

João Manuel Martins Leitão

**TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS DE CALIBRAÇÃO ACOPLADAS A
METODOLOGIAS DE ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Farmácia da Universidade de
Coimbra para a obtenção do grau de
Doutor em Farmácia, na área de
Química Farmacêutica



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

2005

Trabalho desenvolvido sob orientação científica da Professora Doutora Felisbela dos Santos Costa e do Professor Doutor Joaquim Carlos Gomes Esteves da Silva, no Laboratório de Métodos Instrumentais de Análise da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e no Laboratório de Química Inorgânica e Quimiometria do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

À Olga

AGRADECIMENTOS

Nestes agradecimentos não podia deixar de começar por recordar a memória da Professora Doutora Felisbela dos Santos Costa e de reiterar a minha mais sentida homenagem a quem devo um exemplo de vida tanto profissional como pessoal.

Gostaria de agradecer ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto na pessoa do Professor Doutor Joaquim Carlos Gomes Esteves da Silva, meu orientador, pela disponibilidade demonstrada na minha aceitação e que permitiu a realização do trabalho experimental que levou à elaboração desta dissertação. Em particular, quero agradecer-lhe pelo espírito de abertura com que me acolheu no seu laboratório, pela orientação científica e pelos ensinamentos prestados durante a realização deste trabalho. Agradeço-lhe ainda as sugestões e a revisão crítica que muito contribuíram para a realização do presente texto.

Gostaria também de agradecer às pessoas que comigo vivem todos os dias no laboratório onde trabalho. Ao director do meu Laboratório o Professor Doutor Rui Gomes da Silva Barbosa pelo apoio que sempre me prestou. Aos meus colegas Ricardo, António Jorge e Paulo pelo companheirismo e pelas aulas que leccionaram enquanto me encontrava em dispensa de serviço docente. Ao Sr. Pedro e a D. Celeste pela disponibilidade que sempre demonstraram em tudo o que lhes foi solicitado.

Uma palavra de gratidão aos meus familiares pelo apoio permanente que desde sempre demonstraram em todos os momentos. Em particular, uma palavra de amizade para o meu sobrinho Nuno, que ao longo do tempo de realização deste trabalho se viu muitas vezes privado da minha companhia.

Ao Departamento do Ensino Superior do Ministério da Educação agradeço a bolsa que me foi concedida, no âmbito do PRODEP III medida 5.3, para a realização deste trabalho.

Por fim quero expressar um agradecimento sentido a minha companheira de todos os dias, por quem também realizei este trabalho, pela paciência e carinho que sempre demonstrou em todos os momentos.

ÍNDICE

GLOSSÁRIO	V
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Processo analítico	1
1.1.1. Dimensão dos dados em química analítica.....	3
1.1.2. Métodos de otimização.....	4
1.1.3. Métodos de calibração	5
1.2. Análise química farmacêutica	13
1.3. Antagonistas dos canais de cálcio	15
1.3.1. Nifedipina	16
1.3.2. Diltiazem	21
1.3.3. Verapamil	25
1.4. Espectrofotometria	31
1.4.1. Ultravioleta-visível	32
1.4.2. Fluorescência	35
1.5. Técnicas quimiométricas	39
1.5.1. Planeamento experimental.....	40
1.5.2. Métodos de calibração multivariada de segunda ordem.....	43
1.6. Objectivo	61
1.7. Organização da dissertação	62
1.8. Referências	63
2. EXPERIMENTAL	79
2.1. Materiais	79
2.1.1. Nifedipina	80
2.1.2. Diltiazem	81
2.1.3. Verapamil	82
2.2. Métodos analíticos.....	83
2.2.1. Instrumentação	84
2.2.2. Otimização.....	85
2.2.3. Quantificação.....	87
2.3. Referências	94

3. DETERMINAÇÃO POR HPLC.....	95
3.1. Fundamento.....	95
3.2. Procedimento experimental.....	97
3.3. Quantificação.....	99
3.3.1. Curvas de calibração padrão.....	99
3.3.2. Nifedipina.....	100
3.3.3. Diltiazem.....	102
3.3.4. Verapamil.....	105
3.4. Avaliação global.....	107
3.5. Referências.....	108
4. HIDRÓLISE ALCALINA DA NIFEDIPINA	109
4.1. Fundamento.....	109
4.2. Procedimento experimental.....	111
4.3. Optimização.....	113
4.3.1. Resultados.....	113
4.4. Quantificação.....	119
4.4.1. Análise directa.....	121
4.4.2. Análise multivariada.....	125
4.5. Referências.....	168
5. REDUÇÃO DE NIFEDIPINA E REACÇÃO COM OPA	169
5.1. Fundamento.....	169
5.2. Procedimento experimental.....	172
5.3. Optimização.....	174
5.3.1. Resultados.....	175
5.4. Quantificação.....	183
5.4.1. Análise directa.....	185
5.4.2. Análise multivariada.....	189
5.5. Referências.....	234
6. REACÇÃO DE DILTIAZEM COM HIDROXILAMINA	235
6.1. Fundamento.....	235
6.2. Procedimento experimental.....	238
6.3. Optimização.....	240
6.3.1. Resultados.....	241
6.4. Quantificação.....	256
6.4.1. Análise directa.....	258
6.4.2. Análise multivariada.....	262
6.5. Referências.....	306

7. ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA DO VERAPAMIL	307
7.1. Fundamento	307
7.2. Procedimento experimental	308
7.3. Optimização.....	309
7.3.1. Resultados.....	309
7.4. Quantificação.....	312
7.4.1. Análise directa	314
7.4.2. Análise multivariada.....	317
7.5. Referências	361
8. REACÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS COM ANIDRIDO ACÉTICO	363
8.1. Fundamento	363
8.2. Procedimento experimental	365
8.3. Optimização.....	367
8.3.1. Resultados.....	367
8.4. Quantificação.....	376
8.4.1. Análise directa	380
8.4.2. Análise multivariada.....	394
8.5. Referências	475
9. CONCLUSÃO.....	477



