta instrumental).

Geralmente, o erro randômico é desprezado na relação, ficando $y = F(x)$:

$$F(x) = B + Sx \quad (8)$$

Na qual: **B** é a média das medidas do branco (ou linha de base), **S** é a sensibilidade do método e **x** é a concentração do analito na amostra.

Julga-se satisfatória a linearidade do gráfico quando o coeficiente de correlação da reta obtida não é estatisticamente diferente da unidade^[184]. No caso, considera-se:

R = 1	Correlação perfeita
0,91 < R < 0,99	Correlação fortíssima
0,61 < R < 0,91	Correlação forte
0,31 < R < 0,60	Correlação média
0,01 < R < 0,30	Correlação fraca
R = zero	Correlação nula

Embora sempre se busque obter relação linear entre a propriedade a ser medida e a concentração ou quantidade do analito pode-se também admitir a relação não-linear^[185].

2.7c. Intervalo de trabalho

O intervalo do método analítico corresponde à faixa do maior ao menor nível que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade do método^[181-183]. Geralmente, os analistas seguem o caminho inverso. Primeiro, selecionam o intervalo de trabalho (baseado no nível de concentração do analito que desejam estudar) e depois determinam se a relação sinal versus concentração é linear.

2.7d. Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em faixa analítica especificada. Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico^[182-184], que não deve ser estatisticamente diferente de 1 (avaliado pelo teste “t” de *Student*), observando-se que a inclinação da reta seja diferente de zero. Assim, é necessário obter coeficiente de correlação estatisticamente igual a um e coeficiente angular diferente de zero.

A linearidade pode ser avaliada por meio da análise de variância ponderada (ANOVA ponderada). Considera-se que o gráfico analítico satisfaz o critério de linearidade quando quatro gráficos mostrarem resultado positivo para esse teste ou quando três forem lineares^[186] e aquele que não satisfizer as condições no nível de significância de 0,05 as satisfaça no nível de 0,01 (F_a

$0,05 < F_{\text{obtido}} < F_{\alpha} 0,01$). Outra forma de avaliar a linearidade é por meio da relação entre a concentração recuperada e a de fortificação, que deve ser linear^[187]. Assim, estima-se a capacidade do método em desviar-se linearmente da recuperação ideal (100%)^[185].

2.7e. Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas^[185]. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico^[188] expresso como:

$$S = \frac{d\gamma}{d\chi} \quad (9)$$

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito. Entretanto, tornou-se comum o uso errôneo desse termo para designar método com baixo limite de detecção (LD)^[185].

2.7f. Exatidão

A exatidão é definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico^[182-184], constitui a chave para o propósito da validação. Os quatro métodos principais, propostos para o estudo da exatidão, são baseados: no uso de material de referência certificado (MRC), na comparação do método proposto com um método de referência, no uso de ensaios de recuperação na matriz e em estudos colaborativos^[189].

O processo de avaliação por meio de MRC consiste em analisar número suficiente de replicatas desse material e comparar os resultados obtidos com o valor certificado. Entretanto, o alto custo do MRC e a abrangência limitada de matrizes e analitos restringem seu uso^[190].

A exatidão também pode ser estabelecida mediante comparação entre os valores obtidos pelo método proposto com os valores obtidos para as mesmas amostras com outro método validado (método com precisão e exatidão avaliadas). Após análise de diferentes amostras com ambos os métodos, as diferenças obtidas para cada amostra são calculadas e comparadas com o valor desejado (nesse caso, zero). Estabelece-se, então, o nível de confiança de acordo com o intervalo de concentração (menores valores de concentração causam maior dispersão dos dados aumentando o limite de confiança)^[185].

Os estudos colaborativos implicam na aceitação de pelo menos oito laboratórios (número mínimo) em desenvolver determinado método. Somente quando for impossível reunir tal número de laboratórios, o estudo poderá ser conduzido com o mínimo absoluto de cinco participantes^[191].

A maior dificuldade frequentemente encontrada quando se tenta estabelecer a exatidão do método por meio de estudos colaborativos envolve a garantia de estabilidade do analito (assegurar que a concentração do analito, a ser determinada na amostra, permaneça estável durante o decorrer do estudo).

No processo de validação em estudos colaborativos usa-se a análise de variância (ANOVA), que determina a existência de diferenças significativas entre os valores obtidos pelos laboratórios envolvidos^[185].

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. O estudo da recuperação consiste na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado.

A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo^[189]. O erro sistemático ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra (entre outros).

2.7g. Precisão

O parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra é a precisão do processo analítico. Usualmente, é expressa como o desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação de diversas medidas^[187]. O coeficiente de variação (CV) é dado pela seguinte equação:

$$CV\% = \frac{s}{M} \times 100 \quad (10)$$

onde *s* é o desvio-padrão das recuperações e *M* a média das determinações.

A precisão pode ser considerada no nível de repetitividade, de precisão intermediária e de reprodutividade^[192-194]. A repetitividade, também conhecida como precisão intra-ensaios, expressa a precisão nas mesmas condições de operação (equipamento, analista, reagentes, dia e mesmas condições ambientais) em pequeno espaço de tempo. A repetitividade pode ser avaliada com no mínimo nove determinações dentro do intervalo de três diferentes concentrações e três replicatas

cada, ou com no mínimo seis determinações para uma única concentração-teste. A precisão intermediária expressa as variações no mesmo laboratório que envolvem diferentes dias, diferentes analistas e diferentes equipamentos, entre outros. Tal termo tem sido pouco empregado e esses testes não são comumente citados na literatura^[178]. A reprodutividade expressa a precisão entre laboratórios, mediante estudos colaborativos usualmente aplicados para padronização de metodologias^[182-183]. O método será considerado preciso quando apresentar níveis de variações dentro do aceitável para cada nível de concentração (conforme valores tabelados).

2.7h. Limite de detecção

É a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas constitui o limite de detecção^[182,183]. Analistas, quando desenvolvem métodos novos ou modificados para análise de traços, freqüentemente definem Limites de Detecção (LD) em termos do desvio-padrão de medidas do branco. Entretanto, sendo o branco constituído de todos os reagentes, com exceção da amostra e do analito, não reproduz as mesmas condições a que o analito estará sujeito durante a análise^[185].

O LD determinado dessa forma pode avaliar mudanças ocorridas durante o desenvolvimento do método, ou para comparação de instrumentos. Entretanto, em relação à análise prática, esses valores são extremamente baixos e não representam a realidade^[185]. O limite de detecção pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos. O sinal/ruído pode ser aplicado somente para processos analíticos que exibem linha de base. A determinação da razão sinal/ruído é realizada por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado. A razão sinal/ruído com valor 3 é geralmente considerada aceitável para estimar o limite de detecção^[182,183,192]. O limite de detecção pode ser expresso pela equação abaixo^[183,192]:

$$LD = \frac{3 \times s}{S} \quad (11)$$

Onde s é o desvio-padrão da resposta e, S é o coeficiente angular do gráfico de calibração (sensibilidade de calibração). No caso dos processos estatísticos, utiliza-se o "teste de hipótese" para estimar o LD com valores obtidos de várias medidas do branco pela seguinte equação^[185]:

$$LD = \frac{2 \times t_{n,95\%} \times s_B}{S} \quad (12)$$

Onde: $t_{n, 95\%}$ é o valor tabelado em função de n (número de análises); s_B é o desvio-padrão do branco; e S é a sensibilidade do aparelho.

Quando se obtém poucos valores de medidas do branco ou quando tais valores se apresentam como linha de base, esse tipo de estimativa pode não ser adequado. O LD pode ser estimado pelos experimentos de recuperação mediante o desvio-padrão (s_A) do menor nível de fortificação, calculando-se s_{com} com a partir de s_A e s_B :

$$s_{com} = \sqrt{\frac{(m-1)s_A^2 + (n-1)s_B^2}{m+n-2}} \quad (13)$$

Onde: m é o número de determinações do menor nível de fortificação; n é o número de determinações do branco; s_A é o desvio-padrão da amostra do menor nível de fortificação; s_B é o desvio-padrão do branco. A partir desse valor estima-se o limite de detecção pela equação:

$$LD = \frac{2 \times t_{n,95\%} \times s_{com}}{S} \quad (14)$$

No processo estatístico são considerados todos os efeitos a que o método está sujeito (variações do branco e variações da amostra fortificada no menor nível).

2.7i. Limite de quantificação

O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas^[183,192]. Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos. O procedimento sinal/ruído pode ser aplicado somente para processos analíticos que exibem linha de base. Efetua-se a determinação da razão sinal/ruído por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser quantificado^[182,183,192]. Exemplo de razão sinal/ruído típica é 10:1. O limite de quantificação (LQ) pode ser expresso pela equação^[192]:

$$LQ = \frac{10 \times s}{S} \quad (15)$$

Onde: s é o desvio-padrão da resposta e, S é o coeficiente angular do gráfico de calibração (sensibilidade do método).

2.7j. Robustez

Segundo a *International Conference on Harmonisation* (ICH), a robustez do método é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado sob pequenas, mas estudadas variações nos parâmetros do método e prover indicação da sua dependência durante o uso normal^[193,194]. A avaliação da robustez pode ser considerada durante a fase de desenvolvimento e depende do tipo de processo em estudo. Nos testes de robustez são aplicados experimentos estatísticos que examinam, simultaneamente, os efeitos de alterações em diferentes variáveis do método^[193]. Os testes de robustez, em geral, servem para indicar os fatores que podem influenciar, significativamente, a resposta do método estudado. Tal fato fornece a dimensão do problema que ocorre quando o método é repetido em diferentes condições ou é transferido, por exemplo, para outro laboratório^[194] ou para outro campo.

2.8. Tratamento Estatístico da Curva Analítica da dipirona sódica

A validação do modelo de regressão será efetivada mediante os parâmetros apresentados no item anterior (**Item 2.7**) e pela aplicação de métodos estatísticos baseados na análise de variância (ANOVA)^[16, 195], cujas equações se encontram na **Tabela 4**.

Tabela 4. Equações para a análise de variância de dados experimentais adaptados a modelos lineares determinados pelo método dos mínimos quadrados.

Fonte da Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática
Modelo	$SQ_{reg} = \sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	p-1	$MQ_{reg} = SQ_{reg}/(p-1)$
Residual	$SQ_r = \sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	n-p	$MQ_r = SQ_r/(n-p)$
Falta de Ajuste	$SQ_{faj} = \sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	m-p	$MQ_{faj} = SQ_{faj}/(m-p)$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum \sum (y_{ij} - y_{im})^2$	n-m	$MQ_{ep} = SQ_{ep}/(n-m)$

$$s = (MQ_r)^{1/2} \tag{16}$$

$$s(b_0) = s [\sum (x_i)^2 / n \sum (x_i - x_m)^2]^{1/2} \tag{17}$$

$$S(b_1) = s / [\sum (x_i - x_m)^2]^{1/2} \tag{18}$$

Onde: n_i é o número de repetições no nível i da variável x ; m é o número de níveis distintos de x ; $n = \sum n_i$ é o número total de medidas; p é o número de parâmetros do modelo; i é o número de medidas repetidas em x ; j é o número de medidas repetidas de y no nível i de x ; y_m é a média dos y ;

y_{im} é a média dos y em cada nível i de x . Nas expressões com dois somatórios, o segundo somatório vai de $j=1$ até $j=n_i$. Todos os outros somatórios vão de $i=1$ até $i=m$.

A análise dos resíduos do modelo verifica o comportamento aleatório ou homoscedástico dos erros de predição do modelo com relação aos dados experimentais. Um gráfico de resíduos é suficiente para se verificar erros sistemáticos ou resultados tendenciosos.

Já no Teste de falta de ajuste, os resíduos deixados pelo modelo para determinações realizadas em diversos níveis da variável x (representado pela Média Quadrática da falta de ajuste, MQ_{faj}) são comparados aos resíduos deixados pelas análises repetidas (autênticas) em um determinado nível da variável x (representado pela Média Quadrática do erro puro, MQ_{ep}). Quanto maior a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} com relação ao valor de F obtido pela aplicação do teste F para um determinado nível de confiança (geralmente 95%), melhor o modelo linear.

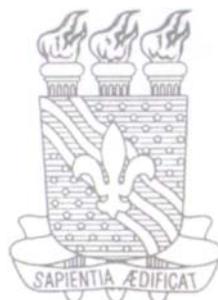
E, no Teste da Significância da Regressão os resíduos deixados pelo modelo com relação a média dos valores de y (representado pela Média Quadrática da regressão, MQ_{reg}) são comparados com os resíduos do modelo com relação aos dados experimentais (representado pela Média Quadrática residual, MQ_r). Quanto menor for o valor da razão MQ_{faj}/MQ_r com relação ao valor de F para um certo nível de confiança, mais ajustado o modelo se encontra com relação aos dados experimentais.

Os cálculos das médias quadráticas para a verificação da validade dos modelos lineares elaborados neste trabalho se basearão nas equações presentes na **Tabela 4**. Realizados os testes de validação, intervalos de confiança para os coeficientes linear (b_0) e angular (b_1) para alguns dos modelos serão elaborados.

Para o cálculo destes parâmetros será determinada a estimativa do erro padrão s para um mesmo nível x utilizando-se a **Equação 16** e, a partir deste valor, serão estimados os erros padrão $s(b_0)$ e $s(b_1)$ nos parâmetros do modelo com as **Equações 17** e **18**. Nestas equações, x_m é o valor médio de todas os valores de x . As outras notações estão explicadas na **Tabela 4**.

CAPÍTULO III

FOTÔMETRO LED-NIR DUPLO FEIXE



3.0. FOTÔMETO LED-NIR DUPLO FEIXE

3.1. Descrição do fotômetro LED-NIR duplo feixe

Na **Figura 9** é apresentada uma fotografia da vista frontal do fotômetro LED-NIR montado, o qual foi colocado em uma caixa (gabinete) de plástico com 22,5 cm x 10,0 cm x 19,0 cm de, respectivamente, largura, altura e profundidade. A caixa do suporte lateral para cubetas tem dimensões 5,5 cm x 10,0 cm x 7,2 cm. Pode se observar na **Figura 9** os botões de controle e de operação do equipamento. Além disso, é encontrado o mostrador de LCD onde são apresentados os valores das medidas efetuadas.

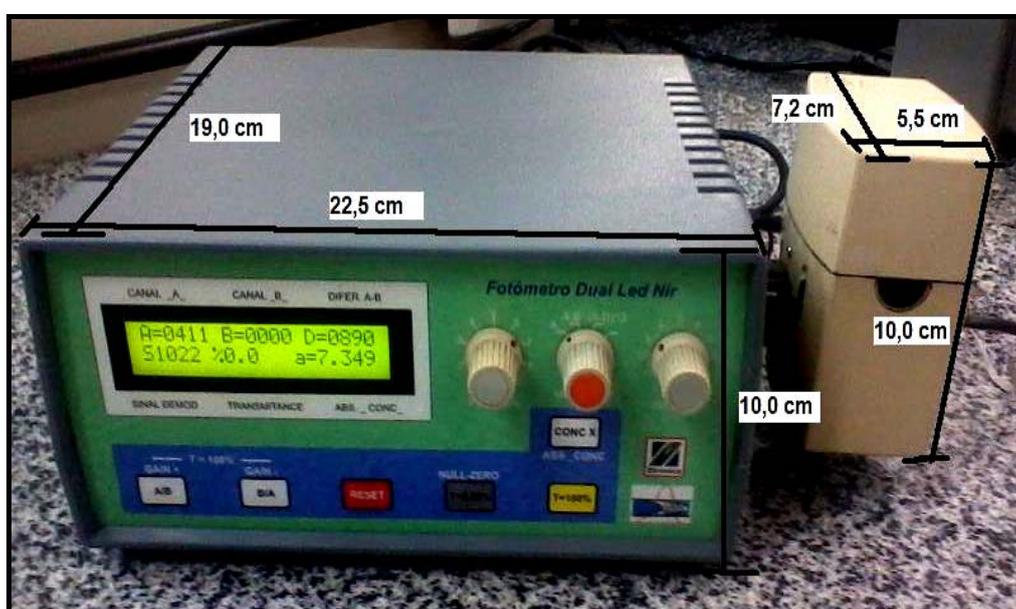


Figura 9 – Vista frontal do fotômetro LED-NIR microcontrolado.



Figura 10 – Vista posterior do fotômetro LED-NIR microcontrolado.

Na **Figura 10** é focalizada a parte posterior do aparelho onde se encontram: a saída para comunicação externa (USB 2.0), conector do cabo de alimentação externa com opção para operar com tensão de 110 ou 220 V, conectores de alimentação “interna” dos LEDs (fios cinza) e detectores (fios vermelho).

3.1.1. Suporte para Celas de Medidas

O suporte para cubetas e ampolas do fotômetro LED-NIR é visualizado na fotografia apresentada na **Figura 11**. Esse dispositivo foi montado na lateral esquerda do equipamento, ao qual encontram-se associados os LEDs e os fototransdutores para as medidas de transmitância.



Figura 11 – Vista frontal (A), ilustrando o suporte para celas de medidas com as ampolas (B), na lateral do fotômetro. Onde: **D** indica a localização dos detectores, **L** indica a localização dos LEDs. Os números correspondem a dimensão do porta cubetas e do acessório para ampolas, onde: **1**= 7,8 cm, **2**= 5,8 cm; **3**= 1,3 cm; **4**= 1,3cm; **5**= 4,2 cm e **6**= 1,3 cm.

O acondicionamento dos LEDs-NIR e fototransdutores nos suportes para as ampolas foi projetado de modo que os dispositivos ficassem fixos frontalmente, próximos e focados o máximo possível (melhor ângulo) para uma melhor obtenção do sinal de transmitância. O módulo foi projetado com encaixes simples, de modo a facilitar a troca dos LEDs e dos detectores, caso seja necessário. O suporte para as amostras está devidamente fixado ao instrumento, porém possui facilidades para sua desconexão caso precise ser substituído.

3.1.2. Fonte de Radiação

Os LEDs-NIR utilizados no fotômetro apresentam emissão em 1050 nm (uma vez que não tínhamos disponibilidade de LEDs na região de 1100 nm). Na montagem foram utilizados dois LEDs-NIR gêmeos (mesmo fabricante e mesmas especificações) como fonte de radiação, com substrato de InGaAsP, montados em uma estrutura principal com lente esférica e corpo cilíndrico de

epóxi transparente, com ângulo de emissão de $\pm 10^\circ$, e intensidade radiante muito alta (**Figura 12**). Seu dimensionamento externo é apresentado na **Figura 13**. Estes dispositivos suportam correntes elétricas pulsadas de até 1A. Os primeiros LEDs utilizados, em polarização direta, emitem uma banda espectral de radiação com pico em 1050 nm, com largura de banda a meia altura de 50 nm (**Figura 14**).



Figura 12. LEDs-NIR de InGaAsP utilizados no fotômetro.

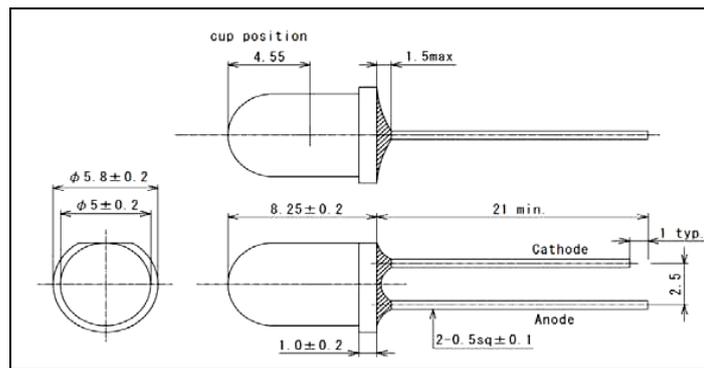


Figura 13. Dimensionamento do exterior dos LEDs utilizados, unidade: mm.

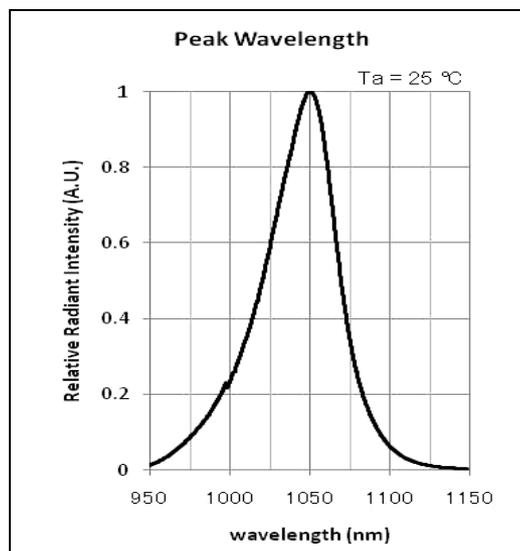


Figura 14. Espectro nominal de um LED com comprimento de onda nominal em 1050 nm.

3.1.3. Fototransdutor

Os detectores de radiação NIR utilizados no Fotômetro, **Figura 15**, tratam-se de dois fototransdutores gêmeos (mesmo fabricante e mesmas especificações) de InGaAs sensíveis à radiação NIR de 900 a 1700 nm, com maior sensibilidade em 1300 nm. São altamente estáveis, com níveis de ruído baixíssimos. Suas dimensões físicas são descritas na **Figura 16**.



Figura 15. Sensor de Radiação utilizado no Fotômetro NIR.

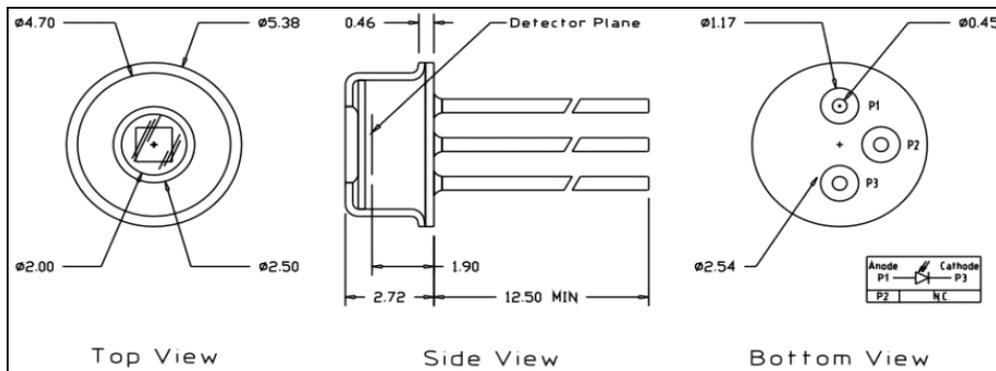


Figura 16. Dimensionamento do exterior do sensor de radiação utilizado no fotômetro, unidade:mm.

Como pode ser observado na **Figura 17**, a sensibilidade do detector aumenta a partir de 900-950 nm, mantendo o seu máximo praticamente constante entre 1350-1650 nm, apresenta um pequeno declive a partir de 1650 nm, e sofre uma queda brusca a partir de 1700 nm.

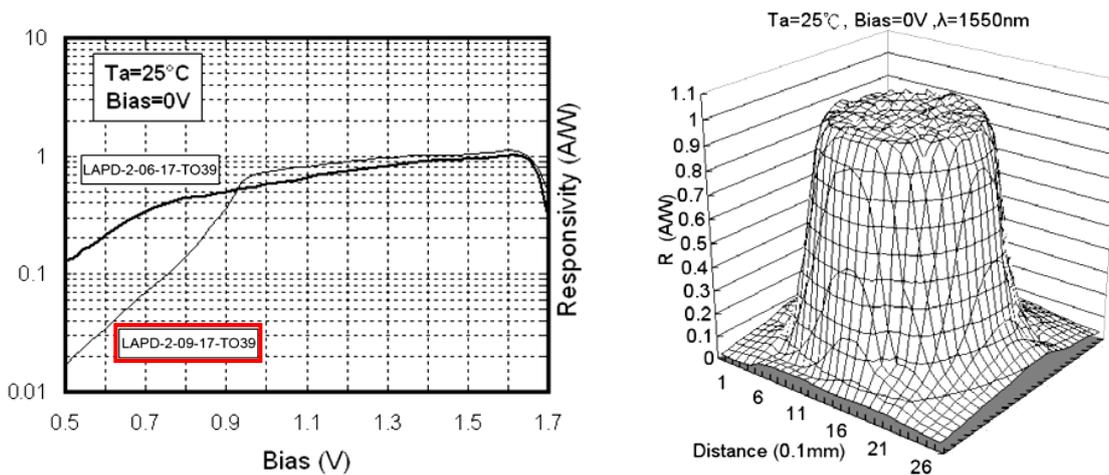


Figura 17. Resposta típica relativa do fototransdutor de InGaAs (LAPD-2-09-17-TO39). Resposta em voltagem contínua (a) e espacial (b).

3.1.4. Microcontrolador

O microcontrolador utilizado no fotômetro foi o PIC18F4550 (**Figura 18**), cuja pinagem encontra-se ilustrada na **Figura 19**. Trata-se de um microcontrolador de alta performance, de 40 (quarenta) pinos, do tipo *FASH-USB* com tecnologia nano-Watt aprimorada: que usa memória tipo *FLASH*, a qual oferece grande vantagem para o desenvolvimento de projetos e protótipos quando comparada às versões antigas que utilizavam memória *EEPROM* (isso porque a memória *FLASH* não requer o uso de luz ultravioleta para apagar e regravar novos conteúdos), e interface para transceptor *USB 2.0 off-chip*.

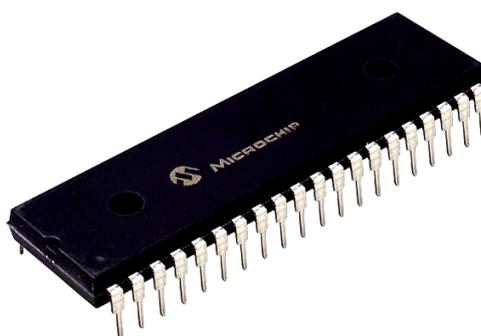


Figura 18 – Microcontrolador PIC18F4550.

As principais características do PIC 18F4550 são:

- 1) Memória *FLASH* para armazenamento de programa: 32 Kbytes;
- 2) Memória *SRAM* (*Static Random Access Memory*) para armazenamento de dados: 2 Kbytes;
- 3) Memória *EEPROM* (*Electrically-Erasable Programmable Read-Only Memory*): 256 bytes;
- 4) Portas configuráveis como entradas ou saídas digitais: 35;
- 5) Portas configuráveis como canais de entradas analógicas: 13;
- 6) Módulo *CCP* (*Capture / Compare / PWM*)
 - *Capture* – Permite a medição do tempo de duração de um evento;
 - *Comparação* – Compara valores entre os registros do *TMRI* (*Timer Module Registers*) e *CCPR* (*Capture/Compare Port Register*);
 - *PWM* (*Pulse Width Modulation*) – gera sinais de frequência variáveis.
- 7) Porta paralela de 8 bits (*SPP* – *Streaming Parallel Port*);
- 8) Temporizadores de 4, 8 e 16 bits;
- 9) Temporizador *Watchdog Timer*;
- 10) Frequência de operação de até 48 MHz;
- 11) Múltiplas fontes de interrupção (20);
- 12) Dois comparadores;

- 13) Periféricos avançados de comunicação: Porta de comunicação serial e Porta de comunicação *USB (Universal Serial Bus)* versão 2.0;
- 14) Arquitetura Harvard, tecnologia RISC (*Reduced Instruction Set Computer*) com um conjunto de 75 instruções;
- 15) Pilha de 31 níveis;
- 16) Faixa de temperatura de operação (C): -40 a 85.

A **Figura 19** apresenta a Pinagem do PIC18F4550 :

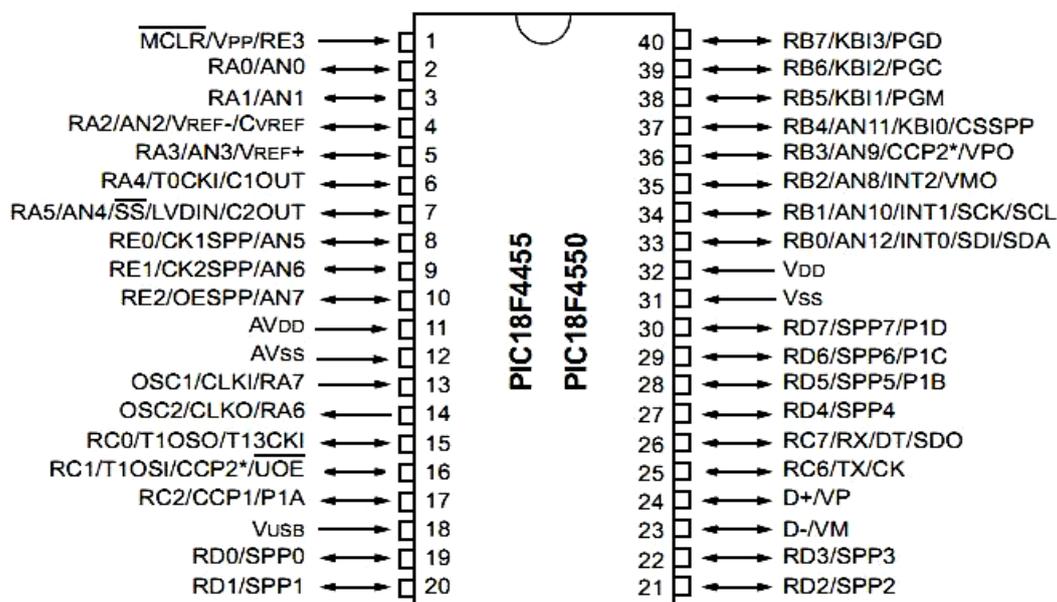


Figura 19 – Pinagem do microcontrolador PIC18F4550.

De acordo com a **Figura 19** o PIC18F4550, possui:

- a) Portas de entrada e saída (RA, RB, RC, RD e RE);
- b) Canais de entradas analógicas (AN);
- c) Pinos de alimentação (VDD e VSS), com faixa de tensão de operação de 2 a 5,5 V;
- d) Pinos de entrada para o oscilador externo (OSC);
- e) Portas de comunicação serial (RX e TX);
- f) Porta de comunicação *USB* (D+ e D-);

Os pinos podem ter mais de uma função. Os 35 pinos de I/O configuráveis estão agrupados em 5 grupos denominados PORTAS, sendo: PORT A; PORT B; PORT C; PORT D; PORT E;

Organização da Memória do PIC18F4550:

- Memória de Programa: memória interna flash de 32.768 Bytes (32 KBytes)
- Armazena instruções, constantes e dados;

- Pode ser escrita/lida de acordo com o programador externo (*Off-board*), *In-circuit* ou durante a execução do programa através de ponteiros.
- Memória *RAM* (*Random Access Memory*) de dados: memória *SRAM* interna de 2048 Bytes (2 *KBytes*) e nela estão incluídos os registradores de função especial *SFR* (*Special Function Register*)
- Armazena dados de forma temporária durante a execução do programa;
- Pode ser lida/escrita em tempo de execução do programa através de diversas instruções.
- Memória *EEPROM* de dados: memória não volátil de 256 Bytes
- Armazena dados que devem ser conservados na ausência de tensão de alimentação;
- Pode ser escrita/lida em tempo de execução do programa através de registradores.
- Memória Configuração: memória que contém bits de configuração (12 Bytes de memória *flash*) e os registradores de identificação (2 Bytes de memória apenas para leitura).

Organização da Memória por *Bits* de Configuração:

- Opções do Oscilador e do *watchdog*;
- Opções do *Reset*;
- Opções para depuração e programação do circuito;
- Opções de proteção contra escrita da memória do programa e de dados da memória *EEPROM*.
- Registradores de identificação: Trata-se de registradores situados nos endereços 3FFFFEH e 3FFFFFH que contém informações do modelo e versão do dispositivo. Os registradores são apenas de leitura e não podem ser alterados pelo usuário.

3.2. Eletrônica do fotômetro NIR desenvolvido

Os circuitos eletrônicos do fotômetro foram confeccionados e implementados utilizando placas de fibra de vidro 1,6 mm dupla face. A montagem dos componentes foi realizada empregando a tecnologia SMD (*Surface Mount Device*)^[196] para diminuir o tamanho da placa, reduzir o tamanho das conexões entre si e diminuir também a influência de interferências.

O Diagrama de Auto Nível apresentado na **Figura 20**, ilustra a parte eletrônica do fotômetro LED-NIR microcontrolado desenvolvido. O circuito eletrônico é responsável pelas seguintes funções: fonte de alimentação, alimentação e pulso dos LEDs-NIR, pré-amplificação (com ou sem diferenciação) e conversão dos sinais dos detectores em AC, amplificação principal/ganho, demodulação (AC para DC), e controle/gerenciamento com microcontrolador PIC18F4550 e amplificação final (*output*). Uma descrição bastante sucinta de cada módulo do circuito eletrônico será apresentada.

