

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

NATANA BECKER

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE VALSARTANA, HIDROCLOROTIAZIDA E
BESILATO DE ANLÓDIPINO EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA POR
INFRAVERMELHO PRÓXIMO E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Uruguaiiana

2015

NATANA BECKER

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE VALSARTANA, HIDROCLOROTIAZIDA E
BESILATO DE ANLODIPINO EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA POR
INFRAVERMELHO PRÓXIMO E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do grau de MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Prof. Dr^a. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva.

Uruguaiiana

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

B395d Becker , Natana

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE VALSARTANA, HIDROCLOROTIAZIDA E
BESILATO DE ANLODIPINO EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA POR
INFRAVERMELHO PRÓXIMO E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA / Natana
Becker .

108 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2015.

"Orientação: Fabiana Ernestina Barcellos da Silva".

1. Valsartana. 2. Hidroclorotiazida. 3. Besilato de
Anlodipino. 4. Espectroscopia no Infravermelho Próximo. 5.
Métodos de Regressão Multivariada PLS, iPLS, siPLS. I. Título.

NATANA BECKER

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE VALSARTANA, HIDROCLOROTIAZIDA E
BESILATO DE ANLODIPINO EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA POR
INFRAVERMELHO PRÓXIMO E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para o grau de MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Desenvolvimento e controle de qualidade de fármacos, medicamentos e cosméticos.

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em: 21/08/2015.

Banca examinadora:

Prof. Dr^a. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva
Orientadora
UNIPAMPA

Prof. Dr. Rafael Roehrs
UNIPAMPA

Prof. Dr. Elton Luis Gasparotto Denardin
UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela vida, proteção, força, foco e fé nos momentos difíceis, por proporcionar-me muitos momentos felizes e por estar sempre comigo. Obrigada.

Aos meus pais Antonio e Bernadete, pelo constante apoio, incentivo, exemplo de vida, dedicação, amor, fé, força, e aos meus irmãos Anthony Naiã e Nataly, pela alegria e momentos felizes e amor incondicional que me proporcionam. Vocês são tudo para mim.

A professora Dr^a Fabiana Ernestina Barcellos da Silva, pela orientação, extrema paciência, ensino, apoio, incentivo, e amizade. Muito Obrigada.

À FAPERGS/CAPES pelo apoio financeiro durante a execução deste trabalho.

Ao Laboratório de Desenvolvimento e Controle de Qualidade de Medicamentos (LDCQ) pela infra-estrutura para a realização deste trabalho e também aos colegas do LDCQ pelo companheirismo, convivência, amizade, apoio.

Ao professor Dr^o Marco Flôres Ferrão, pelos grandes ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório LAQIA da Universidade Federal de Santa Maria, pela realização de alguns experimentos.

A amiga Gabriela Foresti pela amizade verdadeira, paciência nos momentos difíceis, apoio, ajuda na realização dos experimentos.

Ao meu amor Luiz Fernando, pelo apoio, incentivo, força, amor incondicional, paciência.

Ao amigo mestrando Willian pela paciência, ensinamentos e amizade e o amigo Zé Pedro, pelo apoio e grande amizade.

A grande amiga Gabriela de Souza, pela amizade verdadeira, companheirismo, apoio, incentivo incondicional e a mestra e amiga Liara, que mesmo longe sempre torceu e acreditou em mim, além da grande amizade.

A todos, que de alguma maneira, contribuíram para realização deste trabalho.

"O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pela dificuldades que superou no caminho".

Abraham Lincoln

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

RESUMO

Os fármacos valsartana (VAL), hidroclorotiazida (HCT) e besilato de anlodipino (ANL) são utilizados em associação e comercializados no Brasil como agentes anti-hipertensivos. Geralmente a determinação simultânea destes fármacos é realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Este trabalho teve por objetivo a determinação simultânea de VAL, HCT e ANL em uma formulação comercial de comprimidos através da técnica de espectroscopia no infravermelho próximo com transformada de Fourier e acessório de esfera de integração (FT-NIR) associadas a métodos de análise multivariada. Os modelos de calibração foram construídos utilizando mínimos quadrados parciais (PLS) e seleção de variáveis através dos algoritmos mínimos quadrados parciais por intervalo (iPLS) e mínimos quadrados parciais por sinergismo de intervalos (siPLS). Um total de 36 amostras sintéticas e 1 amostra real (26 amostras para o conjunto de calibração e 11 amostras para o conjunto de previsão), foram utilizadas as faixas de concentração de 261,9-500,0 mg g⁻¹ para VAL; 20,2-83,3 mg g⁻¹ para HCT e 11,6-49,6 mg g⁻¹ para ANL. Os dados espectrais foram adquiridos na faixa de 4000 a 10000 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹ por FT-NIR. Os melhores modelos foram obtidos através da utilização do pré-processamento centrado na média (CM) e do tratamento de correção do espalhamento de luz (MSC). O erro relativo de previsão (RSEP%) de 1,27% para VAL, 1,92% para HCT e 5,19% para ANL, foi obtido após seleção dos melhores intervalos por siPLS para dados obtidos por FT-NIR. Não foi encontrada diferença significativa (teste t-pareado, 95% de confiança) entre os valores do método de referência e do método proposto. Os resultados mostraram que modelos de regressão PLS (associados a métodos de seleção de variáveis, como iPLS e siPLS) combinados com FT-NIR são promissores no desenvolvimento de metodologias mais simples, rápidas e não destrutivas. Estes modelos permitem a determinação simultânea de VAL, HCT e ANL na formulação farmacêutica.

Palavras-chave: valsartana; hidroclorotiazida; besilato de anlodipino; espectroscopia no infravermelho próximo; métodos de regressão multivariada PLS, iPLS, siPLS.

ABSTRACT

Valsartan (VAL), hydrochlorothiazide (HCT) and amlodipine besylate (ANL) drugs are used in combination and they are commercialized in Brazil as antihypertensive agents. Generally, the simultaneous determination of these drugs is carried out by high performance liquid chromatography (HPLC). This study aimed to the simultaneous determination of VAL, HCT, and ANL in a commercial tablet formulation through the technique near infrared spectroscopy with Fourier transform and integrating sphere accessory (FT-NIR) associated with methods of multivariate analysis. The calibration models were built using partial least squares (PLS) and variable selection through partial least squares algorithms for interval (iPLS) and partial least squares by synergism intervals (siPLS). A total of 36 synthetic samples and commercial sample (26 samples for the calibration sample set and 10 for the prediction set), were used the concentration ranges of 261.9-500.0 mg g⁻¹ for VAL; 20.2-83.3 mg g⁻¹ for HCT and 11.6-49.6 mg g⁻¹ for ANL. The spectral data were acquired in the range 4000-10000 cm⁻¹ with resolution of 4 cm⁻¹ by FT-NIR. Multiplicative scatter correction (MSC) and the data centered in the media (CM) produced the best models. A relative standard error of prediction (RSEP%) of 1.27% for VAL, 1.92% for HCT and 5.19% for ANL was obtained after selection of the best intervals for data obtained by siPLS FT-NIR. There was no significant difference (paired t-test, 95% confidence) between the values of the reference method and the proposed method. Results showed that PLS models regression (associated with iPLS and siPLS regression models) combined with FT-NIR are promising in the development of simpler methods, rapid and non-destructive. These models allow simultaneous determination of VAL, HCT, and ANL in the pharmaceutical formulation.

Keywords: valsartan; hydrochlorothiazide; amlodipine besylate; near infrared spectroscopy; multivariate regression methods PLS, iPLS, siPLS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do besilato de anlodipino	21
Figura 2 - Estrutura química da hidroclorotiazida.....	22
Figura 3 - Estrutura química da valsartana.....	23
Figura 4 - Tipos de vibrações moleculares.....	27
Figura 5 - Esfera de Integração NIR.....	30
Figura 6 - Esquema do processo de calibração.....	34
Figura 7 - Matriz de variáveis independentes gerada através de dados espectroscópicos (a) e matriz de variáveis dependentes (b).	34
Figura 8 - FT-NIR com acessório esfera de integração.....	50
Figura 9 - Recipiente do FT-NIR para amostra.....	55
Figura 10 - Perfil do espectro da amostra sintética nº 20 (a) e da amostra real (b) por FT-NIR	59
Figura 11 - Valores medidos vs. valores previstos do modelo siPLS para VAL usando os intervalos 19, 29 e 31 por FT-NIR	68
Figura 12 - Erro relativo (%) para as 11 amostras do conjunto de previsão na determinação de VAL por siPLS	69
Figura 13 - Valores medidos vs. valores previstos do modelo siPLS para HCT usando os intervalos 19, 24 e 30 por FT-NIR	72
Figura 14 - Erro relativo (%) para as 11 amostras do conjunto de previsão na determinação de HCT por siPLS	73
Figura 15 - Valores medidos vs. valores previstos do modelo siPLS para ANL usando os intervalos 19, 29 e 30 por FT-NIR	76
Figura 16 - Erro relativo (%) para as 11 amostras do conjunto de previsão na determinação de ANL por siPLS	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos de determinação e quantificação envolvendo VAL, HCT e ANL	24
Tabela 2 - Composição das amostras sintéticas.....	53
Tabela 3 - Parâmetros usados na aquisição dos espectros FT-NIR.....	55
Tabela 4 - Variância e variância acumulada em função do número de CPs utilizadas	61
Tabela 5 - Amostras sintéticas e comprimido (VAL, HCT e ANL) presentes no conjunto de calibração, previsão e amostras excluídas (outliers)	63
Tabela 6 - Parâmetros do modelo global utilizando MSC e CM.....	64
Tabela 7 - Parâmetros dos modelos iPLS para VAL utilizando FT-NIR.....	65
Tabela 8 - Parâmetros dos modelos siPLS para VAL utilizando FT-NIR	67
Tabela 9 - Intervalos e vibrações correspondentes à determinação do fármaco VAL por FT-NIR	67
Tabela 10 - Parâmetros dos modelos iPLS para HCT utilizando FT-NIR	70
Tabela 11 - Parâmetros dos modelos siPLS para HCT utilizando FT-NIR.....	71
Tabela 12 - Intervalos e vibrações correspondentes à determinação do fármaco HCT por FT-NIR	71
Tabela 13 - Parâmetros dos modelos iPLS para ANL utilizando FT-NIR.....	74
Tabela 14 - Parâmetros dos modelos siPLS para ANL utilizando FT-NIR	75
Tabela 15 - Intervalos e vibrações correspondentes à determinação do fármaco ANL por NIR	75
Tabela 16 - Resultados médios da previsão de VAL.....	78
Tabela 17 - Resultados médios da previsão de HCT.....	79
Tabela 18 - Resultados médios da previsão de ANL.....	80
Tabela 19 - Principais parâmetros de mérito para determinação de VAL, HCT e ANL por FT-NIR	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANL - Besilato de anlodipino.

ANN - Redes neurais artificiais, do inglês *artificial neural networks*.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

ASTM - do inglês, *American Society for Testing and Materials*.

ATR - Reflexão total atenuada, do inglês *attenuated total reflection*.

A - Autoescalado.

BPF - Boas Práticas de Fabricação.

CM - Dados centrados na média.

CP - Componente principal.

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

cm⁻¹ - Centímetros Recíprocos.

FDA - *Food and Drug Administration*.

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

FTIR-ATR - Espectroscopia por reflexão total atenuada no infravermelho médio com transformada de Fourier (do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflection*).

FT-NIR - Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Near Infrared*).

GA - Algoritmos genéticos, do inglês *genetic algorithm*.

HCA - Análise de Agrupamentos Hierárquicos (do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*).

HCT - Hidroclorotiazida.

InGaAs - Índio-Gálio-Arsênio.

HPLC - do inglês (*High performance liquid chromatography* - Cromatografia líquida de alta eficiência).

iPLS - Mínimos Quadrados Parciais por Intervalo (do inglês, *Interval Partial Least Squares*).

IR - Espectroscopia na região do infravermelho, do inglês *infrared Spectroscopy*

KN - Kennard-Stone.

LDA - Análise discriminante linear, do inglês *linear discriminant analysis*.

MIR - Espectroscopia de Infravermelho Médio (do inglês, *Medium Infrared*).

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

MSC - Correção do Espelhamento de Luz (do inglês, *Multiplicativ Scatter Correction*).

NIR - Espectroscopia no Infravermelho Próximo (do inglês, *Near Infrared*).

PAT - Tecnologia analítica de processos, do inglês *process analytical technology*.

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

PLS-DA - Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (do inglês, *partial least squares discriminant analysis*).

PCR - Regressão de Componentes Principais (do inglês, *Principal Component Regression*).

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

R² - Coeficiente de determinação.

R - Coeficiente de correlação.

RMSE - Raiz Quadrada dos Erros Médios (do inglês, *Root Mean Square Error*).

RMSEC - Raiz Quadrada dos Erros Médios de Calibração (do inglês, *Root Mean Square Error Calibration*).

RMSECV - Raiz Quadrada dos Erros Médios de Validação Cruzada (do inglês, *Root Mean Square Error Cross Validation*).

RMSEP - Raiz Quadrada dos Erros Médios de Previsão (do inglês, *Root Mean Square Error Prediction*).

RMSEV - Raiz Quadrada dos Erros Médios de Validação (do inglês, *Root Mean Square Error Validation*).

RSEP - Erro Padrão de Previsão Relativo (do inglês, *Relative Standard Error of Prediction*).

SIMCA - Modelagem Independente de Analogia de Classes (do inglês, *Soft Independent Modeling by Class Analogy*).

siPLS - Mínimos Quadrados Parciais por Sinergismo de Intervalo (do inglês, *Synergy Interval Partial Least Squares*).

SQR - Substância química de referência.

USP - Farmacopéia Americana (do inglês, *United States Pharmacopoeia*).

UV - Ultravioleta.

VAL - Valsartana.

VL - Variáveis latentes.

VT - Variáveis totais.

Vs. - *Versus*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo gerais.....	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1	Controle de qualidade de produtos farmacêuticos	17
3.2	Hipertensão arterial	19
3.3	Associação de medicamentos anti-hipertensivos	19
3.4	Besilato de anlodipino (ANL)	20
3.5	Hidroclorotiazida (HCT)	21
3.6	Valsartana (VAL)	22
3.7	Técnicas analíticas utilizadas na quantificação de VAL, HCT e ANL	23
4	Espectroscopia na região do infravermelho	25
4.1	Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)	28
4.2	Espectroscopia no infravermelho próximo com acessório de esfera de integração - NIRA (do inglês - <i>Near Infrared Reflectance Spectroscopy Accessory</i>).....	29
4.3	Aplicações de espectroscopia no NIR	30
5	Quimiometria	31
5.1	Métodos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).....	35
5.2	Métodos de seleção de variáveis em modelos de regressão	40
5.3	Desenvolvimento e avaliação de modelos de calibração.....	41
5.4	Testes de significância	43
5.5	Validação dos modelos de calibração – Figuras de mérito em calibração multivariada.....	44
5.5.1	Linearidade	45
5.5.2	Precisão.....	45
5.5.3	Exatidão.....	46
5.5.4	Erro sistemático (<i>bias</i>).....	46
6	Uso de métodos espectroscópicos no NIR associados à ferramentas quimiométricas	48
7	MATERIAIS E MÉTODOS	50
7.1	Instrumentação	50
7.2	Reagentes.....	51
7.3	Matérias-primas e amostra real	51
7.4	Preparo de amostras sintéticas.....	52

7.5	Determinação de VAL, HCT e ANL por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na amostra real	54
7.6	Programas computacionais.....	54
7.7	Aquisição dos espectros por NIR	55
7.8	Construção dos modelos - Análise multivariada	56
7.9	Seleção das amostras dos conjuntos de calibração e previsão.....	56
7.10	Desenvolvimento dos modelos para a determinação de VAL, HCT e ANL	57
7.11	Avaliação dos modelos obtidos e figuras de mérito	58
7.12	Comparação entre os modelos de calibração através de testes de significância e avaliação dos resultados frente aos parâmetros farmacopeicos ...	58
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
8.1	Características gerais dos fármacos VAL, HCT e ANL	59
8.2	Detecção de amostras anômalas	60
8.3	Seleção das amostras para o conjunto de calibração e previsão	61
8.4	Determinação do número de variáveis latentes (VLs) utilizadas na construção dos modelos	64
8.5	Testes preliminares e otimização do modelo global PLS	64
8.6	Modelos iPLS para VAL.....	65
8.7	Modelos siPLS para VAL	66
8.8	Modelos iPLS para HCT.....	69
8.9	Modelos siPLS para HCT	70
8.10	Modelos iPLS para ANL.....	73
8.11	Modelos siPLS para ANL	74
8.12	Comparação dos valores medidos vs. valores previstos para as amostras de previsão ..	77
8.13	Resultados obtidos para os parâmetros de mérito em calibração multiavariada para os fármacos VAL, HCT e ANL	80
9	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXOS	108

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é considerada um grande problema de saúde pública nacional e mundial (CHOBANIAN et al., 2003; TOLEDO; RODRIGUES; CHIESA, 2007). Além disso, maioria dos portadores desta enfermidade não respondem bem à monoterapia. Desse modo, a terapia combinada, vem ao longo dos anos, destacando-se, como terapia de primeira escolha (ESCOBAR; BARRIOS, 2009; GRADMAN et al., 2010; NIEMEIJER; CLEOPHAS, 2009).

Os fármacos anti-hipertensivos vêm sendo usados em terapia combinada, devido à natureza multifatorial da hipertensão, para que o controle da pressão arterial possa ser alcançado (ALLEMAN et al., 2008, HUSSEIN et al., 2010). A terapia combinada aumenta a segurança e eficácia das formulações. Além disso, é mais eficiente para controlar a pressão arterial através de efeitos sinérgicos e aditivos, tendem a atenuar os efeitos secundários de cada molécula e diminuem o custo financeiro para o paciente, aumentando, dessa forma, sua adesão ao tratamento (HUSSEIN et al., 2010).

Hoje em dia estão disponíveis várias associações que combinam dois ou mais agentes anti-hipertensivos com mecanismos de ação complementares. Neste contexto, as diretrizes recomendam associações de um inibidor do sistema renina - angiotensina, um bloqueador do canal de cálcio e um diurético. A combinação tripla de VAL, HCT e ANL tem mostrado ser uma terapia eficaz e segura para o tratamento da hipertensão (BARRIOS; ESCOBAR, 2010).

Afim de garantir a qualidade desta associação de medicamentos, é necessário avaliar um conjunto de fatores, tais como: características químicas, físicas e microbiológicas das matérias-primas, produtos em processo, acabados e embalagens (BRASIL, 2010; GIL, 2010; GOMES; REIS, 2006).

Durante o controle de qualidade são exigidos métodos analíticos confiáveis, que têm por objetivo produzir resultados analíticos que refletem o teor das amostras com um nível aceitável de precisão (FEINBERG, 2007). A ausência de interferentes na análise é um início importante para o desenvolvimento de métodos (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Desta forma, o desenvolvimento de métodos para a quantificação de associações está baseado na separação analítica dos sinais sobrepostos. Entre os métodos largamente utilizados na quantificação de fármacos isolados e em associação, a cromatografia líquida é a técnica de escolha. Trabalhos têm sido descritos nas determinações de VAL, HCT e ANL isoladamente (ABDEL-WADDOD; MOHAMED; MAHMOUD, 2008; NATARAJ *et al.*, 2011, TAGLIARI, et al., 2008).

Existem alguns trabalhos na literatura descrevem metodologias analíticas para a quantificação da associação tripla dos anti-hipertensivos VAL, HCT e ANL por métodos cromatográficos (DARWISH et al., 2013b; EL-GIZAWY et al., 2012; GADEPALLI et al., 2013; JOTHIESWARI et al., 2010; SHAALAN; BELAL, 2012; SHALAN et al., 2013; VARGHESE; RAVI, 2011; VIGNADUZZO; CASTELLANO; KAUFMAN, 2011; VOJTA et al., 2015; YOUNUS et al., 2010) e espectrofotométricos por UV (ANANDAKUMAR; JAYAMARIAPPAN, 2011, GALANDE et al., 2012; NIKAM et al., 2010)

Segundo Barthus; Mazo; Poppi (2007) nos últimos anos, o uso de métodos espectroscópicos aliados à calibração multivariada tem-se mostrado um meio eficaz e rápido para a determinação de diversos tipos de substâncias em amostras farmacêuticas, além de alternativo a outros métodos de quantificação (BARTHUS; MAZO; POPPI, 2007). Alguns estudos demonstram o uso de técnicas espectrofotométricas em conjunto com métodos de calibração multivariada para a determinação de fármacos isolados (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013; FERREIRA, GOMES; SENA, 2009; PARISOTTO et al., 2007; ROCHA et al., 2010) e em associação (MÜLLER et al., 2011, NAGAVALLI et al., 2010, SILVA et al., 2009).

A espectroscopia NIR em conjunto com ferramentas quimiométricas é considerada uma metodologia rápida, não-destrutiva e tornou-se bem atrativa nos últimos tempo, por não utilizar solventes orgânicos, gerar menor quantidade de resíduos, fornecer resultados satisfatórios e portanto, podendo ser chamada de sustentável. Outro fator importante do método é a menor intervenção humana na análise, com menor manipulação da amostra, proporcionando, desse modo, resultados sensíveis e exatos (PASQUINI, 2003; LIMA; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013). Além disso, é amplamente aplicada em Tecnologia Analítica de Processos (PAT), que monitora diferentes etapas da linha de produção de medicamentos, com o objetivo de fornecer resultados confiáveis de forma simples (JAMRÓGIEWICZ, 2012).

Para Darwish e colaboradores (2013a) foi possível quantificar simultaneamente os fármacos VAL, HCT e ANL por espectroscopia UV (ultravioleta) associada à regressão por mínimos quadrados parciais - PLS e regressão dos componentes principais PCR (do inglês - *Principal Component Regression*). Já Darwish e colaboradores (2014) quantificaram esta associação tripla usando espectroscopia UV(ultravioleta) associada à PLS, ANN (Redes Neurais Artificiais) sem e com o uso do algoritmo de seleção de variáveis GA (algoritmo genético). Os autores propuseram estes métodos como alternativos ao método por CLAE (DARWISH et al., 2013a; DARWISH et al., 2014). Entretanto, não utilizam os métodos de seleção de variáveis por mínimos quadrados parciais por intervalo (iPLS) e por mínimos quadrados parciais por sinergismo de intervalo (siPLS). Além disso, até o presente momento,

são poucos os artigos que quantificam mais de dois fármacos simultaneamente, usando espectroscopia no infravermelho (BLANCO; ALCALÁ, 2006b; NEVES et al., 2012; PIANTAVINI et al., 2014). Não foi encontrado na literatura uma metodologia para quantificação simultânea destes fármacos, utilizando o método PLS e de seleção de variáveis iPLS e siPLS associados à espectroscopia NIR.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo gerais

O objetivo do presente trabalho é desenvolver um método analítico alternativo para a determinação simultânea dos fármacos VAL, HCT e ANL em formulação farmacêutica, através do uso de espectroscopia FT-NIR e acessório de esfera de integração associados à métodos de regressão multivariados.

2.2 Objetivos específicos

- (a) Desenvolver uma metodologia por espectroscopia FT-NIR para a determinação simultânea de VAL, HCT e ANL em formulação farmacêutica;
- (b) Utilizar métodos de regressão multivariada como o algoritmo PLS no desenvolvimento de modelos quimiométricos e escolher os melhores pré-processamentos e tratamentos de dados;
- (c) Utilizar métodos de regressão multivariada como algoritmos de seleção de variáveis (iPLS e siPLS) no desenvolvimento de modelos quimiométricos;
- (d) Comparar o método proposto por espectroscopia FT-NIR com o método de referência.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Controle de qualidade de produtos farmacêuticos

O controle de qualidade é definido como o conjunto de processos capazes de assegurar que os ensaios necessários sejam executados e que os produtos não sejam liberados antes de garantir sua qualidade. Tem por objetivo avaliar características químicas, físicas e microbiológicas de matérias-primas, produtos em processo, acabados e embalagens, envolvendo todas as decisões ligadas à qualidade do produto (BRASIL, 2010; GIL, 2010; GOMES; REIS, 2006).

Nas indústrias farmacêuticas o controle de qualidade tem por objetivo diminuir os riscos em cada etapa do processo, sendo que uma das etapas está voltada ao controle de qualidade da formulação, durante a produção de medicamentos, e outra etapa está ligada ao controle de qualidade do produto final. Nestas duas etapas são exigidos métodos de análises confiáveis e robustos, através de órgãos reguladores, afim de garantir segurança na qualidade do produto final, podendo, dessa forma, ser usados rotineiramente. Essas exigências dizem respeito ao cumprimento das Boas Práticas de Fabricação (BPF) (BRASIL, 2003). Além disso, o controle de qualidade estabelece, valida e executa procedimentos, assegura rotulagem correta de recipientes de materiais, produtos e avalia os produtos acabados desde a produção até a embalagem dos mesmos (BRASIL, 2010; GIL, 2010; GOMES; REIS, 2006).

As BPF estabelecem normas e procedimentos técnicos para produção de medicamentos, com o objetivo de garantir a qualidade sanitária e a conformidade dos produtos farmacêuticos seguindo suas especificações de registro (GIL, 2010; BRASIL, 2010).

A garantia de qualidade, eficácia e segurança de medicamentos torna-se cada vez mais necessária, devido ao aumento do número de indústrias, aumento da demanda e da falsificação de medicamentos. É indispensável aperfeiçoar, avaliar processos de produção e assegurar padrões de qualidade capazes de garantir a segurança e eficácia do medicamento (PINTO; KANEKO; OHARA, 2000).