GLOSSÁRIO

Abreviaturas

AES	Espectroscopia de emissão atómica
AjMM	Percentagem de ajuste do modelo média
ALS	Mínimos quadrados alternados
ANNs	Redes de neurónios artificiais
ANOVA	Análise de variância
ASV	Voltametria de redissolução anódica
BLLS	Mínimos quadrados bilineares
c.d.o.	Comprimento de onda em nanómetros
CCD	“Charged coupled Device”
CCF-DAD	Sistema de fluxo contínuo com detecção por fila de díodos
CE	Electroforese capilar
Center	Teste de significância da curvatura das respostas
CE-UV	Electroforese capilar com detecção de ultravioleta
CG	Cromatografia de gás
CKVR	“Constrained Key Variable Regression”
CLS	Mínimos quadrados clássicos
CORCONDIA	Teste de consistência do núcleo
CR	Regressão contínua
DCP-AES	Espectroscopia de emissão atómica de plasma ligado directamente
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTLD	Decomposição trilinear directa (Direct Trilinear Decomposition)
EC-DC	Electroforese capilar com detecção por condutimetria
EFA	Análise de factores emergentes
EP	Erro de previsão
EPM	Erro de previsão médio
EPT	Erro de previsão total
FIA	Análise de injeção em fluxo
FIA-Cromatografia-DAD	Análise de injeção em fluxo com separação cromatográfica com detecção de fila de díodos
FIA-MS-MS	Análise de injeção em fluxo com detecção de espectrometria de massa acoplada a espectrometria de massa
FIA-VD	Análise de injeção em fluxo com detecção por voltametria
FSW-EFA	“Fixed Size Moving Window - Evolving Factor Analysis”
GA	Algoritmo genético
GC-ECD	Cromatografia de gás com detecção de captura de electrões
GC-FID	Cromatografia de gás com detecção de ionização de chama
GC-FTIR	Cromatografia de gás com detecção espectroscopia de infra vermelho com transformada de Fourier
GC-GC	Cromatografia de gás acoplada a cromatografia de gás
GC-GC/TOFMS	Cromatografia de gás acoplada a cromatografia de gás com detecção de espectrometria de massa de tempo de voo
GC-MS	Cromatografia de gás com detecção de espectrometria de massa
GRAM	Método generalizado de aniquilação de ordem (Generalised Rank Annihilation Method)

GSAM	Método de adição de padrão generalizado
HELP	“Heuristic Evolving Latent Projections”
HOIE	Teste de significância dos efeitos de ordem superior
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta resolução com detecção de fila de díodos
HPLC-DE	Cromatografia líquida de alta resolução com detecção electroquímica
HPLC-FL	Cromatografia líquida de alta resolução com detecção de fluorescência
HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta resolução com detecção de espectrometria de massa
HPLC-MS-MS	Cromatografia líquida de alta resolução com detecção de espectrometria de massa acoplada a espectrometria de massa
HPLC-UV	Cromatografia líquida de alta resolução com detecção de ultravioleta-visível
HPTLC-UV	Cromatografia de camada fina de alta resolução com detecção de ultravioleta
ICR-MS	Espectrometria de massa de ressonância de íões com movimento cíclico em um plano “ciclométrico” (Ion cyclotron resonance mass spectrometry)
ILS	Mínimos quadrados inverso
IV	Infravermelho
LC-UV	Cromatografia líquida com detecção de ultravioleta-visível
LDM	Limite de Detecção Médio
LOF	Perda de ajuste (lack of fit)
LWR	Regressão ponderada na vizinhança
MCR-ALS	Resolução multivariada de curvas – mínimos quadrados alternados (Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares)
MEE	Matrizes de Excitação-Emissão
MLR	Regressão linear múltipla
MS	Espectrometria de massa
MS/MS	Espectrometria de massa acoplada a espectrometria de massa
NBRA	Método de aniquilação de ordem não bilinear
NIR	Espectrofotometria de infravermelho próximo
NIR-FT-Raman	Espectroscopia de Raman com transformadas de Fourier no infravermelho próximo
N-PLS	Mínimos quadrados parciais multilinear
OPA	o-ftaldialdeído em todo o texto e “Orthogonal Projection Approach” em análise química por MCR-ALS
PARAFAC	Análise de factores paralelos (Parallel Factor Analysis)
PARAFAC2	Análise de factores paralelos 2 (Parallel Factor Analysis 2)
PARATUCK2	Modelo baseado no modelo PARAFAC com propriedade similares ao modelo TUCKER2
PCA	Análise de componentes principais
PCR non-linear	Regressão de componentes principais não linear
PCR	Regressão de componentes principais
PLS non-linear	Mínimos quadrados parciais não linear
PLS1 e PLS2	Mínimos quadrados parciais 1 e 2
PSVST	Velocidade de pico sistólico numa estenose
RAFA	Análise de factores de aniquilação de ordem
RBL	Bilinearização residual
RMN	Ressonância magnética e nuclear
RMSEP	Raiz quadrada da média dos erros de previsão
SIA-DAD	Análise de injeção sequencial com detecção por fila de díodos
SIMPLISMA	Modelação branda iterativa de análise de misturas (Simple to use interactive self-modelling mixture analysis)
SOSAM	Método de adição de padrão de segunda ordem
SVD	Decomposição de valor singular
SW-ASV	Voltametria de redissolução anódica de onda quadrada
TUCKER	Modelos Tucker
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
Vis	Visível
VSO	Vantagem de segunda ordem
WFA	“Window Factor Analysis”

Notação geral

ε	Absortividade molar
Δ	Diferença
$\Delta_{AjMS-AjMT}$	Diferença entre o ajuste do modelo da matriz segmentada e o modelo da matriz total obtidos por validação cruzada
$\Delta_{LOFMCR (PCA - Exp.)}$	Diferença de perda de ajuste entre perda de ajuste do modelo MCR-ALS relativamente a análise de componentes principais e perda de ajuste do modelo MCR-ALS relativamente ao experimental
a	Ordenada na origem
AjMS	Percentagem de ajuste do modelo segmentado obtido por validação cruzada
AjMT	Percentagem de ajuste do modelo total obtido por validação cruzada
b	Declive
$C_{esperada}$	Concentração esperada
$C_{estimada}$	Concentração estimada
$DOS_{esperada}$	Dosagem esperada
$DOS_{estimada\ HPLC}$	Dosagem estimada por HPLC
$DOS_{estimada}$	Dosagem estimada
LD	Limite de detecção dado por $3S_{y/x}/b$
$LOF_{MCR\ vs\ Exp}$	Perda de ajuste do modelo MCR-ALS relativamente ao experimental
$LOF_{MCR\ vs.\ PCA}$	Perda de ajuste do modelo MCR-ALS relativamente a análise de componentes principais.
m	Número de pontos experimentais utilizados no ajuste por regressão linear
R	Coefficiente de correlação linear do ajuste de regressão linear
$R_{Emissão}$	Coefficiente de correlação linear do espectro de emissão do componente principal estimado com o experimental
$R_{Espectro}$	Coefficiente de correlação linear do espectro de absorvância do componente principal estimado com o experimental
$R_{Excitação}$	Coefficiente de correlação linear do espectro de excitação do componente principal estimado com o experimental
$R_{múltipla}$	Coefficiente de correlação linear múltipla
RSD	Desvio padrão relativo
$R_{t_{reacção}}$	Coefficiente de correlação linear do perfil de tempo de reacção do componente principal estimado com o experimental
$SSQ_{resíduos}$	Soma dos quadrados dos resíduos
$S_{y/x}$	Desvio padrão dos residuais
$t_{exposição}$	Tempo de exposição
$t_{integração}$	Tempo de integração
$T_{reacção}$	Temperatura de reacção
$t_{reacção}$	Tempo de reacção

