

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**Leandro Soares Alves Pereira**

**Transferência de calibração de misturas de pós para  
comprimidos intactos: um novo uso em análise  
farmacêutica para uma ferramenta quimiométrica  
conhecida**

**Belo Horizonte**

**2013**

UFMG/ ICEx/ DQ.985<sup>a</sup>

D.539<sup>a</sup>

**LEANDRO SOARES ALVES PEREIRA**

**Transferência de calibração de misturas de pós para comprimidos intactos: um novo uso em análise farmacêutica para uma ferramenta quimiométrica conhecida**

**Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química – Química Analítica**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Martins de Sena**

Área de concentração: Química Analítica

Linha de pesquisa: Quimiometria; Desenvolvimento de método analítico.

Laboratório: 214

Palavras-chave: Transferência de calibração, calibração multivariada, comprimidos intactos, infravermelho próximo, controle de qualidade farmacêutico, nevirapina.

P436t  
2013  
D

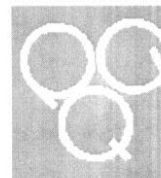
Pereira, Leandro Soares Alves  
Transferência de calibração de misturas de pós para comprimidos intactos [manuscrito] : um novo uso em análise farmacêutica para uma ferramenta quimiométrica conhecida / Leandro Soares Alves Pereira. 2013.  
ix, 51 f. : il.

Orientador: Marcelo Martins de Sena.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química Analítica - Teses 2. Quimiometria - Teses 3. Calibração - Teses 4. Espectroscopia de infravermelho - Teses I. Sena, Marcelo Martins de, Orientador II. Título.

CDU 043



"Transferência de Calibração de Misturas de Pós para Comprimidos Intactos:  
Um Novo Uso em Análise Farmacêutica para Uma Ferramenta Quimiométrica  
Conhecida"

Leandro Soares Alves Pereira

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Marcelo Martins de Sena - Orientador  
UFMG

Prof. Leandro Soares de Oliveira  
UFMG

Profa. Clésia Cristina Nascentes  
UFMG

Belo Horizonte, 20 de agosto de 2013.

## **Agradecimento**

À minha família, que me apoiou e sustentou emocionalmente durante esse trabalho.

Ao professor Marcelo, que tornou possível esse trabalho, auxiliando cada decisão para que o trabalho se desenvolvesse da melhor maneira possível.

Ao Bruno pela ajuda no trabalho operacional e todo o conhecimento que me passou.

À FUNED pela parceria e empenho para o desenvolvimento do trabalho, especialmente à Maíra Carneiro.

Ao LEC-UFGM por disponibilizar seu laboratório para as análises.

A meus amigos de curso, da Fraternidade Espírita Arcanjo Miguel e, principalmente, aqueles que o são pelo tempo de convívio.

À CAPES pelo custeamento pessoal da pesquisa.

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Instituto de Ciências Exatas e ao departamento de Química pela estrutura utilizada no trabalho.

## Resumo

O uso de quimiometria em conjunto com espectroscopia de infravermelho próximo (NIR – *near infrared*) em análises farmacêuticas tem aumentado nos últimos anos e, aos poucos, vem ganhando acesso aos métodos oficiais das farmacopeias. Entretanto, uma modelagem quantitativa multivariada necessita de grande quantidade de amostras, em uma ampla faixa de concentração do analito (princípio ativo). Apesar do uso de calibração multivariada reduzir o custo de análise, em comparação a métodos univariados, a necessidade de produzir muitas amostras em diferentes concentrações na forma de comprimidos pode elevar esse custo. Por outro lado, a produção de amostras de misturas de pós pode ser feita em menor escala, levando a um menor custo de amostragem. Dessa forma, a transferência de calibração, que é uma ferramenta quimiométrica usada para ajustar modelos construídos a partir de amostras medidas em diferentes equipamentos, entre misturas de pós e comprimidos intactos permite a redução do custo de modelagem e a possibilidade de usar o mesmo modelo no controle de qualidade em diferentes etapas do processo de produção.

Esse trabalho desenvolveu um modelo por mínimos quadrados parciais (PLS – *partial least squares*) para quantificar nevirapina em formulação farmacêutica e estudou a transferência de calibração de espectros de misturas de pós para comprimidos intactos usando métodos de padronização direta (PDS – *piecewise direct standardization* – e DWPDS – *double window piecewise direct standardization*). A faixa de trabalho foi de 83,0 a 113,9 % do teor alvo de nevirapina. Os erros médios de previsão dos comprimidos intactos diminuíram significativamente, com o valor da raiz quadrada do erro quadrático médio de validação (RMSEP – *root mean square error of prediction*) sendo reduzido de 2,0 para 1,7 %.

A transferência de calibração entre amostras de diferentes formas físicas é uma ideia original, que se mostrou eficiente, abrindo a oportunidade para aplicações similares em análises nas quais uma mesma amostra possa ser obtida em diferentes formas.

## Abstract

The use of chemometrics and near-infrared (NIR) spectroscopy in pharmaceutical analysis has increased in recent years and is slowly gaining access to the rigorous pharmacopeic methods. However, quantitative multivariate modeling requires a large number of samples, with wide range of active pharmaceutical ingredient concentration. Although the use of multivariate calibration reduces the cost of analysis, comparing to univariate methods, the cost of producing different samples of tablets out of productions specifications may be high. In the other way, samples of powder mixtures can be produced in small scale reaching a low cost of sampling. Due to this, the calibration transfer, which is a chemometric tool used to correct models constructed from samples measured in different instruments, from powder mixtures to intact tablets allows a reduced cost modeling and the possibility of using the same model in different steps of the production's quality control.

This work developed a partial least squares (PLS) model to quantify nevirapine and studied the calibration transfer from powder-mixture model to intact tablet spectra using direct standardization methods (PDS – piecewise direct standardization – and DWPDS – double window piecewise direct standardization). The working range was 83.0 to 113.9% of nevirapine target value. RMSEP (root mean square error of prediction) of tablets was reduced from 2.0 to 1.7 %.

The calibration transfer between different physical forms is an original idea that was effective from powders mixtures to tablets, opening perspectives to determinations in other matrices, since the sample can be obtained in different forms.

## Lista de figuras

Figura 1 – Calibração univariada e multivariada	3
Figura 2 – Funcionamento do DWPDS	9
Figura 3 – Representação vetorial do NAS	18
Figura 4 – Modelos quânticos de (A) oscilador harmônico e (B) oscilador anarmônico	19
Figura 5 – Refletância difusa	19
Figura 6 - Estrutura da Nevirapina	22
Figura 7 – Comprimidos da formulação de nevirapina.	25
Figura 8 – Espectros das 96 amostras (A) brutos e (B) pré-processados	34
Figura 9 – Espectros de nevirapina, placebo e espectro médio das amostras	35
Figura 10 – Espectro pré-processado de nevirapina e <i>loadings</i> da VL1	36
Figura 11 – Espectros de uma mesma amostra nas formas de mistura de pós e de comprimido	37
Figura 12 – Gráficos dos resíduos espectrais Q para (A) abordagem 1 e (B) abordagem 2	38
Figura 13 – Gráfico de resíduo espectral Q para abordagem 3 no modo DWPDS.	40
Figura 14 – Gráfico de valores de referência <i>versus</i> valores previstos	42
Figura 15 – Erros relativos das amostras de validação	43
Figura 16 – Gráfico de resíduos em função dos valores previstos	44



## Lista de tabelas

Tabela 1 – Propriedades da Nevirapina	23
Tabela 2 – Planejamentos experimentais: massa de nevirapina, de placebo, massa total e teor alvo de nevirapina	27
Tabela 3 – Otimização do modelo por remoção de outliers	35
Tabela 4 – Análise de amostras de comprimido por diferentes abordagens	41
Tabela 5 – Análise da amostra T5	41
Tabela 6 – Figuras de mérito do método desenvolvido	42

## Lista de abreviaturas e siglas

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ( <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> )
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLS	Mínimos Quadrados Clássicos ( <i>Classical Least Squares</i> )
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DS	Padronização Direta ( <i>Direct Standardization</i> )
DWPDS	Padronização Direta por Partes em Janela Dupla ( <i>Double Window Piecewise direct Standardization</i> )
FT-NIR	Espectrofotômetro de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier ( <i>Fourier Transform Near Infrared</i> )
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana ( <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
ICH	Conferência Internacional de Harmonização ( <i>International Conference on Harmonization</i> )
ICS	Sociedade Internacional de Quimiometria ( <i>International Chemometrics Society</i> )
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LEC-UFMG	Laboratório de Ensaio de Combustíveis do Departamento de Química da UFMG
MLR	Regressão Linear Múltipla ( <i>Multiple Linear Regression</i> )
MSC	Correção de Espalhamento Multiplicativo ( <i>Multiplicative Scatter Correction</i> )
NAS	Sinal Analítico Líquido ( <i>Net Analyte Signal</i> )
NIR	Infravermelho Próximo ( <i>Near Infrared</i> )
ONU	Organização das Nações Unidas
PAT	Tecnologia Analítica de Processos ( <i>Process Analytical Technology</i> )
PCA	Análise de Componentes Principais ( <i>Principal Component Analysis</i> )
PCR	Regressão por Componentes Principais ( <i>Principal Component Regression</i> )
PDS	Padronização Direta por Partes ( <i>Piecewise Direct Standardization</i> )
PLS	Mínimos Quadrados Parciais ( <i>Partial Least Squares</i> )
RMSEC	Raiz Quadrada dos Erros Quadráticos Médios de Calibração ( <i>Root Mean Square Error of Calibration</i> )
RMSECV	Raiz Quadrada dos Erros Quadráticos Médios de Calibração Cruzada ( <i>Root Mean Square Error of Cross-Validation</i> )
RMSEP	Raiz Quadrada dos Erros Quadráticos Médios de Validação ( <i>Root Mean Square Error of Prediction</i> )
RPD	Relação de Desempenho do Desvio ( <i>Residual Prediction Deviation / Relative Predictive Determinant</i> )
SDV	Desvio Padrão de Erros de Validação ( <i>Standard Deviation of Validation Errors</i> )
SEL	Seletividade
SEN	Sensibilidade
SNV	Varição Normal Padrão ( <i>Standard Normal Variate</i> )
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS ( <i>Joint United Nation Programme on HIV/AIDS</i> )
VL	Variáveis Latentes

## Sumário

Resumo.....	iv
Abstract .....	v
Lista de figuras .....	vi
Lista de tabelas .....	vii
Lista de abreviaturas e siglas.....	viii
Sumário .....	ix
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	3
2.1. Quimiometria - Calibração multivariada.....	3
2.1.1. Mínimos quadrados parciais – PLS.....	4
2.1.2. Transferência de calibração.....	6
2.2. Validação analítica de métodos de calibração multivariada.....	10
2.2.1. Sinal Analítico Líquido – NAS .....	12
2.2.2. Figuras de mérito.....	13
2.3. Espectroscopia na região do infravermelho próximo .....	16
2.3.1. Aspectos teóricos .....	17
2.3.2. Refletância difusa.....	19
2.4. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.....	20
2.4.1. Nevirapina.....	21
3. Materiais e métodos .....	24
3.1. Equipamentos e <i>softwares</i> .....	24
3.2. Planejamento experimental – Preparo das amostras.....	24
3.3. Aquisição de espectros .....	29
3.4. Modelagem quimiométrica .....	29
3.5. Previsão de comprimidos intactos.....	31
3.6. Validação analítica .....	31
4.1. Construção dos modelos.....	33
4.2. Análise espectral qualitativa.....	35
4.3. Previsão de comprimidos e transferência de calibração.....	37
4.4. Validação.....	42
5. Conclusões .....	46
6. Referências bibliográficas .....	47

## 1. Introdução

O desenvolvimento da quimiometria e da espectroscopia de infravermelho próximo tem proporcionado grandes mudanças na química analítica. A junção dessas ferramentas permite análises rápidas, de baixo custo, não destrutivas, com pouco ou nenhum preparo da amostra e sem geração de resíduos. O ganho da indústria com a automatização vinda da Tecnologia Analítica de Processos (PAT – *process analytical technology*) e a aplicação do conceito de química verde, que visa minimizar o consumo de insumos e geração de resíduos, levaram essas técnicas para o uso industrial, em especial para a indústria farmacêutica.<sup>1</sup>

O custo para desenvolver um método de calibração multivariada na indústria farmacêutica tem a amostragem como um de seus principais componentes, já que é necessária a produção de um grande número de amostras, usualmente de comprimidos intactos, com especificações fora das condições de produção, procurando cobrir uma faixa analítica ampla em torno do teor visado. Considerando que a quantidade de matéria prima usada na produção desses comprimidos é bem maior do que a necessária para a obtenção de amostras de misturas de pós, a possibilidade de extrapolar um modelo feito a partir destas amostras para o produto final, os comprimidos, torna-se atraente em termos práticos e financeiros. Para isto, este trabalho pretende utilizar uma metodologia de transferência de calibração, uma ferramenta originalmente desenvolvida para transferir e corrigir modelos multivariados desenvolvidos em diferentes espectrofotômetros por meio de cálculos matriciais.