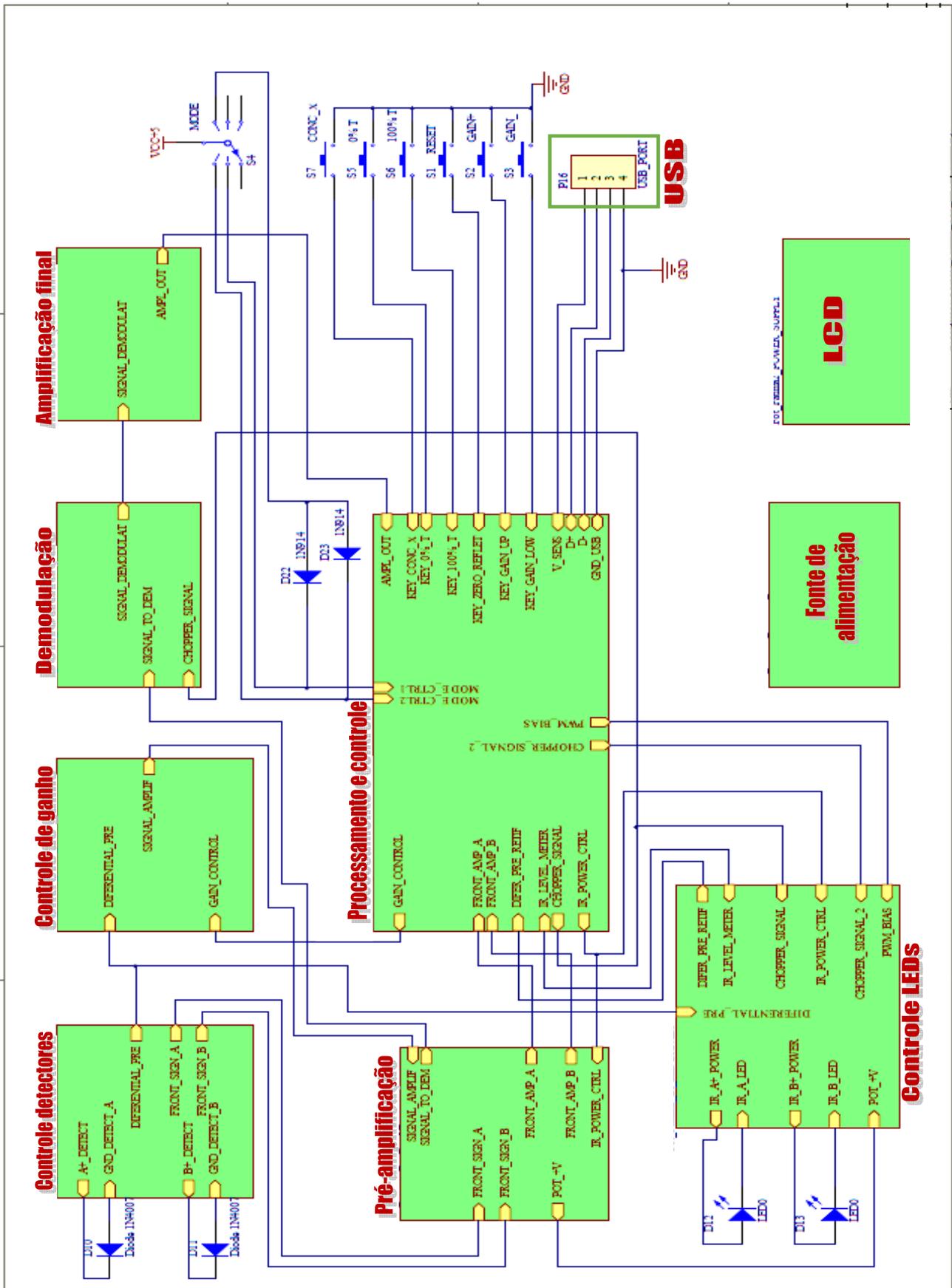


Figura 20 – Diagrama de auto nível (*top level*) dos circuitos eletrônicos do fotômetro LED-NIR proposto, desenvolvido em plataforma Altium.

3.2.1. Fonte de Alimentação

O módulo do circuito eletrônico da fonte de alimentação é responsável por fornecer tensões em módulo contínuo (5 V, ± 12 V e 24 V) para o fotômetro proposto. A tensão de +5 V é utilizada para alimentar o PIC, e os ± 12 V para alimentação simétrica dos amplificadores operacionais. A tensão de +12 V é utilizada para alimentar os detectores de InGaAs e os LEDs, e +24 V a princípio não está sendo utilizada pois foi projetada para o caso de uso de detectores NIR de PbS.

O transformador converte a tensão alternada da rede (≈ 220 V) para 18 V que é integrada ao circuito por intermédio dos capacitores principais. Os capacitores são ligados próximos aos pinos dos reguladores com o intuito de reduzir ruídos geralmente provenientes das altas frequências. Os reguladores de tensão U10 e U12, U11, e U13 convertem as tensões contínuas primárias para, respectivamente, (+/-12 V, +5 V, e +24 V).

3.2.2. Módulos de Amplificação e Detecção

◆ Pré-Amplificação inicial do sinal do canal principal (canal A)

O circuito eletrônico, com esquema apresentado corresponde à amplificação do sinal aplicada ao canal principal (canal A). Este ganho é controlado por um potenciômetro cujo controle fica externado para que o usuário possa “aumentar” o sinal de leitura para valor ótimo de leitura. Este valor ótimo é variável, pois depende do LED que está sendo utilizado, pois os LEDs-NIR tendem a diminuir seu brilho na medida em que se aumenta o comprimento de onda, e consequentemente a sensibilidade do detector diminui.

Esta parte do circuito trabalha diretamente com o microcontrolador, com o módulo de controle dos LEDs, com o módulo de controle dos detectores e com o módulo de controle de ganho; além de monitorar o sinal de saída (sinal demodulado) para que o ganho aplicado não exceda o valor de tensão suportado pelo microcontrolador.

Outra função que esse módulo, juntamente com os módulos citados, ajuda a executar é o controle de ganho de corrente aplicado ao canal secundário (canal B), como também em seu correspondente detector para igualar o valor de tensão de saída em relação ao canal A, para o ajuste do branco, ou seja, 100 % de transmitância. Esse ajuste é realizado tanto quando se liga o instrumento como também quando se usa a tecla de ajuste de 100% de transmitância (**seção 4.2.3.**). Vale salientar que esta função só é acionada quando se utiliza o modo DUAL (feixe duplo) e o modo DIFERENCIAL, uma vez que o modo MONOCANAL (feixe único) utiliza apenas o canal A.

◆ Aplicação do “*chopper* eletrônico” no sinal e alimentação dos LEDs-NIR

Esta parte do circuito eletrônico tem por função principal fornecer uma tensão pulsada aos LEDs dos canais A e B. Esse circuito trabalha em conjunto com o microcontrolador, com o módulo de detecção e com o controle de ganho; além de receber comandos do módulo de pré-amplificação. Entre as funções estabelecidas para esse módulo está o controle da tensão de alimentação aplicada aos LEDs, e o controle da amplitude dos pulsos de modulação aplicados aos LEDs, para o efeito “*chopper*” nos dois LEDs (tanto no sinal do branco como no sinal da amostra).

Os sinais dos LEDs-NIR são modulados por pulsos integrados de *PWM* gerados pelo PIC18F4550, que ajuda a regular e compensar variações do sinal (*ripple* de ondulação) e mudanças na linha de base (*drift*) que o aumento da temperatura ocasiona nos circuitos que utilizam sinal DC (corrente contínua). O microcontrolador ajusta a potência do LED B de tal forma que, comparado ao LED A, suas diferenças sejam zeradas (*zeroed*) em amplitude para assegurar sinais analíticos comparáveis na saída dos pré-amplificadores.

◆ Alimentação e controle dos fototransdutores

Nesta parte do circuito eletrônico ocorre basicamente a detecção pelos fototransdutores, e uma análise comparativa dos sinais (realizada em conjunto com o módulo de pré-amplificação e o módulo de controle de ganho, para ajuste da tensão de saída do canal B, bem como para o ajuste de 100% de transmitância). Este módulo tem como saída três sinais: o sinal detectado no canal A, o sinal detectado no canal B e o sinal diferencial (resultante da subtração dos sinais gerados nos dois canais)

Apenas para medidas no modo DIFERENCIAL, o circuito eletrônico amplificador diferencial irá eletronicamente subtrair os sinais gerados pela amostra e pelo branco, produzindo assim a diferença, ou sinal analítico verdadeiro. O sinal resultante será armazenado (*buffered*), e enviado para o próximo estágio de ganho em forma de corrente alternada (AC), para se evitar problemas potenciais de *drift* e de oscilação. Neste modo de análise são conseguidos ganhos altíssimos de amplificação do sinal, os quais são fundamentais nos casos de medidas de transmitância de amostras muito diluídas, e também poderia ser aplicado para medidas de refletância.

◆ Amplificação principal/ganho aplicado aos sinais dos detectores

O circuito eletrônico do amplificador principal é responsável pelo controle de ganho máximo que o sistema suporta. Essa amplificação é crítica, pois procura assegurar valores de tensão em níveis suficientes para serem reconhecidos pelo microcontrolador PIC18F4550, ou mesmo para

que não ultrapassem os valores máximos de tensão de entrada do PIC. Este módulo está conectado: ao módulo de pré-amplificação, ao módulo de controle dos LEDs, ao módulo de controle do detector, e ao microcontrolador para auxiliar no controle de ganho aplicado ao sinal (principalmente no modo DIFERENCIAL, cujos sinais gerados apresentam intensidades muito baixas).

3.2.3. Módulo Demodulador

Esta é a parte do circuito eletrônico que realiza a demodulação dos sinais resultantes de transmitância do branco e da amostra amplificados. Durante a análise, os sinais de transmitância gerados passam para os módulos subsequentes em modo alternado (modo AC). O circuito eletrônico amplificador/demodulador restaura eletronicamente o sinal de volta para o modo digital (modo DC), gerando assim um sinal compatível com a entrada do microcontrolador PIC18F4550.

3.2.4. Amplificação final

O dispositivo para amplificação final é responsável pelo ganho final aplicado ao(s) sinal(is) demodulado(s). É essencialmente um circuito com dupla amplificação: uma efetuada em um circuito amplificador seguidor de tensão (*buffer*), e outra num circuito amplificador subtrator diferencial (com $V_2=0$). Esse esquema de montagem do circuito foi adotado para manter o ganho obtido nas duas primeiras amplificações, realizar uma pequena filtragem no sinal de saída e manter a tensão máxima de saída dentro de limites estipulados (tanto em termos de tensão como em corrente), adequados aos limites de entrada suportados pelos dispositivos subsequentes que receberão os sinais amplificados.

3.2.5. Módulo de Processamento e Controle

O módulo de processamento e controle é gerenciado por um microcontrolador PIC18F4550. Seu trabalho é o de controle, gerenciamento, processamento e armazenamento dos dados gerados nos módulos anteriores, citados até aqui. Em outras palavras, a placa constitui o coração e o microcontrolador é o cérebro do fotômetro desenvolvido.

O microprocessador PIC18F4550 possui um cristal de quartzo com *clock* operante na frequência de 48 MHz. O PIC monitora e controla os sinais dos pulsos aplicados como “*chopper*” para a modulação da radiação dos LEDs-NIR; ajuda no controle e gerenciamento do sinal pré-amplificado, e do sinal final demodulado e amplificado. É responsável pelo processamento interno dos dados, como também pela sua exteriorização (via LCD ou via USB).

O PIC também é responsável pelo controle de uma tela de cristal líquido, modelo WH-1602A, tipo alfanumérico, a qual possui um barramento de dados de 8 bits (podendo-se trabalhar com 4 ou 8 bits) e um barramento de controle de 3 bits.

O microprocessador PIC18F4550 também permite monitorar o sinal final bem como controlar os ganhos, fazer ajustes e resetar o instrumento pela conexão via porta USB.

3.2.6. Módulo USB

O módulo de comunicação USB foi montado e ativado para possibilitar a comunicação do fotômetro com um computador portátil (*notebook*), para atuar como módulo de controle do fotômetro, e coletar as informações obtidas, as quais também são apresentadas em uma tela de cristal líquido. Essa comunicação permite o armazenamento dos dados no microcomputador, os quais são utilizados tanto para a *screening* das amostras de medicamentos injetáveis como para a construção das curvas de calibração, com posteriores análises estatísticas.

3.2.7. Módulo LCD

Os sinais analógicos produzidos durante as medidas serão convertidos em sinais digitais, filtrados, processados e apresentados em uma tela de cristal líquido - LCD (*Liquid Crystal Display*)^[71]. O LCD utilizado foi do tipo 20x2, um modelo WH-2002A (**Figura 21**).

Um display LCD módulo 20x2 é muito básico e é muito usado em vários dispositivos e circuitos. As razões para o uso de LCD são: LCD são econômicos; facilmente programável; não têm limitação de exibições especiais, podendo-se exibir até mesmo personagens personalizadas, animações, etc.

Um LCD 20x2 significa que ele pode exibir 20 caracteres por linha e há 2 tais linhas. Neste LCD cada personagem é apresentado na matriz de *pixels* 5x7. Este LCD tem dois registros, nomeadamente, de comando e de dados.

O registro de comando armazena as instruções de comando dado ao LCD. Um comando é uma instrução dada para fazer uma tarefa pré-definida como sua inicialização, limpando a tela, ajustando a posição do cursor, o controle de exibição etc. Os registradores de dados armazenam os dados a serem exibidos na tela LCD. Os dados são os valores ASCII dos caracteres a serem exibidos na tela LCD.

A **Figura 21** apresenta o LCD utilizado no fotômetro, e a **Tabela 5** mostra o detalhamento da pinagem do LCD.

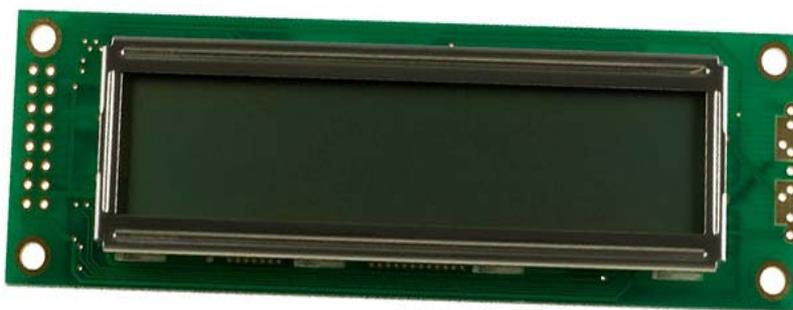


Figura 21 – Módulo LCD 20x2.

Tabela 5 – Descrição dos pinos do módulo LCD 20x2 usado no fotômetro desenvolvido.

Pin N°	Função	Nome
1	Terra (0V)	Ground
2	Tensão de alimentação; 5V (4.7V – 5.3V)	Vcc
3	Ajuste de contraste através de um resistor variável	VEE
4	Comanda a seção de registros quando em baixo, e dados quando em alto	RS
5	Baixo para escrever para o registro; Alto para ler o registro	R/W
6	Envia dados para os pinos de dados quando vai do estado alto a baixo	EM
7	8- pinos de dados	DB0
8		DB1
9		DB2
10		DB3
11		DB4
12		DB5
13		DB6
14		DB7
15	Alimentação da luz do <i>Backlight</i> (5V) – modulo comum	Led+
16	Terra do <i>Backlight</i> (0V) – modulo comum	Led-
17	Terra (0V)	Ground
18	Tensão de alimentação; 5V (4.7V – 5.3V)	Vcc
19	Alimentação da luz do <i>Backlight</i> (5V) – modulo grafico	Led+
20	Terra do <i>Backlight</i> (0V) – modulo grafico	Led-

3.3. Descrição Painel de controle do fotômetro duplo feixe

3.3.1. Painel frontal

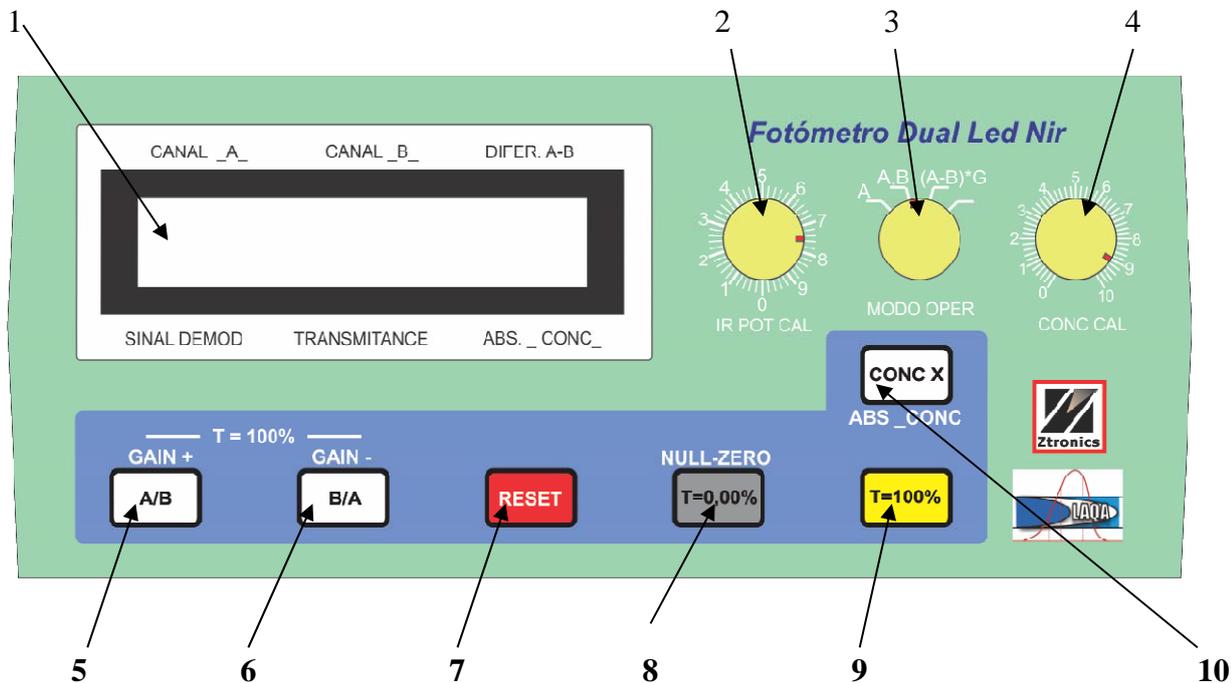


Figura 22 – Vista frontal do painel de controle do fotômetro.

- 1 – **DISPLAY LCD:** O display fornece informações dos sinais analisados e sobre o funcionamento do aparelho.
- 2 – **IR POT CAL:** Controla a corrente de trabalho do LED-NIR correspondente ao canal A.
- 3 – **MODO OPERAÇÃO:** Por meio desta chave rotativa escolhemos o modo de funcionamento desejado: modo MONOCANAL (A), modo DUAL (A.B) e modo SUBTRATIVO (A-B*G).
- 4 – **CONC CAL:** Por meio deste controle, introduzimos na equação de concentração um fator de multiplicação que pode ser um número inteiro entre 0 e 255. Com este valor e mais o fator de escala ajustamos a leitura do padrão a um valor igual ou mais próximo possível da concentração do padrão.
- 5 – **TECLA A/B e GAIN+:** No modo DUAL, esta tecla define que a operação matemática A/B seja executada, considerando que o Branco esta presente no canal B. Uma vez pressionada, todas as leituras posteriores levarão em conta esta definição. No modo SUBTRATIVO esta tecla aumenta o ganho geral do sistema, cada vez que esta é pressionada, veremos aumentar o

valor de $G_a = 0000$, até o máximo de 1022, atingindo o máximo de ganho. No modo MONOCANAL esta tecla fica inoperante.

- 6 – TECLA B/A e GAIN⁻:** No modo DUAL, esta tecla define que a operação matemática B/A seja executada, considerando que o Branco esta presente no canal A. Uma vez pressionada, todas as leituras posteriores levarão em conta esta definição. No modo SUBTRATIVO esta tecla diminui o ganho geral do sistema, cada vez que esta é pressionada, veremos diminuir o valor de $G_a = 0000$, até o mínimo de 0000, atingindo o mínimo de ganho. No modo SUBTRATIVO, cada vez que qualquer uma das duas teclas (GAIN⁺ ou GAIN⁻) for pressionada, também se iniciará o processo de ajuste automático do 100% que deverá acontecer alguns segundos depois da tecla pressionada ficar em repouso. No modo MONOCANAL esta tecla fica inoperante.
- 7 – TECLA RESET:** Esta tecla inicializa o processo de calibração, necessária nos modos: modo DUAL e modo SUBTRATIVO.
- 8 – NULL – ZERO:** No modo MONOCANAL e no modo DUAL, ao pressionar esta tecla dá-se início ao processo de ajuste automático do 0,0 % de transmitância, onde primeiro são desligados os LEDs dos canais A e B, e após a leitura do zero ficar estabilizada, estes valores de sinal residual em cada canal são memorizados para serem subtraídos em cada leitura. No modo SUBTRATIVO este comando dá início a um ajuste fino do balanceamento dos dois canais.
- 9 – TECLA 100%:** Esta tecla iniciará o processo de ajuste automático do 100% de transmitância que deverá acontecer alguns segundos depois da tecla pressionada ficar em repouso. Esse ajuste corresponde a um ganho interno dado ao canal B, de modo a igualar sua tensão de saída com a tensão do canal A.
- 10 – TECLA CONC ABS-CONC:** Esta tecla permite selecionar como o sinal da leitura será mostrado, podemos escolher entre absorbância ou concentração. Quando pressionada e aparecer Concentração, a cada toque da tecla mudará também o fator de escala, que poderá ser 0,1; 1; 10; ou 100.

3.3.2. Painel posterior ou trazeiro

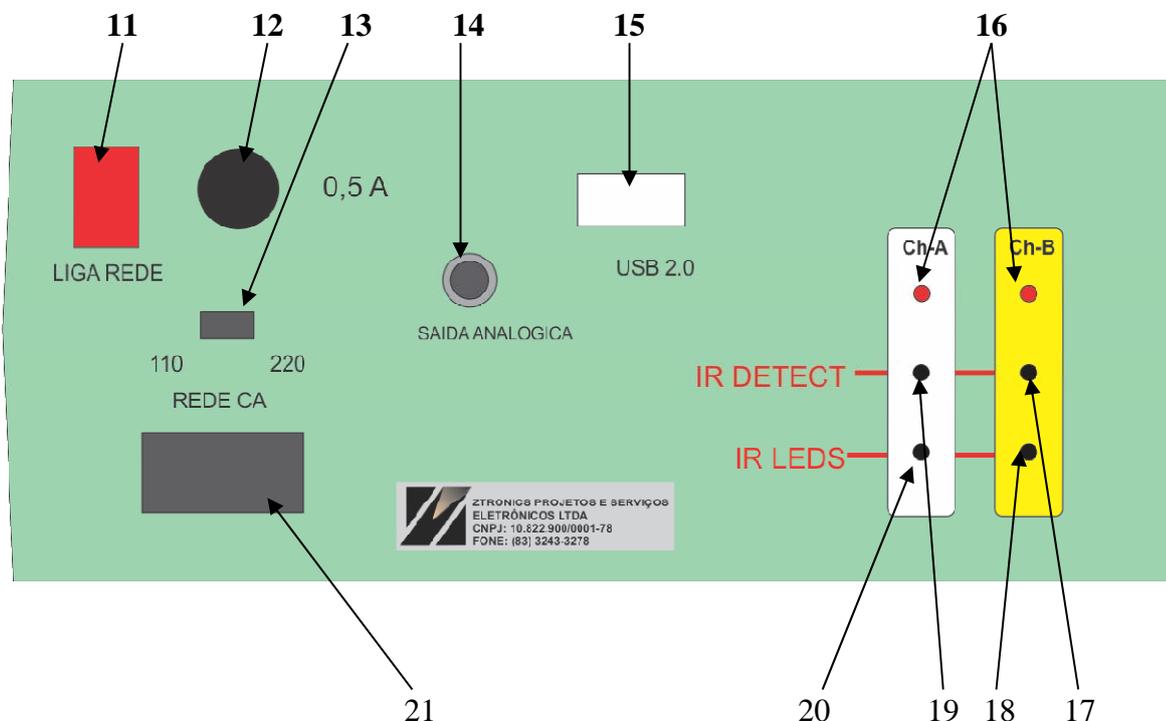


Figura 23 – Vista posterior (trazeira) do painel de controle do fotômetro.

11 – CHAVE LIGA DESLIGA: Liga o equipamento a rede elétrica.

12 – PORTAFUSÍVEL: Contém o fusível de segurança especificado para abrir com correntes superiores a 0,5 A.

13 – CHAVE SELETORA DE TENSÃO DE REDE: Para selecionar as voltagens de entrada permitidas: 110 ou 220 V.

14 – SINAL ANALOGICO: Conector de saída de sinal analógico. Este sinal somente é válido quando utilizado nos modos MONOCANAL ou SUBTRATIVO.

15 – PORTA DE COMUNICAÇÃO E CONTROLE USB: Pela USB é possível enviar todos dados presentes no display mais outros sinais de controle e status do equipamento, também permitir o comando remoto do aparelho.

16 – LED INDICATIVO DE CANAL ATIVO: Quando aceso(s) indica(m) o(s) canal ou canais ativos.

17 – CONECTOR DE ENTRADA DO DETECTOR CANAL B

18 – CONECTOR DE ENTRADA DO LED NIR CANAL B

19 – CONECTOR DE ENTRADA DO DETECTOR CANAL A

20 – CONECTOR DE ENTRADA DO LED NIR CANAL A

21 – CONECTOR CABO DE ALIMENTAÇÃO: Entrada de alimentação da rede elétrica (corrente alternada de 110 ou 220 volts 60 Hz).

Embora as informações geradas pelo instrumento sejam apresentadas no display de LCD, foi desenvolvido um programa computacional para gerenciamento dos dados e armazenamento dos mesmos em um microcomputador.

3.4. Software de controle do fotômetro desenvolvido

O software que realiza o gerenciamento do instrumento foi desenvolvido em ambiente visual LabVIEW® versão 10.0.

A seqüência de processamento do software é facilmente identificável através das informações exibidas na tela durante sua execução. Para maior compreensão sobre seu funcionamento, sua tela será discutida a seguir.

Quando o programa é iniciado, aparece uma tela como à apresentada na **Figura 24**. Esta tela do menu principal apresenta duas abas, onde o analista pode optar pela análise que ele deseja realizar (qual seja: Análise *screening* ou Calibração), bastando apenas clicar na aba responsável pela respectiva determinação analítica. Assim, caso o analista queira realizar a análise qualitativa pelo método *screening*, ele deve optar pela aba Análise *screening* (a qual aparece como primeira opção no programa).

Nesta janela são apresentadas as informações necessárias para a calibração do instrumento para realizar a análise *screening*. Assim, primeiramente o analista deve clicar com o *mouse* sobre o menu localizado logo abaixo da opção “Iniciar”, para expandir o mesmo (como ilustrado na **Figura 25**) e escolher qual opção ele quer ajustar:

- Limite inferior: Esta opção deve ser selecionada sempre que o analista quiser calibrar o instrumento com uma nova amostra, para ajustar o limite de corte inferior a ser adotado na *screening*.

- Limite superior: Esta opção deve ser selecionada sempre que o analista quiser calibrar o instrumento com uma nova amostra, para ajustar o limite de corte superior a ser adotado na *screening*.

- Amostra: Esta opção deve ser selecionada sempre que o analista quiser analisar uma nova amostra. Ela só deve ser selecionada depois que os limites de corte inferior e superior tiverem sido calibrados.

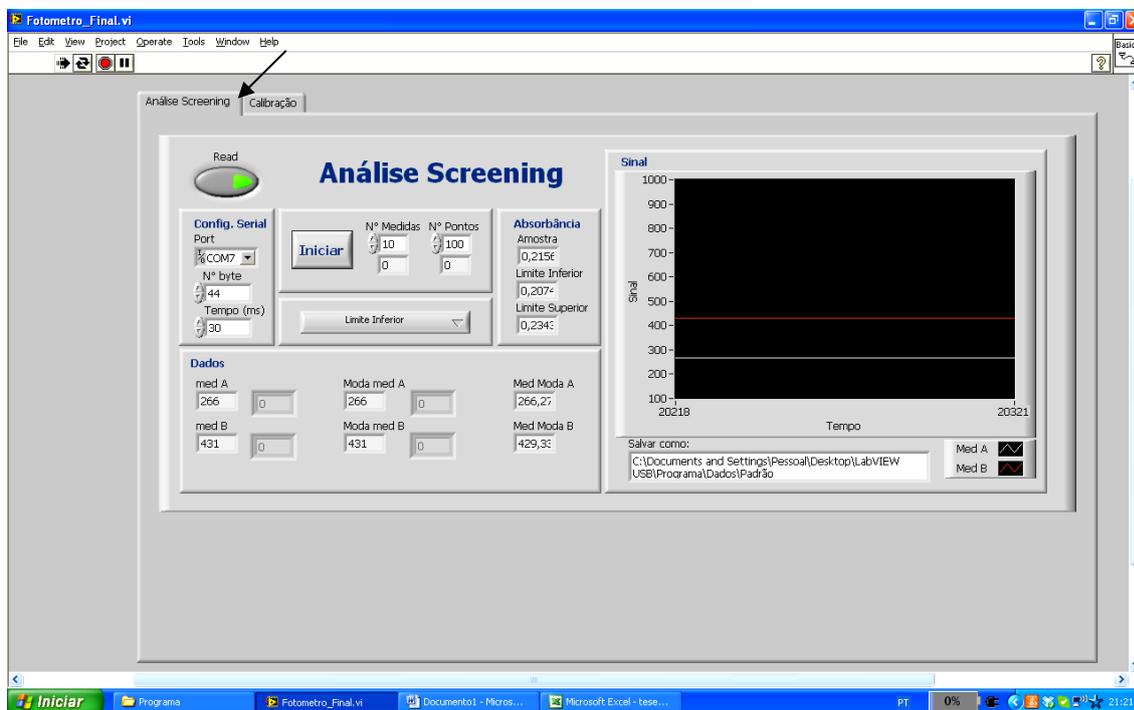


Figura 24 – Vista da tela inicial do software de controle do fotômetro LED-NIR.

Após escolher a opção desejada, o analista deve ajustar a quantidade de replicatas que serão realizadas. Este ajuste deve ser realizado na opção “Nº Medidas”, localizado ao lado da opção “Iniciar”.

Outra opção que também pode ser ajustada é a quantidade de pontos a serem lidas para a realização do cálculo do valor médio obtido para cada análise. O ajuste desta opção deve ser realizado na opção “Nº Pontos”, localizado ao lado da opção “Nº Medidas”.

Depois de serem preenchidas as opções desejadas, o analista deve clicar com o mouse sobre o botão Iniciar, para dar início à análise ou calibração, desejada.

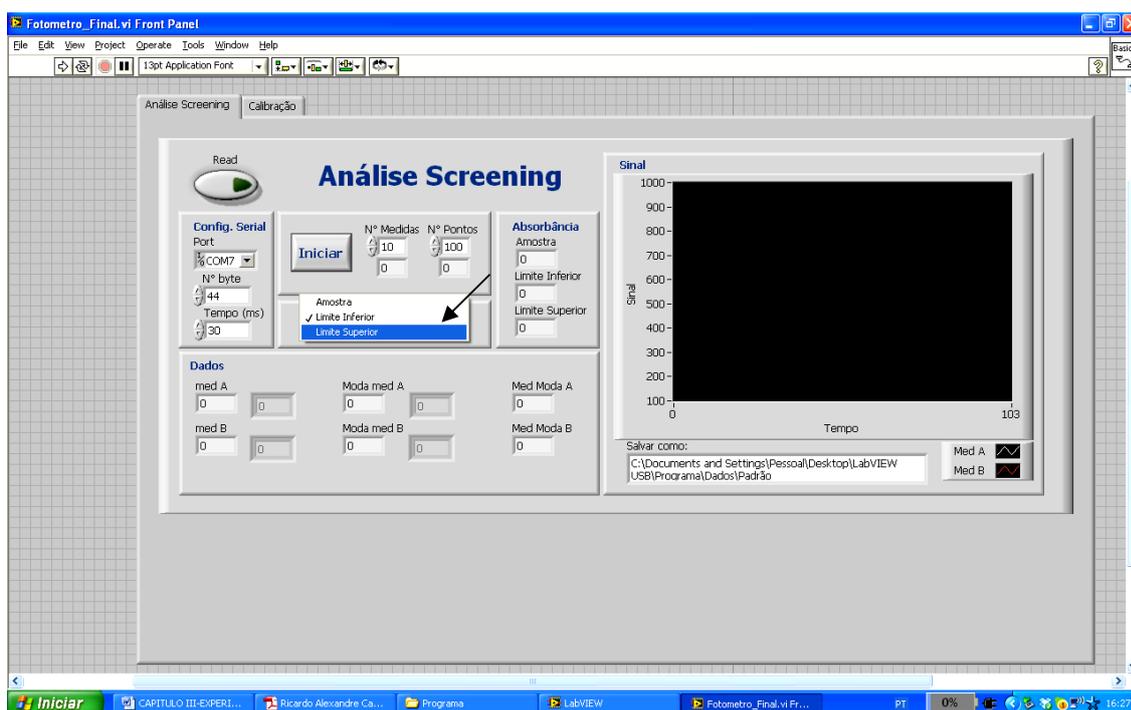


Figura 25 – Tela do software ilustrando as opções de escolha de calibração do instrumento para o método *screening*.