Notação matricial

\odot	Produto de Khatri-Rao
x	Escalar
\mathbf{X}	Matriz
$\underline{\mathbf{X}}$	Matriz tridimensional
\mathbf{x}	Vector
\mathbf{x}^T	Vector transposto



RESUMO

Nesta dissertação foram desenvolvidas com sucesso seis metodologias de quantificação dos antihipertensores Nifedipina, Diltiazem e Verapamil em formulações farmacêuticas. Estas metodologias são constituídas por três partes: (i) uma componente experimental que na maioria das metodologias é caracterizada por uma reacção de derivatização de desenvolvimento de cor ou de fluorescência; (ii) uma componente instrumental caracterizada por uma técnica espectrofotométrica de ultravioleta-visível (UV-Vis) ou fluorescência molecular; e (iii) uma componente quimiométrica de calibração multivariada pelos modelos PARAFAC (“parallel factor analysis”), PARAFAC2 e MCR-ALS (“multivariate curve resolution - alternating least squares”). A optimização destas metodologias foi efectuada segundo estratégias de planeamento experimental adequadas a cada uma delas.

Foram estudadas vinte e duas amostras de formulações farmacêuticas disponíveis comercialmente. Estas amostras foram analisadas por um método cromatográfico de referência da Farmacopeia Americana.

Foram estudadas oito formulações farmacêuticas contendo o antihipertensor Nifedipina usando duas metodologias [entre parênteses apresentam-se respectivamente, o erro de previsão total (EPT) e o limite de detecção médio (LDM) para as oito amostras]: (i) medição dos espectros de UV-Vis dos produtos da reacção de hidrólise alcalina da Nifedipina e sua modelação por MCR-ALS de dois a cinco componentes com restrições de não negatividade ou não negatividade e trilinearidade no componente principal (EPT – 6.695 % e LDM – 0.963); (ii) medição das matrizes de excitação-emissão (MEE) de fluorescência dos produtos da redução da Nifedipina e reacção com o-ftaldialdeído (OPA) e modelação das MEE por PARAFAC2 de dois a cinco componentes com restrição de não negatividade (EPT – 5.071 % e LDM – 0.358).

Foram estudadas nove formulações farmacêuticas contendo o antihipertensor Diltiazem usando duas metodologias [entre parênteses apresentam-se respectivamente, o EPT e o

LDM para as oito amostras]: (i) medição dos espectros de UV-Vis dos produtos da reacção da reacção do Diltiazem com Hidroxilamina e sua modelação por PARAFAC2 de dois a cinco componentes com restrição de não negatividade (EPT – 1.542 % e LDM – 32.318 ppm); (ii) medição das MEE de fluorescência do produto da condensação do ácido cítrico com o anidrido acético por catálise do Diltiazem e modelação das MEE por PARAFAC2 de três a quatro componentes com restrição de não negatividade (EPT – 2.269 % e LDM – 0.095).

Foram estudadas cinco formulações farmacêuticas contendo o antihipertensor Verapamil usando duas metodologias [entre parênteses apresentam-se respectivamente, o erro de previsão total EPT e o LDM para as cinco amostras]: (i) medição das MEE de fluorescência do Verapamil e sua modelação por PARAFAC de cinco a seis componentes com restrições de não negatividade ou não negatividade e unimodalidade (EPT – 1.113 % e LDM – 0.626); (ii) medição das MEE de fluorescência do produto da condensação do ácido malónico com o anidrido acético por catálise do Verapamil e modelação das MEE por MCR-ALS de três a seis componentes com restrições de não negatividade, não negatividade e trilinearidade ou não negatividade e unimodalidade (EPT – 0.995 e LDM – 0.128).

ABSTRACT

This dissertation focuses on the development of six new methodologies for the quantification in pharmaceutical formulations of the antihypertensors Nifedipine, Diltiazem and Verapamil. These methodologies are constituted by three parts: (i) the experimental part that is characterised, in most of the applications, by a derivatization reaction originating a UV-Vis or fluorescent species; (ii) the instrumental part that correspond to the analytical technique used in the method; and (iii) the chemometric method of PARAFAC (“parallel factor analysis”), PARAFAC2 and MCR-ALS (“multivariate curve resolution - alternating least squares”) use in the multivariate calibration. The overall optimisation of these methodologies was done by experimental design strategies.

Twenty-two samples of pharmaceutical formulation available in pharmacies were studied. These samples were analysed by a chromatographic standard method as recommended by the US Pharmacopoeia.

Eight pharmaceutical formulations of Nifedipine were analysed by two methodologies [under parenthesis the total estimated error (EPT) and the average detection limit (LDM)]: (i) acquisition of UV-Vis spectra of the alkaline hydrolysis reaction products followed by MCR-ALS modelation using two to five components and non negativity or non negativity and trilinearity constrains in the main principal component (EPT – 6.695 % e LDM – 0.963); (ii) acquisition of excitation-emission matrices (MEE) of fluorescence of the production of the reduction of Nifedipine followed by o-phthaldeyde (OPA) reaction and PARAFAC2 modelation using from two to five components with non negativity constrains (EPT – 5.071 % e LDM – 0.358).

Nine pharmaceutical formulations of Diltiazem were analysed by two methodologies [under parenthesis the total estimated error (EPT) and the average detection limit (LDM)]: (i) acquisition of UV-Vis spectra of the reaction products of Diltiazem and hydroxylamine followed by PARAFAC2 modelation using two to five components and non negativity

constrains (EPT – 1.542 % e LDM – 32.318 ppm); (ii) acquisition of MEE of fluorescence of the citric acid and acetic anhydride reaction catalysed by Diltiazem and PARAFAC2 modelation using from three to four components with non negativity constrains (EPT – 2.269 % e LDM – 0.095).