Para o estudo dessa abordagem, escolheu-se como fármaco a nevirapina, que é um dos medicamentos mais usados para o tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), tendo demanda de mais de

6 milhões de comprimidos em 2011 no Brasil.<sup>2</sup> A AIDS é uma doença considerada como um dos maiores desafios relacionados à saúde para a Organização das Nações Unidas (ONU).<sup>3</sup> Os medicamentos antirretrovirais, usados no combate a esta doença, apresentam papel importante nesse contexto, permitindo melhores condições de saúde aos portadores do vírus e possibilitando maior expectativa de vida dessas pessoas. Devido à grande escala de produção desse medicamento, há necessidade de efetivo controle de qualidade. Porém, esse controle é feito por métodos que demandam tempo e podem ser de alto custo, como cromatografia líquida de alta eficiência,<sup>4-5</sup> cromatografia em camada delgada de alta eficiência,<sup>6</sup> cromatografia eletrocínética micelar<sup>7</sup> e eletroforese capilar de zona.<sup>8</sup>

Portanto, no presente trabalho, objetivou-se o desenvolvimento e a validação multivariada de um método de análise quantitativa para a determinação de nevirapina na formulação farmacêutica Nevirax®, utilizando calibração multivariada e espectroscopia de infravermelho próximo, além da transferência de calibração de misturas de pós para comprimidos intactos.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Quimiometria - Calibração multivariada<sup>9</sup>

A partir do desenvolvimento e ampliação da presença de microprocessadores e microcomputadores nos laboratórios químicos, no começo da década de 1970, o número de dados obtidos nos experimentos aumentou em grande escala. Com o interesse de extrair maiores informações desses dados, ferramentas multivariadas utilizadas em outras áreas da ciência, como biologia e psicologia, passaram a ser usadas também na química, dando origem à quimiometria.<sup>10</sup>

A quimiometria é definida pela Sociedade Internacional de Quimiometria (ICS) como: “A disciplina química que usa métodos matemáticos, estatísticos e outros empregando uma lógica formal para: 1) planejar ou selecionar procedimentos e experimentos em condições ótimas; e 2) prover o máximo de informação química relevante pela análise de dados químicos”.<sup>11</sup>

Em química analítica, a quantificação de um componente ou uma propriedade em uma amostra é realizada rotineiramente por diversas técnicas e essa medição, salvo para técnicas primárias, está condicionada a uma calibração. Essa calibração é a relação entre o sinal analítico resultado de uma técnica analítica e o valor de referência da unidade a ser medida, como mostrado na Figura 1.<sup>9</sup>

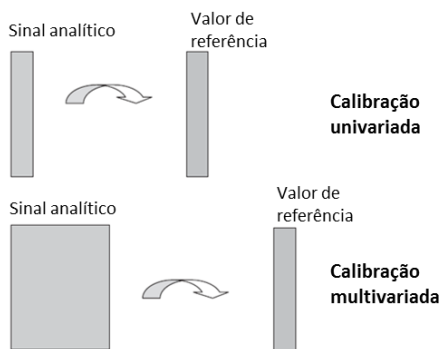


Figura 1 – Calibração univariada e multivariada (adaptada de Brereton<sup>9</sup>, pág. 194)

A calibração univariada, como indica o nome, utiliza apenas uma variável para estabelecer a relação quantitativa, assumindo um sinal analítico sem a presença de interferentes, ou seja, um sinal seletivo. As técnicas analíticas tradicionais usadas em calibração univariada são bem estabelecidas, mas demandam a obtenção de um sinal seletivo. Para isso, é comum a separação física ou química dos componentes da amostra previamente à detecção, por exemplo, por meio de colunas cromatográficas ou métodos de extração.

A calibração multivariada, por outro lado, utiliza muitas variáveis. Isso permite a separação matemática/computacional dos sinais analíticos, dispensando a separação físico-química dos interferentes da amostra. Dessa forma, não é necessário o requisito de sinal analítico seletivo para a variável medida, pois a seletividade se dá no conjunto de variáveis.

Dentre os métodos de calibração multivariada, citam-se: Regressão Linear Múltipla (MLR – *multiple linear regression*), Mínimos Quadrados Parciais (PLS – *partial least squares*), Regressão por Componentes Principais (PCR – *principal component regression*), Redes Neurais Artificiais, entre outros.<sup>12</sup>

### **2.1.1. Mínimos quadrados parciais – PLS<sup>9</sup>**

O método de mínimos quadrados parciais é baseado no conceito de análise de componentes principais (PCA – *principal component analysis*), no qual a matriz de dados de sinais analíticos é decomposta em componentes principais. Porém, a decomposição feita no PLS difere da PCA, por também utilizar o vetor de valores de referência. Assim, o algoritmo usado faz a decomposição em variáveis que não só modelam os sinais analíticos (variáveis independentes, em  $\mathbf{X}$ ), mas também explicam a variância relacionada aos valores de referência (variáveis dependentes, em  $\mathbf{Y}$ ). Devido a

esta diferença, ocorre uma pequena perda de ortogonalidade das componentes principais, e por isso, elas recebem um nome diferente, variáveis latentes (VL).

O PLS é um método de calibração inversa, ou seja, a resposta analítica  $\mathbf{Y}$  (*e.g.* concentração) é uma função do sinal analítico  $\mathbf{X}$  (*e.g.* espectro). Assim, o modelo é calculado pela decomposição simultânea de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  em uma soma de  $A$  variáveis latentes.  $\mathbf{X}$  é uma matriz  $n \times p$ , composta por  $n$  amostras e  $p$  variáveis, e  $\mathbf{Y}$  é uma matriz  $n \times k$ , composta por  $n$  amostras e  $k$  respostas analíticas. No caso mais simples e mais usual,  $k$  é igual a um, sendo o modelo criado para prever apenas uma resposta analítica (PLS-1), mas a decomposição utilizando mais de uma propriedade também é utilizada (PLS-2).

A decomposição é feita segundo as equações 1 e 2.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} = \sum \mathbf{t}_A \mathbf{p}'_A + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 1}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}' + \mathbf{F} = \sum \mathbf{u}_A \mathbf{q}'_A + \mathbf{F} \quad \text{Eq. 2}$$

em que  $\mathbf{T}$  e  $\mathbf{U}$  são as matrizes de escores das matrizes  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ , respectivamente,  $\mathbf{P}$  e  $\mathbf{Q}$  são as matrizes de pesos (*loadings*) de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ , respectivamente, e  $\mathbf{E}$  e  $\mathbf{F}$  são os resíduos de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ , respectivamente. O vetor de coeficientes de regressão linear  $\mathbf{b}$  correlaciona os blocos  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  de forma linear, para  $A$  variáveis latentes, de acordo com a equação 3.

$$\mathbf{u}_A = \mathbf{b}_A \mathbf{t}_A \quad \text{Eq. 3}$$

Os valores de  $\mathbf{b}_A$  são agrupados na matriz diagonal  $\mathbf{B}$ , que contém os coeficientes de regressão entre as matrizes de escores  $\mathbf{T}$  de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{U}$  de  $\mathbf{Y}$ . A melhor relação linear possível entre os escores desses dois blocos é obtida por meio de pequenas rotações das variáveis latentes dos blocos de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ . Os valores previstos para novas amostras ( $\hat{\mathbf{Y}}$ ) podem ser então calculados de acordo com a equação 4, com base nos escores  $\mathbf{T}^*$ .

$$\hat{\mathbf{Y}} = \mathbf{T}^* \mathbf{BQ} \quad \text{Eq. 4}$$



Como as matrizes de escores e pesos dependem do número de variáveis latentes  $A$ , a escolha desse parâmetro é de grande importância, para evitar subajuste ou sobreajuste. O primeiro caso implica a modelagem de dados insuficientes para explicar toda informação sistemática, e o segundo, a inclusão de excesso de informação no modelo, que pode ser aleatória ou estar sistematicamente relacionada à presença de erros. De um modo geral, o risco de sobreajuste em calibração multivariada é muito maior do que o de subajustes. Para a escolha do número de variáveis latentes, usa-se um método de validação cruzada, baseado num procedimento de reamostragem, e deve ser selecionado o número de variáveis latentes correspondente ao modelo de menor raiz quadrada do erro quadrático médio de calibração cruzada (RMSECV – *root mean square error of cross-validation*). Os principais métodos de validação cruzada são: 1) *leave-one-out*, que remove uma amostra de cada vez, sendo indicado apenas para modelos com pequeno número de amostras (aproximadamente 20); 2) blocos contíguos, que separa amostras em blocos de amostras sequenciais; 3) venezianas (*venetian blinds*), que separa amostras sistematicamente espaçadas; e 4) subconjuntos aleatórios, que separa, aleatoriamente, conjuntos de amostras.

### **2.1.2. Transferência de calibração**<sup>13-15</sup>

Os métodos de calibração multivariada, apesar de não precisarem ser recalibrados com tanta frequência quanto os métodos univariados, possuem certa limitação, já que pode haver diferença nos sinais analíticos de uma mesma amostra analisada em condições diferentes. Assim, um modelo criado em determinadas condições pode não ser aceitável, por exemplo, em diferentes temperaturas ou ao longo do tempo de uso do equipamento.

Essa situação também é vivenciada em calibração univariada. Porém, esse problema é minimizado porque, usualmente, refaz-se a calibração completamente. Entretanto, como é grande o número de amostras necessárias para calibração multivariada, essa é uma alternativa pouco viável na maioria das situações, devido ao custo e ao tempo necessários para tal. Para contornar as dificuldades de uma recalibração completa, alguns métodos foram especificamente desenvolvidos, dando origem às ferramentas de transferência de calibração.

A transferência de calibração é a adaptação de um modelo multivariado para atender às novas condições de obtenção do sinal analítico. Dentre os tipos de transferência de calibração, existem modelos globais, adequação por pré-processamento e métodos de padronização.

Os modelos globais são construídos considerando as variações esperadas em larga faixa de condições experimentais. Esses modelos são mais robustos às variações, porém, requerem maior número de amostras, levando a modelos complexos, além de exigirem o conhecimento de todas as possíveis variações antes da calibração.

A adequação por pré-processamento permite que a diferença nos sinais analíticos devido às diferentes condições, entre as originais do modelo e as novas, seja minimizada. Com isso, esses efeitos sobre o sinal analítico deixarão de influenciar o modelo. Porém, os pré-processamentos também devem ser adotados na etapa de calibração e, muitas vezes, não são suficientes para a correção entre equipamentos.

Os métodos de padronização são ferramentas de cálculo matricial que modificam o sinal analítico de uma situação secundária (também chamada de filha ou escrava), na qual é feita a análise, para que ele seja semelhante ao sinal analítico da situação primária (pai ou mestre), na qual foi construído o modelo. Para realizar essa padronização, um grupo de amostras mais representativas dentro do conjunto de

calibração é selecionado como o conjunto de amostras de transferência e elas são analisadas nas duas condições. Assim, geram-se duas matrizes de dados:  $\mathbf{X}_1$  ( $n_{\text{trans}} \times q$ ), da condição primária, e  $\mathbf{X}_2$  ( $n_{\text{trans}} \times p$ ), da condição secundária. Dessa forma, as matrizes são relacionadas por uma matriz de transformação  $\mathbf{F}$ .

$$\mathbf{X}_1 = \mathbf{X}_2 * \mathbf{F} \quad \text{Eq. 5}$$

Estimando-se  $\mathbf{F}$  pela relação das amostras de transferência, pode-se usar essa estimativa ( $\hat{\mathbf{F}}$ ) para ajustar o sinal analítico de uma amostra na condição secundária ( $\mathbf{x}_2$ ), de modo que esse sinal seja semelhante ao que seria observado caso essa amostra fosse analisada na condição primária. Com isso, obtém-se o sinal analítico ajustado à condição primária ( $\mathbf{x}_1^a$ ).

$$\mathbf{x}_1^a = \mathbf{x}_2 * \hat{\mathbf{F}} \quad \text{Eq. 6}$$

Em relação ao conceito de transferência por padronização, Shenk *et al.*<sup>16</sup> foram os pioneiros, publicando, em 1985, um trabalho no qual apresentaram um algoritmo de padronização espectral, que posteriormente foi patentado e ficou conhecido como método Shenk. Este método consiste de um alinhamento espectral e posterior correção de intensidade, sendo um método de padronização univariado, pois cada comprimento de onda é ajustado pela intensidade de um único comprimento de onda do espectro equivalente da amostra medida em outra condição.

Em 1991, Wang *et al.*<sup>17</sup> propuseram os métodos de padronização direta (DS – *Direct Standardization*), e padronização direta por partes (PDS – *Piecewise Direct Standardization*). O primeiro utiliza todo o espectro para o ajuste do sinal analítico em cada comprimento de onda, enquanto o segundo utiliza o modo de janela móvel com alguns comprimentos de onda em torno da variável ajustada. Esses métodos derivaram em outros como padronização direta por partes em janela dupla (DWPDS – *double*

*window piecewise direct standardization*).<sup>18-19</sup> Na Figura 2 é ilustrado o funcionamento do DWPDS utilizando janela de 3 variáveis para a condição primária e 5 variáveis para condição secundária. O funcionamento do método PDS pode ser entendido pela utilização de uma variável para condição primária e uma janela para a condição secundária, enquanto o DS utiliza uma variável para condição primária e todas variáveis para condição secundária.

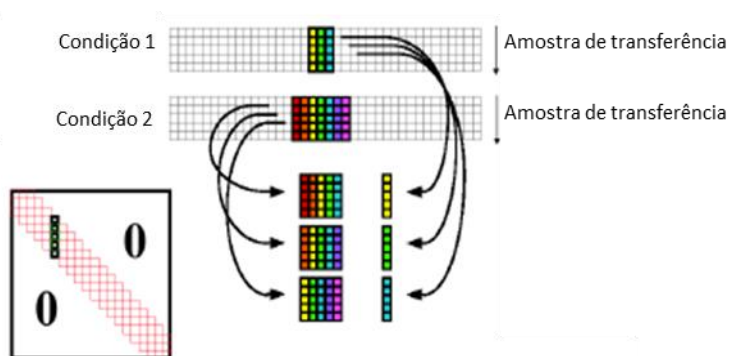


Figura 2 – Funcionamento do DWPDS (adaptada de Eigenvector<sup>20</sup>, pág. 3)

Com o desenvolvimento dos métodos de transferência de calibração e a introdução destes nos *softwares* comerciais, o uso desta ferramenta tornou-se muito importante para evitar a recalibração de modelos em situações comuns de laboratório. As mudanças de condições que causam alteração na eficiência de previsão de modelos são generalizadas em três situações: variação de amostra, variação ambiental e variação instrumental.