Quando a calibração é finalizada, aparece no indicador “Limite Inferior” o valor da absorbância encontrado para esta amostra. O mesmo acontece no indicador “Limite Superior”, após a calibração do ponto de corte superior, e no indicador “Amostra” após a análise da mesma. Após a análise de cada amostra, caso o valor de absorbância obtido esteja dentro dos limites de absorbância obtidos, aparecerá na tela a mensagem “Amostra Conforme”. Caso o valor de absorbância obtido esteja fora dos limites de absorbância obtidos, aparecerá na tela a mensagem “Amostra Não Conforme”.

O calculo da absorbância é efetuado com base nos valores medidos nos canais A e B, seguindo a seguinte instrução:

$$A = - \log \frac{\text{Canal Amostra}}{\text{Canal Branco}} \quad (19)$$

onde A é a absorbância, a qual é medida em função da aplicação da função logarítmica à divisão entre o sinal do canal A pelo sinal do canal B (cuja divisão refere-se ao valor da transmitância medida).

Caso o analista queira realizar a análise quantitativa pela curva analítica, ele deve optar pela aba Calibração. Ao clicar com o mouse sobre a aba, o programa leva a uma segunda janela, a qual irá mostrar informações sobre a análise, como pode ser visto na **Figura 26**.

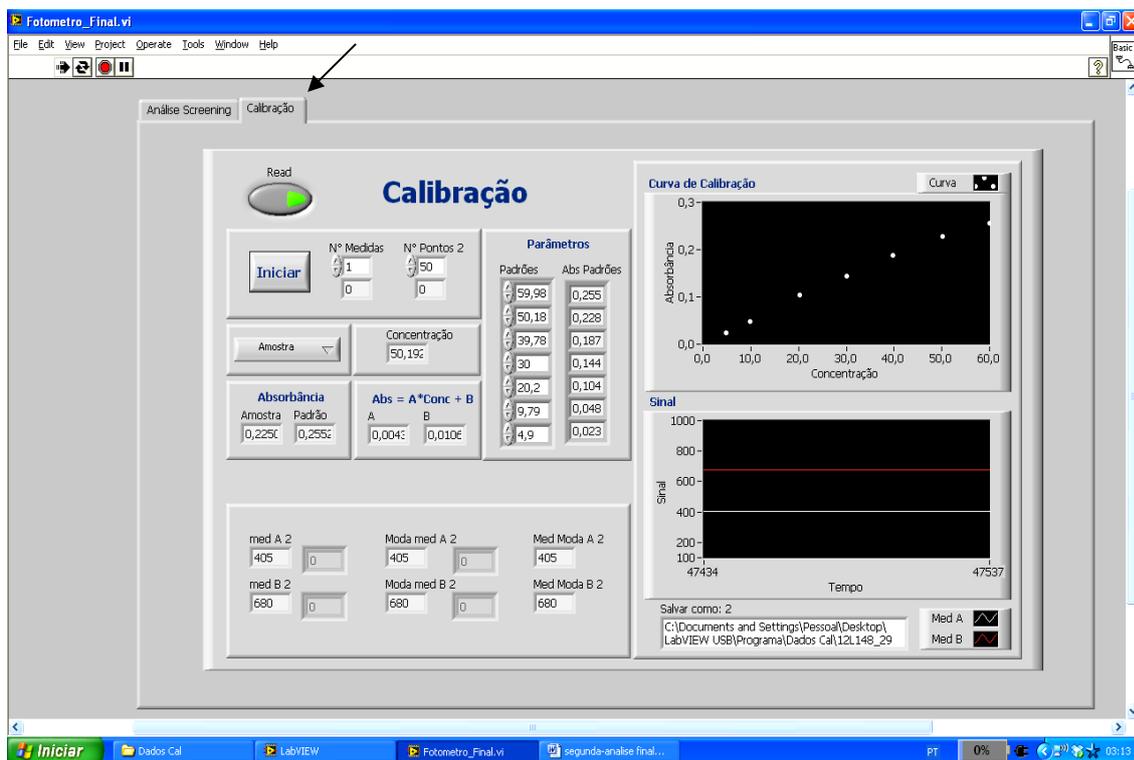


Figura 26 – Vista da tela do software de controle do fotômetro LED-NIR ilustrando a sessão Calibração.

Para realizar a análise quantitativa, primeiramente o analista deve clicar com o *mouse* sobre o menu localizado logo abaixo da opção “Iniciar”, para expandir o mesmo (como ilustrado na Figura 27) e escolher opção:

- Padrão: Esta opção deve ser selecionada sempre que o analista quiser calibrar o instrumento com uma nova curva analítica.
- Amostra: Esta opção deve ser selecionada sempre que o analista quiser realizar uma análise quantitativa da amostra. Ela só deve ser selecionada depois que o instrumento for calibrado com uma nova curva analítica.

O analista deverá calibrar o instrumento, fornecendo os valores das concentrações que serão usadas na curva analítica, conforme ilustrado na Figura 27. A ordem a ser seguida para a calibração deve ser da concentração mais baixa para a mais alta.

O analista também deve ajustar a quantidade de replicatas que serão realizadas e a quantidade de ponto a ser lida para a realização do calculo do valor médio obtido para cada análise. Estes ajustes devem ser realizados nas opções “Nº Medidas” e “Nº Pontos” localizados ao lado da opção “Iniciar”.

Depois de serem preenchidas as opções desejadas, o analista deve clicar com o *mouse* sobre o botão Iniciar, para dar início à construção da curva analítica ou à análise quantitativa da amostra.

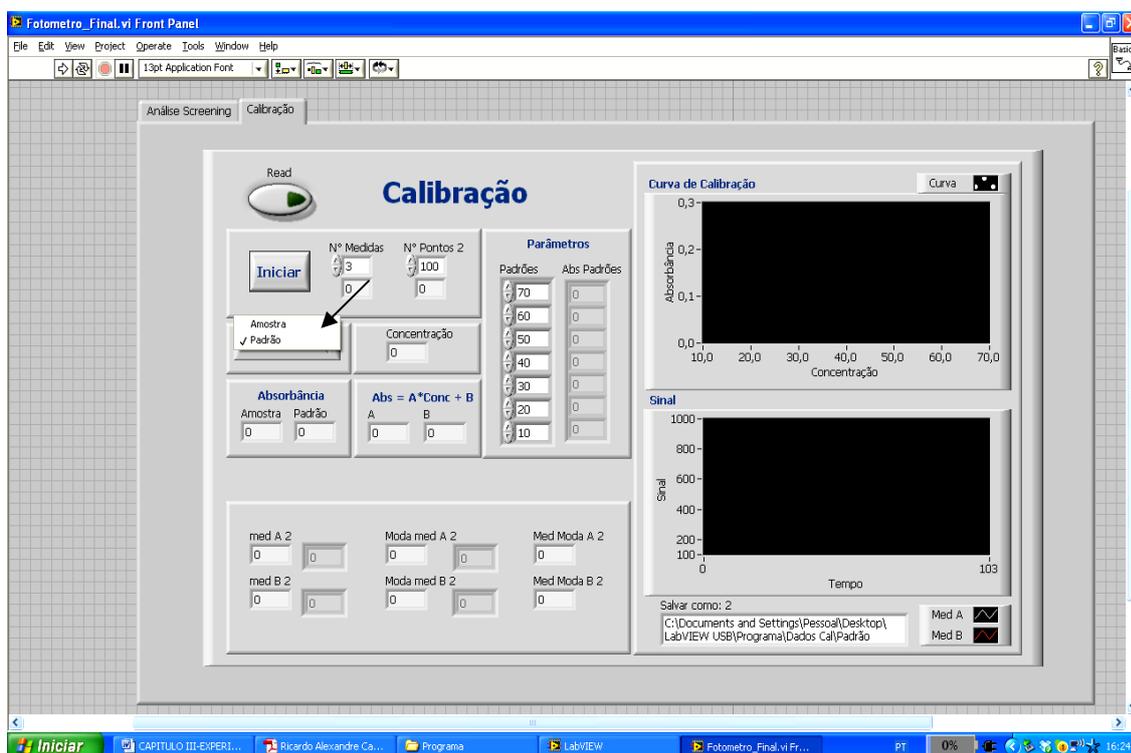


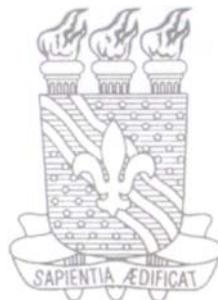
Figura 27 – Tela do software ilustrando as opções de escolha de calibração do instrumento para a curva analítica.

A tela também apresenta indicadores que mostram os valores de absorvância encontrados para os padrões (em “Abs Padrões”), para as amostras (em “Amostra), e para os coeficientes angular e linear (em “A” e “B”), obtidos pela regressão linear calculada pelo método dos Mínimos Quadrados^[11], para as concentrações medidas.

Como se pode observar, procurou-se desenvolver um software simples, amigável, e de fácil execução, para que até mesmo um analista pouco experiente possa acompanhar todo o processo de análise sem maiores dificuldades.

CAPÍTULO IV

EXPERIMENTAL



4.0. EXPERIMENTAL

4.1. Experimental utilizando um espectrômetro NIR comercial

A seguir serão apresentadas informações acerca do método utilizado no desenvolvimento desta etapa do trabalho, cujo objetivo principal foi encontrar a região espectral mais informativa, adequada para a dos LEDs-NIR usados no fotômetro duplo feixe.

4.1.1. Aquisição de amostras e preparo de soluções sintéticas

A investigação envolveu um total de 1340 ampolas comerciais, a partir de 71 lotes diferentes, de dipirona sódica injetável de valor nominal de 1g/2mL (500 mg/mL ou 50,0% m/v), comercializada em frasco ampola de 2 mL de coloração âmbar. Relatórios de análise química com conteúdo real dipirona (vulgo: “laudos”) foram fornecidos pelos fabricantes, seguindo o método de titulação iodométrica indicado na Farmacopéia Brasileira^[9,10].

Em adicional, 15 amostras sintéticas, com concentrações de 40,0; 44,0; 44,5; 45,0; 45,5; 46,0; 48,0; 50,0; 52,0; 54,0; 54,5; 55,0; 55,5; 56,0; 60,0% (m/v) foram preparadas no laboratório por dissolução dipirona sódica (pureza: 99,8 %) em água para preparações injetáveis (fornecidas pelo mesmo fabricante). Esta faixa de concentração adotada para as soluções sintéticas de calibração está de acordo com a recomendação da Agência Européia de Medicamentos: *European Medicines Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA)*^[151,197], que afirma que o intervalo de calibração deve se estender de 80% a 120% do valor nominal (50,0% m/v, no presente caso). Esta faixa também compreende o intervalo de concentrações aceito pela autoridade nacional fiscalizadora (ANVISA), qual seja: 47,5 - 55,0% m/v (50,0% ± 5,0% para a concentração mínima, e 50,0% ± 10,0% para a concentração máxima permitida)^[10].

É importante destacar que a água para preparações injetáveis é uma água estéril, obtida por destilação/deionização, em equipamentos cujas partes em contato com a água são de vidro neutro, quartzo ou metal apropriado, podendo ainda, ser obtida por processo equivalente ou superior à deionização na remoção de contaminantes químicos e microorganismos^[9,10].

4.1.2. Aquisição dos espectros na região NIR

Os espectros das amostras foram obtidos utilizando um espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) da marca *Perkin Elmer*, modelo *Spectrum*, série GX, por medidas de absorvância. Um suporte de teflon (**Figura 28**) foi confeccionado para comportar as ampolas no compartimento do espectrofotômetro, para minimizar os problemas de espalhamento de luz e garantir uma boa reprodutibilidade das medidas. O diâmetro externo das ampolas (percurso

óptico) foi de aproximadamente 1 cm. Cada espectro foi obtido com base na média de 16 varreduras na faixa espectral de 4000-14000 cm^{-1} , com uma resolução de 1 cm^{-1} . Temperatura e umidade relativa foram controladas, em torno de 26 °C e 45%, respectivamente.

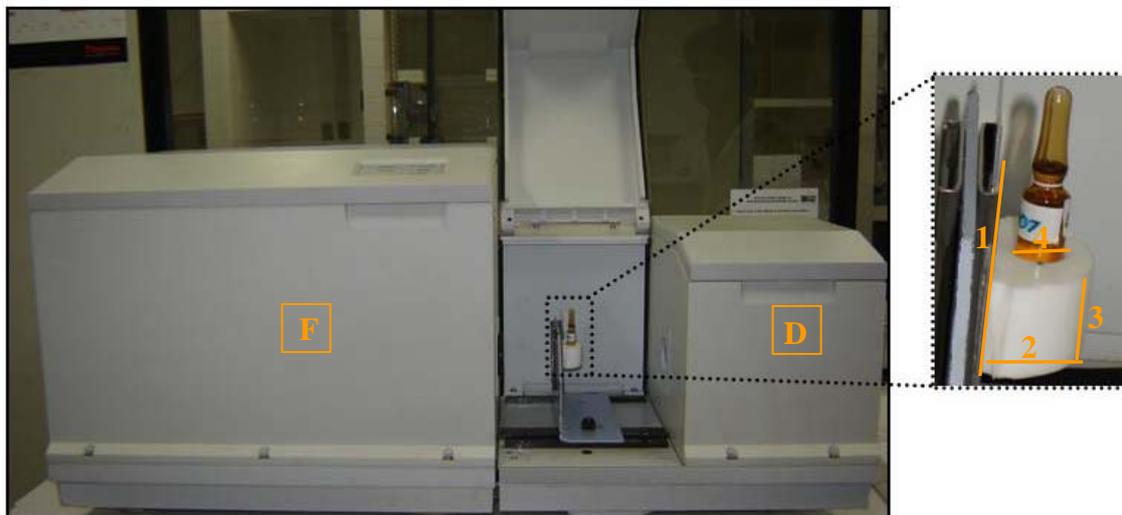


Figura 28 – Instrumentação usada para o registro dos espectros NIR, ilustrando as ampolas no suporte de Teflon dentro do Espectrômetro FT-IR. Onde: em **F** está localizada a fonte de radiação, e em **D** em localizado o detector do instrumento. Os números referem-se às dimensões do porta amostra confeccionado, onde: **1**= 9,1 cm; **2**= 2,5 cm; **3**= 2,5 cm; e **4**= 1,1 cm. O diâmetro designado para passagem do feixe de radiação é de 1 cm.

O espectro em branco foi obtido utilizando água para preparações injetáveis. Para se dar uma pequena variabilidade na calibração dos modelos, a fim de se calibrar as pequenas diferenças entre as ampolas industriais, quatro ampolas diferentes foram usadas como células de registro dos espectros das 15 amostras sintéticas, resultando, portanto, em 60 espectros destas. Para o registro dos espectros, as quatro ampolas foram abertas e seu conteúdo foi descartado, sofreram processo de lavagem e depois foram secas na estufa sob temperatura de 110°C. Os espectros das amostras comerciais foram obtidos com as ampolas originais fechadas, utilizando-se 2 mL de água para injetáveis como branco. Cada espectro foi adquirido em triplicata e a média foi então utilizada nas fases seguintes do estudo. Por fim, os espectros de todas as amostras comerciais do mesmo lote foram convertidos à média para uma representação mais fiel dos lotes. Como resultado final, obtivemos 131 espectros (sendo 60 de amostras sintéticas e 71 de amostras comerciais). Estes espectros foram utilizados para os tratamentos estatísticos posteriores.

4.2. Experimental utilizando o Fotômetro LED-NIR desenvolvido

Para avaliar o desempenho do fotômetro desenvolvido, foram efetuadas medidas de absorvância de soluções padrão de dipirona sódica partindo como base as especificações

estabelecidas pela Farmacopéia Brasileira^[10]. Este mesmo procedimento de análise poderá ser adotado futuramente para a análise de qualquer outro medicamento injetável de interesse.

Em geral, as especificações de análise de determinados medicamentos são alteradas por novas normas de segurança, geralmente aplicadas por meio de resoluções expedidas pela ANVISA, ou de modificação efetuadas diretamente na Farmacopéia Brasileira. Nesse aspecto, o fotômetro desenvolvido poderá ser facilmente re-calibrado de acordo com a legislação vigente, sem a necessidade de modificação física do instrumento. Para esta re-calibração sempre deverão ser utilizadas soluções padrão recém preparadas (seja para a calibração dos novos limites de corte, ou para a construção de novas curvas analíticas).

A seguir serão apresentados os procedimentos adotados para avaliar o desempenho do fotômetro LED-NIR duplo feixe frente a análise de amostras comerciais dentro e fora do prazo de validade.

4.2.1. Aquisição de novas Amostras comerciais e produção de novos padrões sintéticos

Assim, para a etapa de avaliação de desempenho do fotômetro desenvolvido, primeiramente realizou-se um estudo com o método *screening* com ponto de corte a ser empregado nas análises de dipirona. Para isso, primeiramente foram preparadas soluções estoques de dipirona sódica (pureza: 99,4 %) nas concentrações de 60% (m/v), as quais foram padronizadas com solução de iodo 0,5 mol.L⁻¹. A partir destas soluções estoques, foram preparadas soluções sintéticas de dipirona nas concentrações de 47,5 e 55,0% (m/v) em três replicatas autênticas para serem usadas como ponto de corte para análise *screening*. Outras 14 soluções sintéticas de dipirona nas concentrações de 45,0; 46,0; 47,0; 47,5; 48,0; 49,0; 50,0; 53,0; 54,0; 54,5; 55,0; 55,5; 56,0; 57,0% (m/v), (ou seja, 7 pontos para avaliar a capacidade preditiva do ponto de corte inferior e 7 pontos para avaliar a capacidade preditiva do ponto de corte superior) foram preparadas em 10 replicatas autênticas, as quais foram analisadas em triplicata pelo fotômetro previamente calibrado com as soluções de corte, para a avaliação de discriminação do mesmo. Esse planejamento se destina à construção da curva de desempenho/performance do fotômetro LED-NIR, o qual será determinante na escolha das concentrações das soluções padrão que serão utilizadas como pontos de corte e que serão utilizados na calibração do instrumento para análise das amostras comerciais.

Para a construção da curva analítica, foram preparadas 7 amostras sintéticas com padrão analítico nas concentrações de 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 60,0% (m/v) em triplicatas autênticas. Todas as soluções foram preparadas a partir de soluções estoque de dipirona sódica

(grau analítico) nas concentrações de 60% (m/v), padronizadas com solução de iodo 0,5 mol.L⁻¹. As medidas de absorvância de cada replicata também foram realizadas em triplicata.

Para avaliar o desempenho do instrumento, foram adquiridas um total de 300 ampolas comerciais recém produzidas a partir de 3 lotes diferentes, cujo conteúdo nominal de dipirona sódica injetável é de 1g/2mL. Os relatórios de análise química com o conteúdo real de dipirona também foram fornecidos pelos fabricantes, os quais seguem o método de titulação iodométrica recomendado na Farmacopéia Brasileira^[9,10].

O desempenho preditivo do instrumento também foi avaliado pela análise de outras 320 ampolas comerciais com prazos de validade expirados em diferentes datas (em meses e anos variados).

4.2.2. *Materiais e Equipamentos*

O fotômetro desenvolvido (descrito no **Capítulo III**) foi utilizado para a análise dos medicamentos injetáveis. O controle do sistema, a aquisição e o tratamento dos dados foram realizados através de um *notebook* Lenovo, com 4 *Gigabytes* de RAM, processador Centrino 2, e 360 *Gigabytes* de *Hard Disk*, usando um *software* escrito em linguagem gráfica de programação visual LabVIEW®, versão 10.0. Este fotômetro labmade foi projetado, desenvolvido e construído no laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica/Quimiometria (LAQA).

Todos os reagentes utilizados no desenvolvimento do experimental foram adquiridos da empresa *Sigma Aldrich*, e apresentam elevado grau de pureza.

4.2.3. *Procedimento de Calibração do fotômetro LED-NIR*

O modo utilizado para as medidas foi o modo *DUAL* (feixe duplo), onde um feixe é utilizado para o branco e outro para amostra.

No procedimento de calibração do instrumento, primeiramente se fez o ajuste do zero de absorvância (ou 100% de transmitância) e para isso foi necessário usar duas cubetas gêmeas (ou seja duas ampolas iguais contendo 2 mL de água para injetáveis).

Nesta fase, outros procedimentos também devem ser seguidos, como o ajuste de energia no LED do canal A, e o auto zero (procedimento que desliga os LEDs e armazena na memória do processador os valores de corrente de escuro, usada para corrigir o zero verdadeiro do instrumento). Antes de se iniciar as análises o instrumento ficou estabilizando por 30 minutos.

As medidas foram efetuadas sob condições controladas de temperatura e umidade (em torno de 25°C e 50%, respectivamente), utilizando-se os LEDs na região NIR de 1050 nm.

4.2.4. Análise tipo screening usando o fotômetro LED-NIR

Como já foi discutido anteriormente, na análise *screening* recomenda-se adotar como ponto de corte as concentrações limite aceitas pelo órgão regulador, neste caso, descritas na farmacopéia, tanto para a concentração mínima como para a concentração máxima (qual seja: 47,5 % e 55% para a dipirona sódica injetável). Entretanto, também foi discutido que existe uma região de erro (falsos positivos e falsos negativos), atrelados a cada ponto de corte. Assim, um estudo foi realizado para se determinar a região de incerteza da análise *screening*.

No experimental envolvendo a análise *screening* o sinal analítico medido é utilizado para verificar a conformidade do medicamento com o padrão exigido. Para tanto os valores de absorvância obtidos para cada amostra foram comparados com os valores de absorvância referentes aos padrões de corte, que delimitam o sinal esperado para o medicamento injetável dentro de certos limites confiáveis.

Os pontos de corte (limite inferior e limite superior) são determinados com base nos valores das concentrações permitidas pelos órgãos fiscalizadores para que seja considerado um produto com qualidade garantida. Deste modo, os pontos de corte “inferior” e “superior” utilizados na calibração do instrumento foram preparados com base nos valores preconizados na Farmacopéia Brasileira para o analito (ou seja, 47,5 e 55 % m/v para a dipirona sódica injetável).

Para calibrar o software para realizar a análise *screening*, o procedimento descrito no **Item 3.4 do Capítulo III** deve ser seguido. Uma vez estabelecidos os pontos de corte, e calibrado o instrumento este foi utilizado para a análise *screening* das amostras de medicamentos injetáveis comerciais. Caso o medicamento estivesse dentro dos limites de conformidade, ou seja, dentro dos limites da especificação era apresentada na tela do software que estará realizando os cálculos, as palavras “Amostra Conforme”, caso contrário, surgia a mensagem “Amostra Não Conforme”.

A região de confiabilidade da análise pelo fotômetro foi verificada pelas curvas de performance. Posteriormente todas as amostras analisadas pelo método *screening* também foram analisadas pelo método quantitativo de análise utilizando a curva analítica.

4.2.5. Curva Analítica usando o fotômetro LED-NIR

Para a análise quantitativa das amostras de dipirona sódica injetável foi elaborada uma curva analítica. Esse método consiste em se medir sinais instrumentais de soluções de referência (conhecido também como soluções padrão) de um analito e construir uma curva dos sinais analíticos versus concentração do analito das soluções de referência. Esta curva é depois usada para determinar a concentração do analito nas amostras usando a equação estimada empregando uma

regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A construção da curva analítica requer a preparação de 4, 5, ou mais soluções de referência, aqui utilizou-se 7 pontos. Para calibrar o software para realizar a análise usando uma curva analítica, o procedimento descrito no **Item 3.4** do **Capítulo III** deve ser seguido.

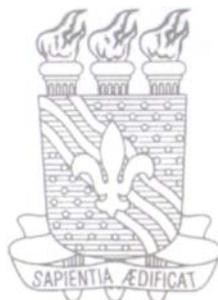
A validação da curva utilizando-se a ANOVA foi efetuada para avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder.

Uma vez calibrada e validada a curva analítica, esta foi utilizada para a predição das concentrações das amostras comerciais de dipirona sódica injetável. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Para verificar a autenticidade e precisão das respostas obtidas pelo instrumento, as análises químicas dessas amostras foram efetuadas, envolvendo o método de referência farmacopeico (o método de titulação iodométrica), somente após a realização de todas as medidas com as ampolas devidamente fechadas. Essa análise foi realizada de forma amostral, conforme é feito na indústria farmacêutica e na fiscalização. Uma amostra de cada lote foi retirada aleatoriamente do conjunto amostral e avaliada pelo método de referência. Os valores de concentração obtidos foram comparados com os valores medidos pelo instrumento desenvolvido e com os valores fornecidos pela indústria produtora.

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO



5.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Resultados do estudo com o espectrofotômetro NIR comercial

A seguir serão apresentados os resultados obtidos, com base no experimental executado utilizando-se um espectrofotômetro NIR comercial, para o estudo de uma região espectral informativa para direcionar a escolha dos LEDs-NIR utilizados no fotômetro.

5.1.1. Estudo e Seleção da Região Espectral NIR

Os espectros médios das amostras comerciais e das soluções sintéticas de calibração, na faixa espectral de 4000 a 14000 cm^{-1} , estão apresentados na **Figura 29**. Boa parte do espectro apresenta sinal analítico saturado ou ruído espectral elevado. A região que contém informações a respeito à dipirona encontra-se basicamente entre 7500 e 10450 cm^{-1} (**Figura 30**).

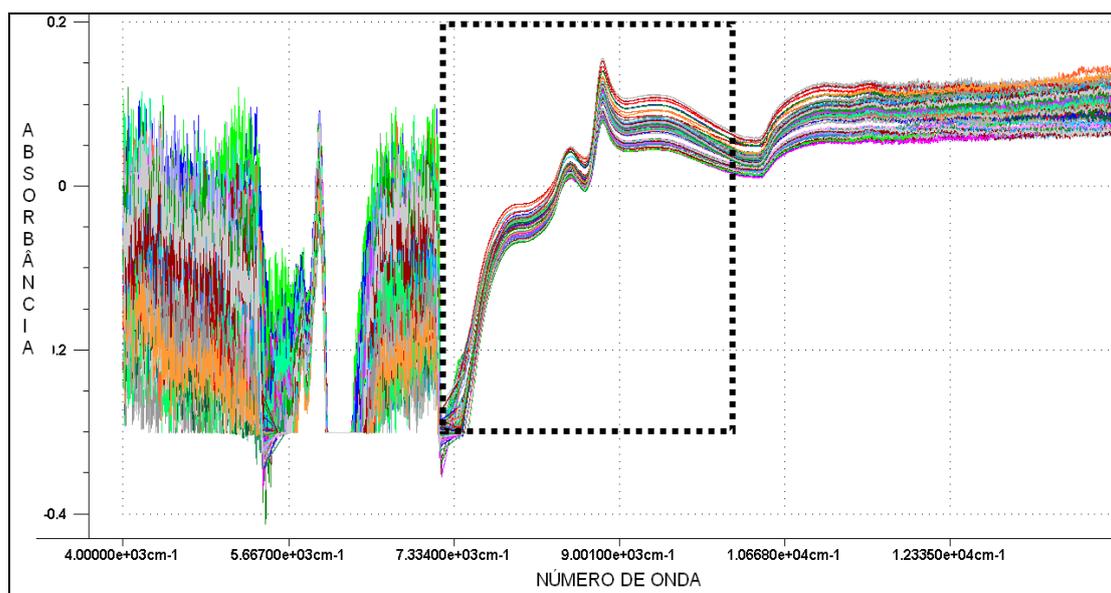


Figura 29 - Espectros brutos das amostras e dos padrões na região NIR entre 4000 a 14000 cm^{-1} .

É possível observar na imagem a presença de absorbâncias negativas na região entre 7500 e 8300 nm . Esse comportamento se deve ao fato do ajuste de “100%” da transmitância (absorbância zero) ter sido realizado com água, cuja absorvidade é maior do que a da dipirona nesta região. Isso quer dizer que a presença da dipirona na solução diminui o sinal absorbância amostra em relação à absorbância do sinal do branco (que contém apenas moléculas de água), ou seja, o sinal da amostra nesta região é menor que o sinal do branco, cuja subtração leva a valores negativos de absorbância. Esses valores se tornam “mais negativos” à medida que se aumenta a concentração de dipirona nas soluções.

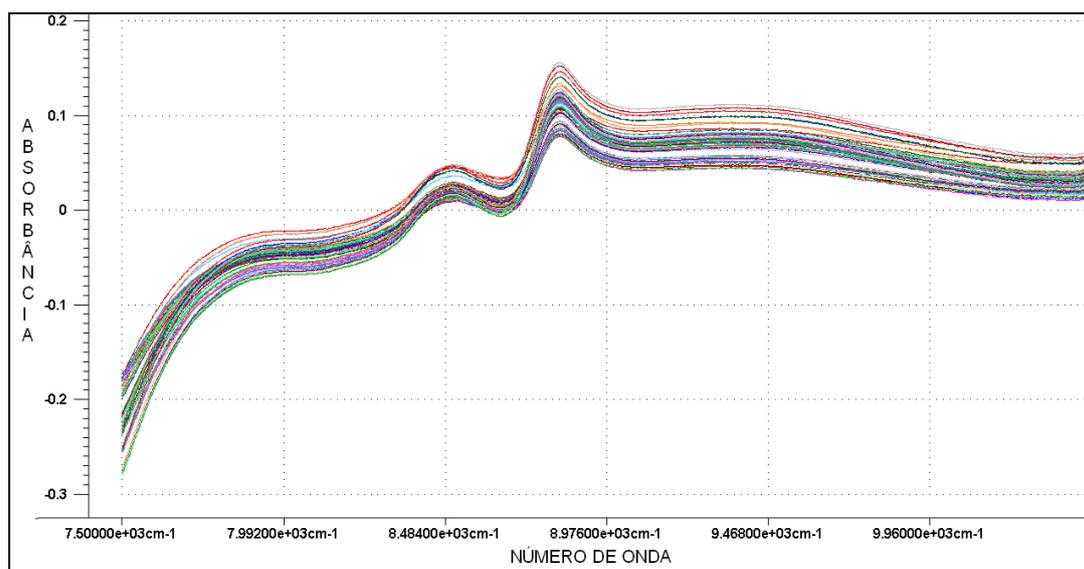


Figura 30 - Espectros brutos das amostras e padrões na região NIR entre 7500 a 10450 cm^{-1} .

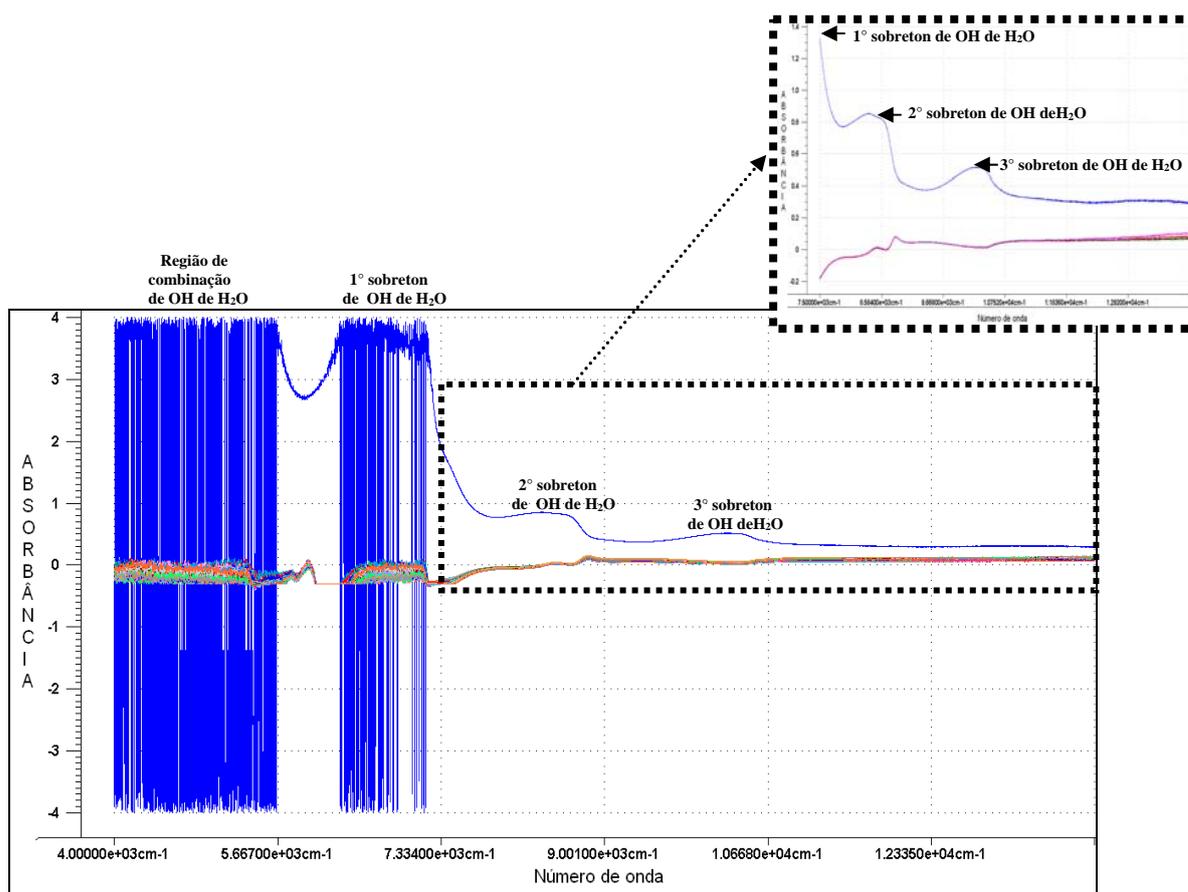


Figura 31 - Espectros de absorvância das amostras (espectros coloridos de menor intensidade) sobrepostos pelo espectro da água (espectro, em azul, de maior intensidade) na região NIR entre 7500 a 14000 cm^{-1} .