Five pharmaceutical formulations of Verapamil were analysed by two methodologies [under parenthesis the total estimated error (EPT) and the average detection limit (LDM)]: (i) acquisition of MEE of fluorescence of Verapamil followed by PARAFAC modelation using five or six components and non negativity or non negativity and unimodality constrains (EPT – 1.113 % e LDM – 0.626); (ii) acquisition of MEE of fluorescence of the malonic acid and acetic anhydride reaction catalysed by Verapamil and MCR-ALS modelation using from three to six components with non negativity constrains, non negativity and trilinearity constraints or non negativity and unimodality constraints (EPT – 0.995 e LDM – 0.128).

1. INTRODUÇÃO

1.1. Processo analítico

O processo analítico inicia-se com a formulação do problema analítico e termina quando a informação requerida é obtida. No seu todo qualquer processo analítico é sempre constituído por uma série de fases ligadas por procedimentos operacionais. Cada uma destas fases, e respectivos procedimentos operacionais, está sujeita a um erro [1].

Na Fig. 1.1 estão representadas as diferentes fases do processo analítico e respectivos procedimentos operacionais.

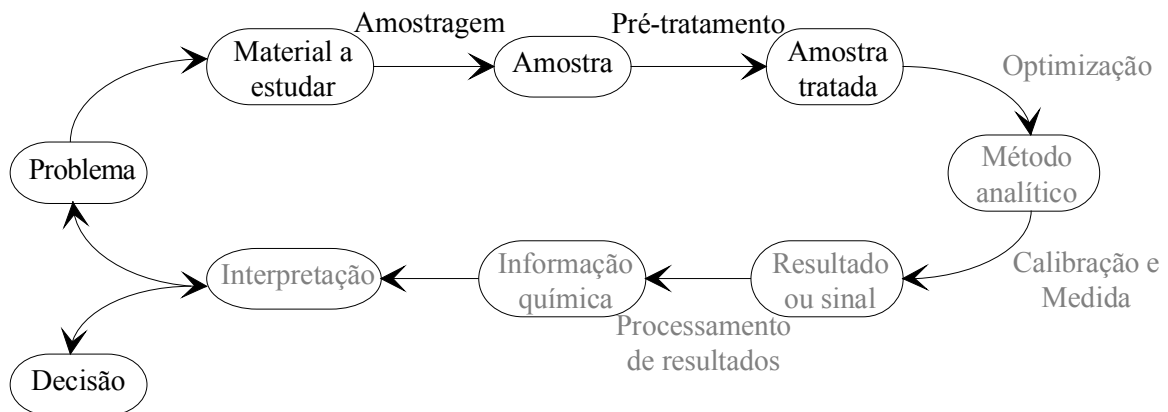


Fig. 1.1 – Fases e procedimentos operacionais do processo analítico.

Para produzir resultados analíticos de qualidade têm que se compreender e controlar todos os passos da sequência analítica. A planificação correcta de todo o processo é importante no sentido de garantir a execução correcta de todas as fases e a obtenção de

resultados de qualidade. Os procedimentos de amostragem, tratamento da amostra para armazenamento, armazenamento da amostra, sub-amostragem, tratamento da amostra para análise, escolha do método analítico, calibração do instrumento de medida e avaliação dos resultados analíticos devem todos ser sujeitos a controlo no sentido de garantir a qualidade dos resultados.

De uma forma genérica o processo analítico é constituído essencialmente por duas fases principais [1]:

- (i) uma primeira fase em que através de tratamentos químicos ou físicos, mais ou menos complexos, a amostra é preparada de forma a que a quantidade física obtida seja inequivocamente relacionada com a quantidade química a ser medida;
- (ii) uma segunda fase é o procedimento de medida propriamente dito com tudo o que isso envolve.

Na primeira fase é necessária a execução correcta de todos os procedimentos de tratamento da amostra e uma diminuição da quantidade de operações necessárias a esse tratamento de modo a reduzir a possibilidade de erro. Na segunda fase, para um procedimento de medida correcto, a escolha da técnica analítica adequada, métodos analíticos correctamente desenvolvidos e otimizados, procedimentos de calibração adequados e uma avaliação correcta dos resultados analíticos obtidos são essenciais para alcançar esse objectivo.

O âmbito desta dissertação enquadra-se sobretudo na segunda fase do processo analítico. O trabalho desenvolvido engloba essencialmente as fases e procedimentos operacionais representados na Fig. 1.1 a cinzento claro. A escolha da técnica analítica é feita atendendo ao tipo de amostra, provável concentração do analito em análise e quantidade de material normalmente requerida para o estudo. O procedimento de optimização é essencial para a obtenção de resultados analíticos de qualidade em qualquer das fases do processo analítico, mas essencialmente no desenvolvimento do método analítico para que a maior sensibilidade na determinação seja conseguida. O procedimento de calibração deve ser adequado ao tipo de amostra e de dados obtidos.

1.1.1. Dimensão dos dados em química analítica

A ordem dos instrumentos analíticos e da calibração em química é igual à dimensão dos dados produzidos para cada amostra. Ordem zero quando um único resultado (escalar) é produzido por amostra, primeira ordem quando um vector de resultados é produzido por amostra e segunda ordem quando uma matriz de resultados é produzida por amostra. Dados de terceira ordem são simplesmente constituídos por um conjunto de dados de segunda ordem ou seja, de matrizes bidimensionais [2].

Considerando y como um escalar correspondente ao sinal analítico instrumental, são representados esquematicamente na Fig. 1.2 os dados de ordem zero, primeira, segunda e terceira ordem produzidos por amostra em química analítica.

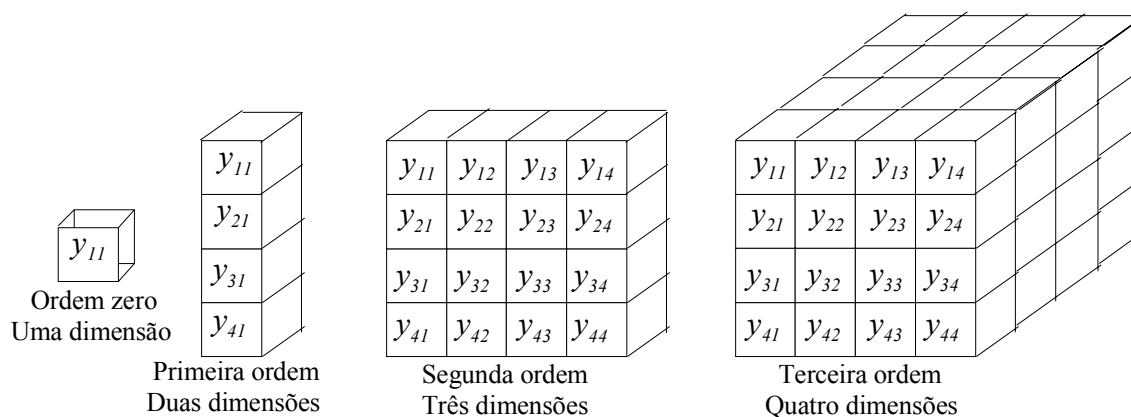


Fig. 1.2 – Dados obtidos em química analítica.