As metodologias mais usadas no controle de qualidade são: a espectroscopia UV e CLAE para separação de misturas mais complexas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010, USP 32, 2009). No entanto, nestas metodologias, principalmente em CLAE, os métodos são demorados, requerem uso de solventes, geram resíduos que prejudicam o meio ambiente, não são técnicas “verdes”, necessitam de pessoas qualificadas para operar o equipamento.

A espectroscopia NIR tem sido usada para contornar os problemas apresentados pelas técnicas convencionais. É altamente aplicada na indústria, pelo fato de ser uma técnica não destrutiva, com curto tempo de análise, sendo fundamental na implementação da Tecnologia Analítica de Processos (PAT), que monitora diferentes etapas da linha de produção afim de identificar parâmetros críticos, desvios, para cada estágio tecnológico em tempo real, visualiza a evolução e caracterização do processo, com o objetivo de fornecer resultados confiáveis de forma simples (JAMRÓGIEWICZ, 2012).

Em PAT são usados controles de processos *off-line*, *at-line*, *in-situ*, *on-line* e *in-line*, ou seja, métodos de amostragem aplicados aonde deseja-se adquirir um espectro no NIR de uma amostra. No método *off-line* a amostragem é manual com o transporte para o laboratório, já no método *at-line* a amostra é obtida manualmente e analisada próxima a linha de produção. No método *in-situ* é colocada uma sonda no recipiente em contato direto com o meio para realizar a medição no NIR. No método *on-line* a amostra é desviada da linha de produção e é medida automaticamente, podendo voltar ao mesmo e no método *in-line* a medida é realizada automaticamente, dentro de um reator ou liofilizador e amostra não é removida da linha de produção (CEITIL, 2007, MAGALHÃES, 2014; MÄRK et al., 2010). Para Jamrógiewicz (2012) espectroscopia NIR é adequada para controles de processos *on-line*, *in-line* e *at-line* (JAMRÓGIEWICZ, 2012).

Grande parte das formulações farmacêuticas apresentam-se disponível na forma de comprimido, seu processo de fabricação geralmente é complexo e envolve vários passos, que devem ser controlados para garantir a qualidade dos mesmos. Desse modo, espectroscopia NIR é usada em processos farmacêuticos com a finalidade de determinar os parâmetros críticos em tempo real, que afetam diretamente a qualidade dos produtos (BLANCO; ALCALÁ, 2010; BLANCO; MESTANZA; PEGUERO, 2010; MOES et al., 2008).

Na indústria farmacêutica, a espectroscopia NIR é aplicada em várias etapas do processo produtivo, tais como caracterização e monitoramento de pseudo-polimorfos no processo de fabricação (KAMADA et al. 2009), determinação do princípio ativo e conservantes em uma formulação farmacêutica de hidrogel (BLANCO; ALCALÁ; BAUTISTA, 2008), estudo das propriedades físicas dos pós nos produtos farmacêuticos (SARRAGUÇA; CRUZ; SOARES, 2010), no controle de processo na quantificação de um ou mais princípios ativos nas formas farmacêuticas sólidas (ITO et al., 2010; BLANCO; MESTANZA; PEGUERO, 2010) além de outras aplicações como determinação de dureza, friabilidade, tempo de desintegração, uniformidade de conteúdo em comprimidos (PESTIEAU et al., 2014).

Wang e colaboradores (2011) utilizaram a espectroscopia NIR como método de monitoramento em linha (*in-line*) no processo de resfriamento e cristalização do paracetamol. Os resultados do estudo demonstraram-se semelhantes com os resultados de técnicas de referência, desse modo, esta técnica pode ser aplicada durante os processos farmacêuticos (WANG et al., 2011).

3.2 Hipertensão arterial

A hipertensão arterial caracteriza-se pela variação da pressão arterial sistólica e diastólica dentro dos vasos sanguíneos, em geral maiores que 140 mmHg e 90 mmHg (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

Quando a pressão arterial sistólica e diastólica atingem níveis superiores a 140 mmHg e 90 mmHg o indivíduo é considerado hipertenso (CARRETERO; OPARIL, 2000; CHOBANIAN et al., 2003). A alta prevalência desta enfermidade faz com que aumente as doenças cardiovasculares, responsáveis por 30% dos óbitos no mundo (LAWES et al., 2008). Diante disso, hipertensão arterial tem se tornado um importante problema de saúde pública, estimando-se que mais de um bilhão da população seja atingida pela doença até 2025, caso não ocorra mudanças nos hábitos alimentares, prática de exercícios físicos (KEARNEY et al., 2005).

O tratamento não medicamentoso para manter a pressão arterial controlada pode ser realizado por meio de exercícios físicos com frequência, mudança nos hábitos de vida, como deixar de ingerir álcool, fumar, fazer uma dieta sem gordura e pouco salgada. Porém, quando há um comprometimento maior dos órgãos alvos dessa enfermidade, faz-se necessário o uso de medicamentos para controle da hipertensão arterial (ARAÚJO, 2001).

3.3 Associação de medicamentos anti-hipertensivos

Há alguns anos vem sendo observado uma maior atenção no tratamento da hipertensão, por meio da combinação de medicamentos anti-hipertensivos (LIU, 2011; MANCIA et al.,

2009), devido à natureza multifatorial da hipertensão (ALLEMANN et al., 2008; HUSSEIN et al, 2010), e já que grande parte da população necessita uma terapia combinada para que o controle da pressão arterial possa ser alcançado (ALLEMANN et al.,2008; GRADMAN et al., 2010; HUSSEIN et al, 2010).

Hoje em dia, estão disponíveis as associações triplas de medicamentos para controlar a pressão arterial. Calhou e colaboradores (2009) avaliaram a associação de três classes de anti-hipertensivos: bloqueadores dos receptores de angiotensina II, antagonistas de canais de cálcio e tiazídicos em hipertensos moderados ou graves, e associação de duas destas classes, e observou-se redução significativa da pressão arterial em pacientes em terapia tripla de medicamentos destas classes, sendo que estes benefícios foram independentes de raça, sexo, etnia (CALHOUN et al., 2009).

Pesquisas realizadas com combinações triplas de medicamentos anti-hipertensivos comprovaram que menos comprimidos podem melhorar adesão dos pacientes ao tratamento e melhorar os resultados clínicos (JULIUS et al., 2004). Além disso, fármacos para hipertensão com mecanismos de ação diferentes proporcionam maior bloqueio do mecanismo pressórico (SOUSA; PIMENTA; BORELLI, 2009).

A combinação tripla de valsartana, besilato de anlodipino e hidroclorotiazida tem mostrado ser uma terapia eficaz e segura para o tratamento da hipertensão (BARRIOS; ESCOBAR, 2010).

Devido a relevância da hipertensão arterial, faz-se necessário o uso metodologias confiáveis e rápidas para o controle de qualidade dos medicamentos, que são utilizados no tratamento desta enfermidade (SANTOS, 2009).

3.4 Besilato de anlodipino (ANL)

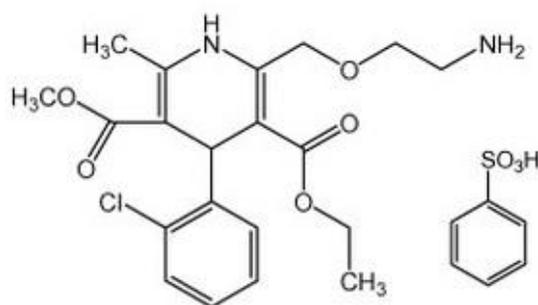
O anlodipino, tanto na forma de sal besilato, maleato e mesilato, é um medicamento que pertence à classe das dihidropiridinas, bloqueador do canal de cálcio e redutor da pressão arterial (HARIA; WAGSTAFF, 1995; MURDOCH; HEEL, 1991).

No mercado farmacêutico o anlopinino, encontra-se, mais frequentemente na forma de sal (Figura 1) denominado benzenossulfonato de (R, S)-3-etil 5-metil 2-[(2-aminoetoxi)methyl]-4-(2-clorofenil)-6-metil-1,4-dihidropiridina- 3,5-dicarboxilato [42], com peso molecular de 567, 1 g mol^{-1} , fórmula química de $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_8\text{S}$ (MERCK INDEX, 2001). Apresenta-se

como um pó branco, solúvel em metanol e etanol e pouco solúvel em 2-propanol e água (BRITISH PHARMACOPEIA, 2007; FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2002; MERCK INDEX, 2001). Possui quatro formas distintas: amorfa, anidra, monohidratada e dihidratada, coeficiente de partição de 1,9 (KORADIA et al.,2010) e pKa de 8,7 (MERCK INDEX, 2001; ZWIETEN, 1994). Em sua estrutura contém um carbono quiral, contendo dois isômeros S(-) e R(+), com diferentes características farmacológicas (KIM et al., 2009), sendo usado na terapia como uma mistura racêmica. Entretanto, seu efeito, corresponde à forma S, que é muito mais ativa (JOSHI; KARBHARI; BHOIR, 2009).

A biodisponibilidade do besilato de anlodipino durante a administração por via oral é de 60 a 65%. Quando administrado na forma de cápsulas ou comprimidos, é absorvido de forma lenta, atingindo as concentrações plasmáticas de 6 a 8 horas. O seu tempo de meia-vida de eliminação é de 40 a 50 horas e sua eliminação é realizada por meio das vias renais (MEREDITH; ELLIOTT, 1992).

Figura 1 - Estrutura química do besilato de anlodipino



Fonte: USP 32, 2009.

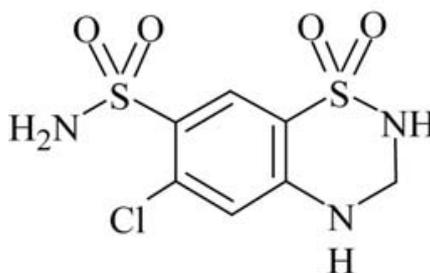
3.5 Hidroclorotiazida (HCT)

A hidroclorotiazida (HCT), também conhecida como 1,1-dióxido de 6-cloro-3,4-diidro-2H-1,2,4-benzotiazina-7-sulfonamida, com fórmula empírica de $C_7H_8ClN_3O_4S_2$. Apresenta-se como um pó cristalino branco, inodoro, pouco solúvel em água e etanol, solúvel em acetona e soluções diluídas de hidróxidos alcalinos, com ponto de fusão de 266°C a 270°C (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010) e valores de pka de 9,2 e 7,9 (nos agrupamentos

aminas) (ANVISA, 2015), cuja estrutura é apresentada na Figura 2, é um diurético tiazídico que atua nos rins, aumentando o fluxo urinário, a excreção de cloreto de sódio e água. Sua função é inibir a reabsorção de Na^+ (sódio) e Cl^- (cloreto) (GOODMAN; GILMAN, 2006).

O fármaco HCT encontra-se em torno de 70% biodisponível, e durante a ingestão de alimentos o tempo e concentração plasmática se reduzem a 20% (MELIAN; JARVIS, 2002). Após a dose oral, sua absorção é em torno de 2 horas, com meia-vida de eliminação de 6 a 15 horas. É excretada na urina, sendo que sua eliminação renal é de 95% (MARTINDALE, 1996; GODMAN, GILMAN, 2006). Atua como anti-hipertensivo, devido a sua ação sobre os vasos sanguíneos, que ocasiona uma vasodilatação capaz de inibir o crescimento vascular e diminuir a pressão arterial (ZHU et al., 2005).

Figura 2 - Estrutura química da hidroclorotiazida

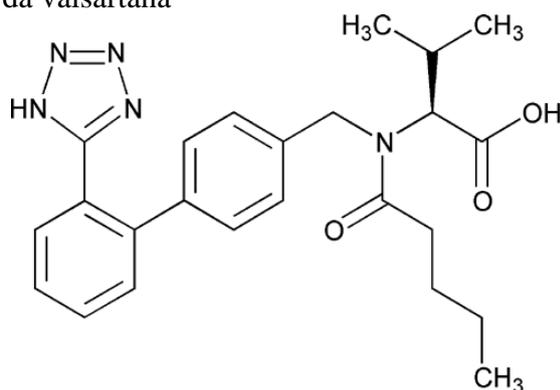


Fonte: Farmacopéia Brasileira, 2010.

3.6 Valsartana (VAL)

A valsartana (VAL) é conhecida como((S)-N-valeril-N-[29-(1H-tetrazol-5-il) bifenil-4-il)-metil]-valina), com fórmula empírica $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_3$, cuja estrutura está representada na Figura 3, seu peso molecular é 435,52g /mol (USP 32, 2009). Apresenta-se como pó branco, muito solúvel em acetonitrila, metanol, etanol e pouco solúvel em água. Tem ponto de fusão na faixa de 105-110°C. Seu pKa varia de 3,9 para 4,73 (SIDDIQUI et al, 2011).

Figura 3 - Estrutura química da valsartana



Fonte: USP 32, 2009.

Este fármaco é um derivado tetrazólico, usado para tratar a hipertensão arterial, atuando como antagonista dos receptores de angiotensina II, com afinidade relativa por receptores AT₁ (DEEKS, 2009; RIBEIRO; MUSCARÁ, 2001), podendo ser administrado isolado ou em associação com outros diuréticos ou anti-hipertensivos. Além de reduzir a pressão arterial inibe o fluxo simpático, diminui a contração do músculo liso vascular, é capaz de melhorar a função renal e reduz lesões ateroscleróticas (SIDDIQUI et al, 2011). Encontra-se 25% biodisponível, com meia vida de eliminação de 6 horas (RIBEIRO; MUSCARÁ, 2001). Sua absorção é rápida quando administrado por via oral, atingindo o pico de concentração plasmática de 2 a 3 horas (SIDDIQUI et al, 2011).

3.7 Técnicas analíticas utilizadas na quantificação de VAL, HCT e ANL

Na literatura são encontradas várias fontes que quantificam VAL, HCT e ANL simultaneamente, utilizando diversas técnicas, sendo as mais comuns a espectroscopia no UV e CLAE. A primeira técnica se caracteriza por ser mais simples, devido à rapidez e ao baixo custo de análise, enquanto a segunda é mais demorada e exige maior tempo, de acordo com o método a ser aplicado. Entretanto, CLAE permite uma determinação e quantificação mais precisa e exata, e, na maior parte das vezes, é capaz de identificar o composto de interesse em meios mais complexos, ou quando existe a presença de mais de um fármaco.

A Tabela 1 mostra alguns dos mais recentes métodos empregados para análise de VAL, HCT e ANL.

Tabela 1 - Métodos de determinação e quantificação envolvendo VAL, HCT e ANL

Amostra	Método	Coluna	Fase móvel	Referência
VAL, HCT e ANL (associação)	CLAE	Hypersil C ₁₈ (150 mm × 4,6 mm)	Acetonitrila Tampão fosfato pH 6,8 (55:45)	(YOUNUS et al., 2010).
	CLAE	Phenomenex Luna C ₁₈ (150 mm × 4,6 mm)	(Gradiente) Tampão acetato de amônio 10 mM pH 6,7 Metanol	(VARGHESE; RAVI, 2011).
	CLAE	C ₁₈ (150 mm × 4,6 mm)	Metanol 68% Tampão fosfato pH 5,5 32%	(VIGNADUZZO et al., 2011).
	CLAE	Phenomenex Luna C ₁₈ (150 mm × 4,6 mm)	Acetonitrila 20% Metanol 50% Tampão fosfato 50mM pH 3 30%	(JOTHIESWARI et al., 2010).
	CLAE	Phenomenex Kinetex C ₁₈ (150 mm × 4,6 mm)	Acetonitrila 40% Tampão fosfato 0,05M (pH 3) 60%	(EL-GIZAWY et al., 2012).
	CLAE	Zorbax SB-C ₈ (250 mm X 4,6 mm)	(Gradiente) Ácido fosfórico 0,025 M Acetonitrila	(SHAALAN; BELAL, 2012).
	CLAE	Zorbax SB-C ₈ (250 mm X 4,6 mm)	(Gradiente) Ácido fosfórico 0,025 M: Acetonitrila	(SHAALAN et al., 2013).
	CLAE	Nucleosil C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm)	Acetonitrila 55% Metanol 41% Álcool isopropílico 4% pH 8	(DARWISH et al., 2013b)
	CLAE-ESI-MS/MS (cromatografia líquida acoplada a massas com ionização eletrospray)	Aquasil C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm)	Acetonitrila 50% Água 50% Ácido fórmico 0,1%	(GADEPALLI et al., 2013)
	CLUE (cromatografia líquida de ultra eficiência)	Zorbax Eclipse Plus C ₈ RRHD (100 mm x 3,0 mm)	(Gradiente) Tampão fosfato 0,01% pH 2,5 Acetonitrila	(VOJTA et al., 2015)

Anadakumar; Jayamariappan (2011) desenvolveram um método por espectroscopia UV para determinação de VAL, HCT e ANL. VAL foi analisada em 250 nm, HCT em 315 nm e ANL em 365 nm. Nikam e colaboradores (2010) desenvolveram um método por espectroscopia UV derivada para determinação de VAL, HCT e ANL. VAL foi analisada em 245 nm, HCT em 279 nm e ANL em 265 nm. Galande e colaboradores (2012) desenvolveram um método por espectroscopia UV para determinação de VAL, HCT e ANL. VAL foi analisada em 317 nm, HCT em 250 nm e ANL em 359 nm. Os métodos propostos pelos diferentes autores podem ser usados para quantificação destes fármacos (ANANDAKUMAR; JAYAMARIAPPAN, 2011; GALANDE et al., 2012; NIKAM et al., 2010).

Darwish e colaboradores (2013) quantificaram simultaneamente a VAL, HCT e ANL por espectroscopia UV derivada associada ao algoritmo PLS e PCR. Já Darwish e colaboradores (2014) quantificaram esta associação tripla usando espectroscopia UV associada à PLS, ANN sem e com o uso do algoritmo de seleção de variáveis GA. Nestes estudos, os autores desenvolvem metodologias por espectroscopia UV associadas à modelos de regressão por PLS como alternativa à determinação simultânea dos fármacos por CLAE (DARWISH et al., 2013a, DARWISH et al., 2014).

4 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia está fundamentada em absorver energia eletromagnética por moléculas, que depende da concentração e da estrutura das mesmas, ou seja, é a ciência que estuda as interações das moléculas com a radiação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Os métodos espectroscópicos são capazes de medir a quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas, sendo classificados de acordo com a região do espectro eletromagnético presente nessa medida (PAVIA et al., 2012).

As informações importantes em relação a propriedades e composição de materiais podem ser fornecidas qualitativamente e/ou quantitativamente pelas análises espectroscópicas. As técnicas espectroscópicas vêm sendo aplicadas nas indústrias desde a década de 50, e após o surgimento da quimiometria e dos espectrofotômetros com transformada de Fourier (FT-IR).

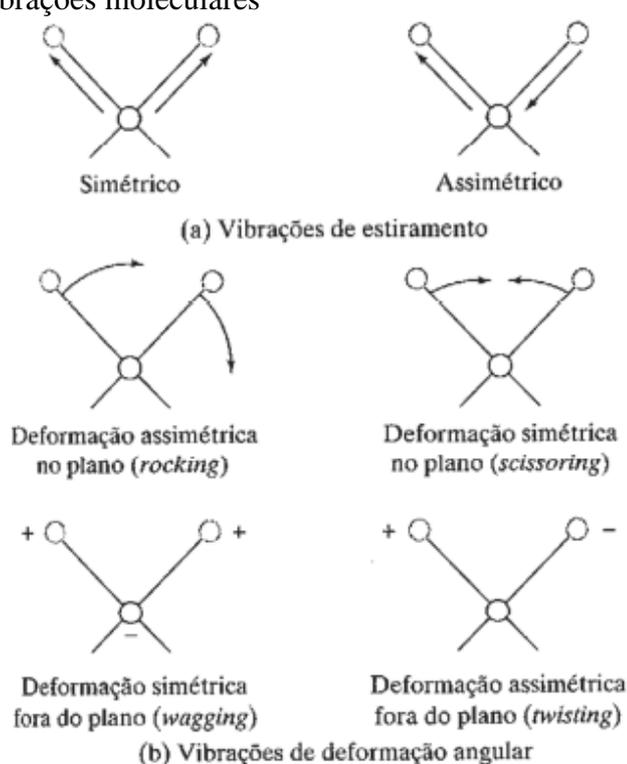
São usadas em várias áreas da pesquisa, tornando-se indispensáveis para o controle de qualidade nas indústrias e na agricultura (SIESLER et al., 2002).

A região do infravermelho (IV) corresponde à parte do espectro eletromagnético localizada entre as regiões do visível e das micro-ondas, e é subdividida em três regiões: infravermelho próximo, médio e distante (PAVIA et al., 2012; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010; VOGEL, 2008). O número de onda é representado em centímetros recíprocos (cm^{-1}), sendo diretamente proporcional à energia. A região do infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near Infrared*) encontra-se na faixa de 12500 a 4000 cm^{-1} , já a região do infravermelho médio (MIR, do inglês *Medium Infrared*) encontra-se na faixa de 4000 a 200 cm^{-1} e a região do infravermelho distante (FIR, do inglês *Far Infrared*) encontra-se na faixa de 200 a 10 cm^{-1} (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; PAVIA et al., 2012; VOGEL, 2008).

A radiação IV não contém energia satisfatória para produzir as transições eletrônicas. Todavia, é capaz de induzir mudanças nos estados vibracionais e rotacionais associados ao estado eletrônico fundamental da molécula. As ligações que absorvem radiação no infravermelho, devem apresentar um momento dipolo com consequência do seu movimento rotacional ou vibracional (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; PAVIA et al., 2012)

Quando a radiação é absorvida pela molécula, ocorrerem diferentes tipos de movimentos vibracionais, tais como: vibrações de estiramento (ou deformação axial) e as vibrações de movimento (ou deformação angular). As vibrações de deformação axial ocorrem através da mudança contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos, aumentando ou diminuindo alternadamente. No momento em que o movimento da distância interatômica for harmônico, o estiramento é simétrico. Se o movimento for desarmônico, o estiramento é assimétrico. Nas vibrações de deformação angular acontece a modificação de ângulo entre duas ligações, podendo ser representadas em quatro tipos de vibrações, de acordo com o seu movimento: vibrações de dobramento simétrica no plano (tesoura) e fora do plano (oscilação) e vibrações de dobramento assimétricas no plano (balanço) e fora do plano (torção). A Figura 4 demonstra os tipos de vibrações moleculares ocorridos no momento em que a radiação IV é absorvida pela molécula. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; PAVIA et al., 2012).

Figura 4 - Tipos de vibrações moleculares



Fonte: Holler; Skoog; Crouch, 2009.

A absorção de radiação na região do IV é capaz de fornecer informações sobre a identidade dos compostos na ausência ou na presença da estrutura de moléculas e grupos funcionais. Desse modo, é uma técnica amplamente aplicada, devido ao fato de que praticamente todas moléculas conseguem absorver no infravermelho, exceto moléculas homonucleares, tais como O₂, N₂ ou Cl₂ (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Os espectros no IV podem ser adquiridos através de métodos de transmissão e reflexão (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). O método de transmissão baseia-se na passagem da radiação infravermelha na amostra, em que parte é absorvida em número de ondas específicos e outra é transmitida, podendo ser utilizada para amostras líquidas, sólidas e gasosas. Muitas vezes a espessura da pastilha dificulta a reprodutibilidade do caminho óptico, tornando-se inadequada para análises quantitativas. Os métodos de reflexão podem ser através de reflexão interna como o Refletância Total Atenuada ou por reflexão externa que pode ser difusa ou especular (STUART, 2004). A reflexão é comumente usada para análise qualitativas ou quantitativas de borracha, alimentos, resinas, fármacos (BARBOSA, 2007; STUART, 2004).

A espectroscopia no IV vem sendo utilizada com frequência, pois não requer preparo de amostra, pode ser usada para fins qualitativos e quantitativos, é uma técnica rápida, não

destrutiva, mínimo preparo de amostra e menor geração de resíduos. Tendo em vista que o presente trabalho utilizou para aquisição dos espectros um espectrofotômetro FT-NIR com o acessório esfera de integração também conhecido pela sigla NIRA (do inglês *Near Infrared Reflectance Spectroscopy Accessory*), na sequência, será dado destaque a estas técnicas.

4.1 Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)

A espectroscopia NIR abrange a região compreendida entre 12500 a 4000 cm^{-1} . Devido as absorções das bandas apresentarem baixa intensidade, ocorrem sobreposições e combinações das ligações C-H, O-H e N-H dos vários grupos funcionais, gerando espectros complexos e difíceis de compreender. Desse modo, técnica NIR é mais utilizada em análises quantitativas de compostos contendo as ligações descritas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

Os espectros do NIR exibem sobretons (*overtones*) de vibrações fundamentais e bandas de combinação de vibrações fundamentais. Estas bandas de combinação vão ocorrer quando dois modos vibracionais são excitados concomitantemente e duas frequências vibracionais ligam-se em uma molécula, gerando uma nova frequência de vibração dentro da molécula (KELLNER et al., 2004; NAES et al., 2002), ou seja, as duas frequências serão soma dos múltiplos de cada frequência de interação. Já os sobretons são transições que resultam de frequências vibracionais $\Delta v = \pm 2$ e $\Delta v = \pm 3$ nos níveis energéticos. Tanto a combinação de vibrações como os sobretons ocorrem em oscilações anarmônicas (SKOOG et al, 2006).