Conforme se pode observar na **Figura 31**, essas regiões onde ocorrem os sinais de absorvâncias negativas para as amostras de dipirona sódica injetável estão relacionadas basicamente

à ocorrência de 1° e 2° sobreton da água, cujas bandas de absorvância caracterizam-se por serem bastante largas e muito intensas. Observa-se ainda, que o sinal de 1° sobreton é tão intenso que chega a saturar o detector.

A **Figura 32** ilustra a região selecionada (7500 a 14000 cm^{-1}) ampliada.

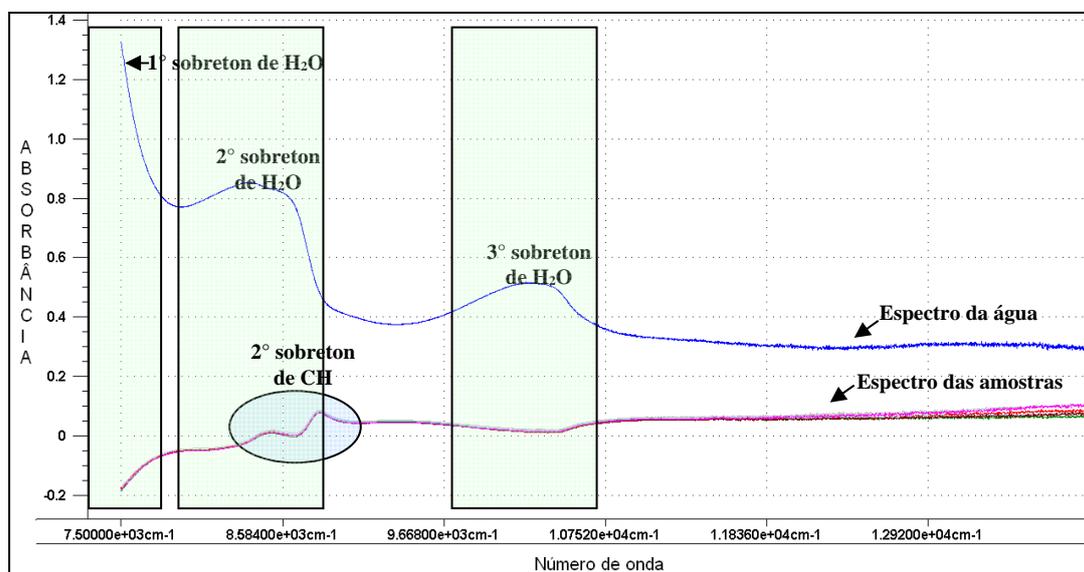


Figura 32 - Espectros de absorvância das amostras (espectros coloridos de menor intensidade) sobrepostos pelo espectro da água (espectro, em azul, de maior intensidade) na região NIR entre 7500 a 14000 cm^{-1} .

A região escolhida para análise foi a faixa espectral compreendida entre 8200 e 9110 cm^{-1} ,

Figura 33.

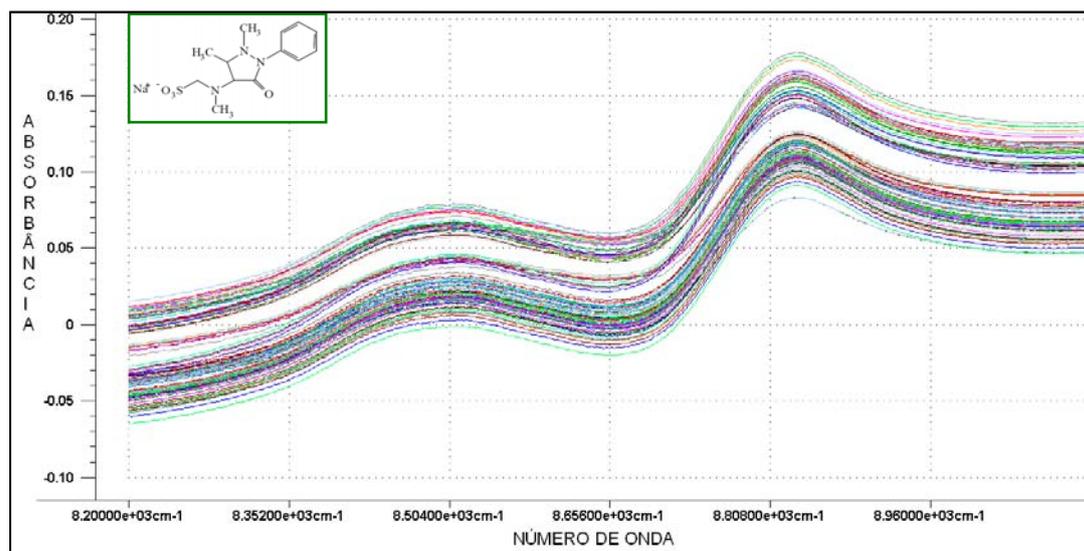


Figura 33 - Espectros brutos das amostras e padrões na região NIR entre 8200 a 9110 cm^{-1} .

O ruído instrumental é comum nessa região espectral, e caso quiséssemos construir modelos de calibração multivariada, este ruído poderia ser facilmente tratado pelo uso de uma técnica de

suavização adequada, por exemplo, a suavização Savitzky-Golay^[198], que ajusta, pelos mínimos quadrados, um polinômio de baixa ordem aos pontos de uma janela. Observa-se também um deslocamento de linha de base, que provavelmente é devido à variação do índice de refração, que também poderia ser corrigido pelo uso de métodos derivativos^[151]. Estudos utilizando este tratamento foram efetuados e modelos de calibração multivariada foram construídos para a quantificação de dipirona sódica, e para maiores detalhes consulte Sanches et. al^[151].

Com relação à **Figura 33**, as bandas de absorção que aparecem em 8333 e 9091 cm^{-1} (que correspondem, respectivamente, a 1200 e 1100 nm) estão associadas basicamente ao segundo sobreton de CH, pertencentes às moléculas de dipirona da amostra analisada (em função dos grupos CH, CH₂ e CH₃ presentes na cadeia carbônica principal de estrutura aberta, como também nas ramificações desta, que geram absorções em torno de 1100 e de 1200 nm, sendo que a absorção é maior na região de 1100 nm em função da grande contribuição dos grupos CH do anel aromático). A **Figura 34** ilustra a localização desta região no espectro NIR, bem como os grupos funcionais responsáveis pela origem das bandas de combinações e sobretons^[199].

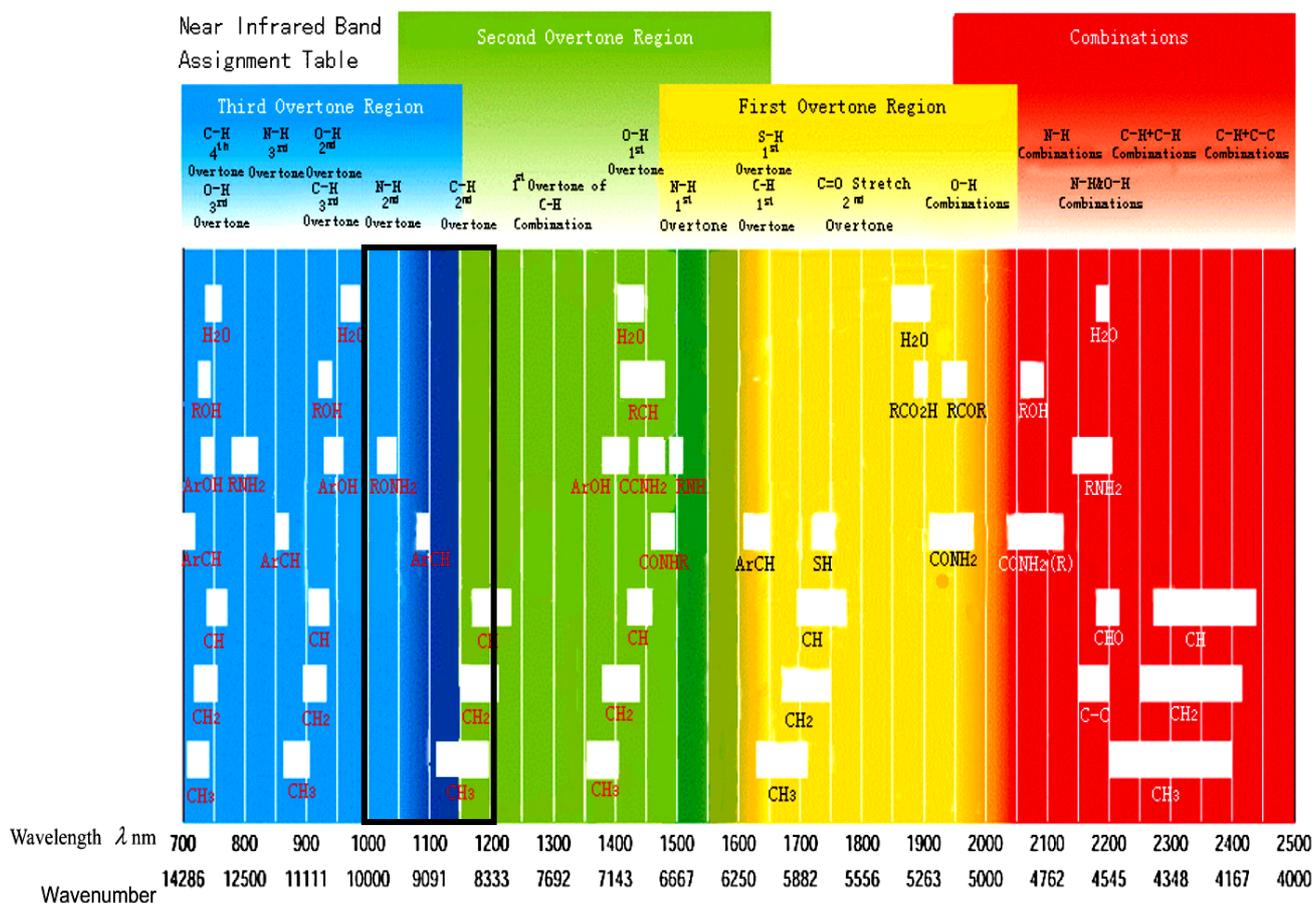


Figura 34 – Atribuições de bandas NIR de sobretons e combinações^[199].

5.1.2. Tratamento estatístico para a escolha dos LEDs

O conjunto de amostras foi então dividido em subconjuntos de calibração (65 amostras), de validação (33 amostras) e de predição (33 amostras) através da aplicação do algoritmo SPXY (*sample set partitioning based on joint x - y distances*)^[200].

Uma vez selecionado os subconjuntos, estes foram utilizados no processo de seleção de variáveis usando o algoritmo das projeções sucessivas - SPA (*Successive Projections Algorithm*)^[201-203], e mais recentemente, foram utilizados no processo de seleção variáveis por intervalos usando o algoritmo *i*SPA (*Interval Successive Projections Algorithm*)^[204,205], sendo que o primeiro está associado à regressão MLR e o segundo à regressão PLS. Os algoritmos de seleção de amostras (SPXY), de variáveis (SPA-MLR), e de intervalos (*i*SPA-PLS) foram elaborados e executados em ambiente *Matlab*® 2010b (*Mathworks*).

O algoritmo *SPA-MLR* compreende basicamente três etapas. Inicialmente, o algoritmo seleciona subconjuntos de variáveis com base no critério de minimização da multicolinearidade. Esses subconjuntos são obtidos de acordo com uma seqüência de operações de projeções aplicadas nas colunas da matriz de calibração^[206].

A etapa seguinte (fase 2 do SPA-MLR) consiste em avaliar a correlação das cadeias com o parâmetro de interesse. Nesta fase, o melhor subconjunto é escolhido de acordo com um critério que avalia a habilidade de predição de um modelo *MLR* para o conjunto de validação, utilizando validação cruzada ou um conjunto de teste independente, e calcula-se o *RMSE* (*Root Mean Squares Error*)^[201,206].

A terceira e última fase, proposta por Galvão e colaboradores^[206], consiste em eliminar as variáveis que não apresentam melhoria em termos de valor *PRESS* (*Predicted Residual Error Sum of Squares*), com base em um teste *F*. A estatística *PRESS*^[201] é uma medida de validação obtida pela eliminação de cada observação, uma por vez, e prevendo-se esse valor dependente com o modelo de regressão estimado a partir das demais observações. Para isso, a cada variável é associado um “fator de relevância” dado pelo produto do desvio padrão amostral e módulo do coeficiente de regressão desta variável. Posteriormente, os modelos *MLR* são construídos incluindo progressivamente as variáveis em ordem decrescente de importância e a cada nova variável adicionada calcula-se o valor de *PRESS* para um conjunto de validação a cada variável incluída. O menor número de variáveis para qual o valor de *PRESS* não difere do mínimo global empregando um teste *F* a 75% de confiança é empregado no modelo *MLR* final.

Já no algoritmo *i*SPA-PLS^[204,205], inicialmente a matriz de calibração *Xcal* é particionada em *Ical* dependendo da quantidade de intervalos determinados pelo usuário. As matrizes *Ical* possuem

igual quantidade de variáveis, contudo em situações em que a razão entre o número de colunas de X_{cal} e a quantidade de intervalos não for exata os primeiros intervalos receberão uma variável a mais. Para cada intervalo, é escolhida uma variável “representante” do mesmo. Esta escolha é feita determinando a norma de cada variável do intervalo.

Na etapa seguinte, é determinada a variável que apresenta a maior norma de cada intervalo, que são denominadas variáveis representante do respectivo intervalo. No final da etapa de projeções é gerada a matriz SEL contendo os índices das variáveis representantes que forma cada cadeia de intervalos. Nesta fase, usa-se as variáveis representantes com índices SEL(1,k), SEL(2,k), ..., SEL(m,k) para construir um modelo *PLS* empregando os respectivos intervalos, com validação cruzada completa^[204,205].

A partir dos conjuntos de amostras selecionados pelo SPXY, o algoritmo SPA-MLR selecionou as variáveis espectrais mais informativas e não redundantes. A **Figura 35** mostra a variação do RMSEV versus o número de variáveis selecionadas pelo SPA-MLR.

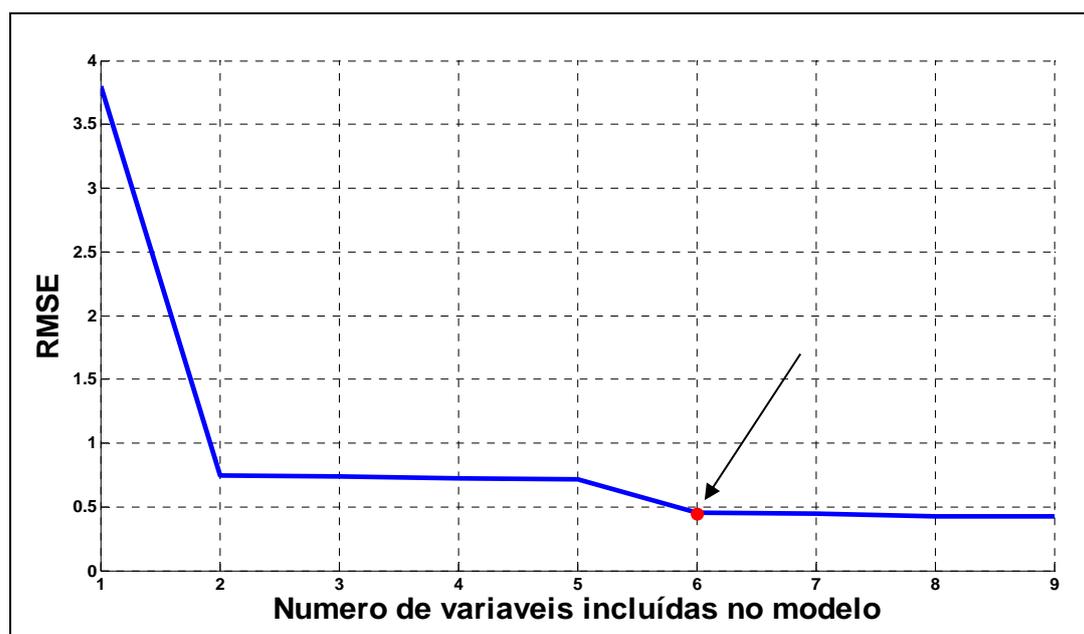


Figura 35 – Variação do RMSEV (% m/v) em função do número de variáveis selecionadas pelo SPA-MLR.

Conforme se pode observar na **Figura 35**, ocorre uma queda acentuada do RMSE até 2 variáveis, e depois o RMSEV praticamente não varia até 6 variáveis, onde volta a cair, e posteriormente praticamente não varia mais. Embora 2 variáveis parecesse ser a escolha do algoritmo, em função da queda no erro de validação do modelo MLR, o algoritmo SPA-MLR selecionou 6 variáveis mais informativas. As variáveis selecionadas pelo SPA-MLR são apresentadas na **Figura 36**.

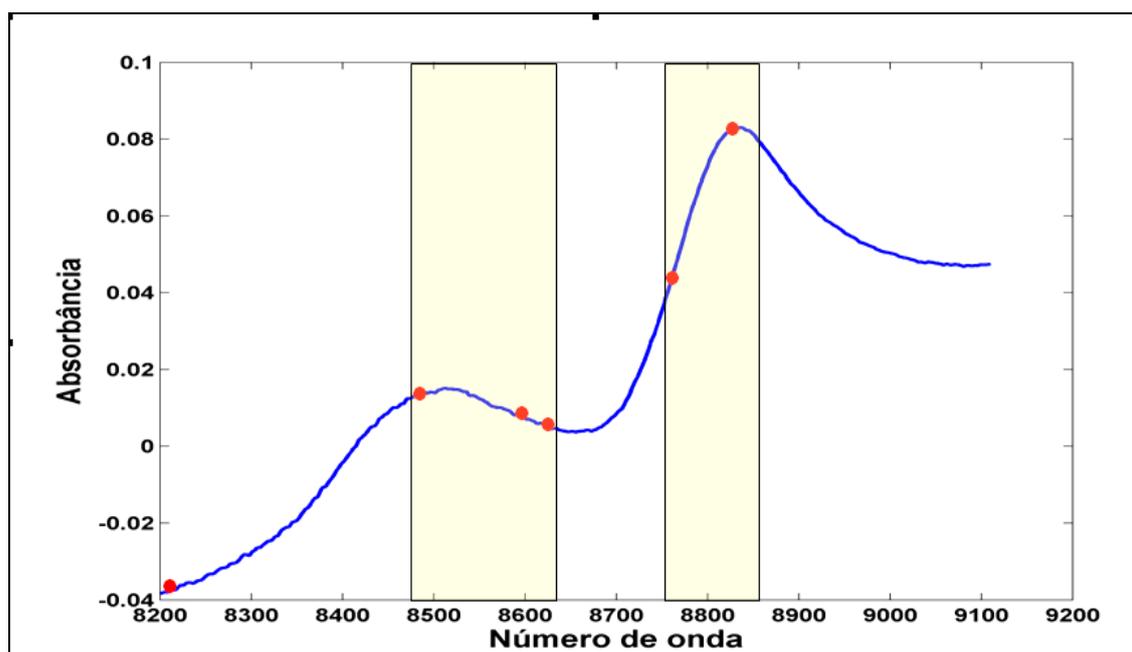


Figura 36 - Espectro NIR de uma amostra de dipirona sódica, indicando as variáveis selecionadas pelo SPA-MLR.

As variáveis selecionadas pelo SPA-MLR (**Figura 36**), com exceção de uma variável selecionada no extremo do espectro NIR, encontram-se distribuídas basicamente em duas regiões, uma entre aproximadamente $8500\text{-}8600\text{ cm}^{-1}$ ($\approx 1176\text{-}1163\text{ nm}$, ou seja, por volta de 1200 nm) e outra entre aproximadamente $8780\text{-}8850\text{ cm}^{-1}$ ($\approx 1139\text{-}1130\text{ nm}$, ou seja, por volta de 1100 nm).

Posteriormente, a partir dos mesmos conjuntos de amostras selecionados pelo SPXY, aplicou-se o algoritmo *i*SPA-PLS. A **Figura 37** mostra a variação do RMSECV versus o número de fatores incluídos no modelo PLS global (usando 10 intervalos e 7 variáveis latentes).

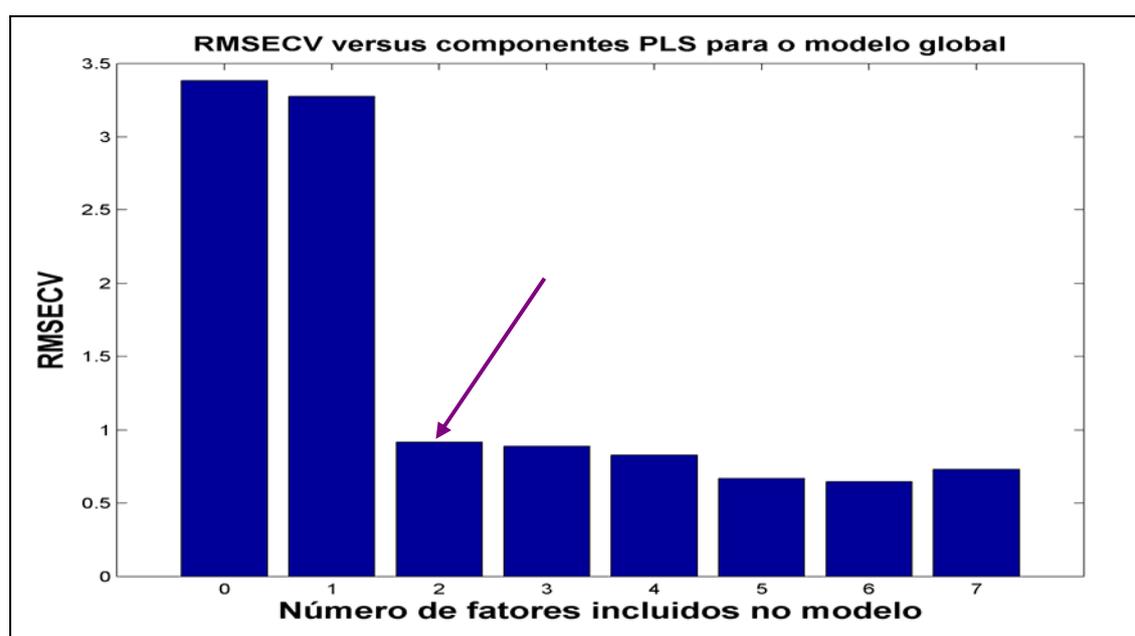


Figura 37 – Variação do RMSECV (% m/v) em função do número de fatores PLS global.

Com base nos gráficos apresentados na **Figura 37**, é possível perceber que após o segundo fator praticamente não ocorre variação significativa no valor do RMSECV. O resultado sugere que dois fatores são suficientes para descrever o sistema em estudo. A **Figura 38** apresenta os intervalos selecionados pelo *iSPA-PLS*.

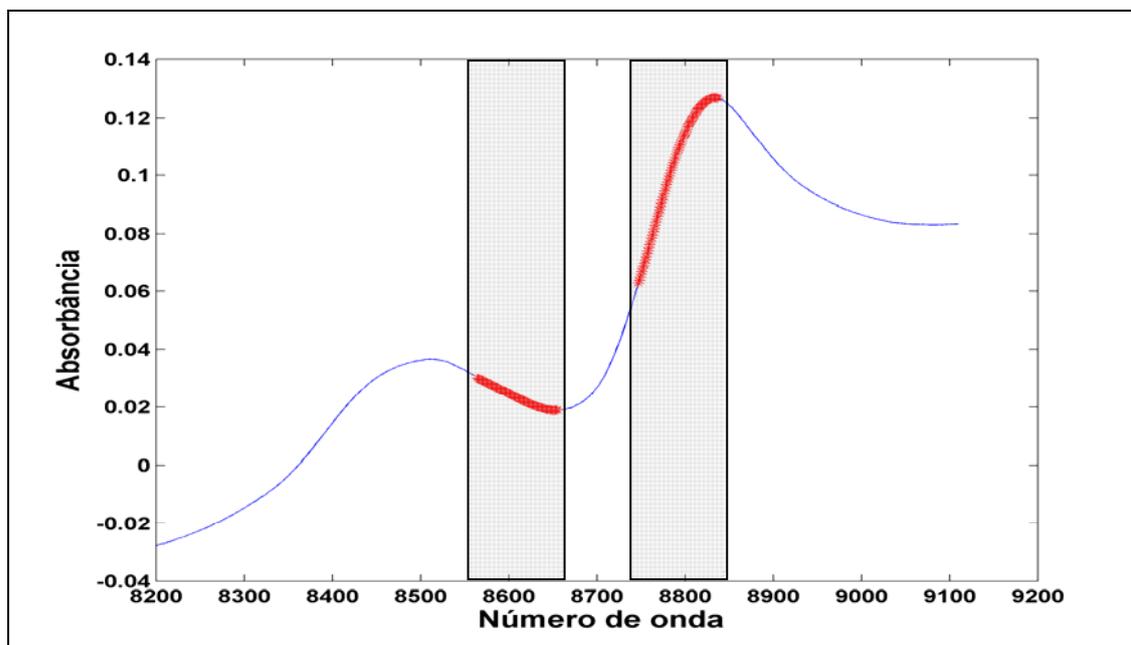


Figura 38: Variáveis selecionadas pelo algoritmo *iSPA-PLS* usando 2 variáveis latentes.

Como se pode observar, as regiões selecionadas pelos dois algoritmos são bastante parecidas. E, como o *iSPA-PLS* seleciona faixas, ele mostra-se mais adequado na escolha dos LEDs a serem utilizados no fotômetro proposto, uma vez que a luz emitida pelo LED não é monocromática.

Essas duas regiões são bastante promissoras para a quantificação dos medicamentos injetáveis uma vez que apresenta uma resposta bastante linear na regressão PLS (RMSEP: 0,69; r: 0,9865; R²: 0,9733; BIAS: 0,1784), conforme se pode observar na **Figura 39**. Entretanto, a princípio, como para a construção do fotômetro irá usar-se apenas um LED (ou seja, um comprimento de onda) para a *screening* da conformidade dos medicamentos injetáveis, assim é prioritário saber qual região é a mais informativa para ser utilizada na análise das amostras. Então, com esse intuito, aplicou-se novamente o algoritmo *iSPA-PLS* (usando 10 intervalos e 7 variáveis latentes), porém utilizando um fator para descrever o sistema em estudo. A **Figura 40** apresenta o intervalo de variáveis selecionado pelo *iSPA-PLS*.

A região selecionada encontra-se entre aproximadamente 8840-8940 cm⁻¹ (\approx 1131-1118 nm, ou seja, por volta de 1100 nm).

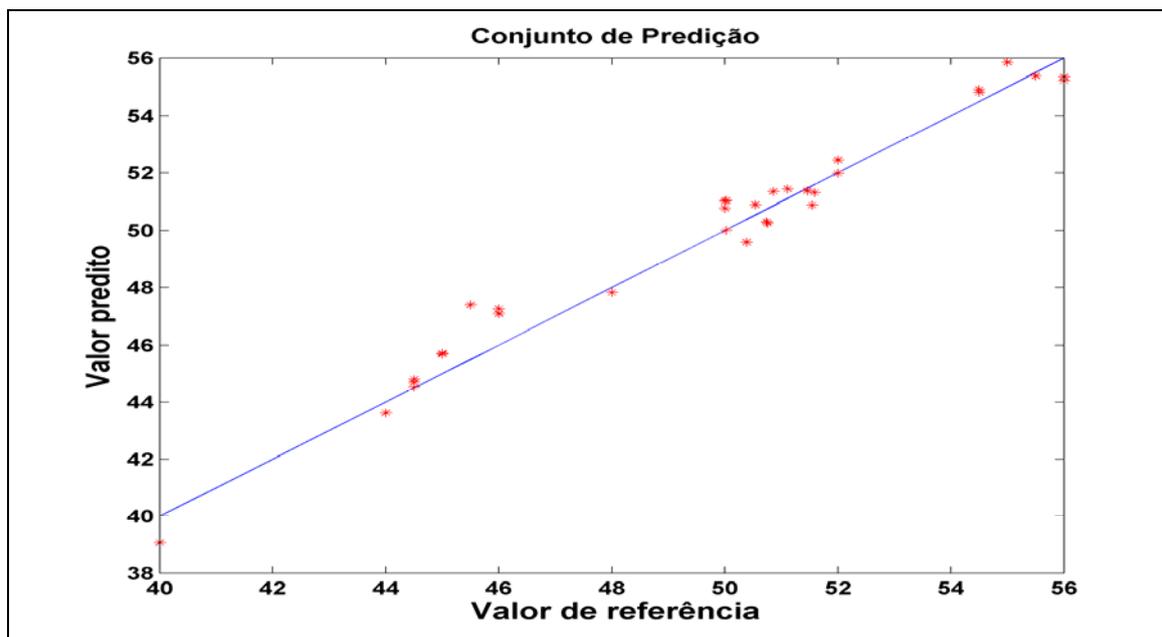


Figura 39 - Valores de referência versus os valores preditos pelo modelo *i*SPA-PLS usando 2 variáveis latentes.

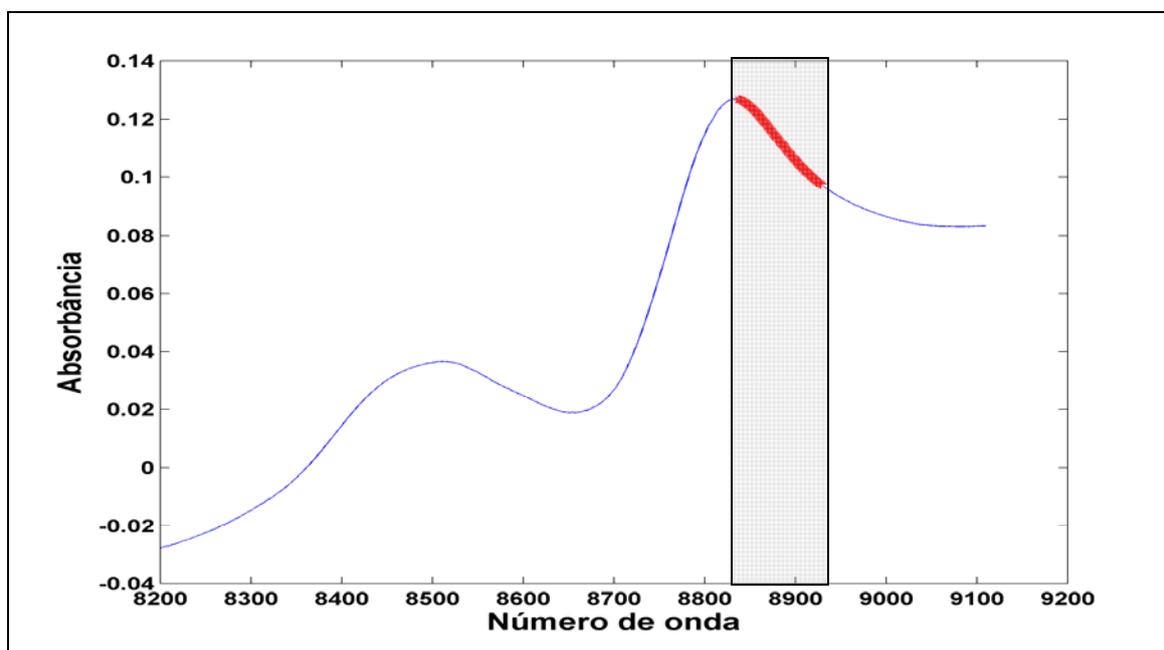


Figura 40: Intervalo selecionado pelo algoritmo *i*SPA-PLS usando 1 variável latente.