Exemplos de instrumentação de ordem zero são os potenciômetros (ex. leitura de pH), fotômetros de filtro e espectrofotômetros de UV-Vis com leitura a um comprimento de onda (c.d.o.). Exemplos de instrumentos de primeira ordem são os espectrofotômetros de uma forma generalizada (UV-Vis com registo de espectros ou com detector de fila de díodos, fluorímetros com registo de espectros de excitação ou de emissão, IV, RMN, difracção de raio X, etc.), cromatografia líquida ou gasosa e estruturas de sensores de ordem zero. Instrumentações de segunda ordem são todas as técnicas hífenadas como GC-MS, LC-UV, GC-FTIR, MS/MS, RMN bidimensional e ainda difracção de raio X, fluorímetros (obtenção de MEE), sensores de fluxo e sensores em espectroscopia baseados na cinética de reacções. Exemplos de instrumentação de ordem superior são técnicas de

decaimento de fluorescência com a obtenção de MEE em função do tempo e técnicas de ICR-MS que permitem gerar dados de terceira ordem ou ordem superior.

Em instrumentação de ordem zero não há forma de detectar erros de interferentes. Em instrumentação de primeira ordem é possível detectar esses erros mas não corrigi-los. Só em instrumentação de segunda ordem é possível a sua detecção, assim como de alguns tipos de desvios, podendo ser eliminados matematicamente. A possibilidade de quantificação na presença de interferentes desconhecidos é a grande vantagem da utilização de instrumentos e dados de segunda ordem, e ordem superior. Esta vantagem é chamada de vantagem de segunda ordem (VSO) [2].

1.1.2. Métodos de otimização

De forma a obter dados analíticos de qualidade, todas as fases e respectivos procedimentos de um processo analítico devem ser executados da melhor forma possível. Para que esta exigência seja satisfeita todas as variáveis que tenham influência na qualidade dos resultados obtidos num processo analítico devem ser optimizadas. A maneira como essas variáveis influenciam o processo analítico é muitas vezes desconhecida, ou parcialmente desconhecida, e interações entre esses efeitos podem existir o que ainda complica mais o processo de optimização.

Métodos de optimização são, como já referido anteriormente, essenciais no desenvolvimento do método analítico. O método analítico deve ser desenvolvido com o objectivo de obter uma maior sensibilidade na determinação. Outros requerimentos, que poderão também ser satisfeitos na optimização do método analítico, são uma maior precisão (menor variação dos resultados), maior rapidez e um menor consumo de reagentes.

Atendendo ao objectivo pretendido são passíveis de utilização procedimentos de optimização univariados ou multivariados. Os procedimentos de optimização univariados, alterando uma variável de cada vez, poderão levar a uma optimização incompleta. Assim, deverão ser utilizados procedimentos de optimização multivariados, variando sequencialmente ou simultaneamente todas as variáveis. Com estes procedimentos estatísticos de optimização, para além da optimização individual das variáveis é possível detectar e avaliar interações entre elas.

Técnicas adequadas de optimização multivariada de aplicação em situações diversas são:

- Optimização por simplex.
- Algoritmos genéticos (GA).
- Planeamento experimental.

Métodos simplex de optimização são métodos sequenciais e métodos de optimização de planeamento experimental são métodos simultâneos. Técnicas de optimização baseadas em GA são técnicas simultâneas de aplicação em casos quando um grande número de variáveis é estudado e um modelo óptimo não é encontrado e assim vários sub-óptimos devem ser procurados.

Os métodos de optimização simultâneos descrevem melhor a região a volta do óptimo e assim são mais eficientes a descrever os efeitos das variáveis enquanto os métodos sequenciais são mais eficientes em encontrar um óptimo. No entanto, um óptimo exacto só pode ser determinado pelas metodologias de planeamento experimental [3].

1.1.3. Métodos de calibração

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

Os métodos de calibração são definidos como os processos matemáticos ou estatísticos de extracção de informação, usualmente concentração do analito, a partir do sinal instrumental [2]. O aumento da capacidade resultante dos avanços instrumentais e computacionais levou a um grande desenvolvimento dos métodos de calibração.

Tal como para a instrumentação analítica, os métodos de calibração podem também ser classificados a partir do tipo de dados que são obtidos. De acordo com a ordem dos dados

recolhidos por amostra os métodos de calibração são classificados em métodos de calibração univariada ou de ordem zero e métodos de calibração multivariada em que estes podem ser de primeira ordem, de segunda ordem ou de ordem superior. Além desta classificação os métodos de calibração podem ainda ser classificados como métodos lineares ou não lineares, métodos de selecção ou totais, métodos directos ou indirectos e métodos clássicos ou inversos [4].

Seguidamente serão apresentados os diferentes métodos de calibração univariada e multivariada, de primeira e segunda ordem, bem como as vantagens e desvantagens de cada um dos tipos de calibração.

Métodos de calibração univariada

Na calibração univariada ou de ordem zero a resposta instrumental do analito r é função da concentração c :

$$r = f(c) + e \quad (1.1)$$

A função $f(c)$ que relaciona a concentração do analito com a resposta instrumental segue um modelo de calibração teórico de acordo com o princípio científico da técnica instrumental de análise. Para a obtenção de resultados exactos, além da assumption de uma resposta conhecida, a resposta do analito de interesse deve ser selectiva.

O método de calibração univariada é normalmente linear. A resposta r é adequadamente modelada por um polinómio de primeiro grau em que b é o coeficiente de regressão e e , ordenada na origem, está relacionado com os erros associados com a resposta:

$$r = bc + e \quad (1.2)$$

No caso mais simples, em que a função é linear só no que respeita a c e em que a resposta do analito é selectiva, a calibração é possível unicamente com um padrão de calibração de concentração conhecida. Normalmente são utilizados vários padrões para construir o modelo de calibração e obter uma média da estimativa do coeficiente de regressão b menos afectado por erros instrumentais fortuitos. O coeficiente de regressão é habitualmente calculado pelo método de regressão dos mínimos quadrados de forma a minimizar o termo e na equação (1.2).

Quando a função é não linear pode transformar-se a função linearizando-a, procurar-se modelos locais lineares (gama linear) ou ainda, se nenhuma das hipóteses anteriores for viável, pode ajustar-se uma função não linear [5].