No NIR as regiões espectrais observadas devem-se quase totalmente às bandas de absorção relacionadas aos sobretons de transições fundamentais e as combinações de transições que ocorrem no MIR (PASQUINI, 2003).

As bandas no NIR são aproximadamente de 10 a 100 vezes mais fracas quando comparadas às transições fundamentais no MIR, de onde originam-se (LIMA et al., 2009). Entretanto, estas bandas fracas possibilitam uma análise direta de matrizes com fortes absorções e com alta dispersão de luz, como por exemplo pastas, suspensões, pós (ARNOLD et al., 2002).

O espectrômetro NIR é composto de uma fonte luz, um sistema óptico e um detector de sinal. A fonte luz contém uma lâmpada de halogênio. Os detectores de silício são úteis para menores comprimentos de onda, já os detectores de sulfeto de chumbo (PbS) ou índio-gálio-arsênio (InGaAs) são utilizados para maiores comprimentos de onda. Estes detectores podem

gerar medidas com alta relação sinal/ruído, compensando parcialmente a baixa intensidade das bandas de absorção na região do infravermelho próximo. Atualmente, são mais utilizados os espectrômetros de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR, do inglês *Fourier Transform Near Infrared*), pois além da alta razão sinal/ruído, apresenta varredura rápida, resolução constante em todo espectro, tempo de análise reduzido e permite a leitura espectral em amostras em movimento (PASQUINI, 2003).

O modo refletância é o mais utilizado em NIR, devido a razão espalhamento/absorção ser maior nesta região, permitindo, desse modo, análises de líquidos e sólidos sem necessitar do preparo da amostra (OLIVEIRA, 2008; VOGEL, 2008).

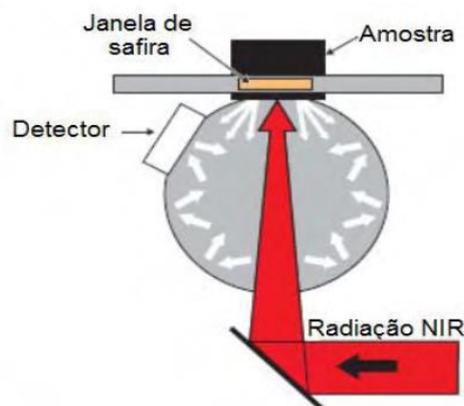
Para Siesler e colaboradores (2002), apesar da dificuldade na interpretação dos espectros, a espectroscopia NIR tem como vantagens ser um método não destrutivo usado para líquidos e sólidos, onde não há preparo de amostra, rapidez na obtenção dos espectros, gera poucos resíduos, pois não usa solventes, pode ser usado para detectar impurezas ou alterações nos produtos (SIESLER et al., 2002).

4.2 Espectroscopia no infravermelho próximo com acessório de esfera de integração - NIRA (do inglês - *Near Infrared Reflectance Spectroscopy Accessory*)

A espectroscopia NIR com acessório esfera de integração - NIRA (*Near Infrared Reflectance Spectroscopy Accessory*) é uma ótima ferramenta para análises qualitativas e quantitativas. Esta técnica combina a refletância difusa e especular, obtendo uma detecção uniforme, mesmo em amostras heterogêneas e baixos efeitos de polarização provenientes do feixe de iluminação e da amostra. Além disso, proporciona uma melhor relação sinal/ ruído e possui um detector Índio-Galio-Arsênio (InGaAs) (PERKIN ELMER, 2010).

Na técnica de reflexão difusa a radiação NIR entra no acessório esfera de integração e passa por uma janela de safira até incidir na amostra e interagir com a mesma, assim, é refletida de maneira difusa. A radiação refletida retorna a esfera vai em direção ao detector de InGAAs depois de reflexões múltiplas na parede da esfera. A radiação NIR que for dispersada é coletada com alta eficiência (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2008). A Figura 5 apresenta a esfera de integração com radiação NIR.

Figura 5 - Esfera de Integração NIR



Fonte: Thermo Fisher Scientific, 2008.

4.3 Aplicações de espectroscopia no NIR

Recentemente a espectroscopia NIR vem sendo aplicada em várias áreas, tais como agricultura (SALGUERO-CHAPARRO et al., 2013), alimentos (BOTELHO; MENDES; SENA, 2013; ESCUREDO et al., 2013; SILEONI et al., 2013), biodiesel (ZHANG, 2012), petróleo (KHANMOHAMMADI; GARMARUDI; GUARDIA, 2012), clínica (SAKUDO et al., 2009), farmacêutica (PALOU et al., 2012), na caracterização de derivados de petróleo, como a gasolina e diesel (PASQUINI; BUENO, 2007). Na indústria farmacêutica esta técnica geralmente é usada no controle de qualidade e para monitorar os processos de produção (REICH, 2005; ÖZDEMIR; OZTURK, 2004).

O uso espectroscopia NIR tem demonstrado resultados satisfatórios na quantificação de medicamentos isolados ou em associação. Ferreira; Gomes; Sena (2009) propuseram um novo método para quantificação de dipirona em soluções orais farmacêuticas, utilizando NIR associado à calibração multivariada. Rocha e colaboradores (2010) quantificaram nimesulida, através de espectroscopia NIR em conjunto com a calibração multivariada. Silva e colaboradores (2012) desenvolveram um método analítico para quantificação da suspensão de amoxicilina aplicando calibração multivariada e espectroscopia NIR. Recentemente, Grangeiro Júnior (2011) quantificou associação de zidovudina e lamivudina usando NIR, espectroscopia UV derivada e calibração multivariada, além de analisar dureza dos comprimidos e umidade dos granulados (FERREIRA; GOMES; SENA, 2009; GRANGEIRO JÚNIOR, 2011; ROCHA et al., 2010; SILVA et al., 2012).

Li e colaboradores (2014) usaram espectroscopia NIR para distinção de comprimidos de anisodamina de diferentes fábricas. Ferreira; Braga; Sena (2013) desenvolveram e validaram um método para a determinação de hidroclorotiazida em amostras farmacêuticas em pó, com o uso de espectroscopia NIR e quimiometria. Tomuta e colaboradores (2013) desenvolveram e validaram um método para analisar dureza, tempo de desintegração, entre outros parâmetros, de comprimidos indapamida aplicando métodos quimiométricos e NIR (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013; LI et al., 2014; TOMUTA et al. 2013).

5 Quimiometria

Os pesquisadores da comunidade científica que usam métodos quimiométricos, têm interesse no controle de processos nas indústrias e no monitoramento rigoroso na área da química analítica, sobretudo na espectroscopia no infravermelho, na qual as pesquisas de quimiometria têm crescido muito (BRERETON, 2007).

A quimiometria é uma disciplina de química, que emprega métodos estatísticos, matemáticos e computacionais, a fim de extrair informações relevantes de dados químicos de natureza multivariada e selecionar ou planejar os melhores procedimentos experimentais (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; BRUNS; FAIGLE, 1985; FERREIRA et al., 1999). Estes dados analíticos podem ser obtidos através dos espectros NIR (PASQUINI, 2003).

Os espectros do infravermelho fornecem as informações relevantes (estrutura química dos analitos) e não relevantes (ruído). Estas informações relevantes são extraídas de maneira indireta, aplicando ferramentas quimiométricas, a partir de dados multivariados de primeira ordem, onde é descrita uma variabilidade dos dados por um número reduzido de variáveis, que buscam informações importantes para construir o modelo, sendo chamadas de componentes principais (CPs) (LAVINE, 2000).

Os dados multivariados diferem dos dados univariados, pois nos primeiros, a análise é realizada com mais de uma variável simultaneamente, podendo, desse modo, identificar a correlação que existe entre elas. Já nos dados univariados, a análise dos resultados é feita com uma única variável de cada vez, como por exemplo, uma propriedade físico-química, ou então, a concentração de uma espécie de interesse (RIBEIRO et al., 2007).

Dentre as diversas subáreas de pesquisa envolvendo métodos quimiométricos pode-se destacar: o reconhecimento de padrões e o planejamento e otimização de experimentos; o pré-

processamento de dados dos espectros; a seleção de variáveis e amostras e a calibração multivariada (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998, RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Os métodos de classificação, também conhecidos como métodos de reconhecimento de padrões, são subdivididos em métodos supervisionados e não supervisionados. Nos métodos supervisionados a informação sobre a que classe pertencem as amostras já está definida, e são classificadas em duas ou mais classes. Como exemplos podem ser citados a Análise Discriminante Linear (LDA, do inglês *Linear Discriminant Analysis*). Já nos métodos não supervisionados não se conhece a classe que pertence a amostra, permitindo atribuir a existência de semelhança entre as amostras. Como exemplo de métodos não-supervisionados destacam-se a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e a análise por agrupamentos hierárquicos (HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*) (CORREIA; FERREIRA, 2007; GELADI, 2003; ROGGO et al., 2007).

Os principais métodos de calibração multivariada são a regressão por componentes principais (PCR, do inglês *Principal Component Regression*), a regressão linear múltipla (MLR, do inglês *Multiple Linear Regression*) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*) (BRERETON, 2000; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; NUNES, 2008). Estes métodos tem por objetivo correlacionar uma propriedade de interesse da amostra com os sinais analíticos e quantifica-las, ou seja, verificar a relação existente entre uma variável depende e várias variáveis independentes (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; HAIR et al., 2005; ROGGO et al., 2007).

Os dados experimentais obtidos dos espectros do infravermelho podem apresentar uma distribuição inadequada para análise, tornando difícil a interpretação e extração de informações importantes. Desse modo, umas das etapas iniciais na construção dos modelos de calibração é a transformação dos dados dos mesmos, afim de possibilitar uma extração maior de informações úteis. Esta transformação consiste no tratamento de dados ou pré-processamento dos mesmos (FERREIRA et al, 1999).

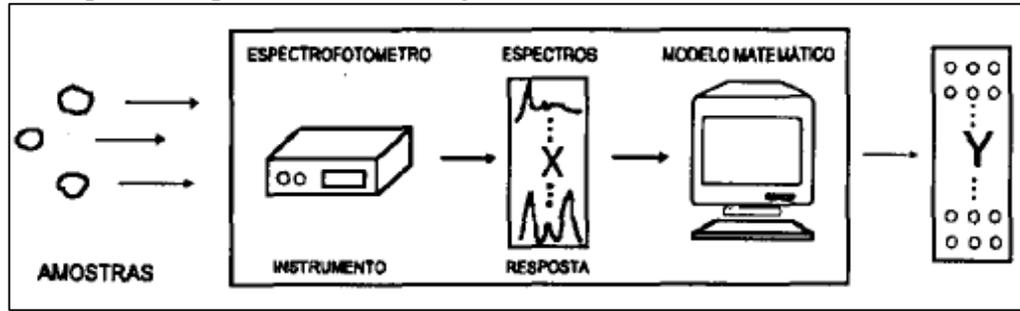
O tratamento de dados tem por finalidade a remoção de variáveis que não são desejadas como mudanças na linha de base, fatores externos que não consegue-se controlar ou efeitos de espalhamento. Entre os tratamentos mais utilizados, destaca-se o MSC (correção do espalhamento multiplicativo (do inglês *multiplicative scatter correction*), que tem por objetivo extrair a informação referente ao processo de difusão da radiação, conservando apenas a informação do analito, e reduzindo assim, o espalhamento de luz das amostras antes da etapa de calibração (GELADI; MACDOUGALL; MARTENS, 1985) e a normalização, que trata os dados através da divisão de cada intensidade espectral pela raiz quadrada da soma dos

quadrados de todas as intensidades do espectro correspondente (MORGANO, 2005). Já os pré-processamentos comparam as variáveis em dimensões distintas. Entre os mais empregados destacam-se os dados centrados na média (CM), subtraindo cada intensidade do respectivo valor médio, para cada comprimento de onda (GEMPERLINE, 2006), e autoescalar os dados (A), centrando os dados na média e dividindo pelo respectivo desvio padrão (GELADI; KOWALSKI, 1986).

Durante a construção de um modelo de calibração multivariada é presumível que uma ou mais amostras não se ajustem devido a fenômenos inevitáveis que podem acompanhar uma análise quantitativa, presença de ruídos aleatórios, tais como erros de operadores, alterações nas respostas de equipamentos (MARTENS; NAES, 1989). Estas amostras são conhecidas como anômalas ou *outliers*. Os mesmos podem estar presentes devido a um erro experimental, diferença de composição, ou até mesmo pela falta de ajuste do modelo de calibração (ASTM, 2012). Os *outliers* diminuem a capacidade de previsão do conjunto de calibração e pode influenciar os resultados dos testes de validação no conjunto de previsão. Dessa forma, anteriormente à construção dos modelos de calibração, são recomendados métodos para detecção de *outliers*, como o cálculo do resíduo de Student em que são avaliados os resíduos das concentrações, sendo extraídas as amostras com valores altos (FERREIRA et al.,1999).

A calibração é um processo muito importante realizado nas análises espectroscópicas quantitativas. Tem como finalidade encontrar o algoritmo matemático apropriado, capaz de obter os resultados esperados, através de dados experimentais adquiridos, ou seja, prever ou prever a concentração da propriedade de interesse a partir de respostas instrumentais, estabelecendo, desse modo, a relação entre duas ou mais variáveis. Habitualmente, um conjunto de variáveis representa o espectro e o outro contém concentração ou outras propriedades de interesse (ADAMS, 2004; FERREIRA et al.,1999). Na Figura 6 representado o processo de calibração.

Figura 6 - Esquema do processo de calibração



Fonte: Ferreira e colaboradores, 1999.

Inicialmente é necessário organizar os dados químicos e submeter a uma avaliação prévia para conhecer o método de análise multivariada ideal. Então aplica-se o procedimento de calibração, para construção do modelo, onde as informações geradas a partir dos espectros são organizadas em uma matriz primária denominada X, de variáveis independentes, na qual os dados de cada amostra estão organizados na linha e as respostas instrumentais medidas para cada comprimento de onda estão em cada coluna. Em uma matriz secundária, designada Y, de variáveis dependentes, serão inseridos os dados de concentração do analito de interesse, sendo que cada linha equivale a uma amostra e cada coluna equivale à concentração do analito em análise (FERREIRA et al.,1999). A Figura 7 representa as variáveis dependentes e independentes.

Figura 7 - Matriz de variáveis independentes gerada através de dados espectroscópicos (a) e matriz de variáveis dependentes (b).

$$(a) \quad X = \begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1m} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2m} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ X_{n1} & X_{n2} & \dots & X_{nm} \end{bmatrix} \quad (b) \quad Y = \begin{bmatrix} X_{11} \\ X_{21} \\ \vdots \\ X_{n1} \end{bmatrix}$$

Fonte: Adaptada de Ferreira e colaboradores, 1999.

Após a construção do modelo de calibração é preciso verificar o seu comportamento na predição dos valores de Y através da validação (previsão). A validação tem por objetivo

determinar a tendência de reprodutibilidade da calibração do modelo quando comparado ao método de referência (GEMPERLINE, 2006). Desse modo, o procedimento geral de calibração consiste, resumidamente, em algumas etapas: calibração, ou seja, construção do modelo de regressão para o conjunto de calibração, validação do mesmo e previsão das novas amostras que não fizeram parte do conjunto de calibração (FERREIRA et al., 1999).

A eficiência do modelo será melhor quanto maior for o número de amostras disponíveis para construção do mesmo. Outro critério importante, é a escolha correta das amostras que pertencerão ao conjunto de calibração e previsão, evitando situações de extrapolações, e aumentando a eficiência e habilidade de previsão do modelo multivariado. A escolha das amostras de calibração e previsão é feita de modo que as de previsão sejam bem representadas pelas amostras de calibração (NAES et al., 2002).

Uma forma de selecionar amostras é por meio do algoritmo Kennard-Stone (KS), que seleciona uma amostra média e então as demais amostras são escolhidas com base em sua distância. Ou seja, a primeira amostra escolhida pelo algoritmo vai ser a que apresentar maior distância em relação à amostra média. Já a segunda amostra escolhida vai ser a que apresentar maior distância em relação à primeira amostra, e assim consecutivamente. Esse procedimento é repetido até que o número desejado de amostras para cada conjunto seja adquirido (KENNARD; STONE, 1969). Desse modo, é possível garantir que as amostras do conjunto de calibração sejam aquelas com maior variabilidade, ou seja, levam a maior parte de informações químicas e físicas pertinentes às propriedades das amostras e que as amostras desconhecidas sejam bem contempladas (GALVÃO et al., 2005; NAES et al., 2002).

5.1 Métodos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

A Análise de Componentes Principais (PCA) é uma das técnicas mais úteis no tratamento de dados multivariados, é base fundamental para outras técnicas multivariadas (EASTMENT; KRZANOWSKI, 1982; FERREIRA et al., 1999). Este método tende a reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original, mantendo maior quantidade de informação possível. A redução da dimensão dos dados é obtida através da formação de novas variáveis ortogonais entre si, afim encontrar combinações das mesmas, que descrevem as principais tendências dos dados, chamadas de componentes principais (CPs) (CORREIA; FERREIRA,

2007; FERREIRA, 2002; GELADI; KOWALSKI, 1986; MARTENS; NAES, 1989; GEMPERLINE, 2006; WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987).

A primeira componente principal (CP1) apresenta a (maior variabilidade) máxima variância do conjunto de dados originais. A segunda componente principal (CP2) apresenta a variância que não foi explicada pela CP1 e é traçada de maneira perpendicular à primeira. Na sequência, as próximas CPs apresentam a variância restante. Assim, cada CP descreve uma fração de variâncias sucessivas de dados em um sistema de coordenadas ortogonais entre si e que não são correlacionadas (CORREIA; FERREIRA, 2007; FERREIRA, 2002). Cada amostra forma agrupamentos que irão apresentar características idênticas, sendo representada por um ponto no espaço multidimensional (NASCIMENTO et al., 2010).

Segundo Beebe; Pell; Seasholtz (1998) e Souza; Poppi (2012), na análise de componentes principais a matriz X é decomposta e resulta em duas matrizes e um produto (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; SOUZA; POPPI, 2012), como ilustrado na Equação 1:

$$X = TP' + E \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

- T – escores (*scores*);
- P – pesos (*loadings*);
- E – resíduos.

Enquanto os escores são as coordenadas das amostras no novo sistema de eixos das CPs, que indicam similaridade e diferenças entre as amostras, os pesos representam a relação das variáveis espectrais entre o sistema original e o sistema definido pelos fatores, quais variáveis são fundamentais para descrever a variância dos dados, a contribuição de cada variável para formação das CPs (CHAMINADE; BAILLET; FERRIER, 1998; FERREIRA et al., 1999) A interação ente os escores e pesos define as CPs (CHAMINADE; BAILLET; FERRIER, 1998). A porcentagem de variância explicada acumulada é uma ferramenta útil na determinação do número ideal de CPs (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987; KAMAL-ELDIN; ANDERSSON, 1997; SABIN; FERRÃO; FURTADO, 2004).

O valor dos escores é dado pelas projeções das amostras na direção da CP, já os valores dos pesos são obtidos pelos cossenos dos ângulos formados entre a CP e cada variável (SENA; POPPI, 1999).

A matriz residual E é a variância não explicada (EINAX; ZWANZIGER; GEIß, 1997). Após o cálculo da CP1, a próxima CP é obtida, com uma nova matriz residual E, formando a t_2p_2 (PC2), que contém menos informação. Esse processo irá se repetir sucessivamente até que a matriz residual apresente uma quantidade de informação semelhante ao nível de ruído instrumental (CHAMINADE; BAILLET; FERRIER, 1998). A Equação 2 demonstra a obtenção de cada CP e a matriz residual (EINAX; ZWANZIGER; GEIß, 1997):

$$X = t_1p_1' + t_2p_2' + \dots + t_h p_h' + E \quad \text{Equação (2)}$$

Desse modo, a PCA é aplicada para simplificar a matriz e dados, modelar, classificar, reduzir o número de variáveis, selecionar variáveis identificar amostras anômalas ("*outliers*") (ANDRE, 2003; ARUMUGAM et al., 2012; KOLASANI; XU; MILLIKAN, 2011).

O método de calibração multivariada PLS foi desenvolvido por Herman Wold (WOLD, 1978). É considerado uma técnica de regressão com diversas aplicações em várias áreas da química analítica, sendo popular em análises quantitativas que utilizam calibração multivariada (BRERETON, 2000; BRERETON, 2003; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001).

No método de regressão PLS todas as variáveis são incluídas nos modelos, tornando-se uma técnica robusta. Desse modo, a calibração pode ser realizada com eficiência, mesmo na presença de interferentes, sem ser necessário conhecer a natureza de todos os componentes presentes nas amostras (FERREIRA et al., 1999).

Na regressão PLS, a matriz de dados X (variáveis independentes) e Y (variáveis dependentes) são decompostas simultaneamente e projetadas em um novo sistema de coordenadas. Assim, é obtida uma função capaz de descrever a variância entre as duas matrizes, aumentando a correlação entre elas e resultando na primeira variável latente (VL). O conjunto de variáveis latentes no novo sistema de coordenadas juntamente com a regressão entre as matrizes X e Y são utilizadas na construção dos modelos de calibração (BRERETON, 2000; GELADI; KOWALSKI, 1986).

A construção do modelo PLS baseia-se na regressão entre os escores das matrizes X e Y em uma soma de “h” variáveis latentes, por meio de uma relação externa que descreve individualmente as duas matrizes, representado pelas Equações 3 e 4 (GELADI; KOWALSKI, 1986):

$$X = TP' + E = \sum t_h p_h' + E \quad \text{Equação (3)}$$

$$Y = UQ' + F = \sum u_h q_h' + F \quad \text{Equação (4)}$$

Onde:

T e U são matrizes de escores das matrizes X e Y;

P e Q são matrizes de pesos das matrizes X e Y;

E e F são os resíduos;

h corresponde ao número de fatores (componentes principais/ variáveis latentes).

A correlação entre os escores dos blocos X e Y é uma relação linear obtida pelo vetor de coeficiente de regressão linear para cada VL (b_h), conforme a Equação 5 (GELADI; KOWALSKI, 1986; OTTO, 1999).

$$u_h = b_h t_h \quad \text{Equação (5)}$$

Onde b_h é obtido através da Equação 6:

$$b_h = u_h' t_h / t_h' t_h \quad \text{Equação (6)}$$

Em que u e t são elementos das matrizes U e T respectivamente.

Os valores de b_h são agrupados na matriz diagonal B denominada matriz identidade, que contém os coeficientes de regressão entre a matriz de escores T de X e a matriz de escores U de Y . A melhor relação linear possível entre os escores das matrizes X e Y é obtida por meio de rotações pequenas das variáveis latentes das mesmas, onde deve haver um comprometimento entre o aumento da correlação entre T e U e a capacidade de descrever amostras individuais, modelando as duas matrizes (GELADI; KOWALSKI, 1986).

A matriz Y pode ser calculada através das informações presentes em u_n , de acordo com a Equação 7. Desse modo, a concentração das novas amostras pode ser prevista a partir de novos escores de X , dado por T^* , substituídos nas Equações 7 e 8:

$$Y = TBQ' + F \quad \text{Equação (7)}$$

$$Y = T^*BQ' \quad \text{Equação (8)}$$

Onde:

T : são os escores da matriz X ;

B : é a matriz identidade de b_h ;

Q' : são os pesos da matriz Y ;

F : é a matriz residual de Y .

A escolha do melhor modelo a partir dos dados químicos investigados pode ser realizada através da avaliação do número de VLs e a raiz quadrada dos erros médios (RMSE, do inglês, *root mean square error*), entre outros fatores, que serão abordados no decorrer do trabalho.

5.2 Métodos de seleção de variáveis em modelos de regressão

Na calibração multivariada, a seleção de variáveis a partir de um conjunto de dados espectrais significa escolher determinadas partes das regiões espectrais para utilizar na construção dos modelos. Ou seja, é uma alternativa aos modelos que utilizam toda a informação espectral, podendo tornar os mesmos mais simples, robustos e de fácil interpretação, além de facilitar na aquisição dos dados espectrais (NAES et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004). Além disso, esta ferramenta pode melhorar o desempenho dos modelos multivariados, uma vez que serão consideradas adequadas somente as regiões espectrais que apresentarem dados úteis à análise, e extraídas aquelas regiões com ruídos, ou sem nenhuma informação (KULIGOWSKI et al., 2010; NORGAARD et al., 2000; OSBORNE; JORDAN; KÜNNERMEYER, 1997).

A escolha das regiões adequadas do espectro permite ao modelo de calibração diminuir os erros de previsão. Todavia, é importante selecionar somente as regiões que apresentam correlação com o analito em estudo (OLIVEIRA et al., 2004; OSBORNE; JORDAN; KÜNNERMEYER, 1997).

O iPLS é o método mais simples para seleção de variáveis, o mesmo seleciona regiões espectrais e não variáveis isoladas. É uma extensão do PLS, na qual o algoritmo divide os espectros em subintervalos equidistantes ao longo de toda a faixa espectral. Para cada intervalo é construído um modelo PLS, sendo os resultados apresentados na forma gráfica para facilitar a comparação com toda a faixa espectral (LEARDI; NORGAARD, 2004; NORGAARD et al., 2000, OSBORNE; JORDAN; KÜNNERMEYER, 1997). Desse modo, é possível selecionar as variáveis com informações relevantes, e um novo modelo é construído a partir das variáveis selecionadas (OSBORNE; ORDAN; KÜNNERMEYER, 1997).