È interessante ressaltar que a região selecionada pelo algoritmo *i*SPA-PLS seria a região de escolha de um analista experiente, com habilidade química, visto que esta é a região de maior intensidade de absorbância.

O intervalo selecionado pelo algoritmo *i*SPA-PLS foi então utilizada como base para a escolha do LED utilizado no fotômetro LED-NIR, descrito no **Capítulo III**.

5.2. Resultados do estudo com o espectrofômetro NIR comercial

5.2.1. Avaliação de desempenho do fotômetro LED-NIR na análise *screening*

A Farmacopéia preconiza valores aceitáveis como sendo +10 % acima e -5% abaixo do teor nominal de dipirona nos medicamentos injetáveis, e como os medicamentos injetáveis analisados apresentam um teor nominal de 50 % m/v, o limite de corte inferior adotado na análise *screening* foi igual a 47,5 % m/v e limite superior adotado foi igual a 55 % m/v. Para encontrar a região de não confiabilidade (ou de incerteza) da análise *screening* foram preparadas soluções padrão de dipirona sódica em concentrações bem próximas a esses pontos de corte. Estudos preliminares realizados utilizando análise *screening* demonstram que o instrumento desenvolvido não apresenta sensibilidade suficiente para distinguir variações nas concentrações iguais ou menores que 0,25% m/v do princípio ativo devido à baixa sensibilidade do fototransdutor para variações de concentração dessa magnitude na região do NIR. Em função disso, foram preparadas soluções padrão com variações mínimas de concentração de $\pm 0,5\%$ m/v dos valores de corte. Para cada ponto de corte foram preparados sete níveis de concentração: 45; 46; 47; 47,5; 48; 49; 50 % m/v para avaliar a imprecisão do ponto de corte inferior; e 53; 54; 54,5; 55; 55,5; 56; 57 % m/v para avaliar a imprecisão do ponto de corte superior. Para cada nível de concentração foram preparadas 10 soluções (ou seja, 10 replicatas autênticas), perfazendo um total de 140 soluções.

A **Tabela 6** apresenta o resultado da análise *screening* para os padrões previamente preparados. Os dados apresentados na **Tabela 6** mostram que: todas as medidas realizadas para concentrações abaixo de 47 % foram discriminadas como não conformes; todas as medidas realizadas para concentrações entre 49 % e 54,5 % foram discriminadas como conformes; e todas as medidas efetuadas acima de 55,5 % foram discriminadas como não conformes. A região de não confiabilidade para o ponto de corte inferior está localizada entre 47% e 49%; e a região de não confiabilidade para o ponto de corte superior está localizada entre 54,5% e 55,5%. Os dados contidos nesta tabela foram utilizados para determinar a taxa de respostas positivas e a taxa de respostas negativas obtidas para o ponto de corte inferior e para o ponto de corte superior.

A **Tabela 7** apresenta o número e a taxa de respostas positivas e negativas obtidas nos sete níveis de concentração do limite de corte inferior (47,5 % m/v), e a **Tabela 8** apresenta o número e a taxa de respostas positivas e negativas obtidas nos sete níveis de concentração do limite de corte superior (55 % m/v). Esta análise foi utilizada para se determinar a região de incerteza da análise *screening*.

Tabela 7 - Número e taxa de respostas positivas e negativas obtidas em sete níveis de concentração ao redor do limite de corte inferior (47,5 % m/v).

Nível de concentração (%)	Resposta Positiva	Resposta Negativa	Taxa de resposta Positiva (%)	Taxa de resposta Negativa (%)
45,0	0	10	0	100
46,0	0	10	0	100
47,0	8	2	80	20
47,5	8	2	80	20
48,0	6	4	60	40
49,0	10	0	100	0
50,0	10	0	100	0

Tabela 8 - Número e taxa de respostas positivas e negativas obtidas em sete níveis de concentração ao redor do limite de corte superior (55 % m/v).

Nível de concentração (%)	Resposta Positiva	Resposta Negativa	Taxa de resposta Positiva (%)	Taxa de resposta Negativa (%)
53,0	10	0	100	0
54,0	10	0	100	0
54,5	7	3	70	30
55,0	4	6	40	60
55,5	2	8	20	80
56,0	0	10	0	100
57,0	0	10	0	100

Para encontrar as regiões de não confiabilidade da análise *screening* para a dipirona sódica, foram elaboradas 2 curvas de desempenho (com a taxa de resposta positiva e a taxa de resposta negativa versus concentração). As curvas de desempenho são apresentadas nas **Figuras 41 e 42**.

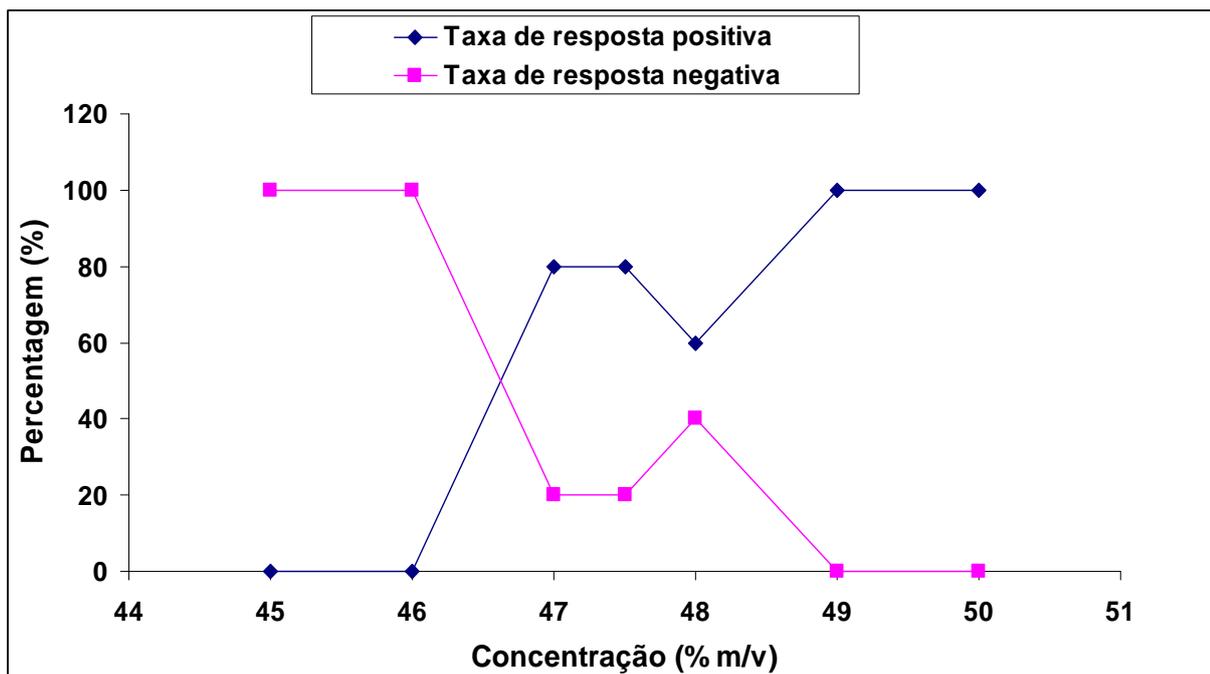


Figura 41 - Curva de desempenho de dipirona para o limite de corte 47,5% m/v.

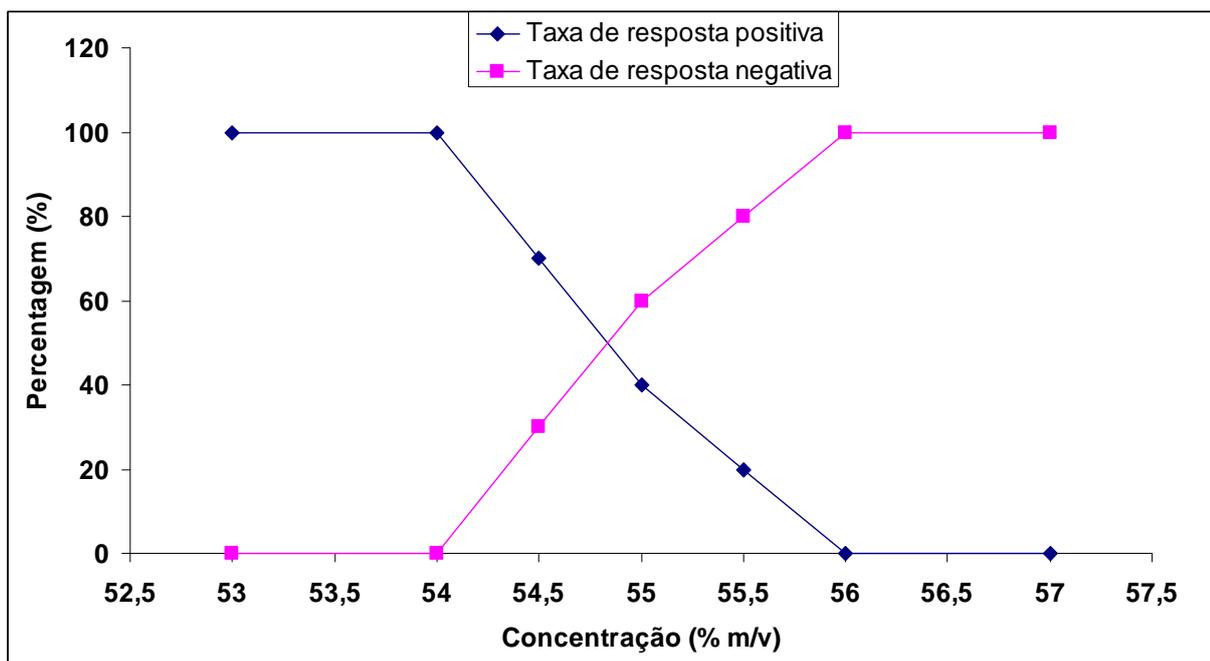


Figura 42 - Curva de desempenho de dipirona para o limite de corte 55% m/v.

Se a probabilidade de cometer uma decisão errada for fixada em 5% para falso positivo e falso negativo, a região de incerteza calculada usando as curvas de desempenho apresentadas nas Figuras 41 e 42 estará entre 46,06 e 48,88 % (m/v) para o limite de 47,5 % (m/v) de dipirona sódica, e entre 54,12 e 55,88 % (m/v) para o limite de 55 % (m/v) de dipirona sódica.

A Figura 43 apresenta os valores das concentrações medidas versus os valores médios das absorbâncias obtidas para as 10 replicatas.

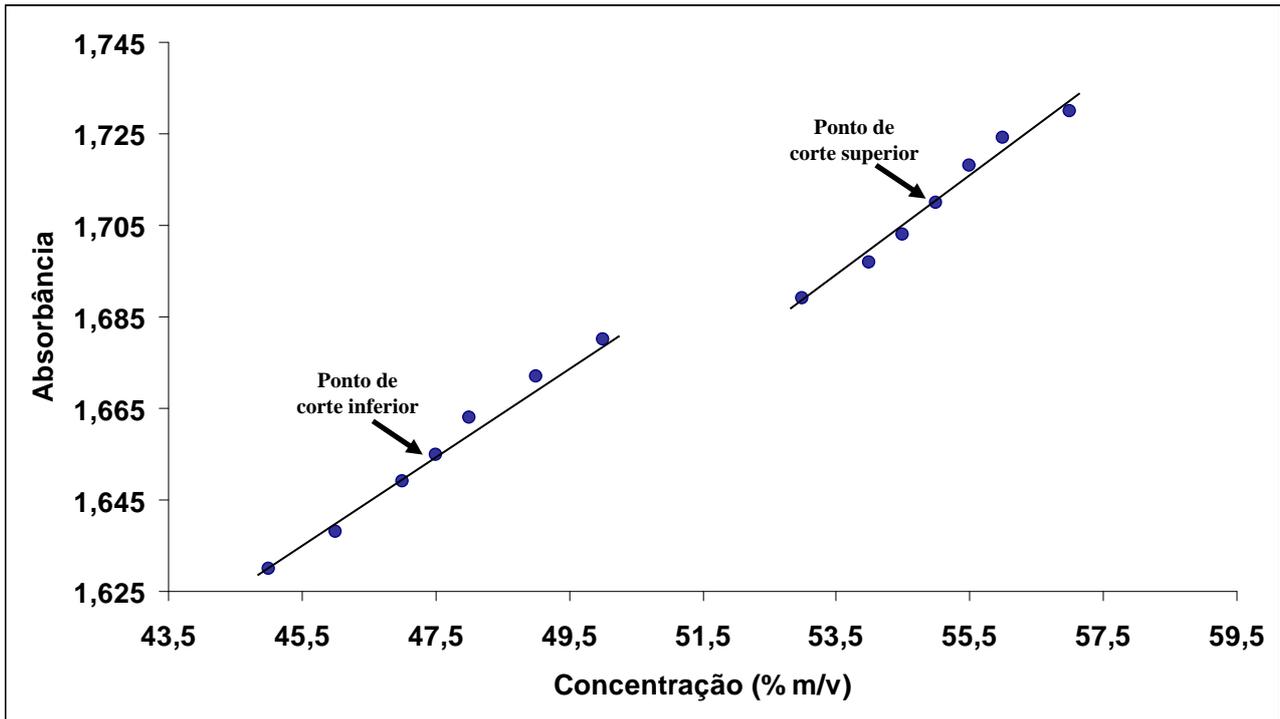


Figura 43 – Gráfico de dispersão dos valores médios das medidas (n = 10) das 14 amostras para o método *screening*.

Sobre a **Figura 43** foram sobrepostas as regiões de confiabilidade e de não confiabilidade obtidas pela análise *screening* para a dipirona sódica, para indicar a região de conformidade, de não conformidade, de falsos positivos e de falsos negativos encontrados. O resultado é apresentado na **Figura 44**.

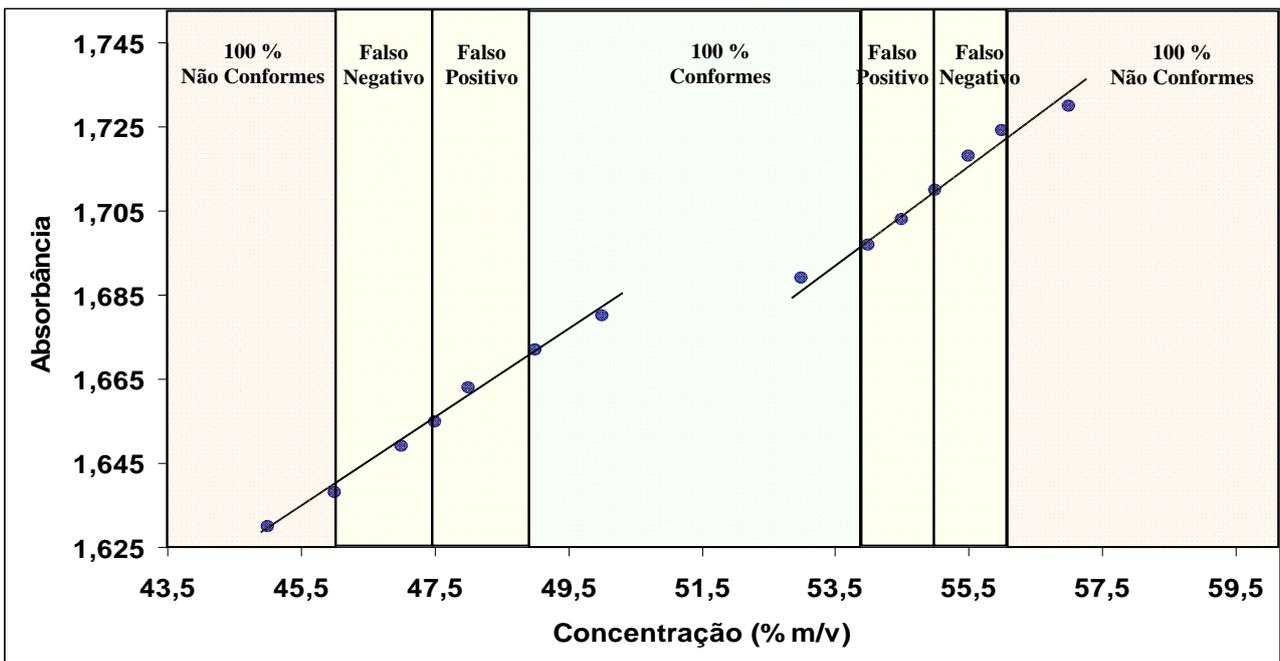


Figura 44 – Gráfico de dispersão dos valores médios das medidas (n = 10) das 14 amostras para o método *screening*, com as regiões de confiabilidade das análises.

Com base nos resultados obtidos, pôde-se constatar que: variações da ordem de 1 % entre as concentrações de dipirona apresentam-se bem definidas, mostrando que o instrumento apresenta sensibilidade suficiente para discerni-las. Assim, com base na análise *screening* efetuada, cujos dados encontram-se apresentados nas **Figuras 41, 42, 43 e 44**, podemos constatar que o instrumento é sensível ao analito e apresenta boa resposta para pequenas variações de concentração de dipirona sódica (na ordem de $\pm 1\%$).

O resultado da análise *screening* para as amostras comerciais está apresentado nas **Tabelas 13 a 28 (Anexo I)**, juntamente com os valores de concentrações previstos pela curva analítica. O índice de acertos encontrados pela análise *screening* foi de 91,61%. As amostras que foram classificadas erroneamente em função das concentrações previstas encontrarem na região de incerteza da análise *screening*, próximas aos limites de corte.

5.2.2. Avaliação do desempenho do fotômetro LED-NIR na análise quantitativa

Nesta etapa é feita a determinação dos parâmetros de desempenho analítico (ou figuras de mérito) para o método de análise quantitativa usando o fotômetro LED-NIR, tais como, faixa linear de concentração, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), etc. Para isso foi construída a curva analítica e esta foi validada usando a análise de variância (ANOVA). Na **Figura 45** é apresentada a curva analítica construída usando o fotômetro LED-NIR desenvolvido.

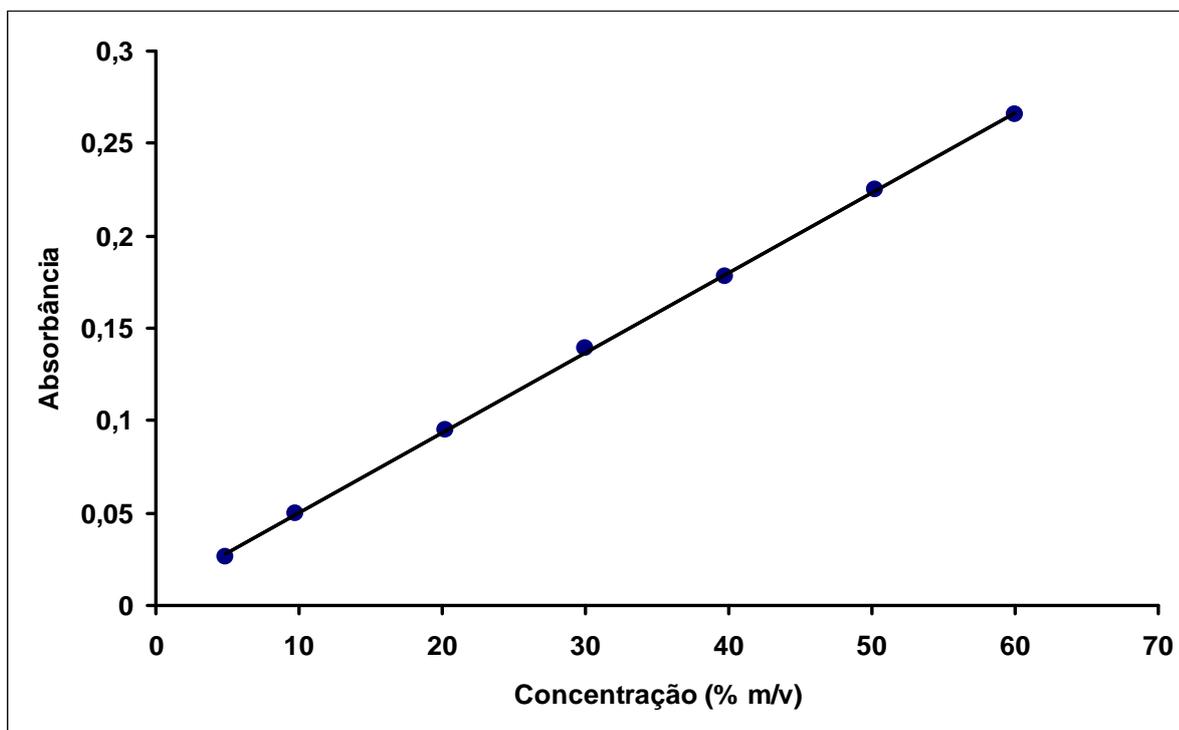


Figura 45 – Curva analítica usando os LEDs de 1050 nm.

Pela aplicação do método dos mínimos quadrados na curva, obteve-se uma equação linear do tipo: $A = a + b * C$, onde A é a absorvância, a é o coeficiente linear da reta, b é o coeficiente angular da reta e C é a concentração do analito. O coeficiente linear obtido foi: $a = 0,0068 \pm 0,0142$; e o coeficiente angular obtido foi: $b = 0,0043 \pm 0,0001$; e coeficiente de correlação linear (r) encontrado foi de 0,9997.

A **Tabela 9** apresenta o tratamento estatístico dos dados da curva analítica pela análise de variância (ANOVA). Para verificar se o modelo explica uma quantidade significativa de variações nos dados experimentais utilizou-se o teste F .

Tabela 9 – Análise de variância para o ajuste do modelo linear, usando LEDs de 1050 nm.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>
Regressão	$4,54 \times 10^{-2}$	1	$4,54 \times 10^{-2}$
Resíduos	$1,65 \times 10^{-4}$	19	$8,68 \times 10^{-6}$
Falta de ajuste	$5,77 \times 10^{-5}$	5	$1,15 \times 10^{-5}$
Erro puro	$1,07 \times 10^{-4}$	14	$7,67 \times 10^{-6}$
Total	$4,56 \times 10^{-2}$	20	

R^2 : 0,9964

Varição percentual explicada pelo modelo: 99,64 %

Varição percentual máxima explicável pelo modelo: 99,76 %

	MQ_{faj}/MQ_{ep}	MQ_{reg}/MQ_{res}	$F_{tabelado}$
<i>Análise de falta de ajuste</i>	1,5		2,96
<i>Análise de significância de regressão</i>		5233,83	4,38

Com base na ANOVA pode-se dizer que o modelo encontra-se ajustado às observações. A regressão foi significativa estatisticamente ao nível de confiança de 95%, apresentando boa correlação com os dados e, portanto, serve para fins preditivos para cobrir a faixa de variação das concentrações estudadas. Em adicional, como a faixa linear de concentração (ou linearidade) de um método analítico instrumental é aquela em que uma resposta linear é obtida dentro dos limites inferior e superior de concentração desta faixa, com base nos valores de r e R^2 obtidos, pode-se afirmar que o sistema é linear para a faixa de concentração de dipirona sódica estudada.

A **Figura 46** apresenta o gráfico dos resíduos do modelo. Os resíduos apresentam-se distribuídos aleatoriamente sobre a bissetriz, indicando a ausência de tendências.

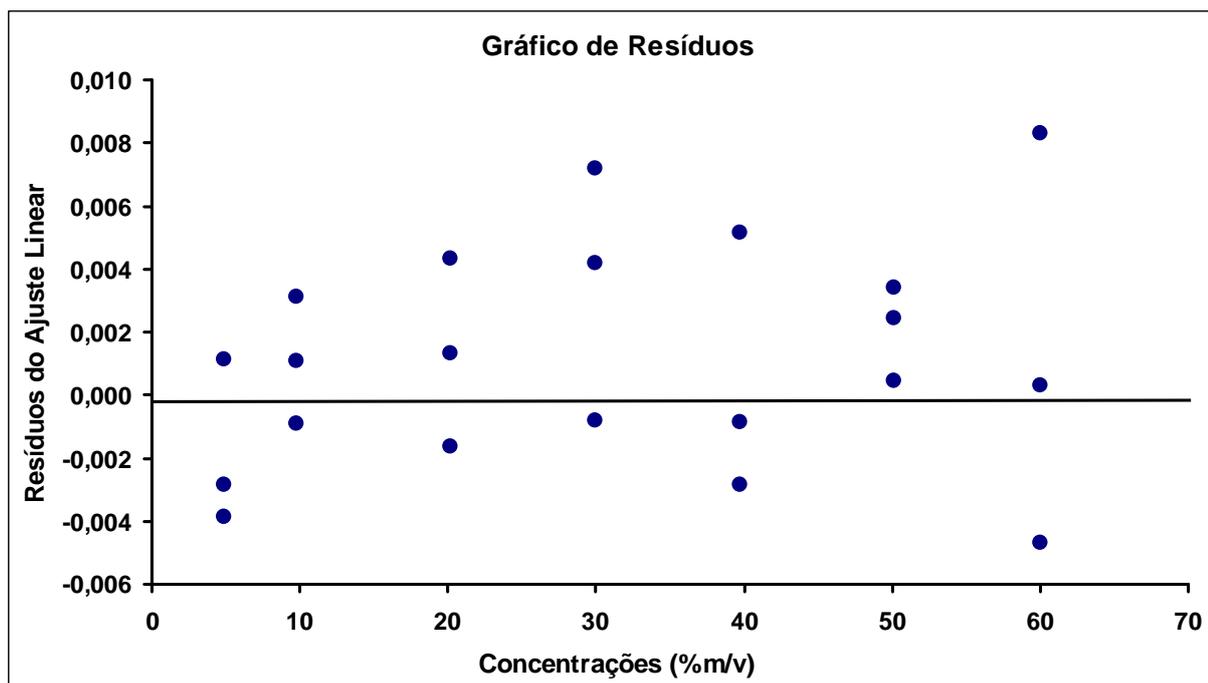


Figura 46 – Gráfico dos resíduos da primeira curva analítica.

Com base na medida de 30 brancos (com as duas ampolas: branco e amostra, preenchidas com água para injetáveis) foram determinados os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), usando as equações abaixo.

$$\text{LOD} = \frac{3 \times s}{b}$$

e

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times s}{b}$$

onde s é o desvio padrão do branco e b é a inclinação da reta

Os valores encontrados para o LOD e para o LOQ foram de 1,09 e 3,65 % m/v, respectivamente.

A curva analítica construída foi utilizada na previsão das concentrações das amostras comerciais obtidas. Os resultados obtidos encontram-se nas **Tabelas 13 a 28 (Anexo I)**, juntamente com a classificação dada pela análise *screening*.

A **Tabela 10** apresenta os lotes, o prazo de validade e a quantidade de amostras comerciais da empresa Farmace que foram analisadas.

Para avaliar a capacidade do método na determinação das concentrações do analito, foram selecionadas aleatoriamente uma amostra de cada lote analisado (num total de 17 amostras), e estas foram abertas e suas concentrações foram determinadas seguindo-se o método de referência (titulação iodométrica) estipulado pela Farmacopéia Brasileira^[10]. A **Tabela 11** apresenta os valores de concentração obtidos pelo instrumento desenvolvido para essas 17 amostras, juntamente com os

valores de concentração das análises realizadas no laboratório (utilizando-se o método de referência); e também apresenta os valores de concentração fornecidas pelo fabricante para cada lote (o qual é realizado de forma amostral e aleatória).

Tabela 10 – Lotes, validade e quantidade das amostras comerciais adquiridas para análise.

Lote	Validade	Quantidade
DP12L148	11/2014	150
DP12B032	11/2014	50
DP12I131	11/2014	98
DP12E073	11/2014	2
DP10B015	02/2012	20
DP09E063	05/2011	20
DP09H109	08/2011	20
DP09G093	07/2011	20
DP10I103	09/2012	20
DP10H098	08/2012	20
DP10D046	04/2012	20
DP09F067	04/2012	20
DP10F064	06/2012	20
DP09I111	09/2011	20
DP10A005	01/2012	20
DP10E059	05/2012	80
DP0006	06/2006	20

Como se pode observar na **Tabela 11**, os resultados obtidos mostraram que os teores de dipirona obtidos com o fotômetro LED-NIR desenvolvido estão bastante concordantes tanto com os valores fornecidos pelo fabricante, como com os valores obtidos pelo método oficial de análise (Iodometria).

Para melhor detalhamento dos resultados obtidos, uma avaliação foi efetuada observando-se as variações das medições entre os lotes analisados. Para isso, foram calculados: a variância

conjunta, a concentração média, o desvio padrão conjunto, e o coeficiente de variação, medido em termos do desvio padrão relativo, RSD dos dados.

Tabela 11 – Dados obtidos da análise amostral dos lotes de dipirona sódica analisadas com o fotômetro, e com método de referência, juntamente com os valores de análise fornecidos pela indústria farmacêutica

	LOTE	Concentração % (m/v) Fotômetro	Concentração % (m/v) indústria	Concentração % (m/v) Referência
1	DP12L148	49,96	50,24	50,00
2	DP12B032	52,62	50,91	52,13
3	DP12I131	50,62	50,64	50,00
4	DP12E073	53,25	50,64	53,20
5	DP10B015	49,66	51,32	50,27
6	DP09E063	50,59	50,48	50,00
7	DP09H109	50,29	51,11	50,00
8	DP09G093	51,76	50,24	50,00
9	DP10I103	50,24	50,74	50,00
10	DP10H098	49,92	50,74	50,53
11	DP10D046	51,10	50,86	51,06
12	DP09F067	50,49	51,19	50,27
13	DP10F064	50,64	50,74	50,00
14	DP09I111	49,92	51,45	49,47
15	DP10A005	48,99	51,37	49,50
16	DP10E059	50,03	51,09	50,00
17	DP000006	49,81	-	50,00

A variância conjunta calculada foi de 1,168, o valor médio das concentrações previstas para os lotes foi de 50,58 % m/v, o desvio padrão conjunto foi de 1,080, o RSD conjunto foi de 2,13 %, e o erro relativo conjunto foi de 0,40%. Assim, utilizando o valor de t tabelado para 95% de confiança a precisão média estimada foi de $50,58 \pm 1,89$ % m/v.

O instrumento conservou-se estável ao longo de todas as análises, mantendo suas características metrológicas praticamente constantes e com boa discriminação entre as medidas.

Um fato bastante interessante observado, foi encontrar os valores de concentração do analito praticamente invariáveis mesmo após ter se passado muito tempo do prazo de validade (**Tabelas 13 a 28, Anexo I**). Este fato é possível em função do rigor estabelecido no processo produtivo para

essa classe de medicamentos. Outro fato interessante observado foi a variação do valor da concentração do analito ao longo do mesmo lote. Essa variação é possível em virtude da alta concentração do analito na solução, o que requer um tempo maior de mistura para sua homogeneização. Entretanto, o preparo do analito não pode ser muito demorado, pois isso gera mais custo para o produtor. Assim, qualquer aceleração do sistema para agilizar o tempo de produção pode gerar variação nas concentrações das amostras do lote envazado, uma vez que o equilíbrio ainda não ocorreu, e a solução ainda não está homogênea. Deste modo a primeira parte do produto envazado terá uma concentração bem superior a ultima parte do produto envazado.

A **Tabela 12** apresenta o maior e o menor valor de concentração encontrado pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe em cada lote analisado.

Tabela 12 – Apresentação dos maiores e dos menores valores obtidos na análise dos lotes de dipirona sódica injetável pelo fotômetro LED-NIR.

	LOTE	Menor valor concentração % (m/v)	Maior valor concentração % (m/v)
1	DP12L148	47,34	51,21
2	DP12B032	47,92	54,75
3	DP12I131	48,44	53,25
4	DP12E074	52,71	53,25
5	DP10B015	47,94	49,66
6	DP09E063	49,82	51,67
7	DP09H109	48,02	50,29
8	DP09G093	51,46	52,82
9	DP10I103	47,9	51
10	DP10H098	47,4	49,92
11	DP10D046	49,25	51,41
12	DP09F067	48,78	51,1
13	DP10F064	48,94	50,64
14	DP09I111	49,92	51,71
15	DP10A005	47,62	48,99
16	DP10E059	47,52	51,26
17	DP000006	49,26	50,91

A **Figura 47** apresenta a variação entre o maior e o menor de concentração encontrado em cada lote analisado.