Um caso particular de sinais não lineares é provocado pelo efeito de matriz em que este efeito só afecta a sensibilidade da resposta instrumental do analito de interesse. Assim em (1.3) c_a é a concentração do analito e $c_1...c_n$ são as concentrações de todas as espécies presentes excepto o analito:

$$r = f(c_a)f^*(c_1...c_n) + e \quad (1.3)$$

O método de calibração recomendado na presença de efeitos de matriz é o método de adição de padrão. Neste, adições do analito de concentração elevada são feitas à amostra em análises repetidas. No método de calibração de adição de padrão assume-se que a função é linear, que $f(0) = 0$ e que o valor de $f^*(c_1...c_n)$ é constante para todas as adições de padrão.

Na calibração univariada, tal como na instrumentação de ordem zero, e baseados só nos dados instrumentais não há forma de detectar erros devido as interferências. Quando interferências estão presentes na amostra a equação (1.1) já não é válida e o sinal já não depende só do analito de interesse. As interferências podem estar relacionadas com o ambiente de medida ou com espécies interferentes. Para uma calibração adequada o sinal relativamente a essas interferências deve ser constante, linear e deve ser integrado no modelo de calibração. De uma forma geral o sinal resultante do instrumento e do solvente é constante enquanto o sinal referente a outras espécies presentes na amostra não é constante [2].

A variação da concentração das interferências presentes nos diferentes padrões aliado a impossibilidade de distinguir o sinal analítico do sinal interferente não torna possível construir um modelo de calibração válido. Ainda, se as interferências estão presentes na amostra de concentração desconhecida e não nos padrões a estimativa da concentração do analito é inexacta.

Exemplos de métodos de calibração univariada são [6]:

- Calibração de padrão externo.
- Calibração de padrão interno.
- Método de adição de padrão.
- Factor de calibração.

Métodos de calibração multivariada

A calibração multivariada utiliza muitas respostas instrumentais por amostra para determinar a concentração do analito de interesse. Tal como já referido, a calibração multivariada pode ser de primeira ordem, de segunda ordem e ordem superior. Em dados de primeira ordem e de ordem superior pode-se estar na presença de dados que podem ser modelados por funções lineares. No entanto, em qualquer das dimensões dos dados de primeira ordem ou ordem superior também se pode estar na presença de dados que podem ser modelados por funções lineares unicamente em algumas das suas dimensões ou por funções não lineares em todas as suas dimensões [5].

Ao contrário dos métodos de calibração univariada, em que um modelo teórico explícito é aplicado aos dados experimentais, nos métodos de calibração multivariada são implicitamente impostos métodos de modelação. Devido ao facto de estes métodos incorporarem outro tipo de variância nos dados, não necessariamente unicamente relacionada com a propriedade de interesse, estes modelos devem ser avaliados de uma forma qualitativa e quantitativa. Também, na calibração univariada, o sinal obtido é o utilizado na calibração enquanto na calibração multivariada o sinal analítico utilizado na calibração é dado por uma “média” do sinal obtido em todos os sensores.

Os objectivos principais da calibração multivariada passam pela previsão da concentração do analito de interesse com a mínima variância e pela eliminação total ou parcial do tratamento da amostra. Vantagens consideráveis na utilização de métodos de calibração multivariada residem na redução do ruído, determinação na presença de interferentes, informação acerca do modelo e controlo de valores aberrantes [4,7,8].

Num método de calibração de primeira ordem, a resposta instrumental do analito, dada pelo transposto do vector de respostas \mathbf{r}^T , é função da concentração $c_1..c_n$ de todas as espécies presentes e em que q é a resposta da linha de base:

$$\mathbf{r}^T = f_1(c_1..c_n) + q_1 + f_j(c_1..c_n) + q_j + \mathbf{e}^T \quad (1.4)$$

Para valores de $f_1(\dots)$ à $f_j(\dots)$ diferentes a equação (1.4) pode ser representada por:

$$\mathbf{r}^T = \mathbf{f}(c_1..c_n) + \mathbf{q} + \mathbf{e}^T \quad (1.5)$$

Uma matriz de respostas instrumentais de primeira ordem para um determinado número de amostras é dada por \mathbf{R} (amostras \times varáveis) e pode ser expressa pela seguinte equação:

$$\mathbf{R} = [\mathbf{r}_1 | \dots | \mathbf{r}_I]^T + \mathbf{Q} + \mathbf{E} \quad (1.6)$$

Em que \mathbf{r} são as respostas de primeira ordem de I amostras. Numa matriz de calibração a sua decomposição em vectores base é única somente se os vectores base forem restringidos a serem ortogonais.

Os métodos de calibração de primeira ordem mais simples são aqueles em que a resposta do instrumento é bilinear (isto é quando a resposta do detector responde de uma forma linear para todas as espécies presentes e também quando os sinais referentes às diferentes espécies são aditivos). Sinais não lineares não podem ser expressos pela forma bilinear dos modelos de calibração de primeira ordem e novos modelos de calibração não lineares têm sido desenvolvidos para tipos diferentes de dados não bilineares [2].

A linha de base pode ser tratada matematicamente. Pode ser eliminada quando constante para todas as amostras centrando os dados na origem ou se variável de amostra para amostra derivando os dados. Pode ainda ser incorporada no modelo da calibração tratando-a como uma espécie interferente.

Tal como nos métodos de calibração de ordem zero o método generalizado de adição de padrão é utilizado na presença do efeito de matriz. Neste método, a adição de padrão é feita adicionando à amostra o analito de interesse e todas as outras substâncias que contribuem para a resposta instrumental. O método generalizado de adição de padrão assume que a função é linear no que respeita ao analito de interesse, constante no que diz respeito as adições de padrão e que para uma concentração de analito nula a função é zero em todo o vector de coeficientes de regressão.

Métodos de calibração de primeira ordem assumem que a resposta é conhecida e linear e que as respostas do analito e de possíveis interferentes são diferentes e independentes.

Devido ao vector de regressão do analito dever ser ortogonal à resposta de todas as interferências os métodos de calibração de primeira ordem têm uma limitação: todas as respostas referentes a todas as espécies presentes na amostra devem ser incluídas no modelo de calibração. Tal como em instrumentação de primeira ordem nos métodos de calibração de primeira ordem é possível detectar os erros devido as interferências mas não é possível corrigi-los [2].