Casos de variação instrumental são os mais explorados para transferência de calibração. Entre as aplicações estão: a transferência entre diferentes equipamentos; a correção após uma manutenção ou troca de peças de um equipamento; e a correção por desgastes devido ao tempo de uso do equipamento. Alguns trabalhos relatam o uso de transferência de calibração para correção de efeitos ambientais, como a temperatura na qual são obtidos os espectros.<sup>21-22</sup>

Apesar do uso expressivo desses métodos, ainda pouco se observa na aplicação a variações físicas da amostra. O efeito de espalhamento de radiação causado por amostras em pó é maior que o observado em amostras comprimidas,<sup>23</sup> portanto, afeta o espectro de infravermelho próximo (NIR – *near infrared*). Para possibilitar a medida em ambas as formas físicas, Blanco e Peguero<sup>24</sup> desenvolveram um modelo multi-forma composto por amostras de um medicamento nas formas em pó, granulado, comprimido e comprimido revestido. Esse tipo de abordagem pode ser considerado um modelo global, pois foi construído levando em consideração as variações esperadas da amostra, e necessita de grande quantidade de amostras em cada forma, levando a alto custo de calibração.

Em uma busca na literatura, não foram encontrados artigos utilizando métodos de padronização para correções devidas a variações de forma física da amostra, o que ressalta a originalidade deste trabalho. A aplicação de métodos de padronização necessita de poucas amostras para o processo de transferência. Por exemplo, um modelo construído com amostras farmacêuticas em pó pode ser transferido para amostras de comprimidos. Tendo em vista a quantidade de matéria prima necessária para a construção de um modelo usando comprimidos, a transferência de modelos de pó para comprimido pode ser de grande impacto de custo na calibração, além de possibilitar o uso de um único modelo em mais de uma etapa de produção (pó – etapa intermediária, e comprimido intacto – etapa final), favorecendo seu uso com o conceito de PAT.

## **2.2. Validação analítica de métodos de calibração multivariada<sup>25-27</sup>**

O desenvolvimento de novos métodos analíticos sempre se depara com a necessidade de demonstração de confiabilidade, sendo que seus resultados são,

comumente, regulamentados por órgãos fiscalizadores, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Assim, é necessário demonstrar que este método é adequado e confiável para a finalidade à qual se destina. Esse estudo é chamado de validação analítica e busca identificar, de maneira objetiva, os parâmetros metrológicos do método, tais como veracidade e precisão.

Para que um método de calibração multivariada apresente melhores resultados e seja robusto às novas amostras, é necessário que ele seja calibrado com amostras representativas. Para isso, são feitas a seleção de amostras de calibração e a remoção de amostras anômalas (*outliers*). São consideradas amostras anômalas aquelas que: 1) não se enquadram ao conjunto de calibração, gerando alta influência (*leverage*) no modelo; 2) apresentam grande resíduo no sinal analítico, portanto, não estão bem modeladas; e 3) apresentam grande resíduo na resposta analítica, portanto, não são bem previstas.<sup>28</sup>

Os parâmetros de validação são importantes para definir se um método atende satisfatoriamente ao seu uso, com um nível de confiança estatística. Com isso, as análises devem atender às especificações desses parâmetros, principalmente quando a aplicação do método é regulada por órgãos fiscalizadores. A maneira que esses parâmetros são calculados é estabelecida em normas específicas para determinados métodos ou guias de validação de modo geral. Os parâmetros são calculados a partir de uma calibração entre um sinal analítico, referente ao analito, e o valor de referência. Porém, em análises multivariadas o sinal analítico é referente tanto ao analito como à matriz. Para suprir a necessidade de um sinal analítico multivariado referente ao analito, desenvolveu-se o conceito de Sinal Analítico Líquido (NAS – *Net Analyte Signal*).

## 2.2.1. Sinal Analítico Líquido – NAS

O Sinal Analítico Líquido, atribuído ao trabalho de Lorber,<sup>29</sup> é a parte do sinal analítico que advém apenas do analito. Por cálculos matriciais, pode-se fazer uma separação entre um vetor do sinal dos interferentes e um vetor NAS, ortogonal ao primeiro e, portanto, independente, como mostrado na Figura 3. O método de cálculo original do NAS foi proposto para modelos de mínimos quadrados clássicos (CLS – *classical least squares*), de calibração clássica/direta. Posteriormente, o método de cálculo foi modificado,<sup>30</sup> permitindo o seu uso em calibração inversa, como nos métodos PLS e PCR, de aplicação muito mais ampla em calibração multivariada.

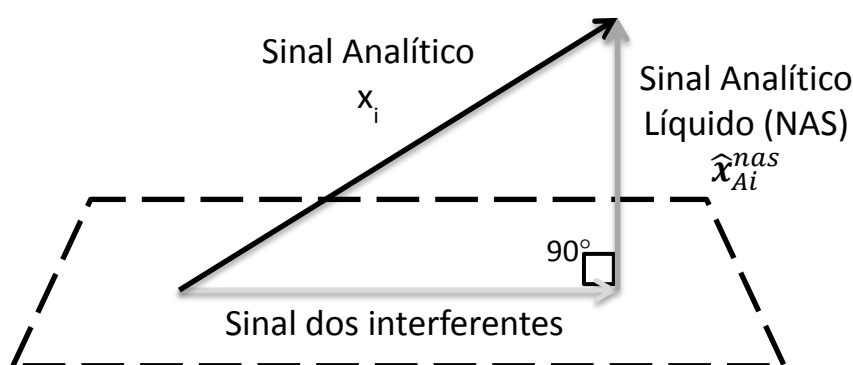


Figura 3 – Representação vetorial do NAS (adaptado de Valderrama<sup>25</sup>, pág. 1281)

O vetor de  $\hat{x}_{Ai}^{nas}$  pode ser calculado para cada amostra  $i$ , a partir dos coeficientes de regressão  $\mathbf{b}$  de um modelo PLS com  $A$  variáveis latentes, de acordo com a equação 7.

$$\hat{x}_{Ai}^{nas} = \mathbf{b}(\mathbf{b}^T \mathbf{b})^{-1} \mathbf{b}^T x_i \quad \text{Eq. 7}$$

A norma do vetor  $\hat{x}_{Ai}^{nas}$  fornece um valor escalar  $\hat{n}as_i$  para cada uma das amostras, cujos valores são organizados em um vetor  $\hat{n}as$ . O escalar  $\hat{n}as_i$  é análogo a um sinal analítico seletivo de uma análise univariada, possibilitando o uso da curva de calibração pseudo-univariada,<sup>31</sup> que é uma representação univariada de um sinal analítico multivariado. Essa representação, apesar de ser redundante em relação à curva de valores de referência *versus* valores previstos, utilizada amplamente em calibração

multivariada, foi proposta por motivos didáticos, visando harmonizar a interpretação de modelos multivariados com a realidade univariada, mais comum à normatização vigente. O modelo de regressão pseudo-univariado é representado pela equação 8.

$$\mathbf{y} = \hat{\mathbf{b}}_{nas} \hat{\mathbf{n}}_{as} + \mathbf{e} \quad \text{Eq. 8}$$

em que

$$\hat{\mathbf{b}}_{nas} = (\hat{\mathbf{n}}_{as}^T \hat{\mathbf{n}}_{as})^{-1} \hat{\mathbf{n}}_{as}^T \mathbf{y} \quad \text{Eq. 9}$$

### 2.2.2. Figuras de mérito

Algumas figuras de mérito para calibração multivariada são calculadas de maneira igual ou semelhante à maneira usada em calibração univariada. Porém, outras figuras exigem novos conceitos especificamente multivariados, como o NAS. Os guias e normas de validação atuais são univariados, como a resolução RE 899 da ANVISA<sup>32</sup> e os guias Q2A<sup>33</sup> e Q2B<sup>34</sup> da Conferência Internacional de Harmonização (ICH – *International Conference on Harmonization*). Isso faz com que métodos multivariados não possam ser usados oficialmente em muitas áreas, já que abordam conceitos diferentes, que em alguns casos são incompatíveis com as definições univariadas. Dessa maneira, é necessária uma revisão destes guias para incluir e harmonizar os conceitos multivariados.

A veracidade é a estimativa do erro entre o valor medido e o valor de referência. Apesar de esta figura poder ser avaliada da mesma maneira que em calibração univariada, nos métodos multivariados, é comum apresentar, como parâmetros de veracidade, as raízes quadradas dos erros quadráticos médios de calibração (RMSEC – *root mean squares errors of calibration*) e de previsão (RMSEP – *root mean squares errors of prediction*). Por ser calculado a partir das amostras de validação, não utilizadas na construção do modelo, o RMSEP é o parâmetro mais robusto usado na avaliação de



métodos multivariados. A precisão é uma estimativa da dispersão dos valores de uma série de medidas, em níveis de repetitividade, precisão intermediária ou reprodutividade. Usa-se como parâmetro o desvio padrão relativo (DPR). A linearidade pode ser verificada por meio do coeficiente de correlação ( $r$ ) da reta estimada para os valores de referência *versus* os valores previstos, mas o qual por si só não é considerado suficiente. A aleatoriedade dos resíduos da regressão também deve ser comprovada de maneira objetiva, por meio de testes estatísticos.<sup>35</sup> Esses testes avaliam a normalidade (Ryan-Joiner), a homocedasticidade (Brown-Forsythe) e a independência (Durbin-Watson) dos resíduos e o uso destes foi recentemente estendido a métodos multivariados.<sup>36</sup> O principal dentre esses testes é o de Durbin-Watson, em que o desvio padrão dos resíduos é comparado com o desvio padrão das diferenças sucessivas. Se não houver diferença significativa entre os desvios, conclui-se que os resíduos são independentes. Se os resultados dos três testes confirmarem que os resíduos são independentes, homoscedásticos e seguem a distribuição normal, conclui-se que estes resíduos são aleatórios e, portanto, os dados são bem modelados linearmente.

A seletividade (SEL) é calculada para cada amostra como a razão entre a norma do vetor NAS ( $\widehat{nas}_i$ ) e norma do vetor de sinal analítico (*e.g.* espectro). A seletividade do método é calculada como a média das seletividades individuais das amostras. É importante destacar que a seletividade na calibração multivariada não tem tanta relevância quanto na univariada. Isso se dá porque na calibração univariada é necessário que haja seletividade de sinal próxima a 100%, enquanto na calibração multivariada esse parâmetro é apenas ilustrativo, pois, é a falta de seletividade que torna justamente necessário o uso de quimiometria. Novamente, ressalta-se a necessidade de modificar a normatização atual, que exige seletividade do sinal analítico.<sup>32-34</sup>

$$SEL = \frac{\widehat{nas}_i}{\|x_i\|} \quad \text{Eq. 10}$$

A sensibilidade (SEN) é a capacidade de o método variar a resposta analítica por unidade de sinal analítico. Para métodos multivariados, a sensibilidade líquida de uma amostra  $i$  pode ser calculada a partir do vetor NAS, pela equação 11, e a sensibilidade do modelo, pela equação 12.

$$s_i^{nas} = \left\| \frac{\hat{x}_{A,i}^{nas}}{y} \right\| \quad \text{Eq. 11}$$

$$SEN = \|s_i^{nas}\| \quad \text{Eq. 12}$$

A sensibilidade é dependente da técnica utilizada e, portanto, a sensibilidade analítica ( $\gamma$ ) se apresenta mais útil para comparação entre técnicas diferentes. Ela pode ser calculada de acordo com a equação 13,

$$\gamma = \frac{SEN}{\varepsilon} \quad \text{Eq. 13}$$

em que ( $\varepsilon$ ), ruído instrumental, é estimado como o desvio padrão combinado de repetidas medidas do branco. O inverso de  $\gamma$  ( $\gamma^{-1}$ ) indica a menor concentração discernível pelo método, considerando que o ruído instrumental aleatório seja a única fonte significativa de erro, e deve ser usado para definir o número de algarismos significativos com os quais os resultados serão expressos.

O viés, ou *bias*, definido como a diferença entre o valor de uma medida e o valor de referência, é a medida de erros sistemáticos no modelo, sendo calculado apenas com as amostras de validação. O cálculo de viés para calibração multivariada (equação 14) é proposto por norma ASTM,<sup>37</sup>

$$viés = \sum_{i=1}^{n_v} \frac{(y_i^{ref} - \hat{y}_i)}{n_v} \quad \text{Eq. 14}$$

em que  $y_i^{ref}$  é o valor de referência e  $\hat{y}_i$  é o valor previsto de cada amostra, e  $n_v$  é o número de amostras do conjunto de validação. O desvio padrão de erros de validação (SDV – *standard deviation of validation errors*) é usado para verificar se o viés é

significativamente diferente de zero, por meio de um teste t de Student, com  $n_v$  graus de liberdade:

$$SDV = \sqrt{\frac{\sum[(y_i^{ref} - \hat{y}_i) - bias]^2}{n_v - 1}} \quad \text{Eq. 15}$$

$$t_{calc} = \frac{|viés|\sqrt{n_v}}{SDV} \quad \text{Eq. 16}$$

A Relação de Desempenho do Desvio<sup>38</sup> (RPD – *residual prediction deviation* ou *relative predictive determinant*) é uma figura de mérito utilizada para verificar a eficiência do modelo em relação à variação natural das amostras. Este parâmetro é utilizado para comparação entre modelos com diferentes faixas analíticas ou em termos absolutos.<sup>39</sup> O RPD é calculado para os conjuntos de calibração e validação, separadamente, como nas equações 17 e 18,

$$RPD_{Cal} = \frac{DP_{Cal}}{RMSECV} \quad \text{Eq. 17}$$

$$RPD_{Val} = \frac{DP_{Val}}{RMSEP} \quad \text{Eq. 18}$$

em que DP é o desvio padrão dos valores de referência para as amostras de calibração ( $DP_{Cal}$ ) e validação ( $DP_{Val}$ ).

### 2.3. Espectroscopia na região do infravermelho próximo<sup>40-41</sup>

A interação entre a radiação eletromagnética e a matéria é o fundamento para o uso das técnicas espectroscópicas. Dentro do espectro eletromagnético, a região do infravermelho, que compreende os comprimentos de onda de 750 nm a 1 mm, é a região que levou ao descobrimento de radiação não visível, relatada por Herschel em 1800.<sup>42</sup> A região do infravermelho próximo (NIR) compreendida entre 750 nm a 2500 nm (13300 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ), é a de comprimentos de onda imediatamente maiores que os da luz visível.