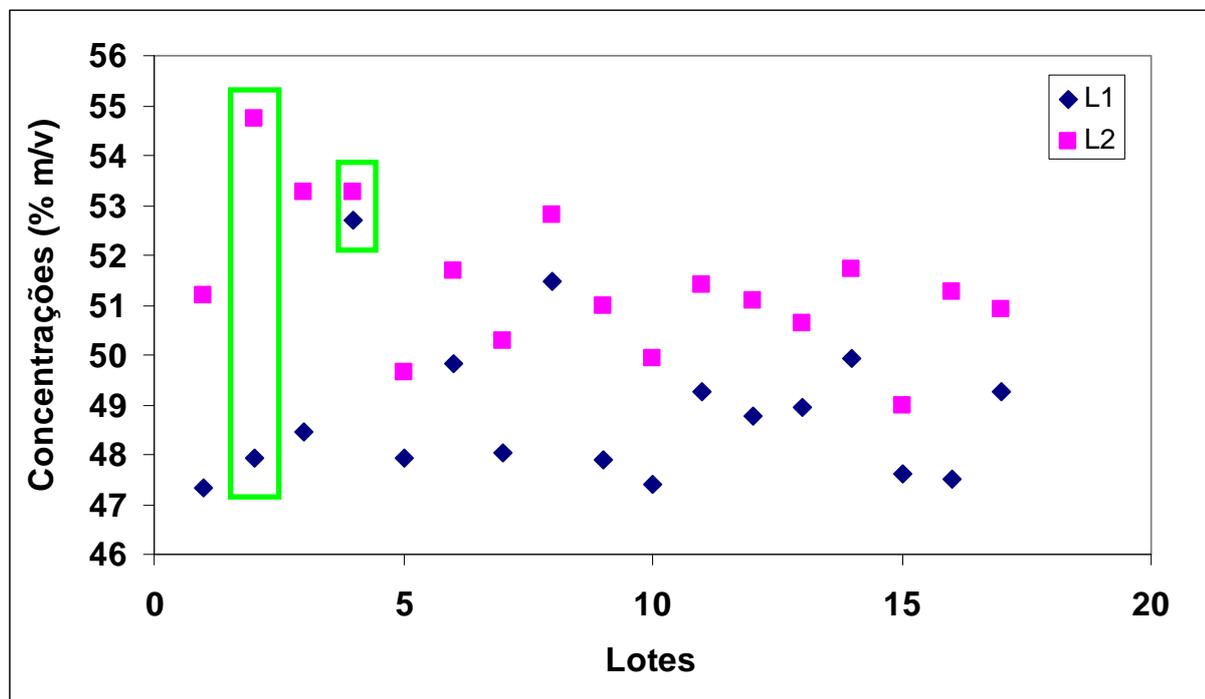
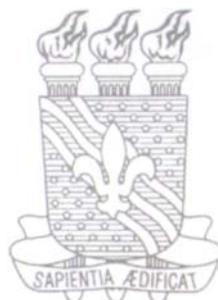


Figura 47 – Dispersão entre as contrações dos lotes analisados, onde: ■ ilustra o maior valor encontrado, e ◆ representa o menor valor encontrado pelo fotômetro.

Em verde está ilustrada a maior e a menor dispersão encontrada em termos de concentração, dentro dos lotes. O quadrado verde maior refere-se ao lote DP12B032, que é o lote que apresenta maior variação nos valores de concentração determinados pela análise fotométrica. Como as variações de concentrações entre os lotes não são constantes, ou seja não há um perfil ou uma tendência na variabilidade das determinações, pode-se demonstrar que não há um erro instrumental nas medidas, ou seja a variação das concentrações não são determinadas por imprecisões nas medidas ocasionadas pelo instrumento e sim variações dentro do próprio lote, uma vez que não se observa tendências nas determinações. Assim, muito embora este não seja o foco do trabalho, um acompanhamento do processo produtivo da indústria farmacêutica também poderia ser realizado com o instrumento desenvolvido, envolvendo análises periódicas, para detectar variações no processo produtivo.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES



6.0. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido um fotômetro LED-NIR microcontrolado e portátil, destinado à determinação de dipirona sódica em soluções injetáveis, de maneira rápida, econômica e confiável.

O instrumento desenvolvido permite determinar a concentração do princípio ativo do medicamento injetável, diretamente em sua embalagem, sem a violação da mesma (análise não-destrutiva e não-invasiva), ou seja, mantém a integridade das amostras comerciais. A metodologia desenvolvida dispensa o tratamento prévio das amostras e uso de reagentes caros, tóxicos e danosos ao meio ambiente, como o método de referência (Iodometria).

O fotômetro desenvolvido é bastante estável, de fácil manuseio e apresenta resultados facilmente compreendidos pelo analista. Por ser portátil, possibilita o seu uso em análises de campo. No caso da necessidade de uma re-calibração do instrumento, necessita-se apenas de novas medidas de amostras padrões para o estabelecimento dos novos limites de cortes estabelecidos pelos órgãos fiscalizadores.

A incorporação de um método *screening* minimiza o tempo e o custo das análises, e possibilita o direcionamento das amostras para procedimentos mais rigorosos apenas quando as mesmas estão degradadas/adulteradas ou sobre suspeita de degradação/adulteração. Ademais, uma análise mais rigorosa também pode ser realizada mediante o uso de uma curva analítica, a qual se mostrou bastante promissora para a quantificação do princípio ativo dipirona.

Para a escolha dos dispositivos emissores de luz utilizados na construção do fotômetro, foi realizado um estudo prévio das amostras analisadas usando a espectrometria NIR. Os resultados da seleção de variáveis e de intervalos mostraram que o comprimento de onda de 1100 nm é o mais apropriado para correlacionar os espectros NIR e a concentração de dipirona sódica nas ampolas. Esse comprimento de onda selecionado norteou a escolha do LED do fotômetro proposto para o controle de qualidade de ampolas de dipirona sódica injetáveis. O valor nominal dos LEDs empregados foi de 1050 ± 50 nm.

As principais etapas do trabalho que compreendiam o planejamento, o desenvolvimento/construção do fotômetro duplo feixe LED-NIR e a determinação do analito de interesse, foram realizadas. Para que isso fosse possível, foi incorporado ao sistema eletrônico do instrumento desenvolvido um *driver* de comunicação USB 2.0, para a transferência dos dados produzidos pelo fotômetro para um *notebook*, e o tratamento dos dados foi todo controlado por um programa desenvolvido em interface *Labview* versão 10.0. A incorporação desse software foi

importante, pois possibilitou a execução das análises e o armazenamento dos dados de modo automático e contínuo, além de possibilitar o tratamento estatístico dos dados obtidos.

No *software* desenvolvido foram incorporadas as opções de *screening* e de determinação quantitativa via curva analítica para que o usuário realize a medida de acordo com sua necessidade, ou caso deseje, realize as duas opções simultaneamente.

Devido às características de análises adotadas, foi possível desenvolver um instrumento de baixo custo, microcontrolado, leve, de fácil portabilidade, simplicidade de acesso, e facilidade de uso e manipulação pelos analistas.

Uma curva de performance foi construída para avaliar o índice de acertos obtidos pela análise *screening* utilizando o fotômetro desenvolvido. Com as curvas de performance foi possível identificar a região duvidosa ou de não confiabilidade que abrange os falsos positivos e falsos negativos para a análise de dipirona sódica injetável, a qual evidencia e reforça a importância de uma análise quantitativa utilizando a curva analítica.

Todas as medições foram realizadas com as amostras comerciais devidamente fechadas, e posteriormente foi selecionada uma amostra de cada lote para a realização das devidas análises pelo método de referência (titulação iodométrica), para avaliar a capacidade do instrumento desenvolvido em prever as concentrações reais do princípio ativo no medicamento analisado.

Os resultados obtidos mostraram que os teores de dipirona estão bastante concordantes tanto com os valores fornecidos pelo fabricante, como com os valores obtidos pelo método oficial de análise.

Os testes realizados para avaliar o desempenho do fotômetro desenvolvido mostraram que o instrumento apresenta uma boa resposta na determinação de conformidade do analito, onde o índice de acertos encontrados pela análise *screening* foi de 91,61%, e a taxa de erros foi de 8,36%. O instrumento apresenta linearidade nas repostas obtidas em função da concentração da dipirona sódica nas soluções de calibração ($R^2 = 0,9964$, na faixa de calibração de 5 a 60 % m/v), estabilidade e discriminação nas medidas obtidas. Na análise inter-lotes, a variância conjunta calculada foi de 1,168, o valor médio das concentrações previstas para os lotes foi de 50,58 % m/v, o desvio padrão conjunto foi de 1,080, o RSD conjunto foi de 2,13 %, e o erro relativo conjunto foi de 0,40 %. Assim, utilizando o valor de t tabelado para 95% de confiança a precisão média estimada foi de $50,58 \pm 1,89$ % m/v.

Muito embora este não seja o foco do trabalho, um acompanhamento do processo produtivo da indústria farmacêutica também poderia ser realizado com o instrumento desenvolvido, envolvendo análises periódicas, para detectar variações no processo produtivo. A análise realizada

por este instrumento permite a identificação de possíveis produtos fora das especificações quantitativas esperadas para o fármaco em análise, ou seja, não conformes com os valores preconizados pela Farmacopeia Brasileira.

O instrumento realiza medições de parâmetros de qualidade de medicamentos injetáveis diretamente em suas ampolas, sem qualquer violação física ou química das amostras evitando a destruição, o consumo e a contaminação das mesmas. Além do fato de a análise ser efetuada de forma não destrutiva/não invasiva^[151], o instrumento desenvolvido exibe uma ampla aplicabilidade analítica pela fácil e flexível troca dos LEDs; dispõe de simplicidade e rapidez nas medições; baixo custo de produção e de manutenção, e exige pouca manipulação analítica.

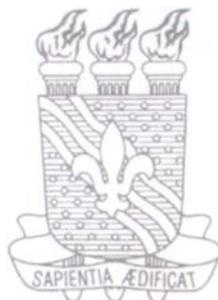
6.1. Propostas futuras

Como propostas futuras para melhoria do fotômetro LED-NIR desenvolvido e para que o instrumento possa ser utilizado para uma variedade de medicamentos injetáveis, modificações deverão ser realizadas. Algumas dessas modificações são citadas a seguir:

- *Utilizar diferentes métodos para a degradação da dipirona e comparar os resultados das análises efetuadas pelo fotômetro desenvolvido com a metodologia oficial.*
- *Desenvolver e incorporar ao fotômetro desenvolvido um acessório que comporte uma maior quantidade de LEDs-NIR de modo a abranger toda a região NIR detectável pelo fototransdutor de InGaAs usado de modo a torná-lo um fotômetro multiLED-NIR, o que irá permitir o controle de qualidade de um número mais abrangente de medicamentos injetáveis em parcerias com as indústrias farmacêuticas utilizando as mesmas estratégias de ação adotadas neste trabalho;*
- *Construir novos modelos para a determinação de outros parâmetros de qualidade, tais como: densidade, pH, viscosidade, índice de refração, etc.;*
- *Buscar a devida Patente do instrumento desenvolvido de modo a garantir financiamento para o desenvolvimento/construção de fotômetros microcontrolados à base de LEDs-NIR para análise dedicada de medicamentos, de forma rápida, não dispendiosa e acessível às indústrias farmacêuticas, aos hospitais, clínicas médicas e farmácias, e aos órgãos responsáveis pela fiscalização e controle de qualidade.*
- *Sugerir esta metodologia, junto aos órgãos responsáveis, como método oficial para fiscalização/controle de qualidade do teor de dipirona sódica em medicamentos injetáveis realizados pela ANVISA, e neste sentido, buscar acreditação do instrumento desenvolvido junto ao INMETRO;*

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organização Mundial de Saúde. *The importance of Pharmacovigilance. Safety monitoring of medicinal products*. 2002.
2. Brasil. Portaria n.º 802, de 08 de outubro de 1998. Institui o sistema de controle e fiscalização em toda a cadeia dos produtos farmacêuticos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, v.1, n.24-E, p. 036, 4 de fevereiro de 1999. Seção 1, pt 1.
3. Conselho Federal de Farmácia, *A Organização Jurídica da Profissão Farmacêutica*, 2ª edição, Editora Cidade Gráfica LTDA, 2000, 1396p.
4. Federação Nacional dos Farmacêuticos. São Paulo, 2013. Disponível em: <http://www.fenafar.org.br/portal/medicamentos/62-medicamentos/500-medicamentos-falsificados-ou-irregulares.html>. Acessado em janeiro de 2013.
5. Instituto Brasileiro de Ciências Criminais – IBCCRIM, 2010. Disponível em: <http://ibccrim.jusbrasil.com.br/noticias/2434017/medicamentos-falsificados>. Acessado em janeiro de 2013.
6. Sanches, F. A. C. Dissertação de mestrado intitulada: *Desenvolvimento de uma Metodologia para o Controle de Qualidade de Medicamento Injetável, sem Violação da Ampola, usando Espectroscopia NIR e Técnicas Quimiométrica*. UFPB, João Pessoa/PB, novembro de 2009.
7. United States Pharmacopoeia 25, NF20, Rock Ville, 2002.
8. Gilman A. G; Hardman J. G.; Limbird L. E., *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2003.
9. Farmacopéia Brasileira. Parte II, 4ª Edição, janeiro de 2000.
10. Farmacopéia Brasileira. Parte II, 6ª Edição, janeiro de 2010.
11. Skoog, D.A.; Holler, F.J; Nieman, T.A.. *Análise Instrumental*, 5ª Edição, Bookman, 2006.
12. Dasgupta, P.K., Bellamy, H.S., Liu, H. et al. *Light emitting diode based flow-through optical absorption detectors*. *Talanta* vol. 40, p. 53-74, 1993.
13. Dasgupta, P. K. et al, *Light emitting diode-based detectors: Absorbance, fluorescence and spectroelectrochemical measurements in a planar flow-through cell*. *Analytica Chimica Acta*, vol. 500, n. 1-2, p.337-364, 2003.
14. Gaião, E.N.; Medeiros, E.P.; Lyra, W.S.; Moreira, P.N.T; Vasconcelos, P.C.; Silva, E.C.; Araújo, M.C.U. *A multi-led, microcontrolled, portable and inexpensive photometer*. *Quím. Nova* vol.28 no.6 São Paulo Nov./Dec. 2005.
15. Pasquini, C. *Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications*. *J. Braz. Chem. Soc.*, vol.14, n. 2, p.198-219, 2003.

16. Santos, S. R. B. Tese de Doutorado intitulada: *Um Fotômetro de Fluxo SW-NIR para Análises tipo Screening do Teor de Etanol em Gasolinas Tipo C e Álcool Combustível*, UFPB, João Pessoa, 2004.
17. Chagas, I. P. Tese de doutorado intitulada: *Desenvolvimento de um Fotômetro Portátil NIR Para Determinação do Teor de Água no Álcool Combustível e do Teor de Etanol na Gasolina*. UNICAMP, São Paulo, 2006.
18. Gaião, E. N.; Santos, S. R. B.; Santos, V. B.; Nascimento, E. C. L.; Lima, R. S.; Araújo, M. C. U.; *An inexpensive, portable and microcontrolled near infrared LED-photometer for screening analysis of gasoline*. Talanta, vol. 72, n. 3, p. 792-796, 2008.
19. Teerasong, S.; Chan-Eam, S.; Sereenonchai, K.; Amornthammarong, N.; Ratanawimarnwong, N.; Nacapricha, D. *A reagent-free SIA module for monitoring of sugar, color and dissolved CO₂ content in soft drinks*. Analytica Chimica Acta, vol. 668, n. 1, p. 47-53, 2010.
20. Silva, L. I.B.; Freitas, A.C.; Rocha-Santosa, T.A.P.; Pereira, M.E.; Duarte, A.C. *Breath analysis by optical fiber sensor for the determination of exhaled organic compounds with a view to diagnostics*. Talanta vol. 83, p. 1586-1594, 2011.
21. Lima, K.M.G. *A portable photometer based on LED for the determination of aromatic hydrocarbons in water*. Microchemical Journal, vol. 103, p. 62-67, 2012.
22. Sanches, F. A. C., Abreu, R. B.; Pontes, M. J. C.; Leite, F. C.; Costa, D. J. E.; Galvão R. K. H.; Araújo, M. C. U. *Near-infrared spectrometric determination of dipyrone in closed ampoules*. Talanta, vol. 92, p. 84-86, 2012.
23. Arikawa, I. *Basic Education in Analytical Chemistry*. Analytical Sciences, vol.17 supplement, n. 571, 2001.
24. Miller, K.E., Synovec, R.E. *Review of analytical next term measurements facilitated by drop formation technology*. Talanta, vol. 51, n. 5, p. 921-933, 2000.
25. Bartle, K. D. Peter Myers, P. *History of gas chromatography*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, vol. 21, n. 9-10, p. 547-557, 2002.
26. Laitinen, H.A. *History of analytical chemistry in the U.S.A*. Talanta, vol. 36, n. 1-2, p. 1-9, 1989.
27. Baccan, N.; Aleixo, L.M.; Stein, E.; Godinho, O.E.S. *Introdução à Semimicroanálise Qualitativa*, N. Editora da Unicamp, 1988.
28. Herschel, W. *Method of viewing the Sun advantageously, with Telescopes of large Apertures and high magnifying Powers*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Part II, p. 255-283, 1800.
29. Herschel, W. *Experiments on the Re-frangibility of the invisible Rays of the sun*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Part II, p. 284-292, 1800.
30. Lima, K. M. G.; Raimundo Jr., I. M. *Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio*. Quim. Nova, vol. 32, n. 6, p. 1635-1643, 2009.

31. Burns, D. A.; Ciurczak, E. W.; *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 2nd ed., Marcel Dekker: New York, 2001.
32. Burns, D. A.; Ciurczak, E. W., *Handbook of Near-Infrared Analysis, 3rd ed.*(practical spectroscopy, 35), CRC Press Taylor & Francis Group, 2008.
33. Bokobza, L; *Origin of Near-Infrared Absorption Bands*. Near infrared spectroscopy, vol. 6, p. 3-17, 1998.
34. Workman, J.J.; Mobley, P.R.; Kowalski, B.R., Bro, R.; *Review of chemometrics applied to spectroscopy: 1985-95*. Appl. Spectrosc. Reviews, vol. 31, p.73-124, 1996.
35. Jerome, J.; Workman, J. R.; *Interpretive Spectroscopy for Near Infrared*. Appl. Spectrosc. Rev. vol. 31, n. 3, p. 251-320, 1996.
36. Ciurczak, E. W., *Uses of near-infrared spectroscopy in pharmaceutical analysis*. Appl. Spectrosc. Rev. vol. 23, n. 1-2, p. 147-163, 1987.
37. Scafi, S.H.F.; Pasquini, C. *Identification of Counterfeit Drugs Using Near-Infrared Spectroscopy for Identification of Falsified*. The Analyst, vol. 126, p. 2218-2224, 2001.
38. Blanco, M.; Eustaquio, A.; González, J. M.; Serrano, D., *Identification and quantitation assays for intact tablets of two related pharmaceutical preparations by reflectance near-infrared spectroscopy: validation of the procedure*. J. Pharm. Biom. Analysis, vol. 1, p. 139-148, 2000.
39. Trafford, A. D.; Lee, R. D.; Moffat, A. C.; Graham, P. *A rapid quantitative assay of intact paracetamol tablets by reflectance near-infrared spectroscopy*. Analyst, vol. 124, n. 1, p. 163-167, 1999.
40. Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S.; Pezuela, C. *Strategies for constructing the calibration set in the determination of active principles in pharmaceuticals by near infrared diffuse reflectance spectrometry*. Analyst, vol.122, n.1, p. 761-765, 1997.
41. Wetzel, D. L., *Near-infrared reflectance analysis sleeper among spectroscopic techniques*. Anal. Chem., vol.55, n. 12, p. 1165A- 1176 A, 1983.
42. FEEMA, *Nitrogênio Kjeldahl total (micro Kjeldahl)*. Manual do Meio Ambiente Volume II – Métodos FEEMA, R.J., MF 421.R2, p.45. 1983.
43. Baiulescu, G. E.; Stoica, A. I., *Green Chemistry-Correlation Between Cause and Effect: A Guest Editorial*. Analytical Letters, vol. 37, n. 15, p. 3105-3110, 2004.
44. Mansfield, C. T.; Barman, B. N. *Petroleum and coal*. Anal. Chem., vol. 71, n. 12, p. 81R-107R, 1999.
45. Corti, P.; Savini, L.; Dreassi, E.; Ceramelli, G.; Montecchi L.; Lonardi, S. *Application of NIRS to the control of pharmaceuticals identification and assay of several primary materials*. Pharm. Acta Helv., vol. 67, p. 57-61, 1992.
46. Dreassi, E.; Celesti, L.; Ceramelli, G.; Savini, L.; Corti, P., *Thin layer cromatography in pharmaceutical quality control*. Pharm. Acta Helv., vol. 67, n.12, p. 341-345, 1992.

47. Ciurczak, E. W.; Torlini, R. P.; Demkowicz, M. P. *Spectroscopy, Determination of particle size of pharmaceutical raw materials using near-infrared reflectance*, vol.1, n.7, p. 36, 1986.
48. Candolfi, A.; Massart, D.L.; Heuerding, S. *Investigation of sources of variance which contribute to NIR-spectroscopic measurement of pharmaceutical formulations*. *Anal. Chim. Acta*, vol. 345, p. 185-196, 1997.
49. Dempster, M.A. Jones, J.A. ; Last, I.R. ; MacDonald B.F. ; Prebble, K.A. *Near-infrared methods for the identification of tablets in clinical trial supplies*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 11, p. 1087-1092, 1993.
50. Moffat, A.C. et al. *Meeting the international conference on harmonisation's guidelines on validation of analytical procedures: Quantification as exemplified by a near-infrared reflectance assay of paracetamol intact tablets*. *The Analyst*, vol.125, p. 1341-1351, 2000.
51. Harmonisation, I.C.o., *ICH harmonised tripartite guideline-text on validation of analytical procedures*. *Federal Register*, vol. 60: 11260, 1995.
52. Harmonisation, I.C.o., *ICH harmonised tripartite guideline-validation of analytical procedures: Methodology*. *Federal Register*, 60 : 27463, 1995.
53. Roggo, Y.; Chalus, P.; Maurer, L.; Martinez, C. L.; Edmond, A.; Jent, N., *A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies*. *J. Pharm. Biomed. Analysis*, vol. 44, n. 3, p. 683-700, 2007.
54. Beebe, K.R.; Pell, R.J.; Seasholtz, B., *Chemometrics - A Practical Guide*, Wiley, Nova Iorque, 1998.
55. Forina, M.; Lanteri, S.; Casale, M., *Multivariate calibration- Review*. *J. Chromatography A*, vol. 1158, p. 61, 2007.
56. Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O. *Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial*, *Quím. Nova*, vol.22, n.5, p.724, 1999.
57. Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Buydens, S.J.; Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Parte B*, Elsevier, Amsterdam, 1997
58. Brereton, R.G., *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant*. Ed. Wiley. University of Bristol, UK, 2003.
59. Martens, H.; Naes, T.; *Multivariate Calibration*. Ed. Wiley, London, 1993.
60. Kalivas, J.H. In: Brown, S.D. Tauler i Ferré, R. Walczak, B. (Eds), *Comprehensive Chemometrics Chemical and Biochemical Data Analysis*, vol. 3, Elsevier, Oxford, 2009, pp. 1– 32.
61. Galvão, R.K. Araújo, M.C.U. In: Brown, S.D. Tauler i Ferré, R. Walczak, B. (Eds), *Comprehensive Chemometrics Chemical and Biochemical Data Analysis*, vol. 3, Elsevier, Oxford, 2009, pp. 233 – 283.

-
-
62. Wold, H., *Soft Modeling by Latent Variables; the Non-linear Iterative Partial Least Squares Approach*, in *Perspectives in Probability and Statistics*, Ed. J. Gani, Academic Press, London, 1975.
 63. Araújo, M. C. U. et al. *Um fotômetro de fluxo para análises clínicas a base de um diodo emissor de luz bicolor*. Química Nova, vol. 20, n. 2, p. 137-145, 1997.
 64. Hauser, P. C., Rupasinghe, T. W. T., Cates, N. *A multi-wavelength photometer based on light-emitting diodes*. Talanta. vol. 42, n.4, p. 605-612, 1995.
 65. Malvino, A. P. ;*Eletrônica*; Makron Books do Brasil, vol. 1, 1986.
 66. Eletrônica e Eletricidade: *Diodos e Fotodiodos*. Disponível em: <http://eletronica-electricidade.blogspot.com.br/2011/04/diodos-fotodiodos-led.html>, acessado em fevereiro de 2013.
 67. SANTOS, S.R.B. Dissertação de mestrado intitulada: *Um sensor a base de led e fototransistor adaptado no injetor proporcional para detecção multilocalizada em FIA*. UFPB, João Pessoa/PB, 1998.
 68. Eletrônica e Eletricidade: *Sensores, Transdutores e Detectores*. Disponível em: <http://eletronica-electricidade.blogspot.com.br/2011/04/sensores-transdutores-e-detectores-1.html>, acessado em fevereiro de 2013.
 69. Infrared Detector Frequently Asked Questions (FAQ's). Disponível em: http://www.calsensors.com/detector_faqs.htm, acessado em fevereiro de 2013.
 70. Pereira, F., *Microcontroladores PIC – Programação em C*. 2a ed., São Paulo: Editora Érica, 2003.
 71. LCD. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/LCD>, acessado em janeiro de 2013.
 72. LCD datasheet. Disponível em: <http://www.engineersgarage.com/electronic-components/16x2-lcd-module-datasheet>, acessado em fevereiro de 2013.
 73. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *O que devemos saber sobre medicamentos*. Brasília, 2010.
 74. Gilman A. G; Hardman J. G.; Limbird L. E., *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2003.
 75. Lachman, L.; Lierman, H. A.; Kaning, J. L., *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. Fundação Calouste Gulbenkian/Lisboa, 2001.
 76. Thompson, J. E. *A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos*. Artmed, 2006.
 77. Prista, L. N.; Alves, A. C.; Morgado, R. M. R. *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica*, 3 ed., vol. 3. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1990.
 78. HORTA, Wanda de Aguiar. *Processo de Enfermagem*. Ribeirão Preto: Pedagógica, 1979.
 79. Trissel, L. A. *Handbook on injectable drugs*. 10ed. Houston, TX-USA: 1998.

-
-
80. Prista, L. N.; Alves, A. C.; Morgado, R. M. R. *Tecnologia Farmacêutica*, 4 ed., vol. 2. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1995.
 81. Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. - Goodman & Gilman's. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11 ed. McGrawHill, New York, 2005.
 82. Brack, A.; Rittner, H. L.; Schafer, M. *Non-opioid analgesics for perioperative pain therapy. Risks and rational basis for use*. *Anaesthesist*, vol. 53, n. 3, p. 263-280, 2004.
 83. Arellano, F.; Sacristán, J. A. *Metamizole: reassessment of its therapeutic role*. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 38, n.6, p. 617-619, 1990.
 84. Weithman, K.U.; Alpermann, H.G. *Biochemical and pharmacological effects of dipyron and its metabolites in model systems related to arachidonic acid cascade*. *Arzneim. Forsch.*, Aulendorf, vol. 35,n.6, p.947-952, 1985.
 85. Goldman, L. Ausiello, D. Cecil, *Tratado de Medicina Interna*, 22 ed., vol. 1, cap. 32, p. 178-185. Elsevier, 2005.
 86. Grieg, C.R. e Stitzel, R.E. *Farmacologia Moderna com aplicações clínicas*. 6a ed. cap.36. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.
 87. Silva, P. *Farmacologia*. 6 ed. cap. 56. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.
 88. Hinz, B. and Brune, K. *Cyclooxygenase-2: 10 years later*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 300, n. 2, p. 367-375, 2001.
 89. Disponível em: http://interacmedicamentosa.blogspot.com.br/2010_09_01_archive.html. Acesso em janeiro de 2013.
 90. Lorenzetti, B. B.; Ferreira, S. H. *Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurones contributes to dipyron-induced spinal and peripheral analgesia*. *Inflammation Res.*, Heidelberg, vol.45, p. 308-311, 1996.
 91. Lorenzetti, B. B.; Ferreira, S. H. *Mode of analgesic action of dipyron: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia*. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, vol. 114, p. 375-381, 1985.
 92. Alves, D.; Duarte, I. *Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyron*. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* Heidelberg, vol. 444, p.47-52, 2002.
 93. Vazquez, E.; Hernandez, N.; Escobar, W.; Vanegas, H. *Antinociception induced by intravenous dipyron (metamizol) upon dorsal horn neurons: Involvement of endogenous opioids at the periaqueductal gray matter, the nucleus raphe magnus, and the spinal cord in rats*. *Brain Res.* Amsterdam, vol. 1048, p. 211-217, 2005.
 94. Cavalcanti, I. L.; Cantinho, F. A. F; Assad, A., *Medicina Perioperatória*, SAERJ- Sociedade de Anestesiologia do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
 95. Sabatowski, R.; Schafer, D.; kasper, S. M.; Brunsch, H.; Radbruch, L. *Pain treatment: a historical overview*. *Pharm. Design*, vol.10, n.7, p. 701- 716, 2004.

-
-
96. Auer, A. *Über novalgin*. Ther. D. Gegenw, vol. 72, p. 154-156, 1931.
 97. Brogden, R.N. *Pyrazolone derivatives*. Drugs, vol. 32, p. 60- 70, 1986. Suppl.4.
 98. Author Affiliations: *International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study (The Boston Study)*. *Risks of Agranulocytosis and Aplastic Anemia*. A first report of their relation to drug use with special reference to analgesics. J. Am. Med. Assoc., vol. 256, n.13, p.1749-1957, 1986.
 99. Hamerschlak, N. O.; maluf, E., Pasquini, R. et al. *Indice of aplastic anemia and agranulocytosis in Latin America – The LATIN study*. Med. J.,vol. 123, n.3, p. 101-104, 2005.
 100. Acido Acetilsalicílico e Acido Ascórbico. Disponível em: http://www.medicinanet.com.br/bula/7985/acido_acetilsalicilico_e_acido_ascorbico.htm, acessado em junho de 2013.
 101. Paracetamol, a dose faz a diferença. Disponível em: <http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0304/Paracetamol/pagina3%20ana/texto%20parac.htm>, acessado em junho de 2013.
 102. Benseñor, M. I. *To use or not to use dipyrone. Or maybe, Central Station versus E.R.? That is the question*. Med. J., vol. 119, p. 190-191, 2001.
 103. Korolkovas, A.; Burckhalter, J.H. *Química farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p.81, 182, 193, 302, 303, 309, 399.
 104. Kehlet, H. *Surgical stress: the role of pain and analgesia*. Br. J. Anaesth., vol. 63, p. 189-195, 1989.
 105. Aburjai, T.; Amro, B. I.; Aiedeh, K.; Abuirjeie, M.; Al-Khalil, S. *Second derivative ultraviolet spectrophotometry and HPTLC for the simultaneous determination of vitamin C and dipyrone*. Pharmazie, vol. 55, n. 10, p. 751-754, 2000.
 106. Acar, N.; Onur, F. *Spectrophotometric simultaneous analysis of analgin-adamon mixture in injection preparations*. Anal. Lett., vol. 29, n. 5, p. 763-773, 1996.
 107. Erk, N.; Onur, F. *Simultaneous spectrophotometric determination of analgin and lidocaine hydrochloride in injection solutions*. STP Pharm. Sci., vol. 6, n. 3, p. 216-220, 1996.
 108. Erk, N.; Onur, F. *Simultaneous determination of analgine and paracetamol in tablets by spectrophotometric methods*. Anal. Lett., v. 30, n. 6, p.1201-1210, 1997.
 109. Erk, N.; Onur, F. *Spectrophotometric simultaneous determination of analgin and hyoscine N-butyl bromide in sugar-coated tablets*. Anal. Lett., vol. 29, n. 3, p.369-380, 1996.
 110. Morelli, B. *Determination of binary mixtures of analgesic and spasmolytic drugs in pure and dosage forms by derivative spectrophotometry*. J. Pharm. Biom. Anal., vol. 33, n. 3, p.423-433, 2003.
 111. Di Nezio, M. S.; Pistonesi, M. F.; Centurión, M. E.; Palomeque, M. E.; Lista, A. G.; Band, B. S. F. *A Home-made Hybrid System for the Simultaneous Determination of Ergotamine*,

- Dipyrone and Caffeine in pharmaceutical Preparations.* J. Braz. Chem. Soc., vol. 18, n. 7, p.1439-1442, 2007.
112. Pezza, L.; Tubino, M.; Melios, C. B.; Pezza, H. R. *Rapid spot test analysis for the detection of dipyrone in pharmaceutical preparations.* Anal. Sci., vol. 16, n. 3, p. 313-315, 2000.
113. Sakiara, K. A.; Pezza, L.; Melios, C. B.; Pezza, H. R.; Moraes, M. *Spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations by using chromotropic acid.* Farmaco, vol. 54, n. 9, p. 629-635, 1999.
114. Vassileva-Alexandrova, P.; Shishmanov, P. S. *Spectrophotometric determination of dipyrone with neotetrazolium chloride.* Anal. Chem., vol. 47, n.8, p. 1432-1435, 1975.
115. Qureshi, S. Z.; Saeed, A.; Hassan, T. *Spectrophotometric determination of novalgin in tablets by use of potassium iodate.* Talanta, vol. 36, n. 8, p. 869-871, 1989.
116. Qureshi, S. Z.; Saeed, A.; Haque, S. *Some observations on a simple method for the determination of novalgin in drug formulations with iron(III)-1,10-phenanthroline.* Microchem. J., vol. 41, n. 3, p. 362-365, 1990.
117. Sastry, C. S. P.; Rao, A. R. *Spectrophotometric determination of some analgesic and antiinflammatory agents with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride.* Microchim. Acta, vol. 97, n. 3/4, p. 237-244, 1989.
118. Belal, F. *Simultaneous polarographic determination of ascorbic acid and dipyrone in pharmaceutical preparations.* Electroanalysis, vol. 4, n. 5, p. 589-593, 1992.
119. Skeika, T.; De Faria, M. F.; Nagata, N.; Pessoa, C. A. *Simultaneous Voltammetric Determination of Dipyrone and Paracetamol with Carbon Paste Electrode and Multivariate Calibration Methodology.* J. Braz. Chem. Soc., vol. 19, n. 4, p. 762-768, 2008.
120. Teixeira, M. F. S.; Marcolino Junior, L. H.; Fatibello Filho, O.; Dockal, E. R.; Cavaleiro, E. T. G. *Voltammetric determination of dipyrone using a N,Nethylenebis(salicylideneaminato)oxovanadium(IV) modified carbon-paste electrode.* J. Braz. Chem. Soc., vol. 15, n. 6, p. 803-808, 2004.
121. Gopu, G.; Manisankar, P.; Muralidharan, B.; Vedhi, C. *Stripping Voltammetric Determination of Analgesics in Their Pharmaceuticals Using Nano-Riboflavin-Modified Glassy Carbon Electrode.* 2 International Journal of Electrochemistry, vol. 2011, p. 1-11, 2011.
122. Muralidharan, B.; Gopu, G.; Vedhi, C.; Manisankar, P. *Voltammetric determination of analgesics using a montmorillonite modified electrode.* Applied Clay Science, vol. 42, p.206-213, 2008.
123. Muralidharan, B.; Gopu, G.; Vedhi, C.; Manisankar, P. *Determination of analgesics in pharmaceutical formulations and urine samples using nano polypyrrole modified glassy carbon electrode.* J. Appl. Electrochem., vol. 39, p.1177-1184, 2009.
124. Altun, M. L. *HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine and dipyrone.* Turkish J. Chem., vol. 26, n. 4, p. 521-528, 2002.