Exemplos de modelos de calibração de primeira ordem são [4,5]:

- Mínimos quadrados clássicos (CLS).
- Mínimos quadrados inverso (ILS).
- Regressão de componentes principais (PCR).
- Mínimos quadrados parciais (PLS1 e PLS2).
- Regressão linear múltipla (MLR).
- Método de adição de padrão generalizado (GSAM).
- Redes de neurónios artificiais (ANNs).
- Algoritmo genético (GA).
- Regressão de componentes principais não linear (PCR non-linear).
- Mínimos quadrados parciais não linear (PLS non-linear).
- Regressão ponderada na vizinhança (LWR).
- Regressão contínua (CR).

Num método de calibração de segunda ordem, a resposta instrumental do analito é dada por uma matriz de respostas. A resposta instrumental do analito, dada pela matriz de respostas \mathbf{R}_{ij} , é função da concentração $c_1..c_n$ de todas as espécies presentes e em que $g_j()$ é a função da resposta do detector e $f_{ci}()$ é a função de resposta instrumental de cada uma das espécies na linha i de \mathbf{R}_{ij} :

$$\mathbf{R}_{ij} = g_j \left(f_{c_i}(c_1..c_n) + \dots + f_{c_n}(c_1..c_n) \right) + \mathbf{E}_{ij} \quad (1.7)$$

Nos métodos de calibração de segunda ordem a calibração e a previsão são efectuadas num só passo ao contrário dos métodos de calibração de primeira ordem e ordem zero. Assim, um novo modelo é calculado para cada amostra analisada. O modelo de calibração é construído a partir de um conjunto de matrizes de respostas instrumentais formando um cubo de respostas instrumentais. Os métodos de calibração de segunda ordem são bastante diferentes dos métodos de calibração de primeira ordem pois muitas vezes a sua decomposição é única, enquanto a decomposição de uma matriz de dados nunca é única.

A decomposição do cubo de dados num conjunto de vectores base não ortogonais, como representado na Fig. 1.3, pode ser efectuada através dos mínimos quadrados alternados (ALS), problema de valor e vector próprio e algoritmo baseado no problema generalizado do valor e vector próprio.

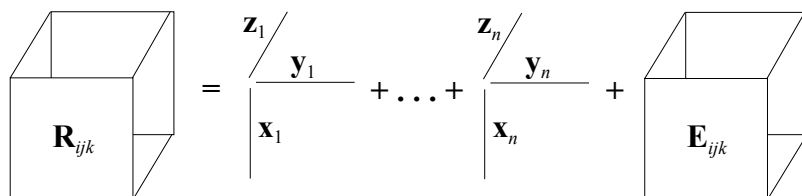


Fig. 1.3 – Decomposição de um cubo de dados nos seus vectores base.

O tipo mais simples de dados de segunda ordem é o que segue um modelo trilinear em que o cubo de respostas instrumentais \mathbf{R} é decomposto segundo a equação seguinte:

$$\mathbf{R}_{ijk} = \sum_{n=1}^N \mathbf{X}_{in} \mathbf{Y}_{jn} \mathbf{Z}_{kn} + \mathbf{E}_{ijk} \quad (1.8)$$

Métodos de calibração de segunda ordem assumem a aditividade linear do sinal e que as respostas do analito e de possíveis interferentes não são colineares.

Desvios à trilinearidade são comuns em química analítica. Por exemplo, muitos métodos intrinsecamente trilineares tornam-se não trilineares quando o detector se comporta de uma forma não linear. O efeito de matriz desfaz a trilinearidade afectando a resposta da mesma forma que o faz em dados de ordem zero e primeira ordem. A linha de base em métodos de calibração de segunda ordem é tratada da mesma forma que uma interferência.

Tal como nos métodos de calibração de ordem zero e primeira ordem, o método de adição de padrão pode ser utilizado. Este método aplica-se quando desvios da trilinearidade se observam, quando o perfil de resposta do analito, a sensibilidade instrumental ou os perfis de resposta dos interferentes estão dependentes das concentrações de outras espécies que não o analito. No entanto o modelo trilinear é aplicável se os padrões e as amostras tiverem a mesma concentração das espécies interferentes. Pela adição de padrão à amostra obtém-se a mesma concentração dos interferentes na determinação da amostra e a quantificação é possível por um modelo trilinear. Sobre o método generalizado de adição de padrão, o método de adição de padrão de segunda ordem tem a vantagem de apenas serem necessárias adições do padrão.

Tal como em instrumentação de segunda ordem, só nos métodos de calibração de segunda ordem é possível a detecção de interferências, assim como de alguns tipos de desvios que podem ser eliminados matematicamente [2]. A quantificação na presença de interferentes é possível. Um problema potencial é que a decomposição do cubo de respostas instrumentais pode não ser único na presença de múltiplos interferentes. A

colinearidade entre a concentração da amostra e dos interferentes resulta numa perda de informação. No entanto quando o cubo é decomposto, a recuperação dos vectores base de compostos não trilineares é ainda possível na presença de múltiplos interferentes [5].

Exemplos de modelos de calibração de segunda ordem são [2,5,7,]:

- Método generalizado de aniquilação de ordem (GRAM).
- Método de aniquilação de ordem não bilinear (NBRA).
- Bilinearização residual (RBL).
- Mínimos quadrados bilineares (BLLS).
- Análise de factores de aniquilação de ordem (RAFA).
- Mínimos quadrados parciais multilinear (N-PLS).
- Decomposição trilinear directa (DTLD).
- Análise de factores paralelos (PARAFAC).
- Análise de factores paralelos dois (PARAFAC2).
- Resolução de curvas multivariada – mínimos quadrados alternados (MCR-ALS).
- Modelos Tucker (TUCKER1, TUCKER2 e TUCKER3)
- Método de adição de padrão de segunda ordem (SOSAM).

1.2. Análise química farmacêutica

A análise química farmacêutica envolve essencialmente a determinação qualitativa ou quantitativa de fármacos, composto principal terapêuticamente activo, na matéria-prima e em formas farmacêuticas. Outras amostras além da matéria-prima e das formas farmacêuticas e outros compostos além do principal são também muitas vezes objecto de análise. Materiais biológicos como plasma e urina são frequentemente amostras analisadas. São também muitas vezes analisados na matéria-prima e formas farmacêuticas os produtos relacionados como os produtos de degradação do composto principal e impurezas, nas formas farmacêuticas os excipientes da formulação e em materiais biológicos os metabolitos, muitas vezes activos [6,9].

Alguns dos requerimentos habituais que se colocam na análise química farmacêutica estão descritos na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Requerimentos habituais em análise química farmacêutica.