Na espectroscopia de infravermelho, a radiação incidente fornece energia igual à diferença de energia entre os níveis quânticos, permitindo a excitação da ligação a um modo de vibração mais energético. Porém, é necessário destacar que, para que um campo elétrico alternado (da radiação) possa ter efeito na amplitude de vibração da ligação, é necessário que haja uma diferença de dipolo nessa ligação, de modo que moléculas diatômicas monoelementares não são excitadas por radiação de infravermelho.

As vibrações observadas na espectroscopia NIR são referentes a sobretons e combinações de ligações fundamentais, portanto, de pequena intensidade, sendo que, experimentalmente, as vibrações observadas se restringem a ligações C-H, N-H, O-H e, em alguns casos, S-H. Como essas ligações estão presentes na maior parte das moléculas, é muito difícil a utilização do NIR em análise qualitativa para identificação de compostos, ao contrário do infravermelho médio. Além disso, também é rara a observação de um comprimento de onda seletivo, que permita o desenvolvimento de um método de quantificação univariado. Por isso, a espectroscopia NIR ficou “adormecida”<sup>43</sup> por um longo período de tempo, até que o desenvolvimento da quimiometria permitisse a aplicação quantitativa desta técnica.

### **2.3.1. Aspectos teóricos**<sup>40-41</sup>

Uma aproximação teórica para explicar o comportamento dessas vibrações, o modelo de oscilador harmônico clássico, considera que os átomos de uma molécula estão ligados por ligações químicas que se comportam como molas. Após o estudo da mecânica quântica, esse modelo foi corrigido para que apenas modos vibracionais com energias discretas fossem possíveis, conceituando o modelo de oscilador harmônico quântico.

A energia potencial  $E$  da ligação, de acordo com o modelo harmônico quântico, é:

$$E = \left( \nu + \frac{1}{2} \right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{Eq. 19}$$

em que  $\nu$  é o número quântico vibracional, inteiro e positivo,  $h$  é a constante de Planck,  $k$  é a constante de força da ligação e  $\mu$  é a massa reduzida do sistema, calculada como:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad \text{Eq. 20}$$

sendo  $m_1$  a massa do átomo 1 e  $m_2$  a massa do átomo 2.

Porém, devido à natureza das ligações químicas, distorções no comportamento da energia potencial são observadas para distâncias interatômicas muito menores ou muito maiores que a distância de ligação. Assim, um modelo mais realista é o de oscilador anarmônico quântico, representado na Figura 4, juntamente com o modelo harmônico quântico. O desvio de anarmonicidade ocorre em intensidade diferente para cada ligação dependendo do tipo desta e dos átomos envolvidos, sendo observado mais pronunciadamente em ligações entre átomos com grande diferença de massas, como as citadas na seção anterior. Esse desvio de anarmonicidade permite que sobretons, transições quânticas proibidas ( $\Delta\nu > 1$ ), ocorram simultaneamente às transições fundamentais que são observadas na região do infravermelho médio. Quanto maior a ordem do sobretom, primeira, segunda ou terceira, maior será a energia envolvida (menor comprimento de onda), porém menor será a intensidade. Por este motivo, os picos no espectro NIR costumam apresentar tendência de intensidade crescente, quando plotados em função do comprimento de onda. Também por isto, a espectroscopia NIR apresenta menor sensibilidade do que a espectroscopia de infravermelho médio.

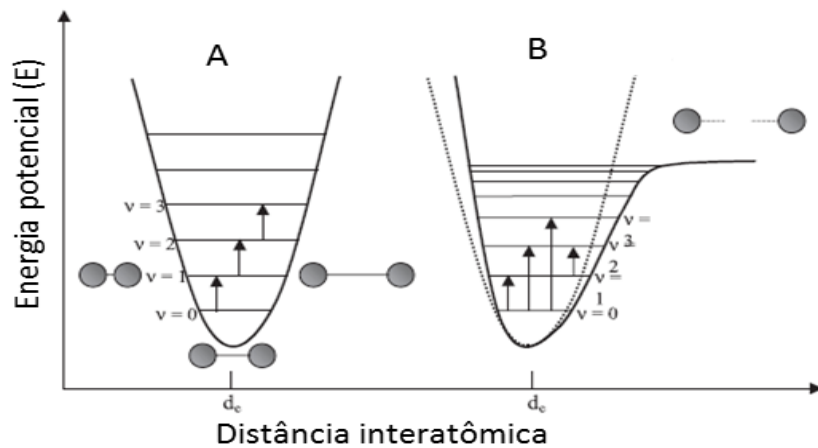


Figura 4 – Modelos quânticos de (A) oscilador harmônico e (B) oscilador anarmônico (adaptado de Pasquini<sup>40</sup>, pág. 201)

### 2.3.2. Refletância difusa<sup>40-41</sup>

A refletância difusa é uma forma eficiente de obter espectros de NIR de amostras sólidas, com pouco ou nenhum preparo desta amostra. Neste modo de aquisição do espectro, a radiação incide sobre a amostra sólida e interage com esta por meio de espalhamento e absorção da luz pelas partículas, sendo refletida em ângulos diferentes do ângulo de incidência. O tamanho das partículas e a disposição destas influenciam diretamente no espectro de refletância, que penetra alguns milímetros na superfície da amostra, como observado na Figura 5.

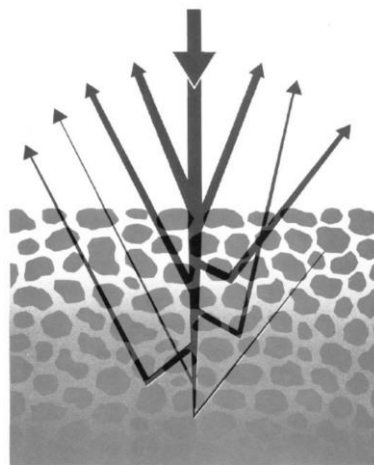


Figura 5 – Refletância difusa (adaptado de Wetzel<sup>43</sup>, pág. 1170A)

Um modelo de tratamento de dados de refletância difusa foi proposto por Kubelka e Munk<sup>44</sup>. Este modelo estabelece uma relação linear entre a concentração de um analito (C) e a refletância difusa (R), mostrada na equação 21.

$$f(C) = \frac{(1-R)^2}{2R} \quad \text{Eq. 21}$$

$$R = \frac{I_R}{I_{R0}} \quad \text{Eq. 22}$$

em que  $I_R$  é a intensidade de radiação refletida pela amostra e  $I_{R0}$  é a intensidade refletida por um padrão não absorvente, considerado branco. Contudo, um modelo mais simples, que também apresenta linearidade entre a refletância difusa e a concentração, é preferencialmente usado em calibração multivariada.

$$f(C) = \log \frac{1}{R} \quad \text{Eq. 23}$$

## 2.4. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida<sup>45</sup>

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é a doença causada pelos vírus da imunodeficiência humana (HIV-1 e HIV-2 – *Human Immunodeficiency Virus*). Os vírus afetam o sistema imunológico, destruindo as células de defesa, enfraquecendo gradualmente a resistência biológica da pessoa infectada. Os primeiros casos relatados da síndrome ocorreram nos anos de 1977 e 1978, nos Estados Unidos, Haiti e África Central, sendo definidos como AIDS apenas em 1982, quando se classificou a nova síndrome. O primeiro caso notificado no Brasil ocorreu em 1980, também identificado como AIDS em 1982. Apenas em 1987 passou-se a tratar a síndrome, utilizando a zidovudina, para a inibição da multiplicação do vírus. A falta de tratamento permitiu a expansão da doença, que infectou 10 milhões de pessoas nos primeiros 10 anos após sua identificação, segundo a ONU. Em 1995, registrou-se redução de 42% da incidência do HIV, devido ao tratamento, que já contava com 5 medicamentos.

Segundo estimativa da UNAIDS – Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS – 34 milhões de pessoas no mundo viviam com o vírus causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ao final de 2011. Apesar de indicar um aumento de 17% no número de pessoas nessa condição, em comparação a 2001, esse aumento é atribuído a melhor qualidade de vida dos portadores, já que o número de novas infecções diminuiu 15% e o número de mortes relacionadas à síndrome reduziu 18% no mesmo período.<sup>3</sup> No Brasil a taxa de incidência, em 2009, foi de 20,1 casos para 100.000 habitantes, segundo o Ministério da Saúde. O boletim informa também a redução do coeficiente de mortalidade, de 1,9 casos por 100.000 habitantes em 1999 para 1,3 em 2009.<sup>45</sup>

A melhora indicada pelos dois órgãos é atribuída ao tratamento com antirretrovirais que inibem a multiplicação do vírus, fortalecendo o paciente e, portanto, aumentando o tempo e a qualidade de vida. Esses medicamentos são classificados separados em 5 classes, indicadas e exemplificadas a seguir: Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (Tenofovir); Inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa (Nevirapina); Inibidores de protease (Darunavir); Inibidores de fusão (Enfurvitida); e Inibidores da Integrase (Raltegravir). O tratamento é feito utilizando pelo menos três medicamentos, de pelo menos duas classes distintas.

#### **2.4.1. Nevirapina<sup>46-48</sup>**

A nevirapina, apresentada na Figura 6, é um fármaco antirretroviral da classe dos inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa do vírus HIV-1, sendo o primeiro dessa classe aprovado para uso clínico, em 1996. Ela atua na enzima da transcriptase reversa do HIV-1, se ligando próximo ao sítio catalítico, de forma não



competitiva, e inibindo a replicação do vírus. A nevirapina é considerada seletiva, pois não afeta as DNA-polimerases humanas nem do vírus HIV-2.

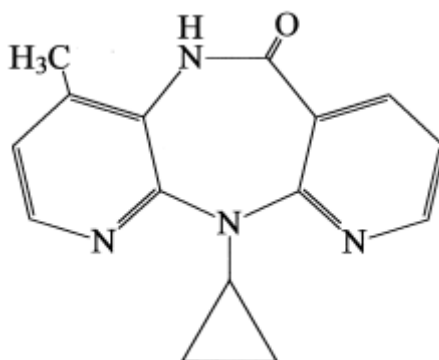


Figura 6 - Estrutura da Nevirapina

As propriedades da nevirapina, apesar de potentes, causam resistência rapidamente quando esta é usada isoladamente. Porém, quando associada a medicamentos nucleosídeos, como a zidovudina, a resistência do vírus ao tratamento diminui e a eficiência aumenta, sendo indicada a utilização de pelo menos três ativos devido aos melhores resultados no tratamento.

Sob o nome químico de 11-Ciclopropil-5,11-dihidro-4-metil-6H-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-ona, a nevirapina foi desenvolvida e patenteada pela Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc., e é comercializada sob o nome de Viramune®, na forma de suspensão oral ou comprimidos. No Brasil, devido ao grande empenho do governo no combate a AIDS, alguns Laboratórios Oficiais produzem o medicamento, que é distribuído gratuitamente nos centros de saúde. Entre esses laboratórios está a Fundação Ezequiel Dias – FUNED – que produz o medicamento sob o nome de Nevirax®.

O fármaco, da classe dos dipirido-diazepínicos, apresenta as propriedades físico-químicas relacionadas na Tabela 1:

Tabela 1 – Propriedades da Nevirapina

<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O
<b>Massa molar</b>	266,30 g.mol <sup>-1</sup>
<b>Temperatura de fusão</b>	247 °C
<b>Constante de dissociação ácida (pKa)</b>	2,8
<b>Solubilidade em água (pH neutro)</b>	100 mg.L <sup>-1</sup>
<b>Coefficiente de partição octanol/água (log Kow)</b>	3,89

A determinação de nevirapina em comprimidos é descrita na farmacopeia americana por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no comprimento de onda de 240 nm.<sup>4</sup> Na literatura, encontram-se métodos que empregam cromatografia líquida de alta eficiência,<sup>5</sup> cromatografia em camada delgada de alta eficiência,<sup>6</sup> cromatografia eletrocínética micelar<sup>7</sup> e eletroforese capilar de zona.<sup>8</sup> Não há nenhum trabalho publicado, porém, que faça essa determinação por um método usando NIR e englobe as vantagens dessa técnica, como ser simples, rápido, não destrutivo, sem geração de resíduos e de baixo custo.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Equipamentos e softwares**

Para realização das análises espectroscópicas, foi utilizado um espectrofotômetro de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) PerkinElmer Spectrum 100N, presente no Laboratório de Ensaio de Combustíveis do Departamento de Química da UFMG (LEC-UFMG). Uma sonda de fibra ótica para refletância difusa, cedida pela FUNED, foi usada, permitindo aquisição de espectros diretamente nas amostras sólidas.

O tratamento dos dados foi feito no programa MATLAB, versão 7.13 (The MathWorks, Natick, MA, EUA), usando o pacote PLS Toolbox, versão 6.7.1 (Eigenvector Technologies, Manson, WA, EUA), que contém as rotinas para métodos de calibração multivariada. Uma rotina para detecção de amostras anômalas (*outliers*) foi utilizada. Esta rotina foi elaborada por Jez W. B. Braga (IQ-UnB) e é compatível com o Matlab.<sup>39</sup>

#### **3.2. Planejamento experimental – Preparo das amostras**

Para a construção do modelo, dois planejamentos experimentais foram feitos: o primeiro consistiu de 78 amostras preparadas apenas como misturas de pós; o segundo consistiu de apenas 9 amostras, preparadas tanto na forma de misturas de pós quanto na forma de comprimidos com a mesma composição, as quais serão chamadas de amostras de transferência. Os planejamentos foram construídos como planejamentos experimentais aleatórios robustos,<sup>49</sup> com quatro fatores: teor de nevirapina (princípio ativo), teor de lactose, teor de celulose e teor da soma dos outros excipientes (povidona,

amidoglicolato de sódio, dióxido de silício e estearato de magnésio). A massa de nevirapina foi variada de 160 a 240 mg por comprimido, correspondendo à faixa de 80 a 120% do valor de rótulo ou teor alvo (200 mg por comprimido de 800 mg). A composição da amostra referente a 200 mg de nevirapina foi a mesma da formulação comercializada. Para as demais amostras, as massas de lactose e celulose foram variadas utilizando a função “Aleatório” do programa Microsoft Excel®, aceitando valores entre 95 e 105% do teor alvo desses excipientes. A massa dos outros excipientes foi mantida constante. Devido à variação aleatória dos excipientes, a massa da amostra foi variável. Assim, os teores alvo de cada fator foram calculados segundo a equação 24.

$$\text{teor} = \frac{\text{massa do componente}}{\text{massa da formulação}} * \frac{\text{massa alvo do comprimido}}{\text{massa alvo do componente}} * 100\% \quad \text{Eq. 24}$$

Devido ao sigilo envolvido na formulação, as massas e teores dos excipientes serão agrupados como um componente, placebo. Na Tabela 2 apresentam-se os valores de massas de nevirapina, placebo e formulação (nevirapina + placebo), assim como o teor de nevirapina em relação ao valor alvo.