Segundo Neto (2005) os subintervalos iPLS são comparados com o modelo global através do parâmetro de validação RMSECV (raiz quadrada dos erros médios de validação cruzada), mas também podem ser empregados outros parâmetros como R, inclinação da reta do gráfico dos valores medidos e previstos pelo modelo (NETO, 2005).

No entanto a limitação deste método é que a informação pode estar distribuída por toda a região espectral, ou então, em mais de um intervalo simultaneamente, o que pode originar erros de previsão maiores do que os modelo que usa toda a região espectral (PATACA, et al., 2007).

O siPLS é uma extensão do algoritmo iPLS, que consiste na divisão do espectro em regiões equidistantes, ou seja, em intervalos, e selecionar a melhor combinação destes,

combinando-os 2 a 2, 3 a 3 e até mesmo 4 a 4 subintervalos do espectro (MUNK et al., 2001; NORGAARD et al., 2000), afim de obter menores erros de previsão, calibração e R^2 próximo à unidade.

5.3 Desenvolvimento e avaliação de modelos de calibração

O objetivo de avaliar os modelos de calibração é validar o método que foi proposto. O número de VLs, a capacidade do modelo em prever amostras desconhecidas e a representatividade do conjunto de dados utilizados são essenciais para o desenvolvimento do modelo (BRERETON, 2000).

A dimensionalidade do modelo é essencial na etapa de previsão, assim o número ideal de VLs para descrever o melhor modelo é aquele que apresentar o menor erro na previsão das amostras. Desse modo, é possível obter um menor número de VLs, diminuindo o ruído e um modelo de interpretação fácil, capaz de explicar o máximo de variância dos dados (GEMPERLINE, 2006). Um modelo com um número de VLs inferior ocasionará um subajuste e um número superior, um sobreajuste. O número maior de VLs não é adequado para o conjunto de previsão, pois informações desnecessárias são incluídas no modelo (GOMEZ-CARRACEDO, et al., 2007).

Para a avaliação dos modelos construídos é comum utilizar o cálculo do RMSE, apresentado na Equação 9. Esse erro pode ser avaliado através da raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração (RMSEC, do inglês *Root Mean Square Error Calibration*), de validação (RMSEV, do inglês *Root Mean Square Error Validation*) e de validação cruzada (RMSECV, do inglês, *Root Mean square Error of Cross Validation*). O RMSECV é utilizado na determinação do número de VLs (BRERETON, 2000).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad \text{Equação (9)}$$

Onde:

y_i é o valor de referência; \hat{y}_i é o valor previsto pelo método proposto e n é o número de amostras utilizadas para construir o modelo.

Na validação cruzada, de uma série de n amostras, uma é retirada, ficando $n-1$ amostras, que são utilizadas na calibração, logo após, constrói-se o modelo com estas amostras que restaram, e então realiza-se uma previsão da concentração da amostra que não foi utilizada na calibração. Esse procedimento é repetido até que todas as amostras sejam excluídas uma vez e previstas, denominando dessa forma o erro obtido como RMSECV (BRERETRON, 2003; NAES et al., 2002). O RMSECV é ideal na avaliação da dimensionalidade dos modelos de calibração e na escolha do número de VLs, podendo ser considerado um valor mais relevante que o RMSEC (BRERETRON, 2003).

A validação cruzada geralmente é usada quando o número de amostras é limitado, nos casos em que as análises laboratoriais tenham custos elevados (PASQUINI, 2003).

A capacidade de previsão de um modelo de calibração multivariada para amostras externas é realizada através do cálculo da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP, do inglês *Root Mean Square Error of Prevision*) (BLANCO et al., 1999; NAES et al., 2002) e seu valor percentual é dado pelo erro padrão de previsão relativo (RSEP, do inglês *Relative Standard Error of Prediction*), demonstrado na Equação 10 (BLANCO et al., 1999).

$$RSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i)^2}} \times 100 \quad \text{Equação (10)}$$

Onde:

y_i é o valor de referência; \hat{y}_i é o valor previsto pelo método proposto e n é o número de amostras utilizadas para construir o modelo.

Desse modo, a validação cruzada é também conhecida como validação interna, e avalia o erro de previsão de amostras que fazem parte do conjunto de calibração, já a validação externa

avalia a capacidade de previsão do modelo construído utilizando amostras externas ao conjunto de calibração, ou seja, as amostras do conjunto de previsão (GELADI; KOWALSKI,1986).

5.4 Testes de significância

Os testes de significância são utilizados quando deseja-se avaliar a diferença entre um valor obtido (experimental) em uma nova metodologia e um valor real (verdadeiro), afim de verificar os erros sistemáticos. Se a diferença entre os valores das duas metodologias for significativa, é conferida a presença de erros sistemáticos ao método novo (MILLER; MILLER, 2010).

A comparação entre os dois métodos é realizada através do teste de significância denominado teste t pareado, que estima o quanto o valor experimental difere significativamente de um valor verdadeiro (GEMPERLINE, 2006).

O cálculo do valor de t é realizado através da Equação 11 (GEMPERLINE, 2006; MILLER; MILLER, 2010).

$$t = \frac{\bar{d} \sqrt{n}}{S_d} \quad \text{Equação (11)}$$

Onde:

t tem $n-1$ graus de liberdade.

n : é número de amostras analisadas.

S_d : é variância

\bar{d} : média da diferença dos resultados entre metodologia 1 e metodologia 2.

Após o cálculo do teste t, o valor do t calculado deve ser comparado com o valor de t tabelado, com 95% de confiança. Se o t calculado for maior que o t tabelado haverá diferença significativa entre os dois métodos, já se for menor, não haverá diferença estatística.

Já o teste de significância teste F é utilizado quando se quer comparar a precisão entre dois métodos, desse modo, comparando suas variâncias (S^2) e testa se suas diferenças são significantes (FERRÃO, 2000; MILLER; MILLER, 2010). O teste F é expresso pela seguinte Equação 12:

$$F_{(i,j)} = \frac{S_i^2}{S_j^2} \quad \text{Equação (12)}$$

Os valores de F (i, j) calculados são comparados com o valor de F tabelado com nível de confiança de 95%. As variâncias vão ser consideradas diferentes estatisticamente quando o valor de F (i,j) calculado for maior que o F tabelado (GEMPERLINE, 2006). Nos modelos multivariados, o teste F pode ser utilizado quando se quer comparar os valores obtidos para os RMSEP, de acordo com a equação 13 (MÜLLER, 2009; SILVA, 2008):

$$F_{(i,j)} = \left(\frac{RMSEP_i}{RMSEP_j} \right)^2 \quad \text{Equação (13)}$$

5.5 Validação dos modelos de calibração – Figuras de mérito em calibração multivariada

A validação de um modelo é essencial para que o mesmo possua a habilidade de estimativa das propriedades de interesse com o desempenho desejado.

Para metodologias analíticas multivariadas a validação requer um teste amplo, por meio de figuras de mérito, aonde se avalia se o modelo multivariado proposto atende as especificações de agências regulatórias como IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) (OLIVIERI et al., 2006), o EMEA (*The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*) (EMEA, 2003) e a Conferência Internacional de Harmonização (ICH), (ICH, 2005). A ASTM E-1655-05 de 2012 (*American Society for Testing and Materials*) faz

algumas recomendações para análises com infravermelho e calibração multivariada (ASTM, 2012).

O relatório técnico da IUPAC (OLIVIERI et al., 2006) define como validação do método a aplicação da sensibilidade, seletividade e razão sinal ruído por meio do sinal analítico líquido (NAS - do inglês net analyte signal). Já a EMEA (2003) estabelece que os principais itens para validação de métodos qualitativos e quantitativos por NIR são especificidade, linearidade, exatidão, precisão e robustez e a ICH (2005) estabelece parâmetros tais como precisão, linearidade e exatidão (EMEA, 2003; ICH, 2005; OLIVIERI et al., 2006)

A seguir serão exibidos alguns parâmetros, de acordo com as agências regulatórias, guias de validação e com alguns trabalhos científicos, para validação de métodos de calibração multivariados.

5.5.1 Linearidade

A linearidade corresponde a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse, dentro de um determinado intervalo, ou seja, é a regressão linear entre os valores previstos e os valores de referência (EMEA, 2003; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007). Normalmente pode ser definida pela observação de parâmetros como coeficiente de regressão “a”, o intercepto “b” (EMEA, 2003; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007) e R (FDA, 2015). Também pode ser avaliada, qualitativamente, pelo o gráfico de resíduos das amostras de calibração e validação. Uma distribuição aleatória destes resíduos indica um comportamento linear (BRAGA; POPPI, 2004; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

5.5.2 Precisão

Para a ASTM e EMEA, no cálculo de precisão utiliza-se valores de uma análise em triplicata das amostras com concentrações diferentes (ASTM, 2012, EMEA, 2003).

Segundo Braga; Poppi (2004), a precisão em termos de repetibilidade é definida como a precisão dos métodos analíticos em um curto espaço de tempo, podendo ser calculada por

meio de nove determinações, onde três são concentrações e três replicatas, cobrindo a faixa ideal do modelo de calibração (BRAGA; POPPI, 2004). Pode ser calculada segundo a Equação 14:

$$precisão = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (\hat{y}_{ji} - \hat{y}_i)^2}{n(m-1)}} \quad \text{Equação (14)}$$

Onde:

m é o número de replicatas feitas,

n é o número de amostras,

\hat{y}_i é a média dos valores previstos de cada replicata \hat{y}_{ji} .

5.5.3 Exatidão

Pode ser definida como o grau de concordância entre o valor previsto e o valor de referência (ASTM, 2012; BLANCO; ALCALÁ, 2006a; GIL, 2010; ROCHA; NOGUEIRA; VAZ, 2012) Os resultados obtidos podem ser avaliados pelo RMSEP (BRAGA; POPPI, 2004; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009) e segundo Moffat e colaboradores (2000) podem ser avaliados pelo RSEP (%) (MOFFAT et al., 2000).

5.5.4 Erro sistemático (*bias*)

Os erros sistemáticos são oriundos de um desvio nos resultados, constantemente, em um mesmo sentido, afetando, assim, o valor médio, a grandeza do resultado (CIENFUEGOS,

2005). O *bias* é o calculado através da diferença entre a média da população e o seu valor de referência, segundo a Equação 15 (BRAGA, 2004).

$$bias = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)}{n} \quad \text{Equação (15)}$$

O teste t irá avaliar quantitativamente, se o *bias* é significativo ou não (ASTM, 2012). Primeiramente é estimado o desvio padrão dos erros de validação (SDV, do inglês – *standard deviation validation*) (BRAGA, 2004; FERRÉ et al., 1997), de acordo com a Equação 16:

$$SDV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(y_i - \hat{y}_i) - bias]^2}{n-1}} \quad \text{Equação (16)}$$

Segundo ASTM (2012), O valor t é obtido segundo a Equação 17:

$$t_{sist} = \frac{|bias|\sqrt{n}}{SDV} \quad \text{Equação (17)}$$

Onde:

n é o número de amostras de previsão.

O erro sistemático é considerado insignificante, quando o valor t_{sist} calculado for menor que o seu valor crítico para *n*-1 (graus de liberdade, 95% de confiança) (BRAGA; POPPI, 2004; ASTM, 2012).

6 Uso de métodos espectroscópicos no NIR associados à ferramentas quimiométricas

A espectroscopia NIR é uma ferramenta eficaz para determinações analíticas, extração de informações quantitativas. Todavia, as bandas espectrais de baixa intensidade, que são sobrepostas, impedem a obtenção de uma boa correlação entre grupos de átomos presentes em uma molécula e a sua composição nas amostras. Desse modo, para tratamento das informações complexas geradas dos espectros, é necessário o uso de ferramentas quimiométricas, que utilizam métodos estatísticos para interpretação adequada dos dados obtidos (PEREIRA, 2007; NUNES, 2008).

O uso de ferramentas quimiométricas em conjunto com a espectroscopia NIR é aplicada em diversas áreas, tais como: análises químicas de alimentos, para classificar a farinhas e amostras de farelo de soja, (COZZOLINO et al., 2009), na determinação de açúcar total e teor de proteína em amostras de café cru (MORGANO et al., 2005; MORGANO et al., 2007), em várias indústrias, também no setor de polímeros (PASQUINI, 2003), além disso, é uma técnica considerada rápida, não-destrutiva, não utiliza solventes orgânicos, gera uma menor quantidade de resíduos e portanto, podendo ser chamada de sustentável. Outro fator importante do método é a menor intervenção humana na análise, com menor manipulação da amostra, proporcionando, desse modo, resultados sensíveis e exatos (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013; PASQUINI, 2003).

Sarraguça; Lopes (2009) desenvolveram uma método analítico para quantificação de paracetamol e excipientes celulose microcristalina, talco e estearato de magnésio, em formulações farmacêuticas usando FT-NIR. O modelo de calibração multivariada foi construído com amostras de escala laboratorial para conjunto de calibração e amostras designadas de escala piloto (pó e comprimidos) para o conjunto de validação. Os RSEP para as amostras de escala laboratorial e da escala piloto pó ficaram entre 0,4% e 5% para os quatro componentes da formulação. Já para as amostras da escala piloto comprimidos, a mesma diferença ficou entre 1,6% a 9% (SARRAGUÇA; LOPES, 2009).

Em um estudo de Shi e colaboradores (2012) foi investigado o conteúdo total de flavonoides na folha do Gingko Biloba usando espectroscopia NIR com esfera de integração e algoritmos PLS, iPLS e siPLS. O modelo selecionado foi o siPLS para duas cores de folhas de Gingko biloba com RMSEP de 2,62 mg.g⁻¹ e R² de 0,82 (SHI et al., 2012).

No trabalho desenvolvido por Sanches e colaboradores (2012), foi proposto um método analítico para determinação de formulações injetáveis de dipirona sódica, sem violação da

ampola, utilizando NIR, PLS e MLR-SPA (regressão linear múltipla com seleção de variáveis através do algoritmo das projeções sucessivas). Os valores de RMSEP foram de 0,39% mv^{-1} para PLS e 0,35% mv^{-1} MLR-SPA, e os R foram de 0,9970 e 0,9975 para PLS e MLR-SPA respectivamente, para uma faixa de concentrações das amostras sintéticas de 40-60 % mv^{-1} (SANCHES et al., 2012).

Zhang e colaboradores (2015) desenvolveram um método para determinação do conteúdo de dois ginsenosídeos (Rg1 e Re) presentes no medicamento Naosaitong (ginseng vermelho) usando espectroscopia NIR e PLS. Rg1 e Re apresentaram os seguintes R^2 de 0,9766 e 0,9764 e RMSEP de 0,00764 e 0,0103 (ZHANG et al., 2015).

Wu e colaboradores (2013) utilizaram a espectroscopia NIR associada aos modelos iPLS e siPLS em PAT, afim de monitorar o perfil da concentração de doze aminoácidos durante o processo de hidrólise de Cornu Bubali (água de chifre de búfalo). O modelo selecionado foi o siPLS. L-prolina, L-tirosina, L-valina, L-fenilalanina e L-lisina apresentaram RMSEP de 0,0915 mg/ml, 0,1605 mg/ml, 0,0515 mg/ml, 0,0586 mg/ml e 0,0613 mg/ml, respectivamente (WU et al., 2013).

Até o presente momento, são poucos estudos descritos na literatura que quantificam mais de dois fármacos simultaneamente, usando espectroscopia no infravermelho e ferramentas quimiométricas. Encontrou-se um artigo de associação quádrupla, descrito por Blanco; Alcalá (2006b), onde desenvolveram um método de espectroscopia no NIR para a determinação simultânea dos princípios ativos paracetamol, ácido ascórbico, bromidrato de dextrometorfano, cafeína e maleato de clorfeniramina em formulações farmacêuticas. Os cinco princípios ativos foram quantificados utilizando o método PLS, sendo que paracetamol obteve um RSEP de 2,2%, o ácido ascórbico obteve RSEP de 2,7%, o bromidrato de dextrometorfano obteve RSEP de 3,3%, a cafeína obteve RSEP de 2,1% e o maleato de clorfeniramina obteve RSEP de 3,4%. (BLANCO; ALCALÁ, 2006b). Em outro estudo com associação tripla descrito por Piantavini e colaboradores (2014), foi desenvolvido um método de calibração por espectroscopia de reflectância difusa no MIR para determinação simultânea de pamoato de pirantel, praziquantel e febantel, em comprimidos. O modelo siPLS apresentou resultados satisfatórios, com RMSEP de 0,69 mg $0,1\text{g}^{-1}$ para febantel, 0,67 mg $0,1\text{g}^{-1}$ para pirantel e 0,34 mg $0,1\text{g}^{-1}$ para praziquantel (PIANTAVINI et al., 2014). E em um terceiro estudo descrito por NEVES e colaboradores (2012), mediu-se a porcentagem de dissolução de quatro ingredientes ativos (isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol) presentes produtos farmacêuticos acabados, aplicando NIR e PLS. O modelo PLS apresentou RMSEP de 9,99%, 8,63%, 8,57% e 9,97% para isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida, respectivamente. (NEVES et al., 2012).

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Instrumentação

A determinação do teor dos comprimidos utilizados no estudo foi feita em cromatógrafo à líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu[®], com bomba LC-20AT Prominence, auto-injetor SIL-20A, forno de coluna CTO-20A, detector UV-DAD SPD-M20A, comunicador CBM-20A e desgaseificador DGU-20A5. A separação foi feita entre 22-25°C, com uma coluna de sílica quimicamente modificada ligada ao grupo octadecilsilano Nucleodur[®] 100-5 C₁₈ com dimensões de 150 mm x 4,0 mm e tamanho de partícula de 5 µm. O ajuste de pH do tampão fostato da fase móvel foi feito utilizando-se um potenciômetro HANNA (modelo 2220). Para desgaseificar a fase móvel foi usada uma lavadora Ultra-Sônica Unique (USC 2850).

Os espectros NIR foram coletados na faixa de 10000 a 4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 16 varreduras, através do modo de refletância, utilizando o Espectrômetro FT-NIR da Perkin Elmer (modelo Frontier Óptica), com o auxílio do acessório de esfera de integração, representado na Figura 8.

Figura 8 - FT-NIR com acessório esfera de integração



Os espectros das amostras foram coletados em triplicata, e em seguida obteve-se o espectro médio.

Para a pesagem das amostras foi utilizada uma balança analítica Shimadzu® modelo AY220, com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g. Todas as amostras foram misturadas em moinho criogênico Spex Certiprep® (Model 6750 Freezer/Mill) (gentilmente cedido pelo LAQIA-UFSM).

7.2 Reagentes

Os solventes utilizados na determinação das amostras por CLAE foram: metanol grau HPLC (Merck), acetonitrila grau HPLC (Merck). Ácido orto-fosfórico p.a. (Vetec) foi utilizado para o ajuste do pH da fase móvel.

A água utilizada para dissolução das amostras foi deionizada em uma coluna trocadora de íons convencional (condutividade máxima de $0,6 \mu\text{S cm}^{-1}$) e purificada em um sistema Milli-Q (Milli-Q®), com resistividade final de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), já para a limpeza de vidrarias utilizou-se água destilada

7.3 Matérias-primas e amostra real

As matéria-primas VAL, HCT e ANL com teores declarados de 99,8%, 98,68% e 99,89%, respectivamente, foram adquiridas no comércio local e utilizadas como SQR (Substância Química de Referência) para o doseamento do comprimido e confecção das misturas sintéticas. A pureza e caracterização das matérias-primas VAL, HCT e ANL foram verificadas através dos testes descritos na Farmacopéia Brasileira (2010) para HCT e USP 32 (2009) para VAL e ANL (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; USP 32, 2010).

O comprimido utilizado neste estudo foi o Exforge HCT® nas concentrações de 160 mg VAL, 12,5 mg HCT e 5 mg ANL, fabricado pela Novartis® (Lote: S0005). Para os comprimidos foram realizados os testes de peso médio (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010) e teor por CLAE segundo El-Gizawy e colaboradores (2012) adaptado (EL-GIZAWY, 2012; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Os excipientes utilizados na confecção das amostras sintéticas (estearato de magnésio, talco e celulose microcristalina) foram adquiridos no comércio local.

7.4 Preparo de amostras sintéticas

Devido a indisponibilidade das concentrações dos excipientes da amostra real, para a confecção das amostras sintéticas optou-se pela concentração considerada usual para comprimidos de uso oral (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Os excipientes estearato de magnésio, talco e celulose microcristalina foram usados nas concentrações de 2,5%, 5% e 92,5%, respectivamente.

Foram preparadas 44 amostras sintéticas, através da mistura dos excipientes e fármacos, com massa total de 1g. As concentrações destas amostras variaram de 261,9-500,0 mg g⁻¹ para VAL; 20,2-83,3 mg g⁻¹ para HCT e 11,6-49,6 mg g⁻¹ para ANL (Tabela 2). As amostras sintéticas, após pesagem, foram misturadas utilizando moinho criogênico, com a finalidade de padronizar o tamanho da partícula e promover a mistura dos componentes, utilizando o seguinte programa: ciclo de pré-congelamento de 2 min, ciclo de moagem de 2 min e velocidade de 15 rpm.

Tabela 2 - Composição das amostras sintéticas

Amostra	VAL (mg g ⁻¹)	HCT (mg g ⁻¹)	ANL (mg g ⁻¹)	Excipientes (mg g ⁻¹)
1	261,90	20,24	11,57	706,29
2	261,90	20,24	16,52	701,34
3	261,90	20,24	49,57	668,29
4	261,90	29,76	11,57	696,77
5	261,90	29,76	16,52	691,82
6	261,90	29,76	33,05	675,29
7	261,90	29,76	49,57	658,77
8	261,90	59,52	11,57	667,01
9	261,90	59,52	16,52	662,06
10	261,90	59,52	33,05	645,53
11	261,90	59,52	49,57	629,01
12	261,90	83,33	11,57	643,20
13	261,90	83,33	16,52	638,25
14	261,90	83,33	33,05	621,72
15	261,90	83,33	49,57	605,20
16	380,95	20,24	11,57	587,24
17	380,95	20,24	16,52	582,29
18	380,95	20,24	33,05	565,76
19	380,95	20,24	49,57	549,24
20	380,95	29,76	16,52	572,77
21	380,95	29,76	33,05	556,24
22	380,95	29,76	49,57	539,72
23	380,95	59,52	11,57	547,96
24	380,95	59,52	16,52	543,01
25	380,95	59,52	33,05	526,48
26	380,95	59,52	49,57	509,96
27	380,95	83,33	11,57	524,15
28	380,95	83,33	16,52	519,20
29	380,95	83,33	33,05	502,67
30	380,95	83,33	49,57	486,15
31	500,00	20,24	11,57	468,19
32	500,00	20,24	16,52	536,76
33	500,00	20,24	33,05	446,71
34	500,00	20,24	49,57	430,19
35	500,00	29,76	16,52	453,72
36	500,00	29,76	33,05	437,19
37	500,00	29,76	49,57	420,67
38	500,00	59,52	11,57	428,91
39	500,00	59,52	16,52	423,96
40	500,00	59,52	33,05	407,43
41	500,00	59,52	49,57	390,91
42	500,00	83,33	11,57	405,10
43	500,00	83,33	16,52	400,15
44	500,00	83,33	49,57	367,10
45				
(Amostra real)	387,22	30,25	12,10	570,42

* Estearato de magnésio:talco: celulose microcristalina (2,5: 5: 92,5).

7.5 Determinação de VAL, HCT e ANL por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na amostra real

A determinação do teor da amostra real com valor nominal de 160 mg de VAL, 12,5 mg de HCT e 5 mg de ANL foi realizada por CLAE, segundo a metodologia descrita por EL-GIZAWY et al. (2012) (adaptado) (EL-GIZAWY et al., 2012). Primeiramente, determinou-se o peso médio de 20 comprimidos individualmente. Na sequência, os comprimidos foram misturados e pulverizados e a quantidade de pó equivalente ao conteúdo do comprimido Exforge HCT[®] foi pesado, transferido para um balão de 100 mL e diluído em fase móvel (tampão fosfato: acetonitrila). Após, a solução foi filtrada com filtro membrana de 0,45 µm, e analisada em um cromatógrafo à líquido Shimadzu[®], com bomba LC-20AT Prominence, auto-injetor SIL-20A, forno de coluna CTO-20A, detector UV-DAD SPD-M20A a 227 nm, comunicador CBM-20A e desgaseificador DGU-20A5 na temperatura de 22-25°C. Utilizou-se uma coluna de sílica quimicamente modificada ligada ao grupo octadecilsilano Nucleodur[®] 100-5 C₁₈ com dimensões de 150 mm x 4,0 mm e tamanho de partícula de 5 µm, um volume de injeção de 20 µl e um fluxo de 0,8 mL/min. No preparo da fase móvel foi utilizado tampão fosfato 0,05 M e ajustado a pH 2,8±0,2 com ácido orto-fosfórico e acetonitrila, na proporção 60:40 (v/v), a mesma foi sonicada em lavadora ultra-sônica por 15 minutos.

7.6 Programas computacionais

Para o tratamento dos dados foram utilizados dois programas computacionais: PIROUETTE[®] versão 3.11 (<http://www.infometrix.com>, EUA), sendo usado a ferramenta PCA para detecção de *outliers*, e o software MATLAB[®] versão 7.10 (The Math Works, <http://www.mathworks.com>, EUA), sendo usado o pacote “iToolbox” versão 2.0, desenvolvido por Lars Norgaard (NORGAARD et al., 2000) (iToolbox for MATLAB) para a seleção das variáveis (algoritmos iPLS e siPLS) (MATLAB, 2010; NORGAARD et al., 2000; PIROUETTE).