-
-
125. Senyuva, H. Z. Aksahin, I. Ozcan, S. Kabasakal, B. V. *Rapid, simple and accurate liquid chromatography-diode array detection validated method for the determination of dipyron in solid and liquid dosage forms.* Anal. Chim. Acta, vol. 547, n. 1, p. 73-77, 2005.
 126. Golubitskii, G. B.; Budko, E. V.; Ivanov, V. M. *Quantitative analysis of pentalgin N tablets by gradient and isocratic high-performance liquid chromatography.* J. Anal. Chem., vol. 61, n. 1, p. 67-71, 2006.
 127. Eddine, N. H.; Bressolle, F.; Mandrou, B.; Fabre, H. *Stability Indicating Assay for Dipyron. Part II: Separation and Quantitative Determination of Dipyron and Its Degradation Products by High-performance Liquid Chromatography.* Analyst, vol. 107, p. 67-70, 1982.
 128. Chen, Y.; Han, F.M.; Yuan, Z.B. *Separation of five antipyretic analgesics by micellar electrokinetic capillary chromatography.* Acta Pharmaceutica Sinica, vol.31, n.8, p. 637-640, 1996.
 129. Pereira, A. V.; Penckowski, L.; Vosgerau, M.; Sassa, M. F.; Fatibello Filho, O. *Spectrophotometric determination of metamizole in pharmaceutical formulations by flow injection triiodide generation.* Quim. Nova, vol. 25, n. 4, p. 553-557, 2002.
 130. Lima, J. L. F. C.; Oliveira, S. S. M.; Santos, J. L. M.; Zagatto, E. A. G. *Multi-pumping flow system for the spectrophotometric determination of dipyron in pharmaceutical preparations.* J. Pharm. Biom. Anal., vol. 32, n. 4/5, p. 1011-1017, 2003.
 131. Marcolino, L. H.; Sousa, R. A.; Fatibello, O.; Moraes, F. C.; Teixeira, M. F. S. *Flow injection spectrophotometric determination of dipyron in pharmaceutical formulations using ammonium molybdate as chromogenic reagent.* Anal. Lett., vol. 38, n.14, p. 2315-2326, 2005.
 132. Bautista, J. A. G.; Zamora, L. L.; Garcia-Mateo, J. V.; Martinez-Calatayud, J. *Indirect catalytic spectrophotometric determination of metamizol following oxidation by lead dioxide immobilized in a polyester resin bed.* Anal. Lett., vol. 29, n. 15, p. 2667-2678, 1996.
 133. Medeiros, E. P.; Castro, S. L.; Formiga, F. M.; Santos, S. R. B.; Araujo, M. C. U.; Nascimento, V. B. *A flow injection method for biamperometric determination of dipyron in pharmaceuticals.* Microchem. J., vol. 78, n. 1, p. 91-96, 2004.
 134. Paixao, T. R. L. C.; Camargo, M. R.; Bertotti, M. *Diffusion layer titration of dipyron in pharmaceuticals at a dual-band electrochemical cell.* Talanta, vol. 61, n. 5, p. 725-732, 2003.
 135. Marcolino Junior, L. H.; Bergamini, M. F.; Teixeira, M. F. S.; Cavalheiro, E. T. G.; Fatibello-Filho, O. *Flow injection amperometric determination of dipyron in pharmaceutical formulations using a carbon paste electrode.* Farmaco, vol. 58, n. 10, p.999-1004, 2003.
 136. Albuquerque, J. S.; Silva, V. L.; Lima, F.; Araujo, A. N.; Montenegro, M. C. B. S. M. *Determination of dipyron in pharmaceutical products by flow injection analysis with potentiometric detection.* Anal. Sci., vol. 19, n. 5, p. 691-694, 2003.

137. Munoz, R. A. A.; Matos, R. C.; Angnes, L. *Amperometric determination of dipyrone in pharmaceutical formulations with a flow cell containing gold electrodes from recordable compact discs*. J. Pharm. Sci., vol. 90, n. 12, p. 1972-1977, 2001.
138. Perez-Ruiz, T.; Martinez, C. L.; Tomas, V. *Flow-injection determination of Novalgin using amperometric detection at a glassy carbon electrode*. J. Pharm. Biom. Anal., vol. 12, n. 9, p.1109-1113, 1994.
139. Marcolino, L. H.; Bonifacio, V. G.; Fatibello Filho, O.; Teixeira, M. F. S. *Flow injection turbidimetric determination of dipyrone using a solid-phase reactor containing silver chloride immobilized in a polyester resin*. Quim. Nova, vol. 28, n. 5, p. 783-787, 2005.
140. Song, Z. H.; Zhang, N. *In vitro detecting ultra-trace novalgin in medicine and human urine by chemiluminescence*. Talanta, vol. 60, n. 1, p. 161-170, 2003.
141. Huang Y.; Zhang, C.; Zhang, X.; Zhang, Z. *A novel chemiluminescence flow-through sensor for the determination of analgin*. Fresenius J. Anal. Chem., vol. 365, p. 381–383, 1999.
142. Huang, Y.; Zhang, C.; Zhang, X.; Zhang, Z. *Chemiluminescence analysis of menadione sodium bisulfite and analgin in pharmaceutical preparations and biological fluids*. J. Pharm. Biom. Anal., vol. 21, n. 4, p. 817-825, 1999.
143. Huang, Y.; Zhang, C.; Zhang, X.; Zhang, Z. *Cerium(IV)-based chemiluminescence analysis of analgin*. Anal. Lett., vol. 32, n. 5, p. 933-943, 1999.
144. Perez-Ruiz, T.; Martinez-Lozano, C.; Tomas, V.; Carpena, J. *Flow-Injection Fluorimetric Determination of Novalgin in Pharmaceutical Preparations*. Microchem. J., vol.47, p. 296-301, 1993.
145. Weinert, P.; Fernandes, J. R.; Pezza L.; PEZZA, H. R. *Flow-Injection Spectrophotometric Determination of Novalgin in Pharmaceuticals Using Micellar Medium*. Analytical Sciences, vol. 23, p. 1383-1389, 2007.
146. Santos, W. T. P.; Gimenes, D. T.; Almeida, E. G. N.; Eiras, S. P.; Albuquerque, Y. D. T.; Richter, E. M. *Simple Flow Injection Amperometric System for Simultaneous Determination of Dipyrone and Paracetamol in Pharmaceutical Formulations*. J. Braz. Chem. Soc., vol.20, n. 7, p.1249-1255, 2009.
147. Pérez, J. A.; Pérez, P.; Alegría, J. S. D.; Hernando, P. F.; Sierra, A. N. *Determination of dipyrone in pharmaceutical preparations based on the chemiluminescent reaction of the quinolinic hydrazide–H₂O₂–vanadium(IV) system and flow-injection analysis*. Luminescence, vol. 27, n.1, p. 45-50, 2012.
148. Zhaoa, L.; Lib, B.; Zhangb, Z; Lin, J. *Chemiluminescent flow-through sensor for automated dissolution testing of analgin tablets using manganese dioxide as oxidate*. Sensors and Actuators B: Chemical, vol. 97, n. 2–3, p. 266–271, 2004.
149. Matos, R. C.; Angnes, L.; Araujo, M. C. U.; Saldanha, T. C. B. *Modified microelectrodes and multivariate calibration for flow injection amperometric simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, epinephrine and dipyrone*. Analyst, vol. 125, p. 2011-2015, 2000.

-
-
150. Lyra, W. S.; Sanches, F. A. C.; Cunha, F. A. S.; Diniz, P. H. G. D.; Lemos, S. G.; Silva, E. C.; Araujo, M. C. U. *Indirect determination of sodium diclofenac, sodium dipyron and calcium gluconate in injection drugs using digital image-based (webcam) flame emission*. Anal. Methods, vol. 3, p. 1975-1980, 2011.
151. Sanches, F. A. C., Abreu, R. B.; Pontes, M. J. C.; Leite, F. C.; Costa, D. J. E.; Galvão R. K. H.; Araújo, M. C. U. *Near-infrared spectrometric determination of dipyron in closed ampoules*. Talanta, vol. 92, p. 84-86, 2012.
152. British Pharmacopoeia, Volume I, December 2000.
153. Vogel, A I. *Análise Química Quantitativa*, 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, p. 314-330.
154. Baccan, N., Andrade. J.C., Godinho, O.E.S., Barone, J.S. *Química Analítica Quantitativa Elementar*, 2. ed. Campinas: UNICAMP, 1985, 259p.
155. Pereira, A. V.; Penckowski, L.; Vosgerau, M.; Sassa, M. F.; Fatibello Filho, O. *Spectrophotometric determination of metamizole in pharmaceutical formulations by flow injection triiodide generation*. Quim. Nova, vol. 25, n. 4, p. 553-557, 2002.
156. Web of Knowledge. Web of science. Version 5.6. Thomsom Reuters. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br>>. Acesso em: setembro 2011 a março 2012.
157. American Chemical Society. Scifinder scholar. Version 2004.2. Columbus, c2004. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br>>. Acesso em: setembro 2011 a março 2012.
158. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Consulta Pública nº 43 de 7 de julho de 2004. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B7760-1-0%5D.PDF>. Acessado em janeiro de 2013.
159. Pechtold, F. *Die Methylrubazonsäure als Oxydationsprodukt von Derivaten des 4-Aminophenazona*, Arzneimittelforschung. vol:14, p.474-475,1964.
160. Pellerin, F.; Le Tavernier, J.F. *Annales Pharmaceutiques*. vol. 31, p.161, 1973.
161. Munoz-Olivas, R.; *Screening analysis: an overview of methods applied to environmental, clinical and food analyses*. Trends in Analytical Chemistry, vol. 23, n. 3, p. 203-216, 2004.
162. Valcárcel, M.; Cárdenas, S.; Gallego, M.; *Sample screening systems in analytical chemistry*, TrAC Trends in Analytical Chemistry. vol.18, n.11, p. 685-694, 1999.
163. Valcárcel, M. *Principios de química analítica*, Springer-Verlag Iberica, Madrid, 1999.
164. Trullols, E.; Ruisaínchez, I.; Rius, F.X.; Huguet, J.; *Validation of qualitative methods of analysis that use control samples*. Trends in Analytical Chemistry, vol. 24, n.6, p. 516-524, 2005.
165. Valcárcel, M.; Cárdenas, S.; Gallego, M. *Continuous flow systems for rapid sample screening*. TrAC Trends Anal. Chem. vol. 21, n. 4, p. 251-258, 2002.

-
-
166. Pulido, A.; Ruisánchez, I.; Boqué, R.; Rius, F. X.; *Estimating the uncertainty of binary test results to assess their compliance with regulatory limits*. *Analytica Chimica Acta* vol. 455, p. 267–275, 2002.
 167. Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Buydens, S.J.; Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Parte A*, Elsevier, Amsterdam, 1997
 168. Ellison, S.L.R. Gregory, S Hardcastle, W.A.; *Perspective Quantifying uncertainty in qualitative analysis*. *Analyst* vol. 123, p. 1155-1161, 1998.
 169. EURACHEM, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, First Internet Version, 1998.
 170. EURACHEM, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, Draft: EURACHEM Workshop, 2nd Edition, Helsinki, 1999.
 171. Hahn, G. J.; Meeker, W. Q.; *Statistical Intervals, A Guide for Practitioners*, Wiley, New York, 1991.
 172. Ruig, W.G.; *Characterizing and optimizing analytical method quality*. *Trends in food Science & Technology*. vol. 7, n. 7, p. 234-240, 1996.
 173. Milman, B.L.; Konopelko, L.A. *Identification of chemical substances by testing and screening of hypotheses. I. General*. *Fresenius J. Anal. Chem.* vol. 367, n. 7, p. 621-628, 2000.
 174. Milman, B.L.; Kovrizhnych, M.A.; *Identification of chemical substances by testing and screening of hypotheses. II. Determination of impurities in n-hexane and naphthalene*. *Fresenius J. Anal. Chem.* Vol. 367, n. 7, p. 629-634, 2000.
 175. Simonet, B. M.; Ríos, A.; Valcárcel, M.; *Unreliability of screening methods*. *Analytica Chimica Acta*, vol. 516, p.67–74, 2004.
 176. Songa, R.; Schlecht, P. C.; Ashley, K.; *Field screening test methods: performance criteria and performance characteristics*. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 83, p. 29–39, 2001.
 177. Lima, R. A. C. Tese de doutorado intitulada: *Um Analisador Fluxo-Batelada Multitarefa Para a Determinação de Parâmetros Físico-Químicos de Controle de Qualidade de Águas Naturais*. UFPE, Recife, 2006.
 178. Brito, N. M. B.; Amarante Jr., O. P.; Polese, L.; Ribeiro, M. L.; *Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão*. *Rev. Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, vol. 13, p. 129-146, 2003.
 179. Walsh, M. C. *Moving from official to traceable methods*. *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 18, p. 616-623, 1999.
 180. *Validation of analytical methods: definitions and terminology*. London: ICH (ICH Harmonised Tripartite Guideline), 1995. 5p.CPMP/ICH/381/95.

-
-
181. Bressolle, F.; Bromet-Petit, M.; Audran, M. *Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics*. J. Chromatogr. B, vol. 686, p.3-10, 1996.
 182. Validation of analytical procedures: methodology : ICH harmonised tripartite guideline. In: *International conference on harmonation of technical requeriments for registration of pharmaceuticals for human use*, 1996. 8 p.
 183. Validation of analytical procedures: methodology. London: ICH (ICH Harmonised Tripartite Guideline), 1996. 9 p. CPMP/ICH/281/95.
 184. Currie, L. A.; Svehla, G. *Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis*. Pure & Appl. Chem., vol. 66, n. 3, p. 595-908, 1994.
 185. Amarante Jr., O. P. de; Caldas, E. P. A.; Brito, N. M.; Santos, T. C. R. dos; Vale, M. L. B. F. *Validação de métodos analíticos: uma breve revisão*. Cad. Pesq., vol. 12, p. 116-131, 2001.
 186. Currie, L.A. *Detection and quantification limits: origins and historical overview*. Anal. Chim. Acta, vol. 391, p. 127-134, 1999.
 187. Hubert, P. et al. *The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory*. Anal. Chim. Acta, vol. 391, p.135-139, 1999.
 188. Currie, L. A. *Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995)*. Anal. Chim. Acta., vol. 391, p.105-126, 1999.
 189. González, A. G.; Herrador, M. A.; Asuero, A. G. *Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays*. Talanta, vol. 48, p. 729-736, 1999.
 190. Wesley, R. J.; Pocklington, D.; Walker, R. F. *Analytical quality assurance: a review*. Analyst, vol. 116, p. 975-990, 1991.
 191. ISO. International Standards Organization. ISO 5725: accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Gêneve, 1994. Part 1-4, 6.
 192. Huber, L. Validation of analytical methods: review and strategy. LC/GC International, Feb 1998, p. 96-105. Disponível em: <<http://www.labcompliance.com/index.htm>>. Acesso em março de 2013.
 193. Nijhuis, A.; Knaap, H. C. M. Van der; Jong, S. de; Vandeginste, B. G. M. *Strategy for ruggedness tests in chromatographic method validation*. Anal. Chim. Acta, vol. 391, p. 187-202, 1999.
 194. Van Der Heyden, Y.; Jimidar, M.; Hund, E.; Niemeijer, N.; Peeters, R.; Smeyers-Verbeke, J.; Massart, D. L.; Hoogmartens, J. *Determination of system suitability limits with a robustness test*. J. Chromatogr. A., vol. 845, p. 145-154, 1999.
 195. Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. *Como fazer experimentos - aplicações na ciência e na indústria*. Editora Bookman, 4ª Edição, 2010.

-
-
196. Técnicas de montagem em circuitos eletrônico, elaborado por Eletrônica.net. Disponível em: <http://www.eletronika.net/wp/tecnica-montagem-circuito-eletronico>, acessada em janeiro de 2013.
197. *The European Medicines Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), Biologics Working Party (BWP), Process Analytical Technologies (PAT) group and Industry, Workshop on Process Analytical Technologies for Biologicals, 2007.* Disponível em: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/18537007en.pdf>, acessado em maio de 2011.
198. Savitzky, A.; Golay, M. J. E., *Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures*. Analytical Chemistry, vol. 36, n. 8, p.1627-1639, 1964.
199. Xiaoboa, Z.; Jiewena, Z.; Poveyb, M.J.W.; Holmesb, M.; Hanpina, M.; *Variables selection methods in near-infrared spectroscopy*. Analytica Chimica Acta, vol. 667, p. 14–32, 2010.
200. Galvão, R.K.H. Araújo, M.C.U. Jose, G.E. Pontes, M.J.C. Silva, E.C. Saldanha, T.C.B.; *A method for calibration and validation subset partitioning*. Talanta vol. 67, p. 736–740, 2005.
201. Galvão, R.K.; Araújo, M.C.U. in: S.D. Brown, R. Tauler i Ferré, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics Chemical and Biochemical Data Analysis*, vol. 3, Elsevier, Oxford, 2009, pp. 233–283.
202. Araújo, M.C.U.; Saldanha, T.C.B.; Galvão, R.K.H.; Yoneyma, T.; Chame, H.C.; Visani, V. *The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis*. Chemom. Intell. Lab. Syst., vol. 57, p. 65–73, 2001.
203. Galvão, R.K.H.; Araújo, M.C.U.; Silva, E.C.; José, G.E.; Soares, S.F.C. Paiva, H.M. *Cross-Validation for the Selection of Spectral Variables Using the Successive Projections Algorithm*. J. Braz. Chem. Soc., vol. 18, n. 8, p. 1580–1584, 2007.
204. Gomes A. A. Dissertação de mestrado intitulada: *Algoritmo das Projeções Sucessivas aplicado à seleção de variáveis em regressão PLS*. UFPB, João Pessoa, 2012.
205. Gomes, A.A.; Galvão, R.H.G.; Araújo, M.C.U.; Vêras, G.; Silva, E. C. *The successive projections algorithm for interval selection in PLS*. Microchemical Journal, vol.110, p. 202–208, 2013.
206. GALVÃO, R. K. H. et al. *A variable elimination method to improve the parsimony of MLR models using the successive projections algorithm*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, vol. 92, n.1, p. 83-91, 2008.

ANEXO 1

Tabela 13 - Resultado da análise do lote DP12L148 pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe.

Amostra	Classificação pela <i>screening</i>	Valor obtido pela curva analítica (% m/v)
DP12L148-01	Conforme	48,65
DP12L148-02	Conforme	48,65
DP12L148-03	Conforme	48,65
DP12L148-04	Não Conforme	47,59
DP12L148-05	Conforme	48,54
DP12L148-06	Conforme	48,94
DP12L148-07	Conforme	48,50
DP12L148-08	Conforme	48,04
DP12L148-09	Conforme	48,67
DP12L148-10	Não Conforme	47,48
DP12L148-11	Conforme	48,04
DP12L148-12	Conforme	49,54
DP12L148-13	Conforme	47,89
DP12L148-14	Não Conforme	47,64
DP12L148-15	Não Conforme	47,63
DP12L148-16	Conforme	47,77
DP12L148-17	Conforme	48,43
DP12L148-18	Conforme	48,86
DP12L148-19	Conforme	48,29
DP12L148-20	Conforme	48,43
DP12L148-21	Conforme	50,64
DP12L148-22	Conforme	51,18
DP12L148-23	Conforme	50,94
DP12L148-24	Conforme	49,29
DP12L148-25	Conforme	49,44
DP12L148-26	Conforme	48,84
DP12L148-27	Conforme	50,64
DP12L148-28	Conforme	48,73
DP12L148-29	Conforme	50,19
DP12L148-30	Conforme	48,99
DP12L148-31	Conforme	48,29
DP12L148-32	Conforme	48,24
DP12L148-33	Não Conforme	47,67
DP12L148-34	Conforme	48,67
DP12L148-35	Conforme	49,52
DP12L148-36	Conforme	49,96
DP12L148-37	Conforme	50,50
DP12L148-38	Conforme	48,61
DP12L148-39	Conforme	48,95
DP12L148-40	Conforme	48,81
DP12L148-41	Conforme	48,14
DP12L148-42	Conforme	48,38
DP12L148-43	Conforme	48,34
DP12L148-44	Conforme	48,48
DP12L148-45	Conforme	48,20

DP12L148-46	Conforme	49,33
DP12L148-47	Conforme	48,34
DP12L148-48	Conforme	49,04
DP12L148-49	Conforme	49,04
DP12L148-50	Conforme	47,91
DP12L148-51	Não Conforme	47,67
DP12L148-52	Conforme	48,57
DP12L148-53	Conforme	49,28
DP12L148-54	Conforme	48,99
DP12L148-55	Conforme	48,43
DP12L148-56	Conforme	48,72
DP12L148-57	Conforme	48,57
DP12L148-58	Conforme	48,53
DP12L148-59	Conforme	49,42
DP12L148-60	Conforme	48,29
DP12L148-61	Conforme	48,72
DP12L148-62	Conforme	48,72
DP12L148-63	Conforme	48,43
DP12L148-64	Conforme	49,42
DP12L148-65	Conforme	48,29
DP12L148-66	Conforme	49,14
DP12L148-67	Conforme	48,57
DP12L148-68	Conforme	47,82
DP12L148-69	Conforme	48,72
DP12L148-70	Conforme	47,77
DP12L148-71	Conforme	47,77
DP12L148-72	Conforme	49,14
DP12L148-73	Conforme	48,76
DP12L148-74	Conforme	48,43
DP12L148-75	Conforme	48,57
DP12L148-76	Conforme	48,57
DP12L148-77	Conforme	48,86
DP12L148-78	Conforme	48,29
DP12L148-79	Conforme	48,43
DP12L148-80	Não Conforme	47,34
DP12L148-81	Conforme	49,42
DP12L148-82	Conforme	48,72
DP12L148-83	Conforme	48,99
DP12L148-84	Conforme	47,77
DP12L148-85	Conforme	48,57
DP12L148-86	Conforme	48,43
DP12L148-87	Conforme	49,04
DP12L148-88	Conforme	48,57
DP12L148-89	Conforme	48,22
DP12L148-90	Conforme	48,72
DP12L148-91	Conforme	49,42
DP12L148-92	Conforme	48,00
DP12L148-93	Conforme	48,86

DP12L148-94	Conforme	48,15
DP12L148-95	Conforme	47,86
DP12L148-96	Conforme	48,72
DP12L148-97	Conforme	48,95
DP12L148-98	Conforme	49,09
DP12L148-99	Conforme	48,81
DP12L148-100	Conforme	48,24

Tabela 14 - Resultado da análise dos lotes DP12B032 e DP12L148 pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe.

Amostra	Classificação pela <i>screening</i>	Valor obtido pela curva analítica (% m/v)
DP12B032-01	Conforme	50,9
DP12B032-02	Conforme	50,76
DP12B032-03	Não Conforme	53,9
DP12B032-04	Conforme	50,76
DP12B032-05	Conforme	51,45
DP12B032-06	Conforme	53,45
DP12B032-07	Conforme	53,72
DP12B032-08	Conforme	50,76
DP12B032-09	Conforme	53,78
DP12B032-10	Conforme	50,21
DP12B032-11	Conforme	49,93
DP12B032-12	Conforme	50,48
DP12B032-13	Conforme	50,35
DP12B032-14	Não Conforme	54,31
DP12B032-15	Não Conforme	54,31
DP12B032-16	Não Conforme	54,18
DP12B032-17	Conforme	50,90
DP12B032-18	Conforme	50,58
DP12B032-19	Conforme	51,29
DP12B032-20	Não Conforme	54,02
DP12B032-21	Conforme	50,33
DP12B032-22	Conforme	49,78
DP12B032-23	Conforme	50,47
DP12B032-24	Conforme	49,78
DP12B032-25	Conforme	49,09
DP12B032-26	Não Conforme	54,02
DP12B032-27	Conforme	48,95
DP12B032-28	Conforme	50,19
DP12B032-29	Conforme	50,33
DP12B032-30	Conforme	49,64
DP12B032-31	Não Conforme	47,92
DP12B032-32	Não Conforme	54,16
DP12B032-33	Não Conforme	54,75
DP12B032-34	Conforme	53,72
DP12B032-35	Não Conforme	53,86
DP12B032-36	Não Conforme	54,29
DP12B032-37	Não Conforme	54,46

DP12B032-38	Não Conforme	53,88
DP12B032-39	Não Conforme	54,01
DP12B032-40	Não Conforme	54,46
DP12B032-41	Conforme	53,12
DP12B032-42	Conforme	53,37
DP12B032-43	Não Conforme	55,01
DP12B032-44	Não Conforme	54,42
DP12B032-45	Não Conforme	54,71
DP12B032-46	Conforme	53,22
DP12B032-47	Conforme	53,67
DP12B032-48	Não Conforme	53,82
DP12B032-49	Conforme	52,62
DP12B032-50	Conforme	50,64
DP12L148-51	Conforme	50,18
DP12L148-52	Conforme	50,18
DP12L148-53	Conforme	48,47
DP12L148-54	Conforme	48,94
DP12L148-55	Conforme	49,25
DP12L148-56	Conforme	48,78
DP12L148-57	Conforme	49,15
DP12L148-58	Conforme	49,87
DP12L148-59	Conforme	50,64
DP12L148-60	Conforme	50,18
DP12L148-61	Conforme	49,21
DP12L148-62	Conforme	51,10
DP12L148-63	Conforme	49,25
DP12L148-64	Conforme	49,09
DP12L148-65	Não Conforme	47,55
DP12L148-66	Conforme	49,72
DP12L148-67	Conforme	49,41
DP12L148-68	Conforme	50,03
DP12L148-69	Conforme	49,61
DP12L148-70	Conforme	50,18
DP12L148-71	Conforme	48,47
DP12L148-72	Conforme	49,87
DP12L148-73	Conforme	48,47
DP12L148-74	Conforme	49,51
DP12L148-75	Conforme	48,73
DP12L148-76	Conforme	51,21
DP12L148-77	Conforme	49,66
DP12L148-78	Conforme	50,13
DP12L148-79	Conforme	50,13
DP12L148-80	Conforme	48,57
DP12L148-81	Conforme	50,13
DP12L148-82	Conforme	48,88
DP12L148-83	Conforme	48,42
DP12L148-84	Conforme	50,28
DP12L148-85	Conforme	49,19

DP12L148-86	Conforme	49,09
DP12L148-87	Conforme	49,51
DP12L148-88	Conforme	50,59
DP12L148-89	Conforme	49,66
DP12L148-90	Conforme	49,66
DP12L148-91	Conforme	49,66
DP12L148-92	Conforme	50,59
DP12L148-93	Conforme	48,73
DP12L148-94	Conforme	50,44
DP12L148-95	Conforme	49,66
DP12L148-96	Conforme	49,04
DP12L148-97	Conforme	50,28
DP12L148-98	Conforme	50,44
DP12L148-99	Conforme	49,66
DP12L148-100	Conforme	49,66

Tabela 15 - Resultado da análise dos lotes DP12I131 e DP12E073 pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe.

Amostra	Classificação pela <i>screening</i>	Valor obtido pela curva analítica (% m/v)
DP12I131-01	Conforme	50,62
DP12I131-02	Conforme	50,07
DP12I131-03	Conforme	50,76
DP12I131-04	Conforme	51,90
DP12I131-05	Conforme	50,62
DP12I131-06	Conforme	50,76
DP12I131-07	Conforme	49,51
DP12I131-08	Conforme	49,51
DP12I131-09	Conforme	51,90
DP12I131-10	Conforme	51,04
DP12E073-11	Conforme	52,71
DP12E073-12	Conforme	53,25
DP12I131-13	Conforme	51,22
DP12I131-14	Conforme	51,08
DP12I131-15	Conforme	50,39
DP12I131-16	Conforme	51,08
DP12I131-17	Conforme	50,66
DP12I131-18	Conforme	49,69
DP12I131-19	Conforme	49,03
DP12I131-20	Conforme	48,44
DP12I131-21	Conforme	48,44
DP12I131-22	Conforme	50,11
DP12I131-23	Conforme	50,11
DP12I131-24	Conforme	49,65
DP12I131-25	Conforme	50,39
DP12I131-26	Conforme	50,53
DP12I131-27	Conforme	50,25
DP12I131-28	Conforme	51,08
DP12I131-29	Conforme	50,53

DP12I131-30	Conforme	50,25
DP12I131-31	Conforme	48,72
DP12I131-32	Conforme	48,72
DP12I131-33	Conforme	50,66
DP12I131-34	Conforme	49,56
DP12I131-35	Conforme	49,42
DP12I131-36	Conforme	50,66
DP12I131-37	Conforme	50,66
DP12I131-38	Conforme	50,25
DP12I131-39	Conforme	50,11
DP12I131-40	Conforme	49,83
DP12I131-41	Conforme	49,69
DP12I131-42	Conforme	49,70
DP12I131-43	Conforme	49,97
DP12I131-44	Conforme	50,39
DP12I131-45	Conforme	49,97
DP12I131-46	Conforme	48,86
DP12I131-47	Conforme	51,94
DP12I131-48	Conforme	50,80
DP12I131-49	Conforme	51,04
DP12I131-50	Conforme	50,21
DP12I131-51	Conforme	49,93
DP12I131-52	Conforme	50,07
DP12I131-53	Conforme	50,62
DP12I131-54	Conforme	50,48
DP12I131-55	Conforme	51,90
DP12I131-56	Conforme	49,79
DP12I131-57	Conforme	50,76
DP12I131-58	Conforme	49,54
DP12I131-59	Conforme	49,65
DP12I131-60	Conforme	49,41
DP12I131-61	Conforme	49,79
DP12E073-62	Conforme	52,13
DP12I131-63	Conforme	50,21
DP12I131-64	Conforme	51,04
DP12I131-65	Conforme	51,45
DP12I131-66	Conforme	49,44
DP12I131-67	Conforme	49,09
DP12I131-68	Conforme	50,07
DP12I131-69	Conforme	49,93
DP12I131-70	Conforme	51,18
DP12I131-71	Conforme	50,35
DP12I131-72	Conforme	49,68
DP12I131-73	Conforme	50,35
DP12I131-74	Conforme	51,03
DP12I131-75	Conforme	49,51
DP12I131-76	Conforme	49,09
DP12I131-77	Conforme	48,81

DP12I131-78	Conforme	49,65
DP12I131-79	Conforme	49,51
DP12I131-80	Conforme	49,93
DP12I131-81	Conforme	50,07
DP12I131-82	Conforme	51,31
DP12I131-83	Conforme	50,07
DP12I131-84	Conforme	50,21
DP12I131-85	Conforme	50,48
DP12I131-86	Conforme	49,93
DP12I131-87	Conforme	50,21
DP12I131-88	Conforme	50,07
DP12I131-89	Conforme	51,18
DP12I131-90	Conforme	50,48
DP12I131-91	Conforme	49,09
DP12I131-92	Conforme	49,79
DP12I131-93	Conforme	50,07
DP12I131-94	Conforme	51,59
DP12I131-95	Conforme	49,37
DP12I131-96	Conforme	50,07
DP12I131-97	Conforme	49,23
DP12I131-98	Conforme	51,90
DP12I131-99	Conforme	50,48
DP12I131-100	Conforme	50,35

Tabela 16 - Resultado da análise do lote DP10B015 pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe.