Para o primeiro planejamento, preparou-se uma quantidade 20 vezes maior de cada formulação (aproximadamente 16 g), pesada exatamente, para reduzir erros de preparo. Os pós foram armazenados em frascos de vidro âmbar. Para o segundo planejamento, preparou-se 200 g de cada formulação. Recolheu-se aproximadamente 15 g da mistura de pós e o restante passou por compressão formando comprimidos. Os comprimidos foram feitos em punção no formato de 13 mm, circular, bicôncavo e liso, como mostrado na Figura 7.

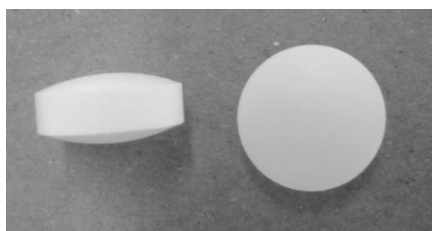


Figura 7 – Comprimidos da formulação de nevirapina.

O preparo das amostras foi realizado pelo Serviço de Desenvolvimento de Medicamentos da FUNED, seguindo procedimento padronizado para o processo que garante a uniformidade da mistura.

Tabela 2 – Planejamentos experimentais: massa de nevirapina, de placebo, massa total e teor alvo de nevirapina.

<b>Amostra</b>	<b>Nevirapina (mg)</b>	<b>Placebo (mg)</b>	<b>Formulação (mg)</b>	<b>Teor alvo (%)</b>
1	160,00	607,00	767,00	83,44
2	162,00	615,60	777,60	83,33
3	164,00	601,40	765,40	85,71
4	166,00	609,80	775,80	85,59
5	168,00	610,80	778,80	86,29
6	170,00	604,40	774,40	87,81
7	172,00	606,30	778,30	88,40
8	174,00	611,70	785,70	88,58
9	176,00	601,80	777,80	90,51
10	178,00	594,00	772,00	92,23
11	180,00	606,70	786,70	91,52
12	180,00	606,70	786,70	91,52
13	180,00	606,70	786,70	91,52
14	180,00	606,70	786,70	91,52
15	181,00	613,80	794,80	91,09
16	182,00	598,70	780,70	93,25
17	183,00	617,80	800,80	91,41
18	184,00	600,10	784,10	93,87
19	185,00	605,20	790,20	93,65
20	186,00	602,90	788,90	94,31
21	187,00	587,80	774,80	96,54
22	188,00	595,70	783,70	95,96
23	189,00	599,50	788,50	95,88
24	190,00	580,00	770,00	98,70
25	191,00	607,30	798,30	95,70
26	192,00	581,10	773,10	99,34
27	193,00	613,90	806,90	95,67
28	194,00	602,30	796,30	97,45
29	195,00	593,50	788,50	98,92
30	196,00	603,90	799,90	98,01
31	196,50	589,20	785,70	100,04
32	197,00	598,90	795,90	99,01
33	197,50	607,00	804,50	98,20
34	198,00	615,70	813,70	97,33
35	198,50	601,60	800,10	99,24
36	199,00	594,40	793,40	100,33
37	199,50	597,80	797,30	100,09
38	200,00	600,00	800,00	100,00
39	200,00	600,00	800,00	100,00
40	200,00	600,00	800,00	100,00
41	200,00	600,00	800,00	100,00
42	200,50	591,00	791,50	101,33
43	201,00	598,80	799,80	100,53

<b>Amostra</b>	<b>Nevirapina (mg)</b>	<b>Placebo (mg)</b>	<b>Formulação (mg)</b>	<b>Teor alvo (%)</b>
<b>44</b>	201,50	600,10	801,60	100,55
<b>45</b>	202,00	601,80	803,80	100,52
<b>46</b>	202,50	607,60	810,10	99,99
<b>47</b>	203,00	601,70	804,70	100,91
<b>48</b>	203,50	596,30	799,80	101,78
<b>49</b>	204,00	577,70	781,70	104,39
<b>50</b>	205,00	611,40	816,40	100,44
<b>51</b>	206,00	585,90	791,90	104,05
<b>52</b>	207,00	620,20	827,20	100,10
<b>53</b>	208,00	586,90	794,90	104,67
<b>54</b>	209,00	583,10	792,10	105,54
<b>55</b>	210,00	607,40	817,40	102,76
<b>56</b>	211,00	591,80	802,80	105,13
<b>57</b>	212,00	612,70	824,70	102,83
<b>58</b>	213,00	583,00	796,00	107,04
<b>59</b>	214,00	608,00	822,00	104,14
<b>60</b>	215,00	611,70	826,70	104,03
<b>61</b>	216,00	601,30	817,30	105,71
<b>62</b>	217,00	612,50	829,50	104,64
<b>63</b>	218,00	611,70	829,70	105,10
<b>64</b>	219,00	585,80	804,80	108,85
<b>65</b>	220,00	602,00	822,00	107,06
<b>66</b>	220,00	602,00	822,00	107,06
<b>67</b>	220,00	602,00	822,00	107,06
<b>68</b>	220,00	602,00	822,00	107,06
<b>69</b>	222,00	599,70	821,70	108,07
<b>70</b>	224,00	591,30	815,30	109,90
<b>71</b>	226,00	595,00	821,00	110,11
<b>72</b>	228,00	592,50	820,50	111,15
<b>73</b>	230,00	597,20	827,20	111,22
<b>74</b>	232,00	593,20	825,20	112,46
<b>75</b>	234,00	598,20	832,20	112,47
<b>76</b>	236,00	600,20	836,20	112,89
<b>77</b>	238,00	602,20	840,20	113,31
<b>78</b>	240,00	584,50	824,50	116,43
<b>T1</b>	160,00	610,93	770,93	83,02
<b>T2</b>	180,00	611,91	791,91	90,92
<b>T3</b>	190,00	592,48	782,48	97,13
<b>T4</b>	196,00	594,63	790,63	99,16
<b>T5</b>	200,00	600,00	800,00	100,00
<b>T6</b>	204,00	595,22	799,22	102,10
<b>T7</b>	210,00	602,49	812,49	103,39
<b>T8</b>	220,00	587,23	807,23	109,01
<b>T9</b>	240,00	602,53	842,53	113,94

As amostras T1 a T9 são amostras de transferência

### 3.3. Aquisição de espectros

Os espectros de refletância foram registrados entre 1000 e 2400 nm com passo de 2 nm e 50 varreduras. Para as amostras em pó, a sonda de refletância difusa foi inserida no frasco âmbar, compactando o pó antes da aquisição. As amostras na forma de comprimidos foram inseridas em um tubo metálico, no qual foi feita a aquisição de 5 espectros, com pequenas rotações do comprimido entre um espectro e o seguinte; calculou-se o espectro médio destas 5 medidas. É importante ressaltar que o diâmetro da fibra ótica(8 mm) é menor que o diâmetro do comprimido(13 mm). Por isso, a curvatura do comprimido não influencia o espectro, já que este é obtido no centro do comprimido, que é aproximadamente plano.

O espectro branco foi obtido em um tubo metálico com fundo não absorvente, fornecido junto ao acessório, e descontado automaticamente pelo *software* do instrumento. Repetições de branco foram feitas a cada 16 espectros. Para a estimativa do ruído experimental, adquiram-se 16 espectros de branco.

### 3.4. Modelagem quimiométrica

As 78 amostras do primeiro planejamento experimental foram organizadas em ordem crescente de teor alvo de nevirapina e separadas entre os conjuntos de calibração e validação. Segundo a norma ASTM E1665,<sup>37</sup> as amostras devem ser separadas em aproximadamente 2/3 para o conjunto de calibração e 1/3 para o conjunto de validação. Assim, as amostras foram separadas pela ordem CVC (calibração, validação, calibração), garantindo a presença de amostras de toda a faixa de concentração em ambos os grupos. As amostras do segundo planejamento – amostras de transferência – foram separadas como mistura de pós para o conjunto de calibração e comprimidos para



o conjunto de validação. Essa separação se deve à necessidade da presença das amostras da condição primária no conjunto de calibração. Dessa forma, o conjunto de calibração foi composto por 61 amostras e o conjunto de validação por 35 amostras.

Considerando que o erro de pesagem no preparo das amostras é menor que o erro de análise pelo método de referência, o valor de referência utilizado foi o valor nominal do teor de nevirapina das amostras, em porcentagem do valor alvo.

Para avaliação dos modelos, foram considerados RMSEC, RMSECV e número de variáveis latentes. O RMSECV foi calculado utilizando validação cruzada por subconjuntos aleatórios, recomendada para conjuntos com mais de 20 amostras organizadas de acordo com um planejamento experimental.

Estudaram-se os métodos de pré-processamentos mais utilizados para espectros NIR:<sup>50</sup> Correção de Espalhamento Multiplicativo (MSC – *Multiplicative Scatter Correction*), Variação Normal Padrão (SNV – *Standard Normal Variate*), derivadas de 1ª e 2ª ordem, com alisamento Savitzky-Golay, além do alisamento sem derivada. Combinações de pré-processamentos também foram estudadas.

Após a seleção de pré-processamentos, otimizou-se o modelo pela detecção de amostras anômalas (*outliers*). Os dados foram submetidos a uma rotina<sup>28,39</sup> de detecção que identifica amostras com alto resíduo espectral, alto resíduo de valores de referência ou alta influência (*leverage*). A rotina empregada não analisa resíduos de valores de referência das amostras de validação. A cada remoção de amostras anômalas, um novo modelo foi gerado e nova etapa de detecção de amostras anômalas foi feita. Esse procedimento foi limitado a 3 vezes, gerando 4 modelos, para evitar o efeito “bola de neve”, em que a redução da quantidade de amostras faz com que o limite de confiança seja reduzido a ponto de incluir cada vez mais amostras no conjunto considerado como amostras anômalas. Ao final do processo de otimização, as amostras de validação foram

submetidas à detecção de amostras anômalas pelo teste de Jackknife,<sup>35</sup> que considera apenas os resíduos de valores de referência, não analisadas pela rotina usada anteriormente.

### **3.5. Previsão de comprimidos intactos**

A capacidade do modelo em prever o teor de nevirapina em comprimidos intactos foi testada por três abordagens diferentes. Na primeira, foi feita uma análise direta dos comprimidos no modelo inicial. Na segunda abordagem, construiu-se um modelo multi-forma pela substituição das amostras de transferência em pó por amostras de transferência em comprimido, no conjunto amostras de calibração. Por último, utilizaram-se métodos de transferência de calibração para ajustar os espectros de comprimidos aos espectros de pós. Foram testados os métodos DS, PDS e DWPDS, utilizando os dados previamente pré-processados.<sup>19</sup>

Para avaliar diretamente a predição do teor nos comprimidos, um subconjunto de validação foi criado, contendo apenas as 9 amostras de transferência na forma comprimido. Dessa forma, a diferença entre os erros das abordagens é referente à previsão dos teores apenas nos comprimidos. Para essa comparação, utilizou-se o RMSEP do conjunto, a faixa de erros relativos e os resíduos espectrais (Q). O resíduo Q é a fração de informação do espectro não utilizada pelo modelo para a previsão de cada amostra.

### **3.6. Validação analítica**

Estimaram-se algumas figuras de mérito para a validação analítica do método proposto. Para veracidade, estimou-se RMSEC, RMSEP e faixa de erros relativos. A

precisão foi estimada, em nível de repetitividade e precisão intermediária, pela análise de 6 replicatas de medidas de amostras em níveis baixo (91,52%), médio (100,00%) e alto (107,06%). Para o nível de repetitividade foi considerado o mesmo analista no mesmo dia. Para o nível de precisão intermediária, as amostras foram analisadas por dois analistas distintos em dois dias diferentes. A linearidade do modelo foi avaliada pelo coeficiente de correlação ( $r$ ) entre valores de referência e valores preditos; e por testes estatísticos de aleatoriedade de resíduos: Brown-Forsythe para homocedasticidade, Ryan-Joiner para normalidade e Durbin-Watson para independência. Seletividade e sensibilidade foram estimadas a partir do NAS. O ruído instrumental, usado para a estimativa da sensibilidade analítica ( $\gamma$ ), foi calculado como o desvio padrão combinado de 16 espectros do branco. Calculou-se o viés (*bias*), de acordo com a norma ASTM.<sup>37</sup> O RPD foi calculado para calibração e validação.

## 4. Resultados e discussões

### 4.1. Construção dos modelos

Os espectros de todas as amostras são mostrados na Figura 8A. Foi observado desvio de linha base não linear, devido ao espalhamento multiplicativo de luz, como é comum em espectros de refletância difusa de amostras sólidas. Assim, fez-se necessário um pré-processamento para correção, utilizando MSC. É necessário ressaltar que o pré-processamento por MSC foi feito usando o espectro médio do conjunto de calibração e, por isso, foi realizado diretamente nos dados. Assim, ao utilizar os espectros para transferência de calibração, que é processada em outra ferramenta do *software*, garante-se que todos os dados foram pré-processados igualmente. Para minimizar efeitos de ruído espectral, amplificando a razão sinal/ruído, utilizou-se também derivada de 1ª ordem com alisamento de Savitsky-Golay, usando janela de 11 variáveis e ajuste por polinômio de 2º grau. Os espectros pré-processados são visualizados na Figura 8B.