O software foi executado em um Microcomputador Dell, com processador core i7 3.40 GHz e 2 GB de memória RAM.

7.7 Aquisição dos espectros por NIR

Na tabela 3 são apresentados os parâmetros utilizados na aquisição dos espectros.

Tabela 3 - Parâmetros usados na aquisição dos espectros FT-NIR

Parâmetros	Condições
Região espectral	4000-10000 cm^{-1}
Detector	InGaAs - detector Índio-Galio-Arsênio
Varreduras	16
Resolução	4 cm^{-1}
Acessório	Esfera de Integração
Aplicativo	Spectrum v 5.0.1 [®]

Para a padronização da quantidade de amostra ideal a ser depositada no recipiente do FT-NIR (Figura 9), foram adquiridos um conjunto de espectros com quantidades crescentes da amostra número 20 (Tabela 2).

Figura 9 - Recipiente do FT-NIR para amostra



Segundo Müller (2009) e Silva (2008) esta uniformização tem por finalidade determinar a quantidade mínima de amostra que produz espectros com menor ruído, beneficiando a produção de bandas espectrais com melhores contornos, de modo a não

prejudicar a identificação dos fármacos (MÜLLER, 2009; SILVA, 2008). Dessa forma, a massa de amostra determinada foi de 50 ± 5 mg.

7.8 Construção dos modelos - Análise multivariada

Anteriormente a construção dos modelos, para garantir a qualidade dos conjuntos de calibração e previsão, foi realizada a detecção de amostras anômalas. Para o determinado procedimento, foi utilizada a PCA, através da análise do gráfico dos resíduos de Student *versus* a distância de Mahalanobis (PIROUETTE® versão 3.11) a qual permite constatar a influência de cada amostra em particular no modelo. Amostras com alto resíduo foram descartadas. Na sequência, foram selecionadas as amostras dos conjuntos de calibração e previsão, utilizando o algoritmo Kennard-Stone (KS) (MATLAB® versão 7.10, 2010). Após, foi construído o modelo global empregando PLS. Para o mesmo verificou-se o desempenho dos pré-processamentos A, CM e do tratamento MSC a partir do RMSEP, RMSECV, coeficiente de determinação (R^2) e número de VLs. Uma vez selecionado o melhor pré-processamento e tratamento utilizou-se na sequência os métodos de seleção de variáveis: iPLS, siPLS, disponíveis no pacote “iToolbox” versão 2.0, desenvolvido por Norgaard (NORGAARD et al., 2000) para ambiente MATLAB.

7.9 Seleção das amostras dos conjuntos de calibração e previsão

A seleção das amostras que compõem os conjuntos de calibração e previsão tem como finalidade: construção de conjuntos que apresentem a informação da matriz de dados utilizados neste estudo e que proporcione a maior variabilidade possível em relação à faixa de concentração.

As amostras que constituíram os conjuntos de calibração e previsão foram selecionadas através do algoritmo KS, presente no software MATLAB® versão 7.10 e fundamentado nas distâncias das amostras em relação à amostra média (KENNARD; STONE, 1969; MATLAB, 2010).

Após à aplicação do algoritmo KS, o conjunto de calibração foi composto por 26 amostras sintéticas e o conjunto de previsão foi composto por 10 amostras sintéticas. A amostra real (comprimidos Exforge HCT[®]) foi adicionada ao conjunto de previsão.

Diferentes autores propõem a inclusão da amostra real nos conjuntos de calibração e previsão, porém esta prática só é possível para formulações farmacêuticas produzidas por diferentes laboratórios (MÜLLER et al., 2011, SILVA et al., 2009). Para a amostra em estudo, não foi possível realizar este procedimento, já que a mesma é produzida por um único laboratório. Desta forma, e por este motivo, a mesma foi incluída no conjunto de previsão.

7.10 Desenvolvimento dos modelos para a determinação de VAL, HCT e ANL

Na determinação de VAL, HCT e ANL nas amostras em estudo foram testados o tratamento MSC associado aos pré-processamentos A e CM na construção de modelos utilizando PLS e toda informação do espectro (modelo global).

O modelo com menor valor de RMSEP (teste F (95% de confiança), valor de R^2 próximo a unidade e valores de RMSECV e RMSEP próximos (para evitar sobreajuste (“*overfitting*”)) foi selecionado como representativo do tratamento e pré-processamento mais adequado. O mesmo tratamento e o mesmo pré-processamento foram adotados para todos os modelos desenvolvidos no estudo, o que permitiu a comparação posterior entre os mesmos.

Após este procedimento foram aplicados os algoritmos iPLS e siPLS. Estes modelos foram construídos pela divisão do espectro em 8, 16 e 32 intervalos. Na aplicação do modelo siPLS os intervalos foram combinados utilizando 2 e 3 intervalos simultaneamente. A escolha dos melhores modelos foi definida a partir dos menores valores de RMSEP (teste F (95% de confiança), valor de R^2 próximo a unidade e valores de RMSECV e RMSEP próximos (para evitar sobreajuste (“*overfitting*”)). Para modelos sem diferença significativa em relação ao RMSEP foi escolhido aquele que apresentava menor número de variáveis totais (VTs).

7.11 Avaliação dos modelos obtidos e figuras de mérito

O desempenho dos modelos selecionados foi avaliado por meio do erro padrão relativo de previsão (RSEP %) e RMSEP.

A linearidade foi avaliada por meio da observação de parâmetros como coeficiente angular, intercepto e R^2 obtidos a partir da equação da reta entre valores previstos vs. valores medidos (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007) e R (FDA, 2015).

O erro sistemático (“*bias*”) foi calculado para as amostras do conjunto de previsão e avaliado sua significância através do teste t. Este método teve por finalidade avaliar a habilidade do modelo desenvolvido em fazer a previsão da amostra, pois a mesma tem uma matriz mais complexa, com excipientes variados, quando comparadas com as amostras sintéticas, o que poderia originar tendência (ITURRIAGA et al., 2001).

A exatidão dos modelos obtidos por FT-NIR foi analisada através do RMSEP (BRAGA; POPPI, 2004; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009) e RSEP% (MÜLLER, 2009; SILVA, 2008), e a precisão foi expressa em termos de repetibilidade (ASTM, 2012; BRAGA; POPPI, 2004; EMEA, 2003). A repetibilidade do método proposto foi analisada por meio do cálculo da precisão, para 3 concentrações diferentes de amostras sintéticas do conjunto de previsão (3 replicatas) (BRAGA; POPPI, 2004).

7.12 Comparação entre os modelos de calibração através de testes de significância e avaliação dos resultados frente aos parâmetros farmacopeicos

Um teste t pareado (95% de confiança) foi aplicado com a finalidade de comparar a método proposto com o método de referência.

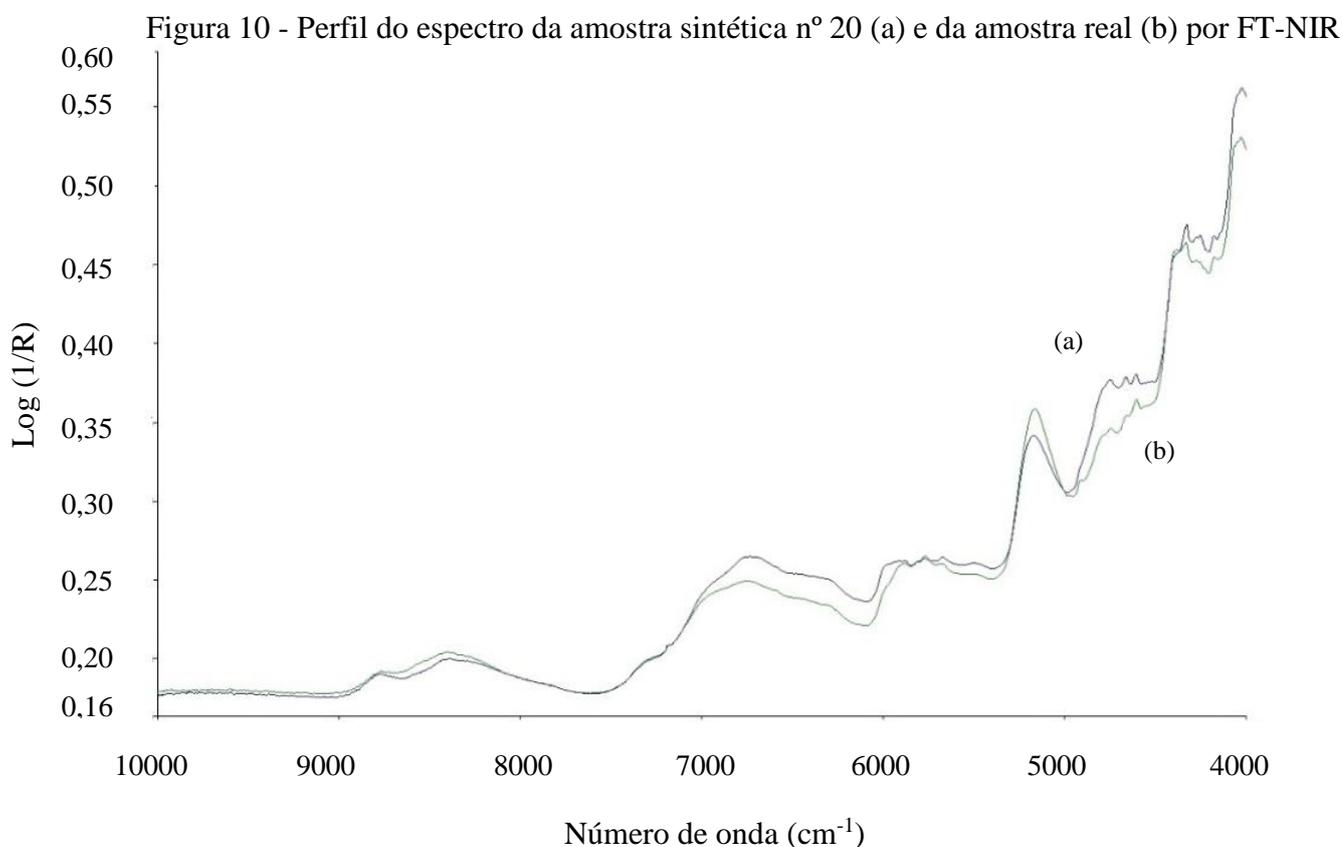
Os resultados obtidos para os melhores modelos foram avaliados frente ao critério farmacopéico o qual estabelece que, isoladamente, comprimidos contendo VAL, HCT e ANL não podem apresentar teores abaixo de 90% e acima de 110% do valor nominal (USP 32, 2009; USP 34, 2011). Desse modo, esta variação foi estabelecida para comprimidos contendo VAL, HCT e ANL. O valor obtido por CLAE foi adotado como valor nominal (devido a esta a informação fornecida ser usada para a construção dos modelos por PLS) e a variação para os valores obtidos por FT-NIR foi calculada a partir deste valor nominal.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Características gerais dos fármacos VAL, HCT e ANL

Os excipientes utilizados no preparo das amostras sintéticas foram determinados através da análise da composição da formulação farmacêutica, declarada pelo laboratório fabricante. Talco, estearato de magnésio e celulose microcristalina foram escolhidos, em virtude da ampla utilização dos mesmos. A informação presente nestes excipientes pode ser favorável para construção de modelos robustos, que apresentem características semelhantes às amostras que serão previstas (MÜLLER, 2009; SILVA, 2008).

Embora a composição quantitativa das misturas sintéticas não seja equivalente a amostra real, pode-se observar uma semelhança entre os espectros, conforme a Figura 10.



A amostra real e as amostras sintéticas foram homogeneizadas e uniformizadas, através de moagem criogênica, afim de padronizar o tamanho de partículas das amostras e não provocar alterações no espectro, já que segundo Gemperline (2006), na espectroscopia NIR a refletância difusa e a refletância especular são distintas para partículas que apresentam diferentes tamanhos e formas desiguais. Dessa forma, a linha base e a intensidade das bandas são afetadas pelas diferenças que existem entre as partículas (GEMPERLINE, 2006).

A seguir, serão expostos os critérios para eliminação de amostras anômalas, definição das amostras que farão parte do conjunto de calibração e previsão, bem como os parâmetros utilizados no desenvolvimento e avaliação dos modelos de calibração para determinação de VAL, HCT e ANL em amostras comerciais e sintéticas contendo os fármacos, utilizando os algoritmos iPLS e siPLS.

8.2 Detecção de amostras anômalas

Inicialmente, a matriz de dados (variáveis X e Y) foi tratada no aplicativo PIROUETTE® versão 3.11, para a detecção de amostras anômalas. Nesta análise foram utilizadas as regiões espectrais compreendidas entre 4000 a 1000 cm^{-1} (PIROUETTE).

A Tabela 4 demonstra a variância dos dados conferidos a cada CP utilizada, assim como a variância acumulada, quando aplicada à PCA do conjunto de dados utilizado no estudo.

Tabela 4 - Variância e variância acumulada em função do número de CPs utilizadas

Número de CPs	Variância (%)	Variância acumulada (%)
1	90,4848	90,4848
2	5,2401	95,7249
3	3,1900	98,9149
4	0,5289	99,4438
5	0,2409	99,6848
6	0,1379	98,8227
7	0,0570	99,8798
8	0,0267	99,9064
9	0,0169	99,9234
10	0,0113	99,9347

Na Tabela 4 é possível observar que 4 CPs são satisfatórias para descrever a maior parte da informação contida no conjunto de dados. Desse modo, fundamentado nas 4 CPs selecionadas, as amostras anômalas presentes foram detectadas por meio da análise do gráfico que relaciona os resíduos de Student *versus* (*vs.*) a distância de Mahalanobis. Amostras que apresentaram alto resíduo foram eliminadas do conjunto. Segundo Silva (2008), este método é eficaz na detecção de *outliers* em um conjunto de amostras contendo fármacos (SILVA, 2008).

8.3 Seleção das amostras para o conjunto de calibração e previsão

As amostras presentes no conjunto de calibração devem conter as mesmas informações das amostras que contemplam o conjunto de previsão e abranger toda faixa de concentração da propriedade de interesse. Quanto mais representativo for o modelo de calibração, menor é a chance de erro frente a amostras desconhecidas (NAES et al., 2002; NESPECA, 2013; SOUZA, 2012). As informações representativas que não forem incluídas podem gerar modelos de

calibração com capacidade preditiva baixa (BARTHUS; MAZO; POPPI, 2005; SENA et al., 2004).

A seleção de amostras pode ser realizada de forma aleatória. No entanto, esse método apesar de ser comum, não garante a representatividade do conjunto (SIMÕES, 2008). Assim, foi utilizado o algoritmo KS (KENNARD; STONE, 1969) para seleção das amostras, afim de obter um modelo de calibração representativo.

Recentemente, estudos que empregam espectroscopia NIR associada à ferramentas quimiométricas e utilizam o algoritmo KS para seleção de amostras, têm demonstrado resultados satisfatórios (COSTA; LIMA, 2013; FERREIRA et al., 2014; MELO et al., 2013; NEVES, 2013; SILVA et al., 2012).

A seguir é representado na Tabela 5 as amostras que foram removidas (*outliers*) e as amostras que pertenceram ao conjunto de calibração e previsão, através do KS.

Tabela 5 - Amostras sintéticas e comprimido (VAL, HCT e ANL) presentes no conjunto de calibração, previsão e amostras excluídas (*outliers*)

Amostras	Conjunto de Calibração	Conjunto de Previsão	Outliers
1			*
2	*		
3	*		
4		*	
5	*		
6	*		
7	*		
8			*
9			*
10	*		
11	*		
12	*		
13	*		
14		*	
15	*		
16	*		
17	*		
18		*	
19		*	
20		*	
21	*		
22	*		
23	*		
24	*	*	
26	*		
27			*
28	*		
29		*	
30	*		
31	*		
32			*
33	*		
34			*
35	*		
36		*	
37			*
38	*		
39		*	
40		*	
41	*		
42	*		
43	*		
44			*
45 (Amostra real)		*	

8.4 Determinação do número de variáveis latentes (VLs) utilizadas na construção dos modelos

A determinação do número de VLs é importante para qualidade do modelo de calibração, pois um número inferior resulta em modelo com baixa capacidade de previsão e um subajuste. Por outro lado, um número superior, ocasionará um sobreajuste. (GOMEZ-CARRACEDO, et al., 2007).

Assim, o número ideal de VLs é determinado pelo menor valor de RMSECV. O menor valor de RMSECV indicará quantas VLs serão usadas para construção do modelo de calibração (BRAGA, 2004; BRERETRON, 2000; COSTA, 2013; FERREIRA et al., 2014; FOLHA, 2014; MÜLLER et al., 2009; MÜLLER et al., 2012; OLIVEIRA, 2014; PIAVAVINI, 2014; SILVA et al., 2009; SOUZA et al., 2013).

8.5 Testes preliminares e otimização do modelo global PLS

O melhor modelo global PLS por FT-NIR para cada um dos fármacos VAL, HCT e ANL foi o que empregou o tratamento MSC associado o pré-processamento CM. Os resultados estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros do modelo global utilizando MSC e CM

	VL	RMSECV	RMSEP	R²	RSEP%
VAL	5	4,84	52,81	0,9975	12,57
HCT	4	1,90	2,67	0,9904	4,96
ANL	7	1,61	9,27	0,9946	29,38

Para Naes e colaboradores (2002) a aplicação do tratamento MSC no desenvolvimento de modelos de calibração que usam o algoritmo PLS é capaz de reduzir o número de variáveis, melhorando a linearidade (NAES et al., 2002).

Em um tutorial realizado por Souza e colaboradores (2013) para determinação de paracetamol aplicando NIR e quimiometria, o tratamento MSC foi aplicado ao conjunto de

espectros com a finalidade de remover flutuações aditivas e multiplicativas relacionadas à parâmetros físicos das amostras, tais como, diferenças de tamanho de partícula, além de garantir que os espectros apresentassem apenas informações químicas relacionadas à propriedade de interesse (SOUZA et al., 2013).

Atualmente, diferentes autores têm usado o tratamento MSC em associação a outros tratamentos e/ou pré-processamentos, afim de obter resultados satisfatórios na construção de modelos de calibração (COSTA; LIMA, 2013; FRIZON et al., 2015; GUIMARÃES, 2014; LENGOWSKI, 2012; MÜLLER et al., 2012). Outros autores utilizam o pré-processamento CM isoladamente (FERRÃO et al., 2011) ou em associação a outros tratamentos e/ou pré-processamentos (MARQUES JÚNIOR et al., 2015, MÜLLER et al, 2011; MÜLLER et al., 2012, NEVES, 2013; SILVA et al., 2009; UBER, 2013).

8.6 Modelos iPLS para VAL

O algoritmo iPLS divide o espectro em regiões equidistantes e através destas constrói modelos para cada subintervalo (NORGAARD et al., 2000). Para construção dos modelos, os espectros obtidos por FT-NIR foram divididos em 8, 16 e 32 intervalos. Os modelos obtidos foram avaliados segundo os valores de RMSECV, RMSEP, VLs (NORGAARD et al., 2000) VTs (variáveis totais), R^2 (MÜLLER, 2009; SILVA, 2008) e RSEP% (MÜLLER, 2009; SILVA, 2008) de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros dos modelos iPLS para VAL utilizando FT-NIR

Modelo	VTs	Intervalos	VLs	RMSECV	RMSEP
				VAL (mg g ⁻¹)	VAL (mg g ⁻¹)
PLS	6000	Todos	5	4,84	52,81
iPLS8	750	3	3	10,11	20,34
iPLS16	375	15	4	7,87	44,43
iPLS32	188	32	4	6,94	23,05

Os modelos iPLS8 (8 intervalos) e iPLS32 (32 intervalos) apresentaram valores de RMSEP sem diferença significativa de acordo com teste F (95% de confiança), com diferença significativa em relação ao modelo global PLS e RSEP de 4,84% e 5,09%, respectivamente.

O modelo iPLS32, embora sem diferença significativa em relação ao RMSEP do modelo iPLS8, apresentou como principal vantagem o reduzido número de VTs (188) quando comparado ao modelo iPLS8 (750).

O modelo iPLS32 utilizou o intervalo 32, que corresponde à região 4000 a 4186 cm^{-1} , onde ocorre combinação de vibrações C-H (OSBORNE, 2000; WORKMAN; 2008), presente na estrutura molecular do fármaco VAL.

Entretanto, a presença de sobreajuste (“overfitting”) em todos os modelos, associado aos altos valores RMSEP, demonstrou que o algoritmo iPLS não foi capaz de produzir modelos adequados para este conjunto de dados. Desta forma, foi aplicado o algoritmo siPLS, com o objetivo de associar diferentes regiões espectro e construir modelos com maior capacidade preditiva.

8.7 Modelos siPLS para VAL

O algoritmo siPLS tem for finalidade dividir o espectro em intervalos e combiná-los de 2 a 2, 3 a 3 ou mais intervalos (NORGAARD et al., 2000). Para construção dos modelos siPLS, os espectros foram divididos em 8, 16 e 32 intervalos com combinações de 2 e 3 intervalos. A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos por siPLS para o fármaco VAL.

Tabela 8 - Parâmetros dos modelos siPLS para VAL utilizando FT-NIR

Modelo	TVs	Intervalos	VLs	RMSECV	RMSEP
				VAL (mg g ⁻¹)	VAL (mg g ⁻¹)
PLS	6000	Todos	5	4,84	52,81
siPLS8(2)	1500	6 e 8	4	4,94	57,21
siPLS8(3)	2250	3, 4 e 8	8	3,81	74,37
siPLS16(2)	750	8 e 15	5	4,42	68,68
siPLS16(3)	1125	5, 8 e 15	6	3,93	73,70
siPLS32(2)	375	21 e 30	4	12,72	26,15
siPLS32(3)	560	19, 21 e 31	4	6,32	5,13

O modelo siPLS32(3), apresentou RMSEP menor e com diferença significativa de acordo com teste F (95% de confiança), quando comparado com os demais modelos.

No modelo selecionado siPLS32(3) não foi observado sobreajuste entre os valores de RMSECV e RMSEP. Este modelo utilizou os intervalos 19, 21 e 31 (vibrações correspondentes (OSBORNE, 2000; WORKMAN, 2008) estão representadas na Tabela 9).

Tabela 9 - Intervalos e vibrações correspondentes à determinação do fármaco VAL por FT-NIR

Intervalo	Número de onda (cm ⁻¹)	Vibração
19	6431 a 6617	1º sobretom de vibrações N-H e O-H
21	6057 a 6243	1º sobretom de vibrações C-H
31	4187 a 4373	Combinação de vibrações C-H

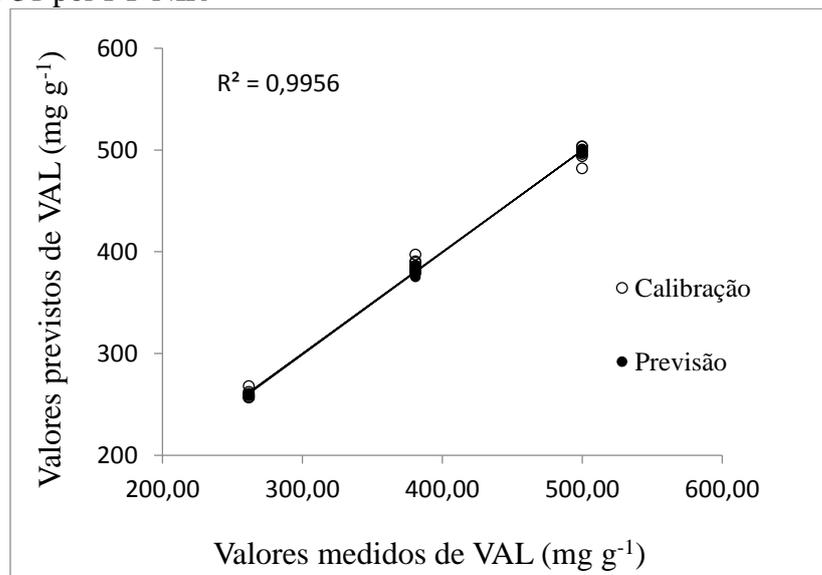
Os intervalos selecionados correspondem a vibrações de grupamentos químicos presentes na estrutura do fármaco VAL.

De modo geral, o modelo selecionado reduziu os valores de RMSEP, além de apresentar um menor número de VTs (560), quando comparado com o modelo global (6000).

Os altos valores de RMSEP dos demais modelos siPLS podem ser atribuído a diferença de composição da amostra sintética em relação a amostra real, já que a mesma apresenta de uma matriz complexa (excipientes variados). Este fato é observado em um estudo realizado por Liu e colaboradores (2014), onde avaliaram a capacidade de previsão do modelo para amostras com excipientes variados do fármaco sulfato de condroitina. As misturas incluídas no conjunto de validação que continham excipientes diferentes, daquelas utilizadas no conjunto de calibração e apresentam erros relativos superiores (LIU et al., 2014). Desse modo, uma matriz complexa tem influência na capacidade preditiva de modelos de calibração.