Amostra	Classificação pela <i>screening</i>	Valor obtido pela curva analítica (% m/v)
DP10B015-01	Conforme	49,04
DP10B015-02	Conforme	48,88
DP10B015-03	Conforme	49,20
DP10B015-04	Conforme	48,25
DP10B015-05	Conforme	48,88
DP10B015-06	Conforme	49,20
DP10B015-07	Conforme	49,04
DP10B015-08	Conforme	49,20
DP10B015-09	Conforme	48,73
DP10B015-10	Conforme	49,35
DP10B015-11	Não Conforme	47,62
DP10B015-12	Conforme	48,73
DP10B015-13	Conforme	48,57
DP10B015-14	Conforme	49,82
DP10B015-15	Conforme	49,66
DP10B015-16	Conforme	47,94
DP10B015-17	Conforme	47,94
DP10B015-18	Conforme	48,88
DP10B015-19	Conforme	49,66
DP10B015-20	Conforme	49,66

Tabela 17 - Resultado da análise do lote DP09E063 pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe.

Amostra	Classificação pela <i>screening</i>	Valor obtido pela curva analítica (% m/v)
DP09E063-01	Conforme	50,75
DP09E063-02	Conforme	51,28
DP09E063-03	Conforme	51,36
DP09E063-04	Conforme	51,21
DP09E063-05	Conforme	51,36
DP09E063-06	Conforme	51,51
DP09E063-07	Conforme	51,67
DP09E063-08	Conforme	51,51
DP09E063-09	Conforme	50,28
DP09E063-10	Conforme	49,82
DP09E063-11	Conforme	50,59
DP09E063-12	Conforme	49,97
DP09E063-13	Conforme	50,59
DP09E063-14	Conforme	50,75
DP09E063-15	Conforme	50,90
DP09E063-16	Conforme	50,75
DP09E063-17	Conforme	50,75
DP09E063-18	Conforme	50,59
DP09E063-19	Conforme	51,05
DP09E063-20	Conforme	50,59

Tabela 18 - Resultado da análise do lote DP09H109 pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe.

Amostra	Classificação pela <i>screening</i>	Valor obtido pela curva analítica (% m/v)
DP09H109-01	Conforme	48,49
DP09H109-02	Conforme	48,64
DP09H109-03	Conforme	48,02
DP09H109-04	Conforme	49,42
DP09H109-05	Conforme	48,95
DP09H109-06	Conforme	48,33
DP09H109-07	Conforme	48,80
DP09H109-08	Conforme	48,33
DP09H109-09	Conforme	49,73
DP09H109-10	Não Conforme	47,52
DP09H109-11	Conforme	48,43
DP09H109-12	Conforme	48,43
DP09H109-13	Conforme	48,74
DP09H109-14	Conforme	49,36
DP09H109-15	Conforme	48,27
DP09H109-16	Conforme	48,12
DP09H109-17	Conforme	50,29
DP09H109-18	Conforme	49,67
DP09H109-19	Conforme	50,29
DP09H109-20	Conforme	48,59

Tabela 19 - Resultado da análise do lote DP09G093 pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe.

Amostra	Classificação pela <i>screening</i>	Valor obtido pela curva analítica (% m/v)
DP09G093-01	Conforme	52,52
DP09G093-02	Conforme	52,22
DP09G093-03	Conforme	51,91
DP09G093-04	Conforme	51,76
DP09G093-05	Conforme	52,82
DP09G093-06	Conforme	52,37
DP09G093-07	Conforme	52,22
DP09G093-08	Conforme	52,07
DP09G093-09	Conforme	52,22
DP09G093-10	Conforme	52,22
DP09G093-11	Conforme	52,07
DP09G093-12	Conforme	51,76
DP09G093-13	Conforme	52,07
DP09G093-14	Conforme	51,46
DP09G093-15	Conforme	51,46
DP09G093-16	Conforme	52,22
DP09G093-17	Conforme	51,76
DP09G093-18	Conforme	51,91
DP09G093-19	Conforme	51,61
DP09G093-20	Conforme	51,61

Tabela 20 - Resultado da análise do lote DP10I103 pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe.

Amostra	Classificação pela <i>screening</i>	Valor obtido pela curva analítica (% m/v)
DP10I103-01	Conforme	49,77
DP10I103-02	Conforme	50,54
DP10I103-03	Conforme	49,93
DP10I103-04	Conforme	51,00
DP10I103-05	Conforme	50,24
DP10I103-06	Conforme	50,85
DP10I103-07	Conforme	50,39
DP10I103-08	Conforme	50,24
DP10I103-09	Conforme	50,39
DP10I103-10	Conforme	50,70
DP10I103-11	Conforme	49,88
DP10I103-12	Conforme	49,88
DP10I103-13	Conforme	50,08
DP10I103-14	Conforme	47,90
DP10I103-15	Conforme	50,24
DP10I103-16	Conforme	50,28
DP10I103-17	Conforme	49,15
DP10I103-18	Conforme	50,54
DP10I103-19	Conforme	50,24
DP10I103-20	Conforme	50,85

Tabela 21 - Resultado da análise do lote DP10H098 pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe.

Amostra	Classificação pela <i>screening</i>	Valor obtido pela curva analítica (% m/v)
DP10H098-01	Conforme	48,10
DP10H098-02	Não Conforme	47,59
DP10H098-03	Conforme	48,88
DP10H098-04	Conforme	49,45
DP10H098-05	Conforme	49,45
DP10H098-06	Conforme	49,61
DP10H098-07	Conforme	49,92
DP10H098-08	Não Conforme	46,83
DP10H098-09	Conforme	48,82
DP10H098-10	Conforme	48,51
DP10H098-11	Conforme	49,29
DP10H098-12	Conforme	49,29
DP10H098-13	Conforme	48,67
DP10H098-14	Não Conforme	47,40
DP10H098-15	Conforme	48,04
DP10H098-16	Conforme	48,82
DP10H098-17	Conforme	48,67
DP10H098-18	Conforme	49,45
DP10H098-19	Conforme	49,29
DP10H098-20	Conforme	48,82

Tabela 22 - Resultado da análise do lote DP10D046 pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe.

Amostra	Classificação pela <i>screening</i>	Valor obtido pela curva analítica (% m/v)
DP10D046-01	Conforme	50,64
DP10D046-02	Conforme	50,34
DP10D046-03	Conforme	51,41
DP10D046-04	Conforme	50,79
DP10D046-05	Conforme	51,26
DP10D046-06	Conforme	51,14
DP10D046-07	Conforme	50,49
DP10D046-08	Conforme	50,79
DP10D046-09	Conforme	50,03
DP10D046-10	Conforme	50,95
DP10D046-11	Conforme	50,03
DP10D046-12	Conforme	50,64
DP10D046-13	Conforme	49,87
DP10D046-14	Conforme	51,10
DP10D046-15	Conforme	51,10
DP10D046-16	Conforme	50,79
DP10D046-17	Conforme	50,34
DP10D046-18	Conforme	50,52
DP10D046-19	Conforme	50,49
DP10D046-20	Conforme	49,25

Tabela 23 - Resultado da análise do lote DP09F067 pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe.

Amostra	Classificação pela <i>screening</i>	Valor obtido pela curva analítica (% m/v)
DP09F067-01	Conforme	50,64
DP09F067-02	Conforme	50,64
DP09F067-03	Conforme	50,79
DP09F067-04	Conforme	50,49
DP09F067-05	Conforme	50,18
DP09F067-06	Conforme	50,49
DP09F067-07	Conforme	50,95
DP09F067-08	Conforme	50,18
DP09F067-09	Conforme	50,64
DP09F067-10	Conforme	51,10
DP09F067-11	Conforme	48,78
DP09F067-12	Conforme	49,56
DP09F067-13	Conforme	50,03
DP09F067-14	Conforme	49,56
DP09F067-15	Conforme	50,34
DP09F067-16	Conforme	49,41
DP09F067-17	Conforme	50,34
DP09F067-18	Conforme	49,41
DP09F067-19	Conforme	49,56
DP09F067-20	Conforme	51,10

Tabela 24 - Resultado da análise do lote DP10F064 pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe.

Amostra	Classificação pela <i>screening</i>	Valor obtido pela curva analítica (% m/v)
DP10F064-01	Conforme	48,94
DP10F064-02	Conforme	49,87
DP10F064-03	Conforme	49,25
DP10F064-04	Conforme	49,41
DP10F064-05	Conforme	49,41
DP10F064-06	Conforme	50,49
DP10F064-07	Conforme	50,49
DP10F064-08	Conforme	49,72
DP10F064-09	Conforme	49,87
DP10F064-10	Conforme	50,64
DP10F064-11	Conforme	49,41
DP10F064-12	Conforme	50,38
DP10F064-13	Conforme	50,64
DP10F064-14	Conforme	50,49
DP10F064-15	Conforme	48,94
DP10F064-16	Conforme	50,03
DP10F064-17	Conforme	50,49
DP10F064-18	Conforme	49,72
DP10F064-19	Conforme	49,56
DP10F064-20	Conforme	49,56

Tabela 25 - Resultado da análise do lote DP09I111 pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe.

Amostra	Classificação pela <i>screening</i>	Valor obtido pela curva analítica (% m/v)
DP09I111-01	Conforme	50,64
DP09I111-02	Conforme	50,64
DP09I111-03	Conforme	51,26
DP09I111-04	Conforme	50,64
DP09I111-05	Conforme	49,92
DP09I111-06	Conforme	51,71
DP09I111-07	Conforme	50,95
DP09I111-08	Conforme	50,79
DP09I111-09	Conforme	50,46
DP09I111-10	Conforme	51,11
DP09I111-11	Conforme	50,18
DP09I111-12	Conforme	50,79
DP09I111-13	Conforme	50,79
DP09I111-14	Conforme	50,95
DP09I111-15	Conforme	50,18
DP09I111-16	Conforme	50,18
DP09I111-17	Conforme	50,95
DP09I111-18	Conforme	51,71
DP09I111-19	Conforme	51,71
DP09I111-20	Conforme	51,10

Tabela 26 - Resultado da análise do lote DP10A005 pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe.

Amostra	Classificação pela <i>screening</i>	Valor obtido pela curva analítica (% m/v)
DP10A005-01	Conforme	48,53
DP10A005-02	Não Conforme	47,74
DP10A005-03	Não Conforme	47,74
DP10A005-04	Conforme	47,96
DP10A005-05	Não Conforme	47,74
DP10A005-06	Não Conforme	47,74
DP10A005-07	Não Conforme	47,75
DP10A005-08	Conforme	47,90
DP10A005-09	Não Conforme	47,59
DP10A005-10	Conforme	48,99
DP10A005-11	Conforme	47,90
DP10A005-12	Conforme	48,22
DP10A005-13	Não Conforme	47,74
DP10A005-14	Conforme	48,99
DP10A005-15	Conforme	48,84
DP10A005-16	Não Conforme	47,74
DP10A005-17	Conforme	47,90
DP10A005-18	Conforme	47,90
DP10A005-19	Não Conforme	47,62
DP10A005-20	Não Conforme	47,74

Tabela 27 - Resultado da análise do lote DP10E059 pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe.

Amostra	Classificação pela <i>screening</i>	Valor obtido pela curva analítica (% m/v)
DP10E059-01	Conforme	47,99
DP10E059-02	Conforme	49,87
DP10E059-03	Conforme	48,78
DP10E059-04	Não Conforme	47,52
DP10E059-05	Conforme	50,34
DP10E059-06	Conforme	49,56
DP10E059-07	Conforme	49,72
DP10E059-08	Conforme	48,16
DP10E059-09	Não Conforme	47,68
DP10E059-10	Conforme	49,72
DP10E059-11	Conforme	49,72
DP10E059-12	Conforme	48,47
DP10E059-13	Conforme	48,16
DP10E059-14	Conforme	48,78
DP10E059-15	Conforme	49,41
DP10E059-16	Conforme	50,03
DP10E059-17	Conforme	48,47
DP10E059-18	Conforme	49,72
DP10E059-19	Conforme	50,03
DP10E059-20	Não Conforme	47,52
DP10E059-21	Conforme	49,41
DP10E059-22	Conforme	48,63
DP10E059-23	Não Conforme	47,68
DP10E059-24	Conforme	50,34
DP10E059-25	Conforme	49,72
DP10E059-26	Conforme	51,10
DP10E059-27	Conforme	50,03
DP10E059-28	Conforme	50,49
DP10E059-29	Conforme	48,31
DP10E059-30	Conforme	49,25
DP10E059-31	Não Conforme	47,53
DP10E059-32	Conforme	49,25
DP10E059-33	Não Conforme	47,65
DP10E059-34	Conforme	49,87
DP10E059-35	Conforme	49,72
DP10E059-36	Conforme	50,03
DP10E059-37	Conforme	50,18
DP10E059-38	Conforme	49,56
DP10E059-39	Conforme	47,84
DP10E059-40	Conforme	49,56
DP10E059-41	Conforme	50,01
DP10E059-42	Conforme	47,99
DP10E059-43	Conforme	49,09
DP10E059-44	Conforme	50,18
DP10E059-45	Conforme	49,09

DP10E059-46	Conforme	50,34
DP10E059-47	Não Conforme	47,52
DP10E059-48	Conforme	49,25
DP10E059-49	Conforme	49,09
DP10E059-50	Conforme	50,03
DP10E059-51	Conforme	50,28
DP10E059-52	Conforme	49,82
DP10E059-53	Conforme	50,44
DP10E059-54	Conforme	47,86
DP10E059-55	Conforme	49,82
DP10E059-56	Conforme	48,57
DP10E059-57	Conforme	49,66
DP10E059-58	Conforme	47,94
DP10E059-59	Não Conforme	47,68
DP10E059-60	Conforme	50,18
DP10E059-61	Conforme	48,31
DP10E059-62	Não Conforme	47,71
DP10E059-63	Não Conforme	47,58
DP10E059-64	Conforme	49,87
DP10E059-65	Conforme	47,84
DP10E059-66	Conforme	49,41
DP10E059-67	Conforme	50,64
DP10E059-68	Conforme	51,26
DP10E059-69	Conforme	49,56
DP10E059-70	Conforme	50,37
DP10E059-71	Conforme	50,03
DP10E059-72	Conforme	49,87
DP10E059-73	Conforme	47,87
DP10E059-74	Conforme	47,84
DP10E059-75	Conforme	49,72
DP10E059-76	Conforme	50,03
DP10E059-77	Conforme	49,56
DP10E059-78	Conforme	49,56
DP10E059-79	Conforme	50,18
DP10E059-80	Conforme	50,95

Tabela 28 - Resultado da análise do lote DP0006 pelo fotômetro LED-NIR duplo feixe.

Amostra	Classificação pela <i>screening</i>	Valor obtido pela curva analítica (% m/v)
DP0006-01	Conforme	50,09
DP0006-02	Conforme	50,22
DP0006-03	Conforme	49,95
DP0006-04	Conforme	50,36
DP0006-05	Conforme	50,22
DP0006-06	Conforme	50,22
DP0006-07	Conforme	49,26
DP0006-08	Conforme	49,95
DP0006-09	Conforme	49,54

DP0006-10	Conforme	50,27
DP0006-11	Conforme	50,36
DP0006-12	Conforme	50,36
DP0006-13	Conforme	49,95
DP0006-14	Conforme	50,77
DP0006-15	Conforme	50,91
DP0006-16	Conforme	50,08
DP0006-17	Conforme	50,36
DP0006-18	Conforme	49,27
DP0006-19	Conforme	49,81
DP0006-20	Conforme	49,95

ANEXO 2



Short communication

Near-infrared spectrometric determination of dipyrone in closed ampoules

Fátima Aparecida C. Sanches^a, Rosimeri B. Abreu^a, Márcio José Coelho Pontes^a, Flaviano C. Leite^a, Daniel Jackson E. Costa^a, Roberto Kawakami H. Galvão^b, Mario Cesar U. Araujo^{a,*}

^a Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Química, Caixa Postal 5093, CEP 58051-970 João Pessoa, PB, Brazil

^b Instituto Tecnológico de Aeronáutica, Divisão de Engenharia Eletrônica, 12228-900 São José dos Campos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 November 2011

Received in revised form

22 December 2011

Accepted 21 January 2012

Available online 25 January 2012

Keywords:

Near-infrared spectrometry

Multiple Linear Regression

Variable selection

Partial-Least-Squares

Dipyrone

ABSTRACT

The present paper proposes an analytical method for fast near-infrared (NIR) determination of dipyrone in injectable formulations with a nominal content of 50.0% $m v^{-1}$ without violation of the ampoule. For this purpose, two multivariate calibration methods are evaluated, namely Partial-Least-Squares (PLS) and Multiple Linear Regression (MLR) with variable selection by the Successive Projections Algorithm (SPA). The resulting models comprised four latent variables (PLS) and five spectral variables (MLR-SPA). Appropriate predictions were obtained in both cases, with RMSEP values of 0.39 (PLS) and 0.35% $m v^{-1}$ (MLR-SPA) and correlation coefficients of 0.9970 (PLS) and 0.9975 (MLR-SPA) for a calibration range of 40–60% $m v^{-1}$. No systematic error was observed and no significant differences were found between the predicted and reference values, according to a paired *t*-test at 95% confidence level.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Dipyrone (metamizole sodium; (sodium [(2,3-dihydro-1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-1H-pyrazole-4-yl) methylamine] methanesulfonate) is an analgesic and antipyretic drug with peripheral, central and anti-inflammatory actions related to the inhibition of the cyclooxygenase enzyme system (COX-1 and COX-2) [1]. Sodium dipyrone in injectable form is routinely used in hospital practice and postoperative care in Brazil and other countries. The injectable formulation has the advantage of providing faster therapeutic effects when compared to other delivery forms, as the active principle is directly deployed in the bloodstream [2]. However, quality control is a major concern, which motivates the development of fast, low-cost, and selective methods for routine analysis.

Iodometric titration is indicated in the Brazilian pharmacopeia as the official method for determination of dipyrone in injectable formulations [3]. This method involves a time-consuming chemical reaction, which must be carried out at a controlled temperature below 15 °C. An additional difficulty is related to the instability of the iodine solution. These inconveniences have motivated the development of methods based on instrumental techniques, such as spectrophotometry [4], fluorimetry [5], electrochemistry [6],

chemiluminescence [7] and high performance liquid chromatography (HPLC) [8]. However, such methods still generate chemical waste and require the violation of the sample ampoule, which must be subsequently discarded. To overcome these drawbacks, near-infrared (NIR) spectrometry may be an advantageous alternative.

NIR spectrometry has been employed in several applications to carry out fast and non-destructive analyses without the need for sample treatment or chemical reagents [9,10]. Within the scope of pharmaceutical applications, NIR spectrometry has been widely used for determination of quality parameters in drug samples. Most investigations in this field have been concerned with solid formulations [11,12], although some works have also dealt with creams [13] and injectables [14]. An interesting feature of NIR spectrometry consists of the possibility of carrying out non-invasive analyses of drug samples in closed packages, such as powders in USP vials [15]. A recent study reported the discrimination of genuine and counterfeit samples of injectable dexamethasone on the basis of NIR spectra measured through the closed ampoules [16].

However, the application of NIR spectrometry for quantitative analysis of injectable drugs in closed ampoules still merits investigation. In this context, the present paper proposes a novel analytical method for fast and accurate determination of sodium dipyrone without violation of the ampoule. For this purpose, NIR spectrometry is employed with two multivariate calibration techniques, namely Partial Least Squares (PLS) [17] and Multiple Linear Regression (MLR) with variable selection by the Successive Projections Algorithm (MLR-SPA) [18–20].

* Corresponding author. Tel.: +55 83 3216 7438; fax: +55 83 3216 7437.
E-mail address: laqa@quimica.ufpb.br (M.C.U. Araujo).

2. Experimental

2.1. Samples

The investigation involved a total of 1340 commercial ampoules from 71 different batches with nominal value of $50.0\% \text{ m v}^{-1}$ of sodium dipyrone. Chemical analysis reports with actual sodium dipyrone content were provided by the manufacturers, following the iodometric titration method indicated in the Brazilian pharmacopeia [3]. In addition, 15 synthetic samples with concentrations 40.0, 44.0, 44.5, 45.0, 45.5, 46.0, 48.0, 50.0, 52.0, 54.0, 54.5, 55.0, 55.5, 56.0, $60.0\% \text{ m v}^{-1}$ were prepared in the laboratory by dissolving sodium dipyrone (analytical grade) in water for injectable preparations. This range of concentrations is in agreement with the recommendation of the European Medicines Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) [21], which states that the calibration interval should extend from 80% to 120% of the label claim ($50.0\% \text{ m v}^{-1}$ in the present case). This range also comprises the interval of concentrations accepted by the Brazilian National Health Authority, namely 45.0–55.0% m v^{-1} [3].

2.2. Spectrum acquisition

The sample spectra were acquired by using an FT-NIR spectrophotometer (Perkin Elmer, Spectrum GX). A lab-made teflon holder (Fig. 1) was used to support the ampoules in the spectrophotometer sample compartment. The external diameter of the ampoules was approximately 1 cm. Each spectrum was obtained as the average of 16 scans in the range 9110–8200 cm^{-1} with a resolution of 1 cm^{-1} . Temperature and relative humidity were controlled around 26 °C and 45%, respectively.

In order to account for small manufacturing differences among the ampoules, four different ampoules were used as cells for recording the spectra of the 15 synthetic samples. Therefore, 60 spectra were obtained. The spectra of the commercial samples were acquired with the original closed ampoules. The blank spectrum was obtained by using water for injectable preparations. Each spectrum was acquired in triplicate and the average was then used in the subsequent stages of the study. Moreover, the spectra of all samples of the same batch were coaveraged. The resulting 131 spectra (60 for the synthetic samples and 71 for the commercial samples) are shown in Fig. 2a.

2.3. Chemometric procedures and software

A Savitzky–Golay derivative filter (second-order polynomial and 81-point window) was employed to eliminate undesirable baseline features in the NIR spectra. The resulting derivative

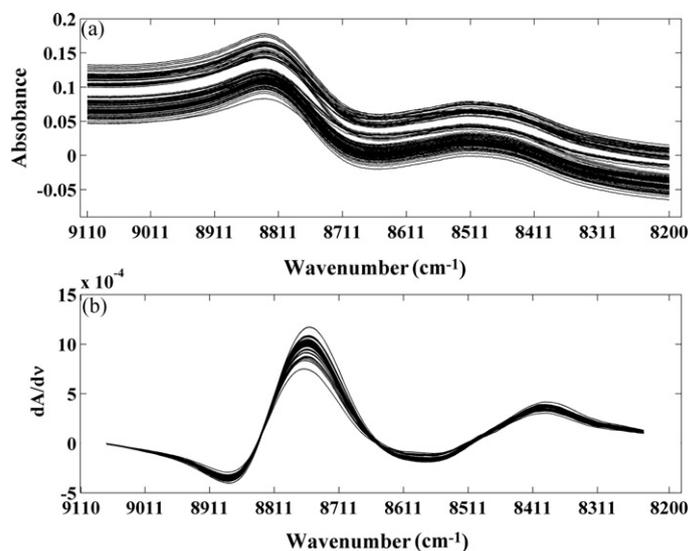


Fig. 2. (a) Raw and (b) derivative NIR absorbance spectra.

spectra, which are presented in Fig. 2b, comprised 831 variables. In addition, the variables were mean-centered before the modeling procedures.

The sample set was divided into calibration (65), validation (33) and prediction (33) subsets by applying the SPXY (sample set partitioning based on joint x - y distances) algorithm [22] to the derivative spectra. The calibration and validation samples were used in the model-building process. The prediction samples were only employed in the final evaluation and comparison of the resulting models.

PLS regression was carried out in the Unscrambler® X.1 software (CAMO S.A.), whereas data pre-treatment and MLR-SPA were implemented in Matlab 2010b (Mathworks). The MLR-SPA routine was implemented as described elsewhere [18]. The validation set was employed to guide the selection of latent variables in PLS and the individual spectral variables in MLR-SPA. The default settings of the computational routines were employed throughout.

The resulting models were compared in terms of the root-mean-square error (RMSEP) and correlation coefficient (r_{pred}) in the prediction set.

3. Results and discussion

Fig. 3a and b present the plots of predicted versus reference values of dipyrone concentration for PLS (4 latent variables) and



Fig. 1. NIR spectrophotometer with the lab-made teflon holder which was used to support the ampoules in the spectrophotometer sample compartment.

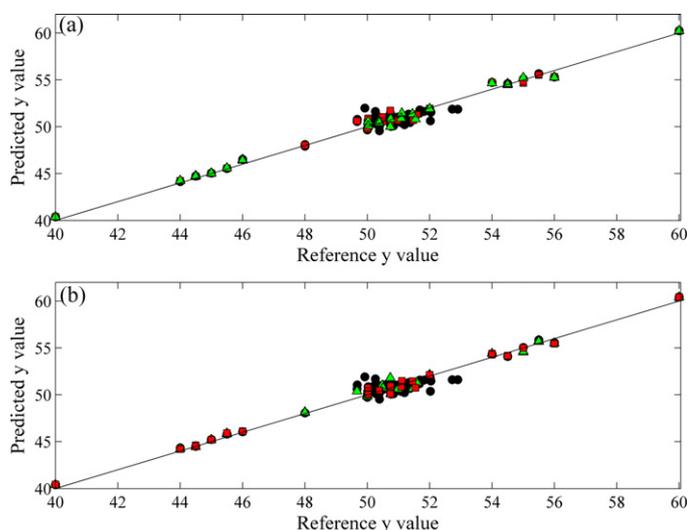


Fig. 3. Predicted versus reference plots obtained with: (a) PLS (full-spectrum) and (b) MLR-SPA models for determination of sodium dipyrone in the calibration (●), validation (■) and prediction (▲) sets.

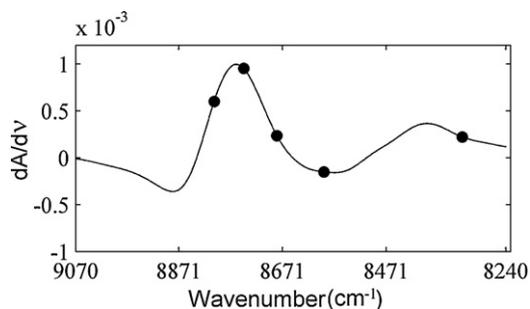


Fig. 4. Mean NIR spectrum with wavenumbers selected by MLR-SPA.

MLR-SPA (5 spectral variables), respectively. As can be seen, there is good agreement between predicted and reference values over the calibration, validation and prediction sets. Moreover, no systematic error is present, as the points are distributed on both sides of the bisectrix line along the entire range of y -values.

In terms of performance metrics for the prediction set, appropriate results were obtained by using either PLS (RMSEP = $0.39\% \text{ m v}^{-1}$, $r_{\text{pred}} = 0.9970$) or MLR-SPA (RMSEP = $0.35\% \text{ m v}^{-1}$, $r_{\text{pred}} = 0.9975$). Moreover, in both cases, a paired t -test for the prediction set did not indicate significant differences between the predicted and reference values at 95% confidence level. These results suggest that the proposed analytical method is a suitable strategy for determination of dipyrone in closed ampoules.

Finally, it is worth noting that an F -test at 95% confidence level did not indicate significant RMSEP differences between the PLS and MLR-SPA models. However, the possibility of obtaining suitable results by using a small number of variables in MLR-SPA (five variables, as illustrated in Fig. 4), offers good perspectives for the design of dedicated, less costly equipment employing LEDs in the NIR range [23,24].

4. Conclusion

The present paper proposed a fast and accurate analytical method for determination of sodium dipyrone in injectable formulations without violation of the ampoule. For this purpose, NIR spectrometry was employed and two multivariate calibration

methods (PLS and MLR-SPA) were evaluated. Appropriate predictions were obtained, with RMSEP values of 0.39 (PLS) and $0.35\% \text{ m v}^{-1}$ (MLR-SPA), which can be deemed small in view of the calibration range ($40\text{--}60\% \text{ m v}^{-1}$). The good agreement between predicted and reference values for dipyrone concentration is also corroborated by the high correlation coefficients observed in the PLS (0.9970) and MLR-SPA (0.9975) results. Furthermore, in both cases no systematic error was observed and no significant differences were found between the predicted and reference values, according to a paired t -test at 95% confidence level.

Although the prediction performance of MLR-SPA was not significantly superior to PLS, the possibility of obtaining suitable results by using few spectral variables (five in this case) may be useful for other reasons. The variable selection result could be used, for instance, to guide the design of dedicated, less costly equipment for use in routine analyses.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq (scholarships and research fellowships) and CAPES (scholarships). The authors also acknowledge the partnership with the pharmaceutical companies Isoforma Industrial Farmacêutica Ltda and Farmace Indústria Químico-Farmacêutica Ltda.

References

- [1] P.A. Insel, in: L.L. Brunton, J.S. Lazo, K.L. Parker (Eds.), Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th edition, McGraw-Hill, 2006.
- [2] L. Lachman, H.A. Liberman, J.L. Kaning, The Theory and Practice of Industrial Pharmacy, CBS Publishers & Distributors, 2009.
- [3] Farmacopéia Brasileira, 4th edition, Atheneu, 2002, parte I, p. 145.
- [4] A.V. Pereira, L. Penczkowski, M. Vosgerau, M.F. Sassa, O. Fatibello-Filho, Quim. Nova 25 (2002) 553–557.
- [5] T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, V. Tomas, J. Carpena, Microchem. J. 47 (1993) 296–301.
- [6] R.C. Matos, L. Angnes, M.C.U. Araujo, T.C.B. Saldanha, Analyst 125 (2000) 2011–2015.
- [7] Y.M. Huang, C. Zhang, X.R. Zhang, Z.J. Zhang, J. Pharm. Biomed. Anal. 21 (1999) 817–825.
- [8] J.A.G. Agundez, J. Benitez, Ther. Drug. Monit. 18 (1996) 104–107.
- [9] D.A. Burns, E.W. Ciurczak, Handbook of Near-Infrared Analysis, 3rd edition, vol. 35, Practical Spectroscopy Series, CRC Press Taylor & Francis Group, 2008.
- [10] C. Pasquini, J. Braz. Chem. Soc. 14 (2003) 198–219.
- [11] S.H.F. Scafi, C. Pasquini, Analyst 126 (2001) 2218–2224.
- [12] M. Blanco, A. Eustaquio, J.M. González, D. Serrano, J. Pharm. Biomed. Anal. 22 (2000) 139–148.
- [13] S.C. Baratiéri, J.M. Barbosa, M.P. Freitas, J.A. Martins, J. Pharm. Biomed. Anal. 40 (2006) 51–55.
- [14] R. López-Arellano, E.A. Santander-García, J.M. Andrade-Garda, G. Alvarez-Avila, J.A. Garduño-Rosas, E.A. Morales-Hipólito, Vib. Spectrosc. 51 (2009) 255–262.
- [15] H.R.H. Ali, Forensic Sci. Int. 206 (2011) 87–91.
- [16] O. Rodionova, A. Pomerantsev, L. Houmøller, A. Shpak, O. Shpigun, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 1927–1935.
- [17] J.H. Kalivas, in: S.D. Brown, R. Tauler i Ferré, B. Walczak (Eds.), Comprehensive Chemometrics Chemical and Biochemical Data Analysis, vol. 3, Elsevier, Oxford, 2009, pp. 1–32.
- [18] R.K.H. Galvão, M.C.U. Araújo, in: S.D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), Comprehensive Chemometrics Chemical and Biochemical Data Analysis, vol. 3, Elsevier, Oxford, 2009, pp. 233–283.
- [19] M.C.U. Araújo, T.C.B. Saldanha, R.K.H. Galvão, T. Yoneyma, H.C. Chame, V. Visani, Chemom. Intell. Lab. Syst. 57 (2001) 65–73.
- [20] R.K.H. Galvão, M.C.U. Araújo, E.C. Silva, G.E. José, S.F.C. Soares, H.M. Paiva, J. Braz. Chem. Soc. 18 (2007) 1580–1584.
- [21] The European Medicines Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), Biologics Working Party (BWP), Process Analytical Technologies (PAT) group and Industry, Workshop on Process Analytical Technologies for Biologics, 2007, <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/18537007en.pdf>, 2007 (accessed 05.11).
- [22] R.K.H. Galvão, M.C.U. Araújo, G.E. Jose, M.J.C. Pontes, E.C. Silva, T.C.B. Saldanha, Talanta 67 (2005) 736–740.
- [23] E.C.L. Nascimento, E.N. Gaião, R.S. Lima, V.B. Santos, S.R.B. Santos, M.C.U. Araújo, Talanta 75 (2008) 792–796.
- [24] G. Veras, E.C. Silva, W.S. Lyra, S.F.C. Soares, T.B. Guerreiro, S.R.B. Santos, Talanta 77 (2009) 1155–1159.