Foi feita uma seleção de variáveis qualitativa. A região de banda de combinação (1800-2500 nm) mostrou grande influência no modelo, porém, apresentou também altos resíduos espectrais. Isso indica que o ruído dessa região foi modelado, apesar de ser informação irrelevante. Portanto, essa região foi removida dos dados. As primeiras e últimas variáveis foram distorcidas pelo uso de alisamento e derivada, já que não estão no centro da janela usada pelo pré-processamento. Por isso, a região de 1000 a 1020 nm também foi removida. Assim, a região utilizada nos modelos foi de 1020 a 1800 nm.

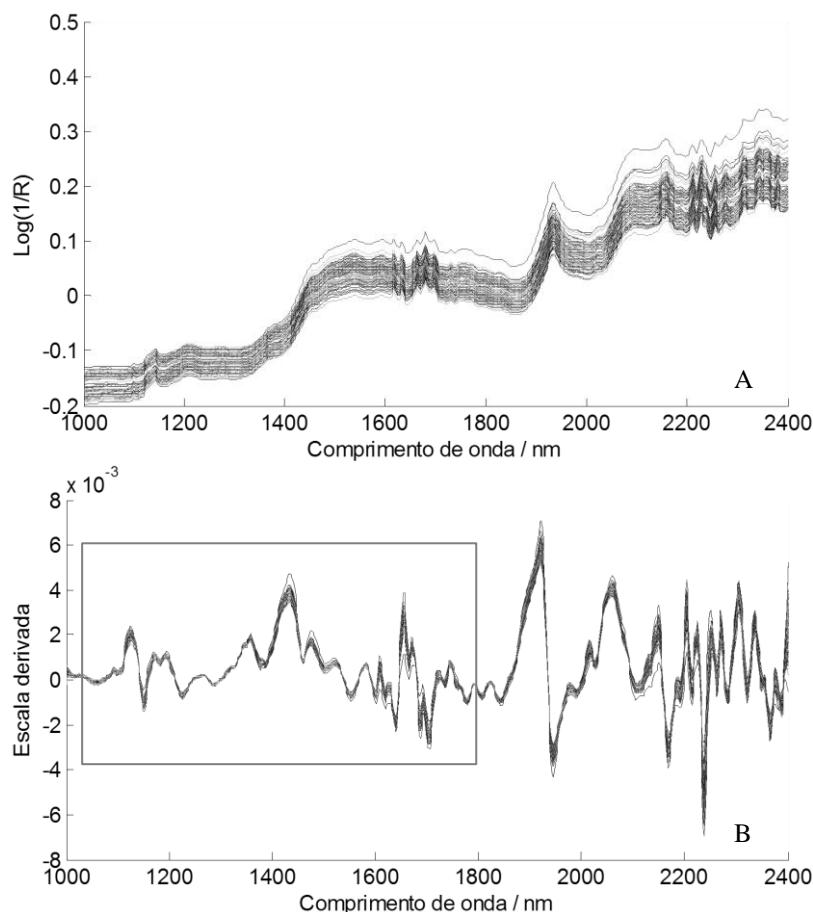


Figura 8 – Espectros das 96 amostras (A) brutos e (B) pré-processados

A detecção de amostras anômalas, com nível de confiança de 95%, identificou 9 amostras no conjunto de calibração, sendo: 1 por alta influência (*leverage*), 3 por altos resíduos espectrais e 5 por altos resíduos no valor de referência. É importante ressaltar que uma amostra de transferência foi considerada anômala, identificada por alto resíduo espectral, e, portanto, não utilizada na transferência de calibração. No último modelo, foi observado que apenas uma amostra do conjunto de validação, além das amostras em comprimido, apresentou alto resíduo espectral. Essa amostra foi a única amostra em pó que foi identificada como anômala pela rotina de detecção, também por alto resíduo espectral. Por isso, essa amostra foi removida. Além disso, o teste de Jackknife foi empregado no conjunto de validação, para avaliar amostras anômalas devido a grandes resíduos no valor de referência. Esse teste foi feito apenas uma vez, resultando em 3

amostras anômalas. Uma dessas amostras foi uma amostra de comprimido, portanto, retirada antes da etapa de transferência de calibração.

Na Tabela 3, é resumido o processo de otimização. O modelo final, contendo 52 amostras de calibração e 31 de validação, foi utilizado nas etapas posteriores.

Tabela 3 – Otimização do modelo por remoção de *outliers*

Modelo	1º	2º	3º	4º
Número de amostras de calibração	61	57	55	52
Número de amostras de validação	35	35	35	31
Número de VL	3	5	5	5
Variância explicada em X (%)	90,5	94,1	94,5	95,1
Variância explicada em Y (%)	67,2	90,6	92,2	93,5
RMSEC (%)	4,4	2,2	2,0	1,9
RMSEP (%)	4,0	2,8	2,8	2,2

## 4.2. Análise espectral qualitativa

Foram obtidos espectros da nevirapina pura e do placebo da formulação. Estes espectros e o espectro médio das amostras estão mostrados na Figura 9.

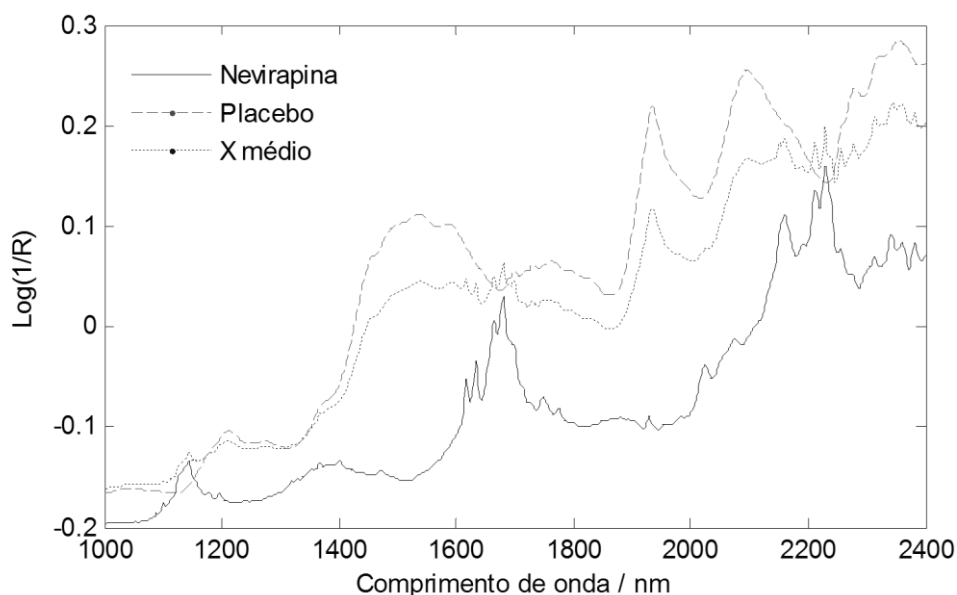


Figura 9 – Espectros de nevirapina, placebo e espectro médio das amostras

As bandas mais proeminentes do espectro de nevirapina são nas regiões de 1140, 1680 e 2230 nm, que estão relacionadas, respectivamente, ao 2º sobretom, 1º sobretom e combinação de bandas de ligação C-H. Observa-se também uma banda de combinação de ligações N-H com C-H em 2160 nm, e uma banda de 1º sobretom de ligação C-H de anel aromático, em 1630 nm. Ressalta-se que a região selecionada para o modelo foi de 1020 a 1800 nm, eliminando a região de bandas de combinação.

Além disso, uma grande correlação ( $r=0,92$ ) foi observada entre a concentração de nevirapina e os escores da VL1. Isso indica que o princípio ativo foi, em grande parte, modelado por essa variável latente. Seguindo uma recomendação da farmacopeia europeia,<sup>51</sup> foi feita uma comparação do espectro de nevirapina, pré-processado, e os pesos (*loadings*) da VL1. Para possibilitar a comparação, no espectro de nevirapina foi selecionada apenas a região usada para construção do modelo (1020-1800 nm). Como mostrado na Figura 10, há grande correlação ( $r=0,96$ ) entre os dados e as regiões de maior amplitude são as referentes às bandas atribuídas à nevirapina.

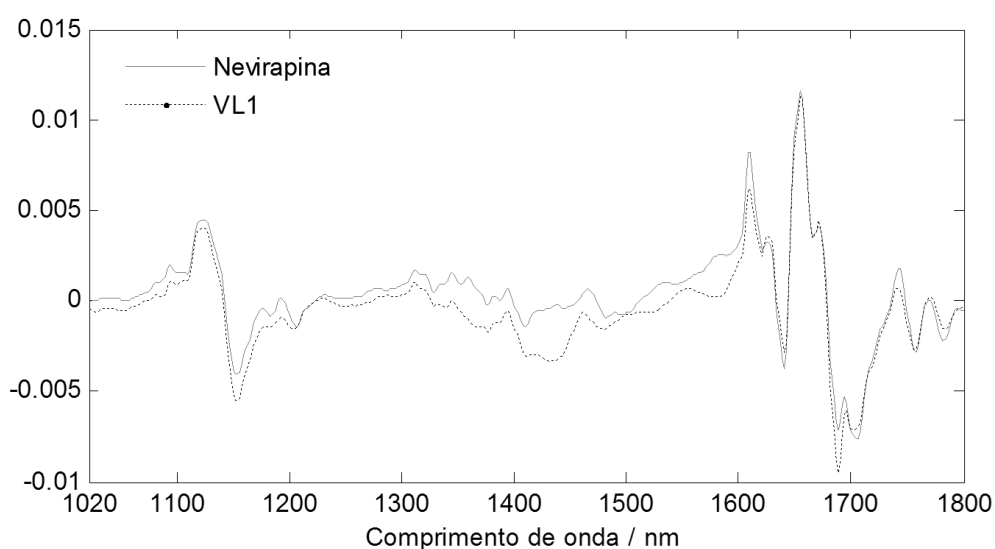


Figura 10 – Espectro pré-processado de nevirapina e *loadings* da VL1

### 4.3.Previsão de comprimidos e transferência de calibração

A diferença entre os espectros de pó e de comprimido, causada pela diferença do tamanho e organização das partículas na amostra pode ser observada na Figura 11, que mostra os espectros de uma mesma amostra nas formas de pó e de comprimido.

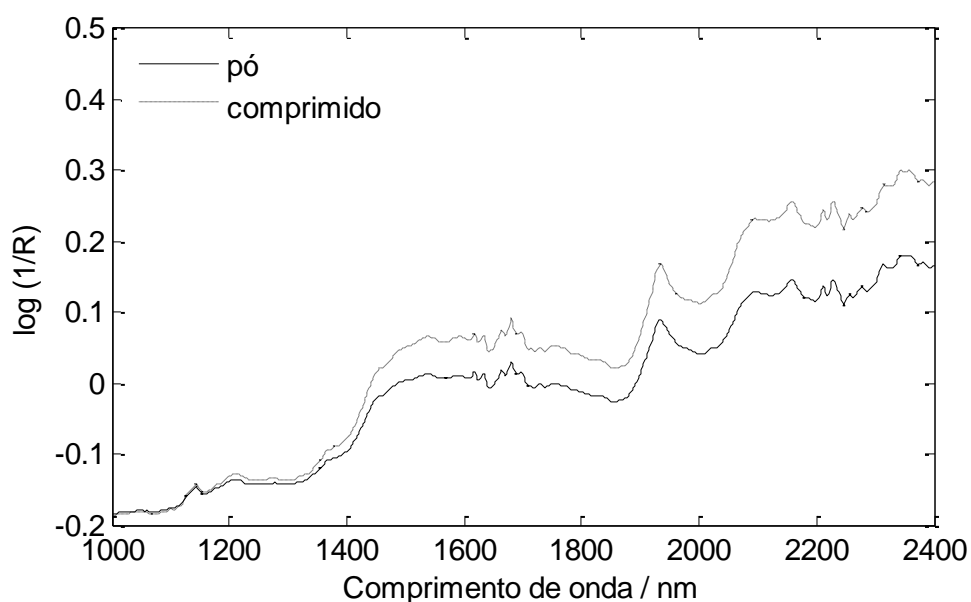


Figura 11 – Espectros de uma mesma amostra (T4) nas formas de mistura de pós e de comprimido

O estudo da eficiência na previsão de comprimidos visou a variação entre as abordagens feitas. Para igualar o efeito da quantidade de amostras nas abordagens, removeram-se as amostras T1 e T5, detectadas como amostras anômalas, no comprimido e no pó, respectivamente. Assim, o subconjunto de validação composto por comprimidos foi composto por 7 amostras. Contudo, o conjunto de validação, contendo 31 amostras, foi usado para comparação dos resultados. Além disso, a amostra T5 na forma de comprimido foi usada para validação externa, já que não pôde ser usada no conjunto de transferência.

As amostras de transferência na forma de comprimidos foram analisadas, de acordo com a primeira abordagem, diretamente pelo modelo construído somente com amostras de misturas de pós. A faixa de erros foi de -2,2 a 4,0 % e o RMSEP 2,0%.



Como esperado, o resíduo espectral dos comprimidos neste modelo foi muito maior que o restante das amostras em pó. Isso pode ser observado na Figura 12A.

Para a segunda abordagem, as amostras de transferência, em pó, do conjunto de calibração foram substituídas pelas amostras na forma de comprimido. Um novo modelo foi criado e as amostras em comprimido foram analisadas. Esse modelo foi composto por 6 variáveis latentes e tem RMSEC igual a 1,8%. A faixa de erros de previsão dos comprimidos foi de -2,7 a 3,8% e o RMSEP 2,0%, da mesma ordem que os erros apresentados na primeira abordagem. Esse resultado indica que a quantidade de amostras na forma de comprimido usada na criação deste modelo não foi suficiente para melhorar a previsão de amostras nesta forma física. Além disso, essas amostras distorceram o modelo, aumentando o resíduo espectral das amostras de pó, e é necessário ressaltar, também, que o resultado da previsão dos comprimidos foi sobreajustado, pois as amostras analisadas foram também utilizadas na construção do modelo. Isso pode ser comprovado ao se observar o baixo resíduo espectral, mostrado na Figura 12B.