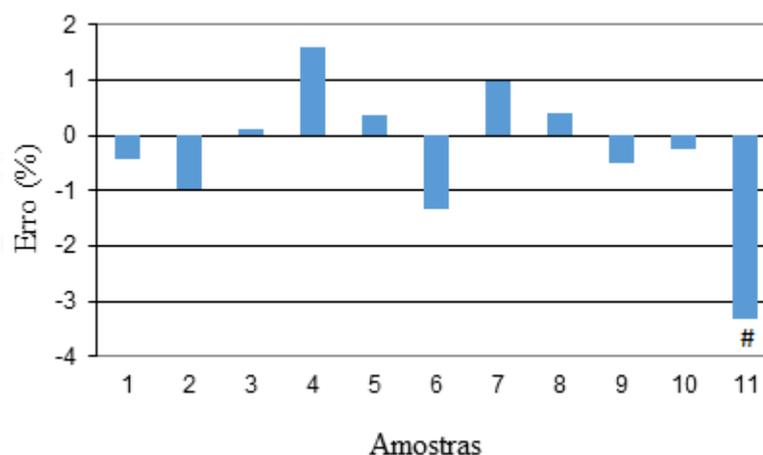
A Figura 11 demonstra os valores medidos vs. valores previstos para o modelo selecionado.

Figura 11 - Valores medidos vs. valores previstos do modelo siPLS para VAL usando os intervalos 19, 29 e 31 por FT-NIR



A Figura 12 mostra o erro relativo para as 11 amostras do conjunto de previsão.

Figura 12 - Erro relativo (%) para as 11 amostras do conjunto de previsão na determinação de VAL por siPLS



- Amostra real

O modelo selecionado apresentou baixo RSEP = 1,27%, indicando que a metodologia utilizada apresenta boa exatidão. O valor do erro (%) para cada amostra foi inferior a 4% (Figura 12). Entretanto o maior erro foi observado para a amostra real, o que pode ser atribuído a composição da mesma, já que apresenta uma matriz complexa (excipientes variados) (LIU et al., 2014).

O erro sistemático incluso no modelo foi insignificante ($bias = 1,15$ e $t_{sist} < t_{crit}$), mostrando que os valores de previsão não apresentam tendência.

O algoritmo siPLS tem sido usado por diferentes autores com resultados satisfatórios. (MÜLLER et al., 2012; WANG et al., 2012). Entretanto, poucos autores exploram o uso deste método de seleção de variáveis na quantificação de fármacos (MÜLLER et al., 2011; SILVA et al., 2009).

8.8 Modelos iPLS para HCT

Para construção dos modelos iPLS os espectros foram divididos em 8,16 e 32 intervalos. Os modelos obtidos foram comparados com o modelo global PLS e avaliados segundo os valores de RMSECV, RMSEP, VLs (NORGAARD et al., 2000) VTs (variáveis totais), R^2

(MÜLLER, 2009; SILVA, 2008) e RSEP% (MÜLLER, 2009; SILVA, 2008) de acordo com a Tabela 10.

Tabela 10 - Parâmetros dos modelos iPLS para HCT utilizando FT-NIR

Modelo	VTs	Intervalos	VLs	RMSECV	RMSEP
				HCT (mg g ⁻¹)	HCT (mg g ⁻¹)
PLS	6000	Todos	4	1,90	2,67
iPLS8	750	8	4	1,53	8,45
iPLS16	375	15	4	3,72	5,65
iPLS32	188	30	5	1,19	1,68

O modelo iPLS32 (32 intervalos) apresentou valor de RMSEP menor em relação ao modelo global PLS, entretanto, sem diferença significativa de acordo com teste F (95% de confiança) e RSEP de 3,12% e 4,96%, respectivamente. Não foram observados sobreajustes entre valores de RMSECV e RMSEP destes modelos.

O modelo iPLS32 utilizou o intervalo 30, que corresponde à região 4374 a 4560 cm⁻¹, onde ocorre combinação de vibrações C-H e combinação de vibrações N-H e O-H (OSBORNE, 2000; WORKMAN, 2008), presentes na estrutura do fármaco HCT. Este modelo apresenta como principal vantagem o reduzido número de VTs (188) quando comparado ao modelo PLS (6000).

Com a finalidade de associar diferentes regiões espectro e construir modelos com maior capacidade preditiva foi usado o algoritmo siPLS.

8.9 Modelos siPLS para HCT

Para construção dos modelos siPLS, os espectros foram divididos em 8, 16 e 32 intervalos com combinações de 2 e 3 intervalos. A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos por siPLS para determinação do fármaco HCT.

Tabela 11 - Parâmetros dos modelos siPLS para HCT utilizando FT-NIR

Modelo	VTs	Intervalos	VLs	RMSECV	RMSEP
				HCT (mg g ⁻¹)	HCT (mg g ⁻¹)
PLS	6000	Todos	4	1,90	2,67
siPLS8(2)	1500	5 e 6	5	1,55	9,26
siPLS8(3)	2250	5, 6 e 8	6	1,41	3,60
siPLS16(2)	750	10 e 15	7	1,20	6,35
siPLS16(3)	1125	10, 15 e 16	6	1,24	8,04
siPLS32(2)	375	19 e 31	3	1,48	4,62
siPLS32(3)	560	19, 24 e 30	4	1,90	0,97

O modelo siPLS32(3) apresentou menor RMSEP e com diferença significativa de acordo com teste F (95% de confiança) quando comparado com os demais modelos siPLS. Este modelo não apresenta um sobreajuste entre os valores de RMSECV e RMSEP e utilizou os intervalos 19, 24 e 30 (vibrações correspondentes (OSBORNE, 2000; WORKMAN, 2008) estão representadas na Tabela 12).

Tabela 12 - Intervalos e vibrações correspondentes à determinação do fármaco HCT por FT-NIR

Intervalo	Número de onda (cm ⁻¹)	Vibração
19	6431 a 6617	1° sobretom de vibrações N-H e O-H
24	5496 a 5682	1° sobretom de vibrações C-H
30	4374 a 4560	Combinação de vibrações C-H
		Combinação de vibrações N-H e O-H

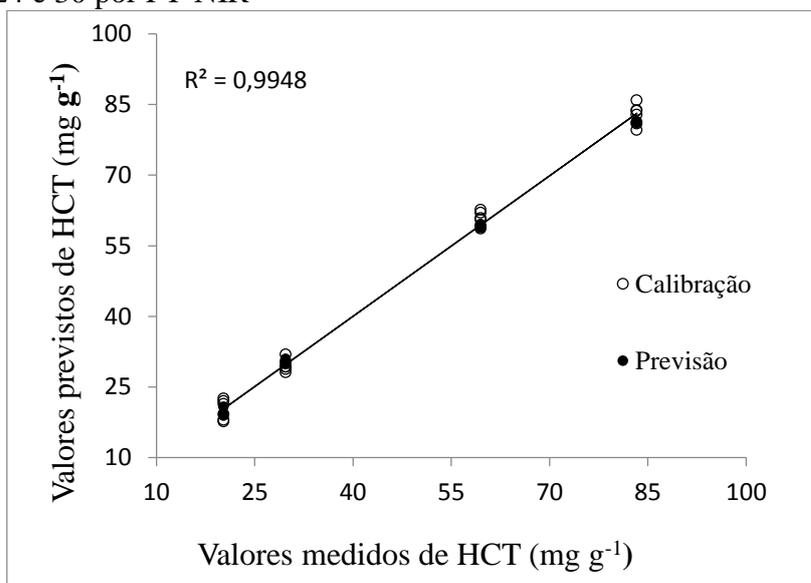
Os intervalos selecionados correspondem a vibrações de grupamentos químicos presentes na estrutura do fármaco HCT.

De modo geral, o modelo selecionado reduziu os valores de RMSEP, além de apresentar um menor número de VTs (560), quando comparado com o modelo global (6000).

Os valores de RMSEP superiores dos demais modelos siPLS podem ser atribuído a diferença de composição da amostra sintética em relação a amostra real, já que a mesma apresenta de uma matriz complexa (excipientes variados). Este fato é observado em um estudo realizado por Liu e colaboradores (2014), onde avaliaram a capacidade de previsão do modelo para amostras com excipientes variados do fármaco sulfato de condroitina. As misturas incluídas no conjunto de validação que continham excipientes diferentes, daquelas utilizadas no conjunto de calibração apresentam erros relativos superiores (LIU et al., 2014). Desse modo, uma matriz complexa tem influência na capacidade preditiva de modelos de calibração.

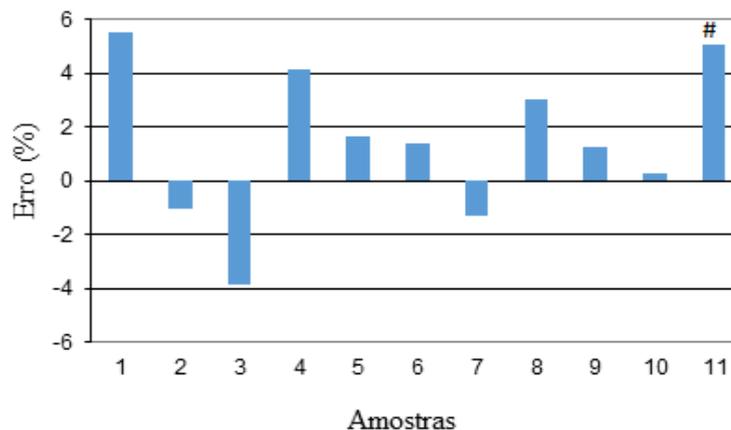
A Figura 13 mostra os valores medidos vs. valores previstos para o modelo selecionado.

Figura 13 - Valores medidos vs. valores previstos do modelo siPLS para HCT usando os intervalos 19, 24 e 30 por FT-NIR



A Figura 14 mostra o erro relativo para as 11 amostras do conjunto de previsão.

Figura 14 - Erro relativo (%) para as 11 amostras do conjunto de previsão na determinação de HCT por siPLS



- Amostra real.

O modelo selecionado apresentou baixo RSEP = 1,92%, indicando, desse modo, que a metodologia utilizada apresenta boa exatidão. O valor do erro (%) para cada amostra foi inferior a 6% (Figura 14).

O erro sistemático incluso no modelo foi insignificante ($bias = -0,40$ e $t_{sist} < t_{crit}$), mostrando que os valores de previsão não apresentam tendência.

O algoritmo siPLS tem sido usado por diferentes autores com resultados satisfatórios (FRANCESQUETT et al., 2013; WU et al., 2013). Todavia, foram encontrados poucos autores que utilizam este método de seleção de variáveis na quantificação de fármacos (MÜLLER et al., 2011; SILVA et al., 2009).

8.10 Modelos iPLS para ANL

Para construção dos modelos iPLS, os espectros foram divididos em 8,16 e 32 intervalos. Os modelos obtidos foram comparados com o modelo global PLS e foram avaliados segundo os valores de RMSECV, RMSEP, VLs (NORGAARD et al., 2000) VTs (variáveis totais), R^2 (MÜLLER, 2009; SILVA, 2008) e RSEP% (MÜLLER, 2009; SILVA, 2008), de acordo com a Tabela 13.

Tabela 13 - Parâmetros dos modelos iPLS para ANL utilizando FT-NIR

Modelo	VTs	Intervalos	VLs	RMSECV ANL (mg g⁻¹)	RMSEP ANL (mg g⁻¹)
PLS	6000	Todos	7	1,61	9,27
iPLS8	750	8	4	1,86	14,28
iPLS16	375	15	4	2,99	2,95
iPLS32	188	32	5	1,88	7,75

O modelo global PLS e o modelo iPLS32 apresentaram valores de RMSEP sem diferença significativa de acordo com teste F (95% de confiança). Já o modelo iPLS16 apresentou valor de RMSEP menor, com diferença significativa em relação ao modelo global PLS e com RSEP de 9,41%. Não foram observados sobreajustes entre valores de RMSECV e RMSEP neste modelo. Além disso, apresentou um número de TVs reduzido (375) quando comparado com o modelo global PLS (6000).

O modelo iPLS16 utilizou o intervalo 15, que corresponde à região 7181 a 7368 cm⁻¹, onde ocorre o sobretom de combinações de vibração de C-H (OSBORNE, 2000; WORKMAN, 2008), presente na estrutura molecular do fármaco ANL.

Com a finalidade de associar diferentes regiões espectro e construir modelos com maior capacidade preditiva foi usado o algoritmo siPLS.

8.11 Modelos siPLS para ANL

Para construção dos modelos siPLS, os espectros foram divididos em 8, 16 e 32 intervalos com combinações de 2 e 3 intervalos. A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos por siPLS para determinação do fármaco ANL.

Tabela 14 - Parâmetros dos modelos siPLS para ANL utilizando FT-NIR

Modelo	VTs	Intervalos	VLs	RMSECV	RMSEP
				ANL (mg g ⁻¹)	ANL (mg g ⁻¹)
PLS	6000	Todos	7	1,61	9,27
siPLS8(2)	1500	6 e 7	6	1,56	10,03
siPLS8(3)	2250	5, 7 e 8	8	1,58	1,37
siPLS16(2)	750	11 e 15	6	1,17	7,63
siPLS16(3)	1125	7, 11 e 15	7	1,09	8,51
siPLS32(2)	375	29 e 32	5	1,93	3,83
siPLS32(3)	560	19, 29 e 30	4	2,90	1,55

O modelo siPLS32(3) e siPLS8(3) apresentaram RMSEP menor quando comparados com os demais modelos e o modelo global PLS, com diferença significativa de acordo com teste F (95% de confiança) em relação ao modelo global PLS.

O modelo siPLS8(3), embora equivalente ao modelo siPLS32(3), apresentou um número de VLs (GOMEZ-CARRACEDO et al., 2007) e TVs superiores, podendo selecionar regiões com informações desnecessárias, afetando a capacidade preditiva do modelo. Por este motivo, foi selecionado o modelo siPLS32(3) para estudos posteriores.

No modelo siPLS32(3) não foi observado sobreajuste entre valores de RMSECV e RMSEP. Este modelo utiliza os intervalos 19, 29 e 30 (vibrações correspondentes (OSBORNE, 2000; WORKMAN, 2008) estão representadas na Tabela 15).

Tabela 15 - Intervalos e vibrações correspondentes à determinação do fármaco ANL por NIR

Intervalo	Número de onda (cm ⁻¹)	Vibração
19	6431 a 6617	1º sobretom de vibrações N-H e O-H
29	4561 a 4747	Combinação de vibrações N-H e O-H
30	4347 a 4560	Combinação de vibrações C-H
		Combinação de vibrações N-H e O-H

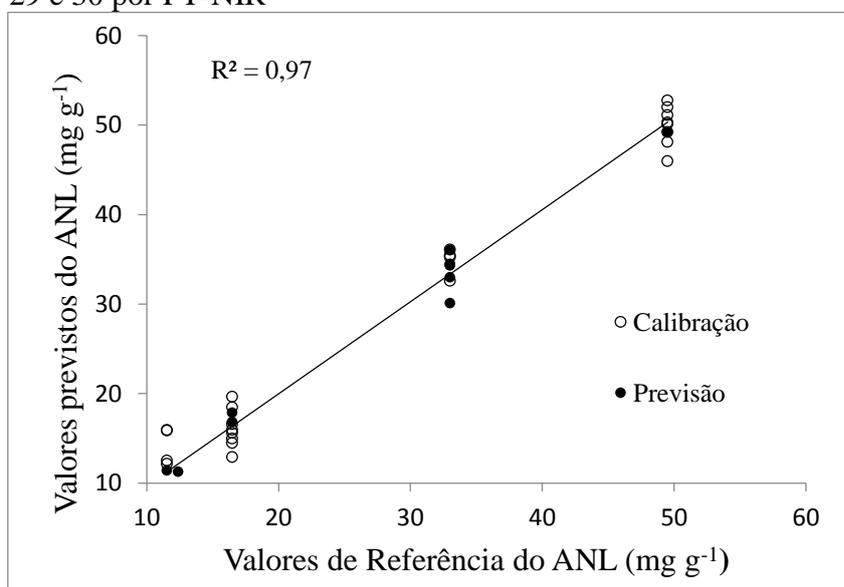
Os intervalos selecionados correspondem a vibrações de grupamentos químicos presentes na estrutura do fármaco ANL.

De modo geral, o modelo selecionado reduziu os valores de RMSEP, além de apresentar um menor número de VTs (560), quando comparado com o modelo global (6000).

Os altos valores de RMSEP de alguns dos modelos siPLS podem ser atribuído a diferença de composição da amostra sintética em relação a amostra real, já que a mesma apresenta de uma matriz complexa (excipientes variados). Este fato é observado em um estudo realizado por Liu e colaboradores (2014), onde avaliaram a capacidade de previsão do modelo para amostras com excipientes variados do fármaco sulfato de condroitina. As misturas incluídas no conjunto de validação que continham excipientes diferentes, daquelas utilizadas no conjunto de calibração apresentam erros relativos superiores (LIU et al., 2014). Desse modo, uma matriz complexa tem influência na capacidade preditiva de modelos de calibração.

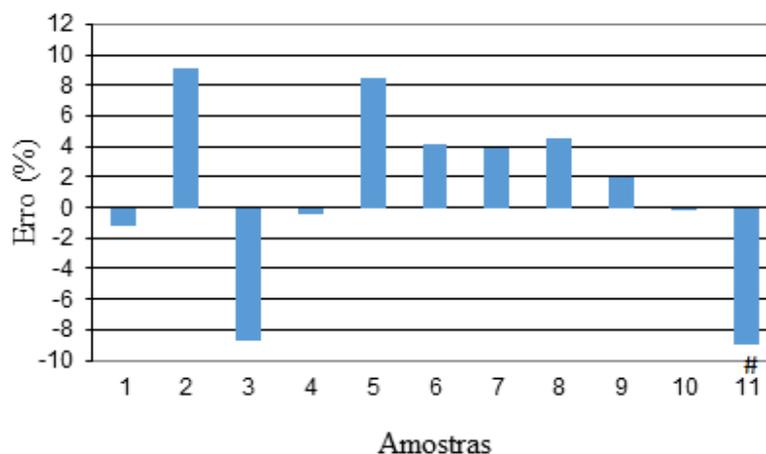
A Figura 15 mostra os valores medidos (CLAE) vs. valores previstos para o modelo selecionado.

Figura 15 - Valores medidos vs. valores previstos do modelo siPLS para ANL usando os intervalos 19, 29 e 30 por FT-NIR



A Figura 16 mostra o erro relativo para as 11 amostras do conjunto de previsão.

Figura 16 - Erro relativo (%) para as 11 amostras do conjunto de previsão na determinação de ANL por siPLS



- Amostra real.

O modelo selecionado apresentou baixo RSEP = 5,19%, indicando, desse modo, que a metodologia utilizada apresenta boa exatidão. O valor do erro (%) individualmente para cada amostra, neste modelo, foi inferior a 10% (Figura 16).

O erro sistemático incluso no modelo foi insignificante ($bias = -0,41$ e $t_{sist} < t_{crit}$), mostrando que os valores previsão não apresentam tendência.

O algoritmo siPLS tem sido usado por diferentes autores com resultados satisfatórios (FERRÃO et al., 2011; SHI et al., 2012, LIU et al., 2012; MARQUES JUNIOR et al., 2015; MENEZES et al., 2014; PIANTAVINI et al., 2014). Porém, são poucos artigos que utilizam este método de seleção de variáveis na quantificação de fármacos (MÜLLER et al., 2011; SILVA et al., 2009).

8.12 Comparação dos valores medidos vs. valores previstos para as amostras de previsão

O teor da amostra real foi determinado por CLAE, segundo El-Gizawy e colaboradores (2012) e os valores percentuais encontrados para VAL, HCT e ANL foram 107,69%, 100,79% e 102,48%, respectivamente, com tempos de retenção de 2,06 minutos para HCT; 3,54 minutos para ANL e 12,97 minutos para VAL.

A Tabela 16 mostra os resultados médios da previsão de VAL para as amostras do conjunto de previsão.

Tabela 16 - Resultados médios da previsão de VAL

Amostras do conjunto de previsão	Valor declarados (mg g⁻¹)	Valores medidos (mg g⁻¹)	Valores previstos (mg g⁻¹)
4	261,90	261,37	260,28
14	261,90	261,37	258,81
18	380,95	380,18	380,60
19	380,95	380,18	386,29
20	380,95	380,18	381,58
25	380,95	380,18	375,13
29	380,95	380,18	383,86
36	500,00	499,00	500,96
39	500,00	499,00	496,49
40	500,00	499,00	497,80
45(Comprimido)	387,22	417,03	403,16

* Para a amostra real foi considerado o valor obtido pela quantificação por CLAE (convertida em mg g⁻¹, através do peso médio).

Para determinação de VAL nas amostras utilizando o método por FT-NIR obteve-se teores de 96,67 a 101,7% (valor médio de 99,7%). O método proposto apresentou uma variação dentro da faixa especificada (90%-110%) pela Farmacopéia Norte Americana (USP 32, 2009; USP 34, 2011).

Os valores medidos foram comparados com os valores previstos segundo o teste t pareado (95% de confiança) e não foi observada diferença significativa entre os mesmos. Desta forma, sugere-se que o método é adequado para aplicação na determinação do fármaco VAL em comprimidos contendo a associação tripla.

A Tabela 17 mostra os resultados médios da previsão de HCT para as amostras do conjunto de previsão.

Tabela 17 - Resultados médios da previsão de HCT

Amostras do conjunto de previsão	Valores declarados (mg g⁻¹)	Valores medidos (mg g⁻¹)	Valores previstos (mg g⁻¹)
4	29,76	29,36	30,98
14	83,33	82,23	81,39
18	20,24	19,97	19,20
19	20,24	19,97	20,80
20	29,76	29,36	29,85
25	59,52	58,73	59,55
29	83,33	82,23	81,16
36	29,76	29,26	30,25
39	59,52	58,73	59,45
40	59,52	58,73	58,90
Amostra real*	30,25	30,49	32,04

* Para a amostra real foi considerado o valor obtido pela quantificação por CLAE (convertida em mg g⁻¹, através do peso médio).

Para determinação de HCT nas amostras utilizando o método por FT-NIR obteve-se teores de 96,14 a 105,51% (valor médio de 101,49%). O método proposto apresentou uma variação dentro da faixa especificada (90%-110%) pela Farmacopéia Norte Americana (USP 32, 2009; USP 34, 2011).

Os valores medidos foram comparados com os valores previstos segundo o teste t pareado (95% de confiança) e não foi observada diferença significativa entre os mesmos. Desta forma, sugere-se que o método é adequado para aplicação na determinação do fármaco HCT em comprimidos contendo a associação tripla.

A Tabela 18 mostra os resultados médios da previsão de ANL para as amostras do conjunto de previsão.

Tabela 18 - Resultados médios da previsão de ANL

Amostras do conjunto de previsão	Valores declarados (mg g ⁻¹)	Valores medidos (mg g ⁻¹)	Valores previstos (mg g ⁻¹)
4	11,57	11,55	11,41
14	33,05	33,01	36,02
18	33,05	33,01	30,12
19	49,57	49,51	49,28
20	16,52	16,50	17,89
25	33,05	33,01	34,39
29	33,05	33,01	34,30
36	33,05	33,01	34,50
39	16,52	16,50	16,82
40	33,05	33,01	33,00
Amostra real*	12,10	12,40	11,28

* Para a amostra real foi considerado o valor obtido pela quantificação por CLAE (convertida em mg g⁻¹, através do peso médio).

Para determinação de ANL nas amostras utilizando o método por FT-NIR obteve-se teores de 90,96 a 108,42% (valor médio de 101,13%). O método proposto apresentou uma variação dentro da faixa especificada (90%-110%) pela Farmacopéia Norte Americana (USP 32, 2009; USP 34, 2011).

Os valores medidos foram comparados com os valores previstos segundo o teste t pareado (95% de confiança) e não foi observada diferença significativa entre os mesmos. Desta forma, sugere-se que o método é adequado para aplicação na determinação do fármaco ANL em comprimidos contendo a associação tripla.

8.13 Resultados obtidos para os parâmetros de mérito em calibração multiavariada para os fármacos VAL, HCT e ANL

A seguir serão apresentados os parâmetros de mérito usado neste trabalho e seus respectivos resultados (Tabela 19).

A linearidade foi determinada através da análise do coeficiente angular e do intercepto da equação linear obtida dos valores medidos e os valores previstos e pelo R (FDA, 2015; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007) (Tabela 19).

A exatidão dos modelos obtidos por FT-NIR foram expressos através do RMSEP (BRAGA; POPPI, 2004; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009) e RSEP% (MOFFAT et al., 2000; MÜLLER, 2009; SILVA, 2008, UBER, 2013), e a precisão foi expressa em termos de repetibilidade (ASTM, 2012; BRAGA; POPPI, 2004; EMEA, 2003) (Tabela 19).

O erro sistemático *bias* foi determinado e sua significância foi avaliada em termos de teste t, onde anteriormente a aplicação do teste realiza-se o cálculo do desvio padrão dos erros de validação (SDV) (ASTM, 2012) (Tabela 19). Diferentes autores avaliam se erro sistemático *bias* é insignificante através do SDV e teste t (MARQUES JÚNIOR et al., 2015; NESPECA, 2013; UBER, 2013).

Tabela 19 - Principais parâmetros de mérito para determinação de VAL, HCT e ANL por FT-NIR

	FT-NIR		
	VAL	HCT	ANL
Exatidão – RSEP%	1,27	1,92	5,19
Erro sistemático (<i>bias</i>)	-	-	-
Precisão (mg g ⁻¹)	1,87	1,17	0,79
Inclinação*	0,9985	1,0075	1,0295
Intercepto*	0,5594	0,2699	0,6220
Coeficiente de correlação	0,9977	0,9973	0,9848

*valores baseados a na equação da reta obtida entre valores previstos vs. valores medidos.