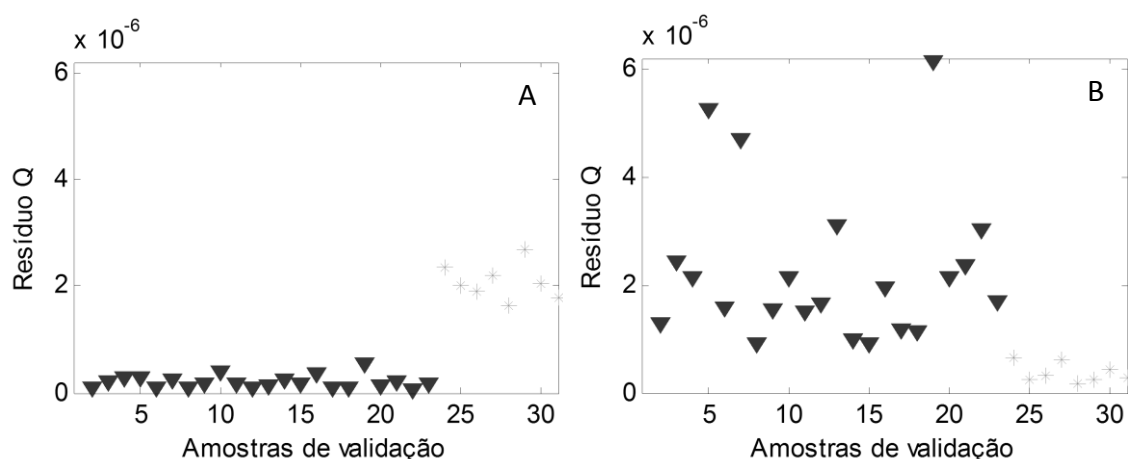


Figura 12 – Gráficos dos resíduos espectrais Q para (A) abordagem 1 e (B) abordagem 2. ( $\blacktriangledown$  – amostras na forma de pó; \* - amostras na forma de comprimido)

Para a terceira abordagem, foi feita a transferência de calibração entre as amostras na forma de pó e na forma de comprimidos. Usualmente, a transferência de

calibração é feita usando as amostras mais representativas do conjunto de calibração selecionadas sistematicamente, por exemplo, por meio do algoritmo de Kennard-Stone.<sup>52</sup> Porém, como as amostras de transferência devem ser obtidas em ambas as situações envolvidas na transferência, é necessário que a mesma mistura de pós usada para preparar os comprimidos seja utilizada na calibração do modelo. Para que isso seja possível, as amostras de transferência precisam ser selecionadas antes da modelagem. Dessa forma, a alternativa direta para escolher as amostras de transferência foi um planejamento experimental que abrangesse toda a faixa de teores do princípio ativo. Bouvesse e Massart<sup>52</sup> estimaram a eficiência de transferência em função da quantidade de amostras usadas para isso, concluindo que apenas 3 ou 4 amostras são suficientes quando selecionadas por Kennard-Stone e 6 amostras quando selecionadas pela maior influência (*leverage*). Outros trabalhos descrevem o uso de aproximadamente 10% das amostras do conjunto de calibração.<sup>53-54</sup> Dessa forma, o uso de 7 amostras de transferência foi considerado adequado.

A função de transferência de calibração do PLS *toolbox* foi utilizada, gerando modelos de transferência que posteriormente foram aplicados nas amostras. O programa exibe a diferença espectral entre os dados primários (pó) e secundários (comprimido), antes e depois da transferência, facilitando a interpretação desta. A diferença inicial entre os dados foi de 11,5%.

O modelo DS reduziu os erros de previsão das amostras e o RMSEP diminuiu de 2,0 para 1,6%. Porém, essa técnica usa todo o espectro para fazer o ajuste de cada variável, o que pode ser considerado como sobreajuste dos dados. Isso é comprovado pela redução da diferença espectral dos dados que passou a ser indicada como menor que 1%, ou seja, não há diferença significativa. Efetivamente, os valores previstos para

as amostras em comprimido são os mesmos que os de previsão das amostras em forma de pó, com erros de previsão entre -2,9 e 2,1%.

O modelo PDS foi construído usando janela de 11 variáveis e reduziu a diferença espectral dos dados para 4,0%. O RMSEP foi reduzido, de 2,0 para 1,1%, e os erros de previsão foram de -1,9 a 1,7%. Porém, essa técnica utiliza apenas uma variável do espectro primário para ajustar uma janela de variáveis no espectro secundário. Isso assume que o espectro primário foi obtido sem erros, podendo levar a sobreajustes.

O modelo DWPDS foi testado com diferentes conjuntos de janelas e o melhor modelo utilizou janelas de 7 variáveis para a condição primária e de 11 variáveis para a condição secundária. Esse modelo também reduziu a diferença espectral dos dados, que passou a ser 5,0%. Os erros de previsão também foram reduzidos, porém, menos que no modelo PDS, com faixa de erros entre -2,6 e 2,1% e RMSEP de 1,7%. Apesar disso, esta técnica foi considerada a mais adequada, pois ela utiliza uma janela do espectro primário para corrigir uma janela no espectro secundário, diminuindo o efeito de ruído na transferência, evitando sobreajustes. Os resíduos espectrais resultantes dessa transferência são da mesma ordem que das amostras na forma de pó, como mostrado na Figura 13.

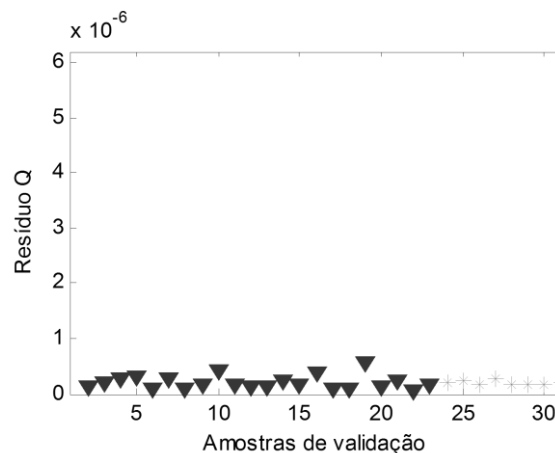


Figura 13 – Gráfico de resíduo espectral Q para abordagem 3 no modo DWPDS. (▼ – amostras na forma de pó; \* - amostras na forma de comprimido)

Na Tabela 4 são apresentados os resultados da avaliação das abordagens de previsão de comprimidos.

Tabela 4 – Análise de amostras de comprimido por diferentes abordagens

<b>Abordagem</b>	<b>RMSEP (%)</b>	<b>Faixa de Erros (%)</b>
<b>1ª</b>	2,0	-2,2 a 4,0
<b>2ª</b>	2,0	-2,7 a 3,8
<b>3ª DS</b>	1,6	-2,9 a 2,1
<b>3ª PDS</b>	1,1	-1,9 a 1,7
<b>3ª DWPDS</b>	1,7	-2,6 a 2,1

A análise da amostra T5 foi feita pelas 3 abordagens, sendo que para a transferência de calibração, a análise foi feita pelos modos de padronização direta PDS e DWPDS. O valor previsto, o erro de previsão e o resíduo espectral, usados na comparação, estão presentes na Tabela 5.

Tabela 5 – Análise da amostra T5

<b>Abordagem</b>	<b>Valor previsto / %</b>	<b>Erro / %</b>	<b>Resíduo Q / 10<sup>-7</sup></b>
<b>1ª</b>	101,8	1,8	21,8
<b>2ª</b>	102,3	2,3	6,3
<b>3ª PDS</b>	101,3	1,3	7,9
<b>3ª DWPDS</b>	101,8	1,8	2,8

Observando a tabela e os dados anteriores, concluiu-se que a terceira abordagem é a mais eficiente. Além disso, dentre os modos de padronização, o DWPDS modela melhor os espectros que o PDS, apesar de seu erro ter sido um pouco maior. Por isso, o modelo DWPDS foi utilizado para a previsão do teor de nevirapina nos comprimidos.

## 4.4. Validação

A validação analítica foi feita utilizando a o conjunto de validação contendo 31 amostras, sendo que as amostras de comprimido foram transferidas pelo modelo DWPDS. As figuras de mérito calculadas estão indicadas na Tabela 6 e o gráfico de valores de referência versus valores previstos é apresentado na Figura 14.

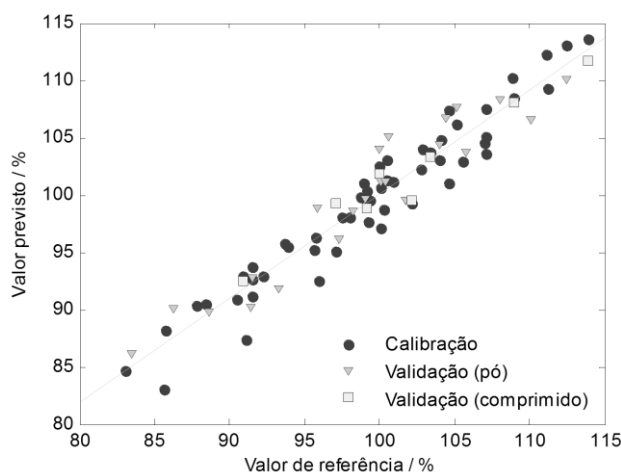


Figura 14 – Gráfico de valores de referência *versus* valores previstos

Tabela 6 – Figuras de mérito do método desenvolvido

Figuras de mérito	Parâmetro	Valores
<b>Faixa de trabalho</b>	---	83,0 a 113,9 %
<b>Veracidade</b>	Erros relativos (mín/máx)	-3,2 / 4,5 %
	RMSEC	1,9 %
	RMSEP	2,1 %
<b>Precisão</b>	Repetitividade (DPR)	2,2 / 2,0 / 3,0 % <sup>a</sup>
	Precisão intermediária (DPR)	2,1 / 2,8 / 4,3 % <sup>a</sup>
<b>Linearidade</b>	Durbin-Watson	2,26
	Inclinação	0,94 ± 0,03
	Intercepto	6 ± 3
	Coeficiente de correlação	0,97
<b>Seletividade</b>	---	21,50%
<b>Ruído (ε)</b>	Desvio padrão combinado	0,00099
<b>Sensibilidade</b>	---	0,0011 <sup>b</sup>
<b>Sensibilidade analítica (γ)</b>	---	1,1 % <sup>-1</sup>
<b>γ<sup>-1</sup></b>	---	0,9%
<b>Viés±SDV</b>	---	0,5±2,1 %
<b>RPD</b>	RPD calibração	3,1
	RPD validação	3,4

<sup>a</sup> valores para níveis baixo (91,52%), médio (100,00%) e alto (107,06%)

<sup>b</sup> unidade como razão de log(1/R) e %.

A faixa de trabalho do método foi planejada de 80 a 120% do teor alvo de nevirapina. Porém, devido ao planejamento experimental aleatório e à remoção de amostras anômalas, essa faixa foi reduzida para 83,0 a 113,9%. Essa faixa cobre a faixa de aceitação de comprimidos contendo nevirapina, que é de 90 a 110%. A faixa de trabalho da transferência de calibração, também planejada para 80 a 120%, foi reduzida, de 90,9 a 113,9%.

A legislação brasileira<sup>32</sup> não estabelece valores para aceitação de veracidade de um método, mas o RMSEP com valor de 2,1% foi considerado baixo. Na Figura 15 são mostrados os erros relativos das amostras de validação. Para valores de precisão, existe a recomendação que sejam medidos como DPR e não sejam maiores que 5%. Portanto, os valores de precisão estimados, apresentados na Tabela 6, foram condizentes com a legislação.

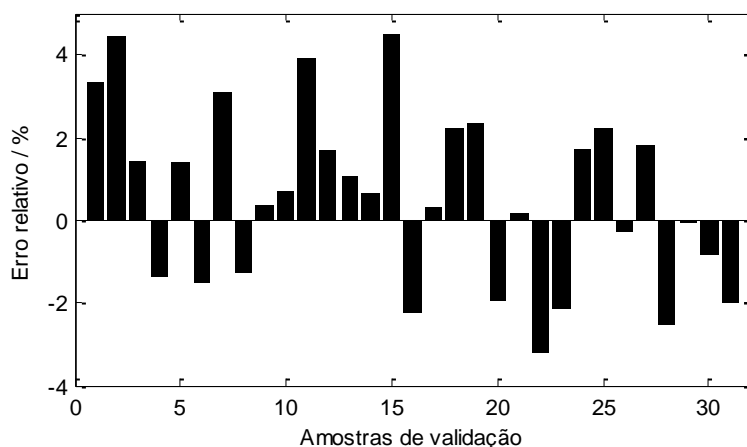


Figura 15 – Erros relativos das amostras de validação

A linearidade do método foi avaliada pelo coeficiente de correlação ( $r$ ) do ajuste entre os valores de referência e os valores previstos e por testes de aleatoriedade dos resíduos resultantes desse ajuste. O coeficiente de correlação obtido é 0,97, menor que o valor requerido pela legislação, 0,99.<sup>32</sup> Porém, essa exigência não é compatível com calibração multivariada, na qual a quantidade mínima de amostras é 24.<sup>37</sup> Além disso, esse critério foi removido de normas mais atuais, como o guia de validação do

INMETRO.<sup>55</sup> Portanto, não se considera inviável a utilização deste modelo devido à esse parâmetro. A linearidade das amostras em comprimido, após a transferência de calibração, apresentou  $r=0,98$ . Inicialmente, a verificação da aleatoriedade dos resíduos pôde ser feita por meio de inspeção visual, observando-se a Figura 16. Neste gráfico, dos resíduos em função dos valores previstos para teor de nevirapina, não se observa tendência sistemática. Os testes de Ryan-Joiner, Brown-Forsythe e Durbin-Watson permitiram concluir que, com 95% de confiança, os resíduos são normais, homoscedásticos e independentes, respectivamente. Portanto, pode-se afirmar que a regressão linear foi adequada e o método desenvolvido demonstrou linearidade.