A aplicação do método de seleção de variáveis siPLS aos dados permitiu a construção de modelos mais robustos em relação à dimensionalidade do modelo (número de VTs e VLs) e menores RMSEPs, quando comparados aos modelos obtidos com informação do espectro inteiro. Para Oliveira e colaboradores (2004) a escolha das regiões do espectro pode melhorar significativamente a habilidade de predição dos modelos, reduzindo os erros de predição e mostrando a concordância entre os valores previstos e os valores medidos (coeficiente de

correlação próximo à unidade) (OLIVEIRA et al., 2004). Segundo Chen e colaboradores (2008), Wu e colaboradores (2010), o algoritmo siPLS oferece melhores coeficientes de correlação e menores erros de predição em relação ao iPLS (CHEN et al., 2008; WU et al., 2010).

Os valores de precisão do método proposto por FT-NIR, em termos de repetibilidade foram inferiores a $1,87\text{mg g}^{-1}$ nas concentrações das amostras 4, 20 e 40 apresentadas na Tabelas 16, 17 e 18 para VAL, HCT e ANL.

Em relação a exatidão os valores foram expressos em termos de RSEP%. Para o fármaco ANL, apesar da amostra real não apresentar o maior erro individual, o valor de RSEP% foi maior quando comparado aos resultados de RSEP% para determinação dos fármacos VAL e HCT. Este fato pode ser atribuído a sua baixa concentração em relação aos demais componentes da formulação.

No que diz respeito ao parâmetro linearidade, segundo o FDA (2015), o R deve ser próximo a 1 e o intercepto próximo a 0, o que pode ser observado na tabela 19.

De modo geral, o método proposto por FT-NIR reduziu o tempo de análise quando comparado com o método de referência, não utilizou solventes orgânicos, foi executado com mínimo preparo de amostra, proporcionou resultados satisfatórios, podendo, dessa forma, ser usado nas rotinas de controle de qualidade de medicamentos.

9 CONCLUSÃO

A espectroscopia no FT-NIR associada à ferramentas quimiométricas, mostraram-se adequados para determinação de VAL, HCT e ANL em comprimidos. Esta metodologia é considerada rápida, não-destrutiva, de fácil manuseio dos instrumentos, além de ser uma técnica considerada “verde”, podendo ser aplicada em diversas áreas.

Na quantificação de VAL por FT-NIR, o modelo utilizando todas as variáveis independentes (modelo global com 6000 comprimentos de onda) forneceu um valor de RMSEP de 52,81 mg g⁻¹, RSEP de 12,57%, R² de 0,9975, utilizando 5 VLs. No entanto, empregando-se o método de seleção de variáveis siPLS foi possível obter um modelo melhor, que apresentou um valor de RMSEP de 5,13 mg g⁻¹ (90% menor que o do modelo global), RSEP de 1,27% (90% menor que o modelo global), R² de 0,9956, 4 VLs, utilizando somente 560 variáveis independentes (91% menos variáveis que o modelo global).

Na quantificação de HCT por FT-NIR, o modelo utilizando todas as variáveis independentes (modelo global com 6000 comprimentos de onda) forneceu um valor de RMSEP de 2,67 mg g⁻¹, RSEP de 4,96%, R² de 0,9946, utilizando 4 VLs. No entanto, empregando-se o método de seleção de variáveis siPLS foi possível obter um modelo melhor, que apresentou um valor de RMSEP de 0,97 mg g⁻¹ (64 % menor que o do modelo global), RSEP de 1,92% (61% menor que o modelo global) R² de 0,9948, 4 VLs, utilizando somente 560 variáveis independentes (91% menos variáveis que o modelo global).

Na quantificação de ANL por FT-NIR, o modelo utilizando todas as variáveis independentes (modelo global com 6000 comprimentos de onda) forneceu um valor de RMSEP de 9,27 mg g⁻¹, RSEP de 29,38%, R² de 0,9904, utilizando 7 VLs. No entanto, empregando-se o método de seleção de variáveis siPLS foi possível obter um modelo melhor, que apresentou um valor de RMSEP de 1,55 mg g⁻¹ (83 % menor que o do modelo global), RSEP de 5,19% (82% menor que o modelo global), R² de 0,9700, 4 VLs, utilizando somente 560 variáveis independentes (91% menos variáveis que o modelo global).

Desse modo, o método proposto por siPLS mostrou-se uma ferramenta eficaz na redução do número de variáveis independentes, aumentando a capacidade preditiva dos modelos e assim, proporcionando resultados satisfatórios. Além disso, quando comparado com o método de referência, não apresentou diferenças significativas de acordo com teste t pareado (95% de confiança).

De modo geral, uso da técnica analítica por FT-NIR associada à regressão multivariada é considerada eficaz, pois é capaz de quantificar as substâncias ativas na formulação disponível comercialmente, sem a etapa de preparo da amostra, sem uso de solventes, menor geração de resíduos, sendo considerada rápida e simples. Dessa maneira, pode colaborar com o controle de qualidade de fármacos inclusos em associações, fornecendo subsídios para avaliação do teor na formulação disponível comercialmente a partir deste método espectroscópico.

REFERÊNCIAS

ABDEL-WADOOD, H.M.; MOHAMED, N.A.; MAHMOUD, A.M. Validated spectrofluorometric methods for determination of amlodipine besylate in tablets. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomelecular Spectroscopy**, v. 70, p. 564-570, 2008.

ADAMS, M.J. **Chemometrics in analytical spectroscopy**. 2^a ed., Royal Society Chemistry:UK, 2004.

ALLEMANN, Y.; FRAILE, B.; LAMBERT, M.; BARBIER, M.; FERBER, P.; IZZO, J.J. Efficacy of the Combination of Amlodipine and Valsartan in Patients With Hypertension Uncontrolled With Previous Monotherapy: The Exforge in Failure After Single Therapy (EX-FAST) Study. **The Journal Clinical Hypertension**, v. 10, p. 3, 2008.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM E1655: standard practices for infrared multivariate quantitative analysis. West Conshohocken, 29 p., 2012.

ANANDAKUMAR, K.; JAYAMARIAPPAN, M. Absortion correction method for the simultaneous estimation of amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in bulk and in combined tablete dosage form. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 23-27, 2011.

ANDRE, M. Multivariate Analysis and Classification of the Chemical Quality of 7-Aminocephalosporanic Acid Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 3460-3467, 2003.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografia Farmacopeica: Hidroclorotiazida. Acesso pelo site: www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/arquivos/cp_materia_prima/HIDROCLORO_TIAZIDA_CP.doc, em 27 de janeiro de 2015.

ARAÚJO, C.G.S. Fisiologia do exercício físico e hipertensão arterial: uma breve introdução. **Revista de Hipertensão**, v. 4, p. 4, 2001.

ARNOLD, S.A.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B.; HALL, J. W. Employing Near-Infrared Spectroscopic Methods of Analysis for Fermentation Monitoring and Control - Part 1, Method Development. **BioPharm International**, p. 26-34, nov, 2002.

ARUMUGAM, R.; KANNAN, R.R.R.; JAYALAKSHMI, J.; MANIVANNAN, K.; DEVI, G.K.; ANANTHARAMAN, P. Determination of element contents in herbal drugs: Chemometric approach. **Food Chem.**, v. 135, p. 2372-2377, 2012.

BARBOSA, L.C.A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**, 1ªed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007.

BARRIOS, V.; ESCOBAR, C. Valsartan-amlodipine-hydrochlorothiazide: the definitive fixed combination? **Expert Review Cardiovascular Therapy**, v. 8, p. 1609-1618, 2010.

BARTHUS, R.C.; MAZO, L.H.; POPPI, R.J. Simultaneous determination of vitamins C, B6 and PP in pharmaceuticals using differential pulse voltammetry with a glassy carbon electrode and multivariate calibration tool. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 38, p. 94-99, 2005.

BARTHUS, R.C.; MAZO, L.H.; POPPI, R.J. Aplicação de calibração multivariada para a determinação simultânea de riboflavina (VB2), tiamina (VB1), piridoxina (VB6) e nicotinamida (VPP). **Quim. Nova**, v. 30, p.1638-1643, 2007.

BEEBE, K.R.; PELL, R.J.; SEASHOLTZ, M.B. **Chemometrics A Practical Guide**. New York: John Wiley & Sons, 1998.

BLANCO, M.; ALCALÁ M.; Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by near infrared spectroscopy. A contribution to process analytical Technologies. **Anal. Chim. Acta**, v. 557, p. 353-359, 2006^a.

BLANCO, M.; ALCALÁ, M. Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation: Development and validation of a near infrared spectroscopic method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 280–286, 2006b.

BLANCO, M.; ALCALÁ, M. **Process Analytical Technology: Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries: NIR spectroscopy in Pharmaceutical Analysis: Off-line and At-line PAT Applications**, 2ª ed., John Wiley & Sons, Ltd, 2010.

BLANCO, M.; ALCALÁ, M.; BAUTISTA, M. Pharmaceutical gel analysis by NIR spectroscopy Determination of the active principle and low concentration of preservatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, p. 409-414, 2008.

BLANCO, M.; COELLO, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S.; PAGÈS, J. Calibration in nonlinear near infrared reflectance spectroscopy: a comparison of several methods. **Anal. Chim. Acta**, v. 384, p. 207-214, 1999.

BLANCO, M.; PEGUERO, A. Influence of physical factors on the accuracy of calibration models for NIR spectroscopy. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 52, p. 59-65, 2010.

BLANCO, M.R.; MESTANZA, C.; PEGUERO, A. "Controlling individual steps in the production process of paracetamol tablets by use of NIR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 797-804, 2010.

BOTELHO, B. G.; MENDES, B. A. P.; SENA, M. M. Implementação de um método robusto para o controle fiscal de umidade em queijo minas artesanal. Abordagem metrológica multivariada. **Química Nova**, p. 1-7, 2013.

BRAGA, J.W.B. **Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada, aplicada na determinação de carbamazepina por espectrometria no infravermelho próximo e médio.** Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, 2004.

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

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003**. Dispõe sobre o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União - Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brasil, de 04/08/2003.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC nº 17, de 16 de abril de 2010**: Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União - Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brasil, de 17/04/2010.

BRERETON, R.G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, v. 125, p. 2125-2154, 2000.

BRERETON, R.G. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and chemical Plant.** Chichester/ Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltda, 2003.

BRERETON, R.G. **Applied chemometrics for scientists**. Chichester/ Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd, 2007.

BRITISH. Pharmacopoeia 2007. 5. London: The Stationery Office on behalf of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, 2007.

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. 4ª ed. São Paulo: Pearson/Prentice Hall, 2006.

BRUNS, R.E.; FAIGLE, J.F.G. Quimiometria, **Quím. Nova**, v. 4, p. 84-99, 1985.

CALHOUN, D.A.; LACOUCIÈRE, Y.; CHIANG, Y.T.; GLAZER, R.D. Triple antihypertensive therapy with amlodipine, valsartan, and hydrochlorothiazide: a randomized clinical trial. **Hypertension**, v. 54, p. 32-39, 2009.

CARRETERO, O.A.; OPARIL, S. Essential hypertension: part I – definition and etiology. **Circulation**, vol.101, pag. 329-335, 2000.

CEITIL, L.O.S.R. **Process Analytical Technology in Active Pharmaceutical Ingredients Production**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2007.

CHAMIDADE, P.; BAILLET, A.; FERRIER, D. Data treatment in near infrared spectroscopy. **Analisis Magazine**, v. 26, p. 33-38, 1998.

CHEN, Q., ZHAO, J.; LIU, M.; CAI, J.; LIU, J. Determination of total polyphenols content in green tea using FT-NIR spectroscopy and different PLS algorithms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 568–573, 2008.

CIENFUEGOS, F. **Estatística Aplicada ao Laboratório**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2007.

CHOBANIAN, A.V.; BAKRIS, G.L.; BLACK, H.R.; CUSHMAN, W.C.; GREEN, L.A.; IZZO, J.L.Jr.; JONES, D.W.; MATERSON, B.J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J.T.Jr.; ROCELLA, E.J. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, p. 1206-1252, 2003.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C.; Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos, **Quím. Nova**, v. 30, p. 481-487, 2007.

COSTA, R.C. **Determinação de parâmetros (sólidos solúveis, pH e acidez titulável) em ameixas intactas usando espectroscopia no infravermelho próximo e seleção de comprimento de onda.** Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

COSTA, R.C.; LIMA, K.G. Prediction of Parameters (Soluble Solid and pH) in Intact Plum using NIR Spectroscopy and Wavelength Selection. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 24, p. 1351-1356, 2013.

COZZOLINO, D.; RESTAINO, E.; MANNA, A.L.; FERNANDEZ, E.; FASSIO, A. Usefulness of near infrared reflectance (NIR) spectroscopy and chemometrics to discriminate between fishmeal, meat meal and soya meal samples. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 36, p. 209-124, 2009.

DARWISH, H.W.; HASSAN, S.A.; SALEM, M.Y.; EL-ZEANY, B.A. Comparative study between derivative spectrophotometry and multivariate calibration as analytical tools applied for the simultaneous quantitation of Amlodipine, Valsartan and Hydrochlorothiazide. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 113, p. 215-223, 2013a.

DARWISH, W.H.; HASSAN, S.A.; SALEM, M.Y.; EL-ZEANY, B.A. Rapid and sensitive TCL and CLAE with on-line wavelength switching methods for simultaneous quantification of amlodipine, valsartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, p. 345-356, 2013b.

DARWISH, W.H.; HASSAN, S.A.; SALEM, M.Y.; EL-ZEANY, B.A. Different approaches in Partial Least Squares and Artificial Neural Network models applied for the analysis of a ternary mixture of Amlodipine, Valsartan and Hydrochlorothiazide. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.122, p. 744-750, 2014.

DEEKS, E.D. Amlodipine/Valsartan/Hydrochlorothiazide: Fixed-dose combination in hypertension. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v. 9, p. 411-418, 2009.

EASTMENT, H.T.; KRZANOWSKI, W.J. Cross-validatory choice of the number components from a principal components analysis. **Technometrics**, v. 24, p. 73-77, 1982.

EINAX, J.W.; ZWANZIGER, H.W.; GEIß, S. **Chemometrics in environmental analysis.** Weinheim: Wiley-VCH, cap. 5, 1997.

EL-GIZAWY, S.M.; ABDELMAGEED, O.H.; OMAR, M.A.; DERYEA, S.M.; ABDELMEGIED, A.M. Development and Validation of CLAE Method for Simultaneous Determination of Amlodipine, Valsartan, Hydrochlorothiazide in Dosage Form and Spiked Human Plasma. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 422-430, 2012.

ESCOBAR, C.; BARRIOS, V. Combined therapy in the treatment of hypertension. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, p. 3-8, 2009.

ESCUREDO, O.; SEJO, C.M.; SALVADOR, J.; GONZÁLEZ-MARTÍN. Near infrared spectroscopy for prediction of antioxidant compounds in the honey. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3409-3414, 2013.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5^a ed. São Paulo: Atheneu, Brasília, 2010.

FEINBERG, M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 174-183, 2007.

FERRÃO, M.F. **Aplicação de técnicas espectroscópicas de reflexão no infravermelho no controle de qualidade de farinha de trigo**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas -- UNICAMP, Campinas, 2000.

FERRÃO, M.F.; VIEIRA, M.S.; PAZOS, R.E.P.; FACHINI, D.; GERBASE, A.E.; MARDER, L. Simultaneous determination of quality parameters of biodiesel/diesel blends using HATR-FTIR spectra and PLS, iPLS or siPLS regressions. *Fuel*, v. 90, p. 701-706, 2011.

FERRÉ, J.; BOQUÉ, R.; FERNÁNDEZ-BAND, B.; LARRECHI, M.S.; RIUS, F.X. Figures of merit in multivariate calibration. Determination of four pesticides in water by flow injection analysis and spectrophotometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 348, p. 167-175, 1997.

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

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

FERREIRA, M.H.; BRAGA, J.W.B.; SENA, M.M. Development and validation of a chemometric method for direct determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples by diffuse reflectance near infrared spectroscopy. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 158-164, 2013.

FERREIRA, D.S.; GALÃO, O.F.; PALLONE, J.A.L.; POPPI, R.J. Comparison and application of near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopy for determination of quality parameters in soybean samples. **Food Control**, v. 35, p. 227-232, 2014.

FERREIRA, M.H.; GOMES, J.F.F.; SENA, M.M. Development and validation of a multivariate calibration model for determination of dipyrone in oral solutions by near infrared spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1680-1686, 2009.

Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry: **Development and Submission of Near Infrared Analytical Procedures**, 2015. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM440247.pdf>. Acesso: maio/2015

FOLHA, T.O. **Uso de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) para avaliação de parâmetros de qualidade de farinhas de mandioca**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

FRANCESQUETT, J.Z.; DOPKE, H.B.; COSTA, B.; KIPPER, L.M.; FERRÃO, M.F. Determinação do Poder Calorífico de Amostras de Gasolina Utilizando Espectroscopia no Infravermelho Próximo e Regressão Multivariada. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 5, p. 88-95, 2013.

FRIZON, C.N.T.; OLIVEIRA, G.A.; PERUSSELLO, P.G.; ZAMORA, P.; CAMLOFSKI, A.M.O.; ROSSA, Ü.B. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 795-801, 2015.

GADEPALLI, S.G.; DEME, P.; KUNCHA, M.; SISTLA, R. Simultaneous determination of amlodipine, valsartan and hydrochlorothiazide by LC-ESI-MS/MS and its application topharmacokinetics in rats. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, p. 399-406, 2013.

GALVÃO, R.K.H.; ARAUJO, 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**, v. 67, p. 736-740, 2005.

GELADI, P. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics, **Spectrochim. Acta Part B**, v. 58, p. 767-782, 2003.

GELADI, P.; KOWALSKI, B.R. Partial Least-square: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1-17, 1986.

GELADI, P.; MACDOUGALL, D.; MARTENS, H.; Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat. **Appl. Spectrosc.**, v. 39, p. 491-500, 1985.

GEMPERLINE, P. **Practical guide to chemometrics**, 2ª ed.; Editora CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton- Flórida, 2006.

GALANDE, V.R; K. G. BAHETI, K.G.; INDRAKSHA, S.; DEHGHAN, M.H. Estimation of Amlodipine Besylate, Valsartan and Hydrochlorothiazide in Bulk Mixture and Tablet by UV Spectrophotometry. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 74, p. 18-23, 2012.

GIL, E.S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3ª ed. São Paulo, Pharmabooks, 2010.

GOMES, M.J.V.M.; REIS, A.M.M. **Ciências Farmacêuticas: Uma abordagem em farmácia hospitalar**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11ª. Ed. Rio de Janeiro: Mc Graw- Hill, cap 29, 2006.

GOMEZ-CARRACEDO, M. P.; ANDRADE, J. M.; RUTLEDGE, D. N; FABER, N. M.; Selecting the optimum number of partial least squares components for the calibration of attenuated total reflectance-mid-infrared spectra of undersigned kerosene samples. **Anal. Chim.Acta**, v. 585, p. 253-265, 2007.

GRADMAN, A.H.; BASILE, J.N.; CARTER, B.L.; BAKRIS, G.L. Combination therapy in hypertension. *The Journal of Clinical Hypertension*, cap. 4, p. 42–50, 2010.

GUIMARÃES, P.Q. **Comparação entre técnicas de calibração multivariada para quantificação de zidovudina em comprimidos utilizando espectroscopia NIR**. Monografia. (Graduação em Química Industrial) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

GRANGEIRO JÚNIOR, S. **Aplicação de Métodos Quimiométricos em Análises de Formas Farmacêuticas Sólidas Lamivudina (3TC) + Zidovudina (AZT) Baseados na Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta e do Infravermelho próximo**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

HAIR, J.F.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L.; BLACK, W.C. **Análise Multivariada de dados**, 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2005.

HARIA, M.; WAGSTAFF, A.J. Amlodipine - a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in cardiovascular-disease. **Drugs**, v. 50, p. 560-586, 1995.

HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. Princípios de Análise Instrumental, 6ª ed. Porto Alegre: Bookma, 2009.

HUSSEIN, M.A.; CHAPMAN, R.H.; BENNER, J.S.; TANG, S.S.K.; SOLOMON, H.A.; JOYCE, A.; FOODY, J.M. Does a single-pill antihypertensive/ lipid-lowering regimen improve adherence in US managed care enrollees? A non-randomized, observational, retrospective study. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v.10, p.193-202, 2010.

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINES. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**, USA, 2005. Disponível em http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf . Acesso: março de 2015.

ITO, M.; SUZUKIB, T.; YADAB, S.; NAKAGAMI, H.; TERAMOTO H.; YONEMOCHI, E.; TERADA, K. Development of a method for nondestructive NIR transmittance spectroscopic analysis of acetaminophen and caffeine anhydrate in intact bilayer tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 396-402, 2010.

ITURRIAGA, H.; COELLO, J.; MASPOCH, S.; PORCEL, M. Multi-component kinetic spectrophotometric analysis. Selection of wavelength and time ranges. **Analyst**, v. 126, p. 1135-1141, 2001.

JAMRÓGIEWICZ, M. Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 66, p. 1-10, 2012.

JOSHI, S.; KARBHARI, P.; BHOIR, S. RP-LC simultaneous determination of nebivolol hydrochloride and amlodipine besilate in bi-layer tablets. **Chromatographia**, v. 70, p. 557-561, 2009.

JOTHIESWARI, D.; ANANDAKUMAR, K.; VIJAYA, D.D.; VIJAYAKUMAR, B.; PRIYA, D.; STEPHEN, B.R. Validated RP-CLAE Method for the Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate, Valsartan and Hydrochlorothiazide in Bulk and in Pharmaceutical Formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 5, p. 1-7, 2010.

JULIUS, S.; KJELDSSEN, S.; WEBER, M.; BRUNNER, H.; EKMAN, S.; HANSSON, L.; HUA, T.; LARAGH, J.; MCINNES, G.T.; MITCHELL, L.; PLAT, F.; SCHORK, A.; SMITH, B.; ZANCHETTI, A. Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with

regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. **Lancet**, v. 363, p. 2022-2031, 2004.

KAMADA, K.; YOSHIMURA, S.; MURATA, M.; MURATA, H.; HAGAI, H.; USHIO, H.; TERADA, K. Characterization and monitoring of pseudo-polymorphs in manufacturing process by NIR. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 368, p. 103-108, 2009.

KAMAL-ELDIN, A.; ANDERSSON, R.A. Multivariate Study of the Correlation Between Tocopherol Content and Fatty Acid Composition in Vegetable Oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, p. 375-380, 1997.

KEARNEY, P.M.; WHELTON, M.; REYNOLDS K., MUNTNER, P.; WHELTON, P. K.; HE, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet**, v. 365, p. 217-223, 2005.

KELLNER, R.; J.M.; OTTO, M.; VALCARCEL, M.; M.H. **Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science**, 2^a ed., Wiley-VCH, 2004.

KENNARD, R. W.; STONE, L.A. Computeraided design of experiments. *Technometrics*, v. 11, p. 137-148, 1969.

KHANMOHAMMADI, M.; GARMARUDI, A.B.; DE LA GUARDIA, M. Characterization of petroleum-based products by infrared spectroscopy and chemometrics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 135-149, 2012.

KIM, K.A.; PARK, P.W.; PARK, J.Y. Effect of cytochrome P450 3A5*3 genotype on the stereoselective pharmacokinetics of amlodipine in healthy subjects. **Chirality**, v. 21, p. 485-491, 2009.

KOLASANI, A., XU, H. & MILLIKAN, M. Evaluation of mineral content of Chinese medicinal herbs used to improve kidney function with chemometrics. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1465-1471, 2011.

KULIGOWSKI, J.; QUINTÁS, G.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Direct determination of polymerized triglycerides in deep-frying olive oil by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy using partial least squares regression. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 861-869, 2010.

LAVINE, B.K. **Clustering and Classification of Analytical Data in the Encyclopedia of Analytical Chemistry: Instrumentation and Applications**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000.

LAWES, C.; HOORN, S.V.; LAW, M.; ELLIOT, P.; MACMAHON, S.; RODGERS, A. Blood pressure and the global burden of disease 2000. Part II: Estimates of attributable burden. **J. Hypertens.**, v. 24, p. 423-430, 2008.

LEARDI, R.; NORGAARD, L.; Sequential application of backward interval partial least squares and genetic algorithms for the selection of relevant spectral regions. **J. Chemom.**, v. 18, p. 486-497. 2004.

LENGOWSKI, E.C. **Caracterização e predição da cristalinidade de celulose através de espectroscopia no infravermelho e análise multivariada**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

LI, L.; ZANG, H. LI, J.; CHEN, D.; LI, T.; WANG, F. Identification of anisodamine tablets by Raman and near-infrared spectroscopy with chemometrics. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 127, p. 91-97, 2014.

LIMA, K.M.G.; RAIMUNDO JR, I.M.R.; SILVA, A.M.S.; PIMENTEL, M.F. Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. **Quím. Nova**, v. 32, p. 1635-1643, 2009.

LIU, H.J.G.; MEI, C.; YU, S.; XIAO, X.; DING, Y. Measurement of process variables in solid-state fermentation of wheat straw using FT-NIR spectroscopy and synergy interval PLS algorithm. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 97, p. 277-283, 2012.