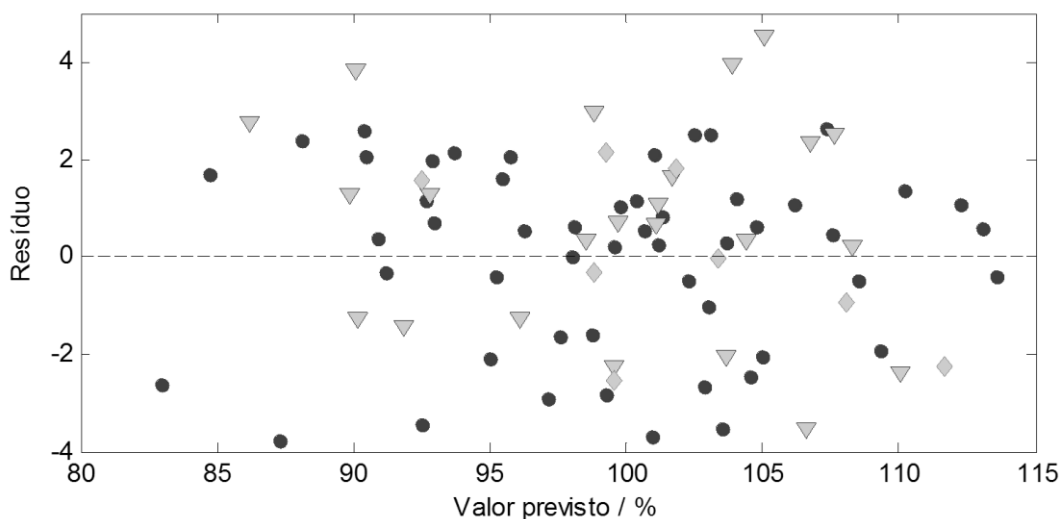


Figura 16 – Gráfico de resíduos em função dos valores previstos para teor de nevirapina  
Legenda: ●—calibração; ▼—validação (pó); ◆—validação (comprimido)

A seletividade média das amostras foi de 21,5%, ou seja, essa é a quantidade de informação espectral média usada para prever o teor de nevirapina. Reforça-se a necessidade de adequação da legislação aos métodos multivariados, pois a falta de seletividade não permite o uso desses métodos, segundo a legislação. A sensibilidade analítica ( $\gamma$ ), que pode ser usada para comparação de métodos, foi de 1,1% e a menor quantidade discernível pelo método ( $\gamma^{-1}$ ) foi de 0,9%. Esta estimativa corrobora a expressão dos resultados deste método com uma casa decimal.

O viés foi calculado usando as amostras de validação. Constatou-se que o método não apresentou tendência sistemática para um nível de confiança de 95%, por meio de um teste t de Student com 31 graus de liberdade ( $t_{\text{calc}}=1,33 < t_{\text{crit}}=2,04$ ). Os valores de RPD calculados para calibração e validação foram, respectivamente, 3,1 e 3,4. Esses valores são maiores que 2,4, um valor considerado desejável para boas equações de calibração.<sup>38</sup> Portanto, pode-se considerar que o modelo foi adequado à faixa de trabalho.



## 5. Conclusões

Um modelo para prever o teor de nevirapina em formulação farmacêutica foi desenvolvido. Este modelo apresentou bons parâmetros de validação e poderia ser aceito para uso segundo a regulamentação da ANVISA,<sup>32</sup> se for desconsiderada a exigência dos parâmetros de seletividade e do coeficiente de correlação, incompatíveis com a realidade de calibração multivariada.

O método NIR apresentou muitas vantagens em relação ao método oficial, cromatográfico<sup>4</sup>. Ele é não destrutivo, não gerando resíduos nem consumindo solventes, não há necessidade de preparar a amostra, é rápido e de baixo custo. Além disso, devido à versatilidade do uso de sonda para obter as medidas, pode-se aplicá-lo em monitoramento de produção em tempo real, como objetivado nas aplicações de PAT.

A transferência de calibração de misturas de pós para comprimido se mostrou efetiva e ampliou o uso do modelo validado, sem necessidade de recalibração. Essa transferência possibilita a redução de custos da calibração, pois a quantidade de matéria prima necessária para o preparo de amostras em pó (16 g) é 12,5 vezes menor que a necessária para o preparo de amostras em comprimido (200 g). Além disso, houve redução do tempo de preparo por não haver etapa de compressão, levando à redução do custo de mão de obra. Estende-se também à aplicação em PAT, pois um único método pode ser usado em mais de uma etapa da produção (pós – etapa intermediária – e comprimidos – etapa final).

Esse estudo, além de alcançar seu objetivo de transferência de calibração de mistura de pós para comprimidos em formulação farmacêutica, abre oportunidade para que sejam imaginadas outras propostas de transferência entre formas físicas diferentes, como entre frutas *in natura* e polpa de frutas,<sup>56</sup> ou entre madeira intacta e serragem.<sup>57</sup>

## 6. Referências bibliográficas

- 1 DE BLEYE, C.; CHAVEZ, P. F.; MANTANUS, J.; MARINI, R.; HUBERT, PH; ROZET, E.; ZIEMONS, E. Critical review of near-infrared spectroscopic methods validations in pharmaceutical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 125-132, 2012.
- 2 FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS (FUNED).  
<<http://funed.mg.gov.br/noticias/generico/>>. Acesso em: 17 Junho 2013.
- 3 JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS).  
**Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic: 2012**. Geneva, Suíça. 2012
- 4 U.S. PHARMACOPEIAL CONVENTION. **Nevirapine - Tablets**. U.S. Pharmacopeia - Medicines compendium 2013.
- 5 KAPOOR, N.; KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Simultaneous determination of lamivudine, stavudine and nevirapine in antiretroviral fixed dose combinations by high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 570, p. 41-45, 2006.
- 6 KAUL, N. ; AGRAWAL, H.; PARADKAR, A. R.; MAHADIK, K. R. HPTLC method for determination of nevirapine in pharmaceutical dosage form. **Talanta**, v. 62, p. 843-852, 2004.
- 7 SEKAR, R.; AZHAGUVEL, S. MEKC determination of antiretroviral reverse transcriptase inhibitors lamivudine, stavudine, and nevirapine in pharmaceutical formulations. **Chromatographia**, v. 67, p. 389-398, 2008.
- 8 ZANOLLI FILHO, L. A.; GALDEZ, C. R.; SILVA, C. A.; TAVARES, M. F. M.; COSTA, D. M.; AURORA-PRADO, M. S. Development and Validation of a Simple and Rapid Capillary Zone Electrophoresis Method for Determination of NNRTI Nevirapine in Pharmaceutical Formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 2005-2012, 2011.
- 9 BRERETON, R. G. **Applied Chemometrics for Scientists**. Chichester, Inglaterra: Wiley, 2007.
- 10 BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. **Química Nova**, v. 8, p. 84-99, 1985.
- 11 INTERNATIONAL CHEMOMETRICS SOCIETY (ICS).  
<<http://www.namics.nysaes.cornell.edu/>>. Acesso em: 17 Junho 2013.
- 12 NETO, B. D. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, p. 1401-1406, 2006.

- 13 HONORATO, F. A.; NETO, B. B.; MARTINS, M. N.; GALVAO, R. K. H.; PIMENTEL, M. F. Transferência de Calibração em Métodos Multivariados. **Quimica Nova**, v. 30, p. 1301-1312, 2007.
- 14 FEUDALE, R. N.; WOODY, N. A.; TAN, H.; MYLES, A. J.; BROWN, S. D.; FERRÉ, J. Transfer of multivariate calibration models: A review. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 64, p. 181-192, 2002.
- 15 FEARN, T. Standardisation and calibration transfer for near infrared instruments: a review. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 9, p. 229-244, 2001.
- 16 SHENK, J. S.; WESTERHAUS, M. O.; TEMPLETON, W. C. Calibration Transfer Between Near-Infrared Reflectance Spectrophotometers. **Crop Science**, v. 25, p. 159-161, 1985.
- 17 WANG, Y. D.; VELTKAMP, D. J.; KOWALSKI, B. R. Multivariate Instrument Standardization. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 2750-2756, 1991.
- 18 GREENSILL, C.V.; WOLFS, P.J.; SPIEGELMAN, C.H.; WALSH, K.B. Calibration transfer between PDA-based NIR spectrometers in the NIR assessment of melon soluble solids content. **Applied Spectroscopy**, v. 55, p. 647-653, 2001.
- 19 SOHN, M.; BARTON, F. E., II; HIMMELSBACH, D. S. Transfer of near-infrared calibration model for determining fiber content in flax: Effects of transfer samples and standardization procedure. **Applied Spectroscopy**, v. 61, p. 414-418, 2007.
- 20 EINGENVECTOR. Alternatives for Stable Model Design. <http://www.eigenvector.com/Docs/Alternatives%20for%20stable%20model%20design%20FACSS%2002.pdf>. Acesso em: 2 Julho 2013.
- 21 WANG, Y. D.; KOWALSKI, B. R. Temperature-Compensating Calibration Transfer For Near-Infrared Filter Instruments. **Analytical Chemistry**, v. 65, p. 1301-1303, 1993.
- 22 BARBOZA, F. D.; POPPI, R. J. Determination of alcohol content in beverages using short-wave near-infrared spectroscopy and temperature correction by transfer calibration procedures. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, p. 695-701, 2003.
- 23 BLANCO, M.; PEGUERO, A. Influence of physical factors on the accuracy of calibration models for NIR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 59-65, 2010.
- 24 BLANCO, M.; PEGUERO, A. A new and simple PLS calibration method for NIR spectroscopy. API determination in intact solid formulations. **Analytical Methods**, v. 4, p. 1507-1512, 2012.

- 25 VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, p. 1278-1287, 2009.
- 26 OLIVIERI, A. C.; FABER, N. K. M.; FERRE, J.; BOQUE, R.; KALIVAS, J. H.; MARK, H. Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration. **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, p. 633-661, 2006.
- 27 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.
- 28 VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8331-8338, 2007.
- 29 LORBER, A. Error Propagation And Figures Of Merit For Quantification By Solving Matrix Equations. **Analytical Chemistry**, v. 58, p. 1167-1172, 1986.
- 30 LORBER, A.; FABER, K.; KOWALSKI, B. R. Net analyte signal calculation in multivariate calibration. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 1620-1626, 1997.
- 31 FABER, N. M. Exact presentation of multivariate calibration model as univariate calibration graph. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 50, p. 107-114, 2000.
- 32 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RE Nº 899 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasil 2003.
- 33 INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Tripartite Guideline - Q2A Text on Validation of Analytical Procedures** 1995.
- 34 INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Tripartite Guideline - Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology** 1997.
- 35 DE SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.
- 36 BOTELHO, B. G.; MENDES, B. A. P.; SENA, M. M. Development and Analytical Validation of Robust Near-Infrared Multivariate Calibration Models for the Quality Inspection Control of Mozzarella Cheese. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 881-891, 2013.

- 37 **ASTM INTERNATIONAL. ASTM E1655-05 Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis** 2012.
- 38 WILLIAMS, P. C. Implementation of near-infrared technology. Em: **Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries**, p. 145-169, 2001.
- 39 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.
- 40 PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 198-219, 2003.
- 41 HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6a. Porto Alegre, Brasil: Bookman, 2009.
- 42 HERSCHEL, W. Experiments on the refrangibility of the invisible rays of the sun. **Philosophical Transaction of the Royal Society**, v. 90, p. 255-283, 1800.
- 43 WETZEL, D. L. Near-Infrared Reflectance Analysis - Sleeper Among Spectroscopic Techniques. **Analytical Chemistry**, v. 55, p. 1165A-1176A, 1983.
- 44 KUBELKA, P.; MUNK, F. Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche. **Zeitschrift für Technische Physik**, v. 12, p. 593-601, 1931.
- 45 MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico - AIDS e DST**. Brasília 2012.
- 46 NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Nevirapine - PubChem. <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=4463>>. Acesso em: 17 Junho 2013.
- 47 POLLARD, R. B.; ROBINSON, P.; DRANSFIELD, K. Safety profile of nevirapine, a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor for the treatment of human immunodeficiency virus infection. **Clinical Therapeutics**, v. 20, p. 1071-1092, 1998.
- 48 MURPHY, R. L.; MONTANER, J. Nevirapine: A review of its development, pharmacological profile and potential for clinical use. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 5, p. 1183-1199, 1996.
- 49 XIANG, D.; BERRY, J.; BUNTZ, S.; GARGIULO, P.; CHENEY, J.; JOSHI, Y.; WABUYELE, B.; WU, H.; HAMED, M.; HUSSAIN, A. S.; KHAN, M. A.. Robust Calibration Design in the Pharmaceutical Quantitative Measurements

- with Near-Infrared (NIR) Spectroscopy: Avoiding the Chemometric Pitfalls. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, p. 1155-1166, 2009.
- 50 RINNAN, A.; VAN DEN BERG, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 1201-1222, 2009.
- 51 COUNCIL OF EUROPE. **2.2.40 - Near-Infrared Spectrophotometry**. European Pharmacopoeia 5th Ed. Strasbourg, França 2004.
- 52 BOUVERESSE, E.; MASSART, D. L. Improvement of the piecewise direct standardisation procedure for the transfer of NIR spectra for multivariate calibration. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 32, p. 201-213, 1996.
- 53 SIANO, G. G.; GOICOCHEA, H. C. Representative subset selection and standardization techniques. A comparative study using NIR and a simulated fermentative process UV data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 88, p. 204-212, 2007.
- 54 BOIRET, M.; MEUNIER, L.; GINOT, Y.-M. Tablet potency of Tianeptine in coated tablets by near infrared spectroscopy: Model optimisation, calibration transfer and confidence intervals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 510-516, 2011.
- 55 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **DOQ-CGCRE-008-04 Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Brasil 2011.
- 56 BAG, S. K.; SRIVASTAV, P. P.; MISHRA, H. N. FT-NIR spectroscopy: a rapid method for estimation of moisture content in bael pulp. **British Food Journal**, v. 113, p. 494-504, 2011.
- 57 RAYMOND, C. A.; SCHIMLECK, L. R. Development of near infrared reflectance analysis calibrations for estimating genetic parameters for cellulose content in Eucalyptus globulus. **Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere**, v. 32, p. 170-176, 2002.