LIU, L.S. 2010 Chinese guidelines for the management of hypertension. **Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi**, cap. 39, p. 579-615, 2011.

LIU, X.; LI, L.; ZHAO, T.; DONG, H. Determination of chondroitin sulfate in tablets by Raman spectroscopy and near-infrared spectroscopy combined with chemometric methods. **Analytical Methods**, v. 6, p. 4219-4227, 2014.

MAGALHÃES, D.F. **Aplicações da Espectroscopia de Infravermelho Próximo na Monitorização de Processos Farmacêuticos**. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.

MANCIA, G.; LAURENT, S.; ROSEI-AGABITI-ROSEI, E.; AMBROSINI, E.; BURNIER, M.; CAULFIELD, M.J.; CIFKOVA, R.; CLÉMENT, D.; COCA, A.; DOMINICZAK, A.; ERDINE, S.; FAGARD, R.; FARSANG, C.; GRASSI, G.; HALLER, H.; HEAGERTY, A.; KJELDSSEN, S.E.; KIOWSKI, W.; MALLION, J.M.; MANOLIS, A.; NARKIEWICZ, K.;

NILSSON, P.; OLSEN, M.H.; RAHN, H.; REDON, J.; RODICIO, J.; RUILOPE, L.; SCHMIEDER, R.E.; STRUIJKER-BOUDIER, H.A.J.; ZWIETEN, P.A.V.; VIIGIMAA, M.; ZANCHETTI, A. Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document. **J Hypertens.**, v. 27, p. 2121-2158, 2009.

MÄRK, J.; ANDRE, M.; KARNER, M.; HUCK, ChW. Prospects for multivariate classification of a pharmaceutical intermediate with near-infrared spectroscopy as a process analytical technology (PAT) production control supplement. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 76, p. 320-327, 2010.

MARQUES JUNIOR, J.M.; MÜLLER, A.H.L.; FOLETTTO, E.L.; COSTA, A.B.; BIZZI, C.A.; MÜLLER, E.I. Determination of Propranolol Hydrochloride in Pharmaceutical Preparations Using Near Infrared Spectrometry with Fiber Optic Probe and Multivariate Calibration Methods. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, (2015), doi.org/10.1155/2015/795102

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

MARTINDALE: **The extra pharmacopoeia** / James E.F. Reynolds (Ed.). London: Royal Pharmaceutical Society, 1996.

MASSART, D., VANDEGINSTE, B.G.M.; BUYDENS, L.M.C; DE JONG, S.; LEWI, P.; SMEVERS-VERBEKE, J. **Handbook of chemometrics and qualimetrics, Parts A and B**, Elsevier: Amsterdam, 1997.

MATLAB- The language of technical computing, version 7.10, The Mathworks Inc., Estados Unidos, 2010.

MELIAN, E.B; JARVIS, E.B. Candesartan Cilexetil plus Hydrochlorothiazide combination: a review of its use in hypertension. **Drugs**, v. 62, p. 787-816, 2002.

MELO, C.A.D.; SILVA, P.; GOMES, A.A.; FERNANDES, D.D.S.; VÉRAS, G.; MEDEIROS, A.C.D. Classification of Tablets containing Dipyrone, Caffeine and Orphenadrine by Near Infrared Spectroscopy and Chemometric Tools. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 24, p. 991-997, 2013.

MENEZES, C.M.; COSTA, A.B.; RENNER, R.R.; BASTOS, L.F.; FERRÃO, M.F.; DRESSLER, V.L. Direct determination of tannins in *Acacia mearnsii* bark using near-infrared spectroscopy. **Anal. Methods**, v. 6, p. 8299-8305, 2014.

MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological. 13^{ed}. New Jersey: Whitehouse Station, 2001.

MEREDITH P. A; ELLIOTT H. A. Clinical Pharmacokinetics of Amlodipine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 22, n. 1, p. 22 - 31, 1992.

MILLER, J.N.; MILLER, J.C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 6^a ed. Londres: Pearson Prentice Hall, 2010.

MOES, J.J.; RUIJKEN, M.M.; GOUT, E.; FRIJLINK, H.W.; UGWOKÉ, M.I. Application of process analytical technology in tablet process development using NIR spectroscopy: blend uniformity, content uniformity and coating thickness measurements. **Int. J. Pharm.**, v. 357, p. 108-118, 2008.

MOFFAT, A.C.; TRAFORD, A.D.; JEE, R.D.; GRAHAM, P. Meeting the International Conference on Harmonisation's Guidelines on Validation Procedures: Quantification as exemplified by a near-infrared reflectance assay of paracetamol in intact tablets. **Analyt.**, v.125, p. 1341-1351, 2000.

MORGANO, M.A. **Aplicação de métodos quimiométricos em análise de alimentos**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MORGANO, M.A.; FARIA, C.G.; FERRÃO, M.F.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M.M.C. Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e Regressão PLS. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, p. 25-31, 2005.

MORGANO, M.A.; FARIA, C.G.; FERRÃO, M.F.; FERREIRA, M.M.C. Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. **Quím. Nova**, v. 30, p. 346-350, 2007.

MÜLLER, A.L.H. **Determinação simultânea de ácido clavulânico e amoxicilina em formulações farmacêuticas utilizando técnicas de reflexão no infravermelho médio e métodos de regressão multivariados**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria- UFSM, Santa Maria, 2009.

MÜLLER, A.L.H.; FLORES, E.M.M.; MÜLLER, E.I.; SILVA, F.E.B.; FERRÃO, M.F. Attenuated Total Reflectance with Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR/FTIR) and Different PLS Algorithms for Simultaneous Determination of Clavulanic Acid and Amoxicillin in Powder Pharmaceutical Formulation. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, p.1903-1912, 2011.

MÜLLER, A.L.H.; PICOLATO, R.S.; MELLO, P.A.; FERRÃO, M.F.; SANTOS, M.F.P.; GUIMARÃES, R.C.L.; MÜLLER, E.I.; FLORES, E.M.M. Total sulfur determination in

residues of crude oil distillation using FT-IR/ATR and variable selection methods. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 89, p. 82-87, 2012.

MURDOCH, D.; HEEL, R.C. Amlodipine - a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in cardiovascular-disease. **Drugs**, v. 41, p. 478-505, 1991.

MUNK, L.; NIELSEN, J.P.; MOLLER, B.; JACOBSEN, S.; SONDERGAARD, I.; ENGELSEN, S.B.; NORGAARD, L.; BRO, R. Exploring the phenotypic expression of a regulatory proteomealtering gene by spectroscopy and chemometrics. **Anal. Chim. Acta**, v. 446, p. 171-186, 2001.

NASCIMENTO, J.A.; DIONÍSIO, A.G.G.; NASCIMENTO, E.C.L.; FREITAS, S.K.B.; ARAUJO, M.C.U. Análise screening de vinhos empregando um analisador fluxo-batelada, espectroscopia uv-vis e quimiometria. **Quím. Nova**, v. 33, p. 351-357, 2010.

NAES, T.; ISAKSSON, T.; FEARN, T.; DAVIES, T. **A User-friendly Multivariate Calibration and Classification**. 1ª ed., Chichester/UK: NIR Publications, pag. 114-119, 2002.

NAGAVALLI, D.; VAIDHYALINGAM, V.; SANTHA, A.; SANKAR, A.S.K.; DIVYA, O. Simultaneous spectrophotometric determination of losartan potassium, amlodipine besilate and hydrochlorothiazide in pharmaceuticals by chemometric methods. **Acta Pharm.**, v. 60, p. 141-152, 2010.

NATARAJ, K.S.; CHARYA, S.V.R.; GOUD, E.S.; SAIGEETHIKA, S.; RAMANJINEYULUS K. Simple Quantitative Method Development and Validation of Valsartan in Pureform and Pharmaceutical Dosage Forms by UV-Spectroscopy. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v.1, issue 2, ISSN: 2230-7605, 2011.

NESPECA, M.G. **Desenvolvimento de modelos quimiométricos associados à espectroscopia no infravermelho para determinação de parâmetros físico-químicos do óleo diesel**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

NETO, W.B. **Parâmetros de qualidade de lubrificantes e óleo de oliva através de espectroscopia vibracional, calibração multivariada e seleção de variáveis**. Tese (Doutorado em Química) - UNICAMP- Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2005.

NEVES, A.C.O. **Espectroscopia no infravermelho próximo e métodos de calibração multivariada aplicados à determinação simultânea de parâmetros bioquímicos em plasma sanguíneo**. Dissertação (Mestrado Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2013.

NEVES, A.C.O.; SOARES, G.M.; MORAIS, S.C.; COSTA, F.S.L.; PORTO, D.L.; LIMA, K.M.G. Dissolution testing of isoniazid, rifampicin, pyrazinamide and ethambutol tablets using near-infrared spectroscopy (NIRS) and multivariate calibration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 57, p. 115-119, 2012.

NIEMEIJER, M.; CLEOPHAS, T. Combination therapy with olmesartan and amlodipine in the treatment of hypertension. **Pharmaceuticals**, v. 2, p. 125-133, 2009.

NIKAM, M.B., DHAMANE, H., ALIGAVE, A., KONDAWAR, M.S. Simultaneous estimation of valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide by first order derivative UV spectrophotometric method. *Int. J. Pharm. Technol*, v. 2, p. 642–650, 2010.

NORGAARD, L.; SAUDLAND, A.; WAGNER, J.; NIELSEN, J.P.; MUNCK, L.; ENGELSEN, S.B. Interval partial least-squares regression (iPLS): a comparative chemometric study with an example from near-infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 54, p. 413-419, 2000.

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

OLIVEIRA, F.C.; SOUZA, A.T.P. C.; DIAS, J.A.; DIAS, S.C.L.; RUBIM, J.C. A escolha da faixa espectral no uso combinado de métodos espectroscópicos e quimiométricos. **Quím. Nova**, v. 27, p. 218-225, 2004.

OLIVEIRA, G.A. **Determinação de parâmetros de qualidade do maracujá (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) por espectroscopia MID e NIR e calibração multivariada**. Tese (Doutorado em Engenharia dos Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

OLIVEIRA, G.A.; CASTILHOS, F.; RENARD C. M-G. C.; BUREAU, S. Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. *Food Research International*, vol. 60, pag. 154–162, 2014.

OLIVEIRA, I.K. **Aplicação de quimiometria e espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de biodiesel e mistura biodiesel/diesel**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

OLIVIERI, A.C.; FABER, N.K.M.; FERRÉ, J.; BOQUÉ, R.; KALIVAS, J.H.; MARK, H. Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration. **Pure Appl. Chem.**, v. 78, p. 633-661, 2006.

OSBORNE, B.G. **Near-infrared Spectroscopy in Food Analysis**. Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons Ltd., 2000.

OSBORNE, S.D.; JORDAN, R.B.; KÜNNERMAYER, R. Method of wavelength selection for partial least square. **Analyst**, v. 122, p. 1531-1537, 1997.

OTTO, M. **Chemometrics – Statistics and Computer application in Analytical Chemistry**. Weinheim: Wiley, 1999.

PALOU, A.; CRUZ, J.; BLANCO, M.; TOMÀS, J.; DE LOS RÍOS, J.; ALCALÀ, R. Determination of drug, excipients and coating distribution in pharmaceutical tablets using NIR-CI. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, vol. 2, pag. 90-97, 2012.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals practical aspects and analytical applications. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.14, p. 198-219, 2003.

PASQUINI, C.; BUENO, A.F. Characterization of petroleum using near-infrared spectroscopy: Quantitative modeling for the true boiling point curve and specific gravity. **Fuel**, v. 86, p. 1927-1934, 2007.

PARISOTTO, G.; FERRÃO, M.F.; FURTADO, J.C.; MOLZ, R.F. Determination of amoxicillin content in powdered pharmaceutical formulations using DRIFTS and PLS. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 89-96, 2007.

PATACA, L.M.; NETO, W.B.; MARCUCCI, M.C.; POPPI, R.J. Determination of apparent reducing sugars, moisture and acidity in honey by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectrometry, **Talanta**, v. 71, p. 1926-1931, 2007.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à espectroscopia**. 4ª ed., São Paulo: Cengage Learning, 2012.

PERKIN ELMER. User Guide. Inc. Massachusetts, USA, 2010.

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

PESTIEAU, A.; KRIER, F.; THOORENS, G.; DUPONT, A.; CHAVEZ, P-F.; ZIEMONS, E.; HUBERT, P.; EVRARD, B. Towards a real time release approach for manufacturing tablets using NIR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 98, p. 60-67, 2014.

PIANTAVINI, M.S.; PONTES, F.L.D.; UBER, C.P.; STREMEL, D.P.; SENA, M.M.; PONTAROLO, R. Chemometric quality inspection control of pyrantel pamoate, febantel and praziquantel in veterinary tablets by mid infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 125, p. 396-403, 2014.

PIANTAVINI, M.S. **Desenvolvimento e validação de modelos multivariados usando PLS para quantificação de febantel, pamoato de pirantel e praziquantel utilizando UV e IV.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos, 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

PIROUETTE, Multivariate Data Analysis, versão 3.11, Infometrix, Inc. Washington, EUA.

PORTUGAL. Farmacopeia Portuguesa. 7ª ed. Lisboa: Ministério da Saúde, 2002.

RIBEIRO, F.A.; BARBOZA, F.D.; BREITKREITZ, M.C.; MARTINS, J.A. Quimiometria: inovação no desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade na indústria química. *Jornal do conselho regional de química IV região*, v. 85, p.14-15, 2007.

RIBEIRO, W.; MUSCARÁ, M.N. Características farmacocinéticas de antagonistas de cálcio, inibidores da ECA e antagonistas de angiotensina II em humanos. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 114-124, 2001.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1109-1143, 2005.

ROCHA, W.F.; NOGUEIRA, R.; VAZ, B.G. Validation of model of multivariate calibration: an application to the determination of biodiesel blend levels in diesel by nearinfrared spectroscopy. **Journal of Chemometrics**, v. 26, p. 456-461, 2012.

ROCHA, W.F.C.; ROSA, A.L.; MARTINS, J.A.; POPPI, R.J. Determination and validation of nimesulide in pharmaceutical formulation by near infrared spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1929-1936, 2010.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos – Uma estratégia sequencial de planejamentos**. 1ª edição, Campinas: Editora casa do pão, 2005.

ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; MARTINEZ, C.L.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 683-700, 2007.

ROWE, C.R.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6ªed. London, UK: Pharmaceutics Press, 2009.

SABIN, J.G.; FERRÃO, M.F.; FURTADO, J.C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 387-396, 2004.

SANCHES, F.A.; ABREU, R.B.; PONTES, M.J.C.; LEITE, F.C.; COSTA, D.J.E.; GALVÃO, R.K.H.; ARAUJO, M.C.U. Near-infrared spectrometric determination of dipyrone in closed ampoules. **Talanta**, v. 92, p. 84-86, 2012.

SALGUERO-CHAPARRO, L.; GAITÁN-JURADO, A.J.; ORTIZ-SOMOVILLA, V.; PEÑA-RODRÍGUEZ, F. Feasibility of using NIR spectroscopy to detect herbicide residues in intact olives. **Food Control**, v. 30, p. 504-509, 2013.

SAKUDO, A.; KURATSUNE, Y.H.; KATO, Y.H.; IKUTA, K. Non-invasive prediction of hematocrit levels by portable visible and near-infrared spectrophotometer. **Clinica Chimica Acta**, v. 408, p. 123-127, 2009.

SANTOS, J. **Desenvolvimento de Métodos Espectroscópicos Multivariados para Quantificação de Captopril e Hidroclorotiazida em Associação**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SARRAGUÇA, M.C.; CRUZ, V.A.; SOARES, S.O. Determination of flow properties of pharmaceutical powders by near infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 484-492, 2010.

SARRAGUÇA, M.C.; LOPES, J.A. Quality control pharmaceutical with NIR: From lab to process line, *Vib. Spectrosc.* vol. 49, pag. 204-210, 2009.

SENA, M.M.; CHAUDHRY, Z.F.; COLLINS, C.H.; POPPI, R.J. Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 36, p. 743-749, 2004.

SENA, M.M.; POPPI, R. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de dados. *Quím. Nova*, v. 23, p. 546-556, 1999.

SHAALAN, R.A.; BELAL, T.S.; EL YAZBI, F.A.; ELONZY S.M. Validated stability-indicating CLAE-DAD method of analysis for the antihypertensive triple mixture of amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their tablets. *Arabian Journal of Chemistry*, doi:10.1016/j.arabjc.2013.04.012, 2013.

SHAALAN, R.A.; BELAL, T.S. Gradient CLAE-DAD determination of the antihypertensive mixture of amlodipine besylate, valsartan, and hydrochlorothiazide in combined pharmaceutical tablets. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 35, p. 215-230, 2012.

SHI, JI.; ZOU, X.; ZHAO, JW.; MEL, H.; WANG, KL.; WANG, X.; CHEN, H. Determination of total flavonoids content in fresh Ginkgo biloba leaf with different colors using near infrared spectroscopy. *Spectrochimica. Acta Part A*, v. 94, p. 271-276, 2012.

SIDDIQUI, N.; HUSAIN, A.; CHAUDHRY, L.; ALAM, M.S.; MITRA, M.; BHASIN, P.S. Pharmacological and Pharmaceutical Profile of Valsartan: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 4, p. 12-19, 2011.

SIESLER, H.W; OZAKI, Y.; KAMATA, S.; HEISE, H.M. **Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications.** Alemanha: Weinheim, Wiley-VCH, 2002.

SILEONI, V.; MARCONI, O.; PERRETTI, G.; FANTOZZI, P. Evaluation of different validation strategies and long term effects in NIR calibration models. *Food Chemistry*, v.141, p. 2639-2648, 2013.

SILVA, F.E.B. **Determinação de simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em formulações farmacêuticas por FTIR/ATR e DRIFTS empregando calibração multivariada.** Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria –UFSM, Santa Maria, 2008.

SILVA, F.E.B.; FERRÃO, M.F.; PARISOTTO, G.; MÜLLER, E.I.; FLORES, E.M.M. Simultaneous determination of sulphamethoxazole and trimethoprim in powder mixtures by attenuated total reflection-Fourier transform infrared and multivariate calibration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 800-805, 2009.

SILVA, M.A.M.; FERREIRA, M.H.; BRAGA, J.W.B.; SENA, M.M. Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of amoxicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 89, p. 342-351, 2012.

SIMÕES, S. da S. **Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIRR e calibração multivariada**. Tese (Doutorado), Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa/PB, 2008.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Espectrometria no infravermelho. In: **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC. Cap. 2, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA/ SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO/ SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes brasileiras de hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, p. 1-51, 2010.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Fundamentos de Química Analítica**. Trad. 8ª ed. Norte Americana. Porto Alegre: Bookman, 2006.

SOUSA, M.G.; PIMENTA, E.S.; BORELLI, F.A.O. Interações e associações medicamentosas no tratamento da hipertensão – Combinações fixas. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 16, p. 237-241, 2009.

SOUZA, A.M.; BREITKREITZ, M.C.; FILGUEIRAS, P.R.; ROHWEDDER, J.J.R.; POPPI, R.J. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. **Quim. Nova**, v. 36, p. 1057-1065, 2013.

SOUZA, A.M.; POPPI, R.J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: Um tutorial, Parte I. **Quím. Nova**, v. 35, p. 2230-229, 2012.

SOUZA, J.A.L. **Desenvolvimento de uma metodologia baseada na espectroscopia no infravermelho próximo para determinação do produto de degradação do captopril em**

comprimidos. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications, Chichester:** John Wiley, 2004.

TAGLIARI, M.P.; STULKER, H.K.; MURAKAMI, F.S.; KUMINEK, G.; VALENTE, B.; OLIVEIRA, P.R.; SILVA, M.A.S. Development and Validation of a Stability-Indicating LC Method to Quantify Hydrochlorothiazide in Oral Suspension for Pediatric Use. **Chromatographia**, v. 67, p. 647-652, 2008.

THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS (EMA): Note for guidance on the use of near-infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations, CPMP/QWP/3309/01,EMA/CVMP/961/01. London, 2003. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC50003331.pdf. Acesso em: março, 2015.

THE UNITES STATES PHARMACOPEIA, USP 32 – NF 27: the official compendia of standards. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2009.

THE UNITES STATES PHARMACOPEIA USP 34 – NF 29: the official compendia of standards. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2011.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Smart NIR integrating sphere.** Madison, 2008.

TOLEDO, M.M.; RODRIGUES, S.C.; CHIESA, A.M. Educação em saúde no enfrentamento da hipertensão arterial: uma nova ótica para um velho problema. *Texto Contexto Enferm*, v. 16, p. 233-238, 2007.

TOMUTA, I.; RUS, L.; IOVANOV, R.; RUS, L.L. High-throughput NIR-chemometric methods for determination of drug content and pharmaceutical properties of indapamide tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 84, p. 285-292, 2013.

UBER, C.P. **Desenvolvimento e validação de métodos por CLAE-EM/EM e infravermelho médio para quantificação simultânea de metformina e vildagliptina em comprimidos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J.W.; POPPI, R.J. Variable Selection, Outlier Detection, and Figures of Merit Estimation in a Partial Least-Squares Regression Multivariate Calibration Model. A Case Study for the Determination of Quality Parameters in the Alcohol Industry by Near-Infrared Spectroscopy. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 8331-8338, 2007.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J.W.; POPPI, R.J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Quím. Nova**, v. 32, p. 1278-1287, 2009.

VARGHESE, S.J.; RAVI, T.K. Quantitative simultaneous determination of amlodipine, valsartan, and hydrochlorothiazide in "Exforge HCT" tablets using high-performance liquid chromatography and high-performance thin-layer chromatography. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 34, p. 981-994, 2011.

VIGNADUZZO, S.E.; CASTELLANO, P.M.; KAUFMAN, T.S. Development and validation of an CLAE method for the simultaneous determination of amlodipine, hydrochlorothiazide, and Valsartan in tablets of their novel triple combination and binary pharmaceutical associations. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v.34, p. 2383-2395, 2011.

VOGEL, A.I. **Análise Química Quantitativa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

VOJTA, J.; JEDLICKA, A.; COUFAL, P.; JANECKOVÁ, L. A new, rapid, stability-indicating UPLC method for separation and determination of impurities in amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their combined tablet dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 109, p. 36-44, 2015.

WANG, I.C.; LEE, M.J.; SEO, D.Y.; LEE, H.E.; CHOI, Y.; KIM, W.S.; JEONG, M.Y.; CHOI G.J. Polymorph Transformation in Paracetamol Monitored by In-line NIR Spectroscopy During a Cooling Crystallization Process. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, p. 764-770, 2011.

WANG, X.; BAO, Y.; LIU, G.; LI, G.; LIN, L. Study on the Best Analysis Spectral Section of NIR to Detect Alcohol Concentration Based on SiPLS. **Procedia Engineering**, v. 29 p. 2285-2290, 2012.

WOLD, S. Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models. **Technometrics**, v. 20, p. 397-405, 1978.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal Component Analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, p. 37-52, 1987.

WOLD S.; SJÖSTRÖM M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometric. **Chemometrics and inteligente laboratory systems**, v. 58, p.109-130, 2001.

WORKMAN, J. J.; WEYER, L. **Practical Guide to Interpretative Near-Infrared Spectroscopy**. Boca Raton- FL: CRC Press - Taylor & Francis, 2008.

WU, D.; HE, Y.; NIE, P.; CAO, F.; BAO, Y. Hybrid variable selection in visible and near-infrared spectral analysis for non-invasive quality determination of grape juice. **Analytica Chimica Acta**, v., 659, 229-237, 2010.

WU, Z.; PENG, Y.; CHEN, W.; XU, B.; MA, Q.; SHI, X.; QIAO, Y. NIR spectroscopy as a process analytical technology (PAT) tool for monitoring and understanding of a hydrolysis process. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 394–399, 2013.

YOUNUS, M.; REDDY, T.K.; REDDY, Y.R.; ARIF, M.F. RP-HPLC Method Development and Validation for Simultaneous Estimation of Amlodipine besylate, Valsartan and Hydrochlorothiazide in Tablet Dosage form. **J Pharmacy Res.**, v. 11, p. 2647-2650, 2010.

ZHANG, W. Review on analysis of biodiesel with infrared spectroscopy. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 6048-6058, 2012.

ZHANG, W.; QU, Z.; WANG, Y.; YAO, Y.; BAI, X.; BIAN, S.; ZHAO, B. Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for rapid determination of ginsenoside Rg1 and Re in Chinese patent medicine Naosaitong pill. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 139, p. 184-188, 2015.

ZHU Z.; ZHU S.; LIU D.; CAO T.; WANG L.; TEPEL M. Thiazide-like diuretics attenuate agonist-induced vasoconstriction by calcium desensitization linked to Rho kinase. **Hypertension**, v. 45, p. 233-239, 2005.

ZWIETEN, V. Amlodipine na overview of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. **Clinical Cardiology**, v. 17, p. 3-6, 1994.

ANEXOS

26/07/2015

ScholarOne Manuscripts

**Submission
Confirmation**

Thank you for submitting your manuscript to *Química Nova*.

Manuscript ID: QN-2015-0525

Title: Determinação simultânea de valsartana, hidroclorotiazida e besilato de anlodipino em formulação farmacêutica por infravermelho próximo e calibração multivariada

Authors: Becker, Natana
Almeida, Willian
Nicorena, Karine
Foresti, Gabriela
Ferrão, Marco
Silva, Fabiana

Date Submitted: 26-Jul-2015