<i>Análise Quantitativa</i>
Qual a percentagem do conteúdo estabelecido do fármaco na forma farmacêutica?
Qual a estabilidade do fármaco na forma farmacêutica e conseqüentemente qual o prazo de validade da forma farmacêutica?
A que velocidade o fármaco é libertada da sua forma farmacêutica e assim ser absorvida pelo organismo?
Qual a concentração de impurezas especificadas do fármaco na matéria-prima?
Qual a concentração do fármaco numa amostra de tecido ou fluido biológico?
Qual o valor ou valores de p_{K_a} , coeficientes de partição, solubilidades e estabilidade do fármaco em desenvolvimento?
<i>Análise Qualitativa</i>
Encontra-se o fármaco na forma farmacêutica correctamente identificado?
Encontram-se na forma farmacêutica impurezas adicionais ou só o fármaco está presente?
Encontram-se a identidade e pureza do fármaco na matéria-prima de acordo com as especificações na preparação da forma farmacêutica?
Encontram-se a identidade e pureza dos excipientes de acordo com as especificações na preparação da forma farmacêutica?

A determinação quantitativa de qualquer dos compostos atrás indicados é efectuada quer no controlo de qualidade analítico de produção quer em qualquer estudo que implique a sua determinação. Tal como na avaliação de estabilidade, estabelecer o prazo de validade, monitorização terapêutica, estudos toxicológicos ou estudos farmacológicos. No entanto, a análise química farmacêutica mais frequente é a determinação quantitativa do fármaco e de compostos relacionados em formas farmacêuticas.

De maneira a obter-se o efeito fisiológico desejado as formas farmacêuticas são formuladas como misturas químicas. Formas farmacêuticas e dosagens diferentes do mesmo composto activo representam tipos de misturas químicas diferentes. Também, as amostras biológicas pela sua natureza apresentam uma heterogeneidade apreciável. Todas estas amostras são consideradas complexas e podem apresentar problemas de interferência aquando da determinação do fármaco, composto principal, ou mesmo de qualquer um dos outros compostos relacionados.

A maioria dos métodos analíticos utilizados na determinação destas substâncias tem como base a utilização de uma técnica analítica separativa [10-12]. Sendo a maioria baseados nalguma forma de cromatografia líquida. Além disso, inerente a muitos métodos analíticos, estão procedimentos analíticos prévios de tratamento da amostra. Tais factos tornam estes métodos relativamente dispendiosos, lentos e poderão apresentar alguma falta de robustez devido a acumulação de erros em todas estas operações.

A possibilidade de quantificação destes compostos com o mínimo de manuseamento da amostra permite a diminuição da possibilidade de erro. Este será o objectivo final de qualquer processo analítico e também da análise química farmacêutica.

1.3. Antagonistas dos canais de cálcio

O grupo de fármacos designado por antagonistas ou bloqueadores dos canais de cálcio foi o grupo de fármacos escolhido, de entre todos os grupos de fármacos existentes no arsenal terapêutico actual, para estudo na dissertação apresentada. Os antagonistas dos canais de cálcio actuam a nível do aparelho cardiovascular [13-17]. São os agentes cardiovasculares mais utilizados e um dos grupos de fármacos de maior utilização a nível mundial. Além da sua ampla utilização, também o facto deste grupo de fármacos ser um grupo quimicamente muito heterogéneo, constituído por um conjunto de compostos que pertencem a diferentes classes de compostos químicos, reforçou a escolha destes fármacos para estudo nesta dissertação.

A Nifedipina, o Diltiazem e o Verapamil representam a primeira geração de antagonistas dos canais de cálcio e são os grandes representantes das três classes principais de compostos (1,4-dihidropiridinas, benzotiazepinas e fenilalquilaminas) [15,16]. Além destas classes de compostos mais duas classes (difenilpiperazinas e diarilaminopropilaminas) são identificadas como pertencendo aos antagonistas dos canais de cálcio [15].

Apesar de todos terem como alvo comum os canais de cálcio tipo L os antagonistas dos canais de cálcio são um grupo químico, farmacológico e terapêuticamente heterogéneo que não são facilmente convertidos uns nos outros [13,14,17]. Estas diferenças também se aplicam a uma segunda geração de antagonistas dos canais de cálcio. Desta segunda geração de fármacos fazem parte a amlodipina, lacidipina, felodipina, nimodipina, nisoldipina, nicardipina e nitrendipina que pertencem à mesma classe da Nifedipina, além do galopamil e tiapamil que pertencem a classe do Verapamil. Na prática, as únicas drogas terapêuticamente disponíveis como antagonistas de cálcio são a Nifedipina, Diltiazem e Verapamil.

Muitas vezes o Verapamil e o Diltiazem são vistos como antagonistas “não selectivos” enquanto a Nifedipina e as outras 1,4-dihidropiridinas são descritas como “selectivas vasculares” apesar do grau de selectividade vascular variar consideravelmente no grupo da 1,4-dihidropiridina. Estas acções definem o seu papel terapêutico. O Verapamil apresenta um efeito superior no tecido cardíaco, diminuindo a contractilidade e a condução aurículo ventricular. A Nifedipina apresenta um efeito superior no tecido vascular promovendo a

vasodilatação. O Diltiazem apresenta efeitos próximos no tecido cardíaco e vascular tanto na vasodilatação como na diminuição da contractilidade e da condução aurículo ventricular [16].

As três classes principais de antagonistas dos canais de cálcio possuem efeitos antihipertensores significativos, embora com características muito diferentes segundo cada um dos grupos. Os antagonistas dos canais de cálcio da classe da Nifedipina possuem fundamentalmente um efeito antihipertensor diastólico. Os da classe do Diltiazem possuem fundamentalmente um efeito anti-anginoso, com alguma actividade depressora miocárdica e, em doses altas, actividade antihipertensora. Os da classe do Verapamil possuem fundamentalmente um efeito anti-arritmico, com alguma actividade anti-anginosa e antihipertensora.

Para a Nifedipina, Diltiazem e Verapamil serão apresentadas as propriedades químicas principais bem como para cada um deles os métodos analíticos de quantificação encontrados em revistas internacionais desde o seu aparecimento.

1.3.1. Nifedipina

A Nifedipina é uma dihidropiridina também designada por 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)piridino-3,5-dicarboxilato de dimetilo ou éster do ácido 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)piridino-3,5-dicarboxílico.

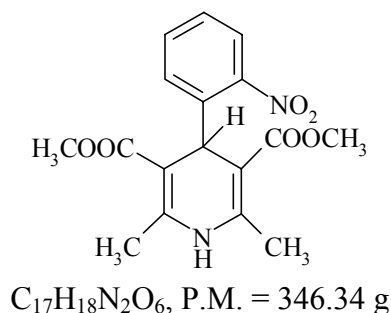


Fig. 1.4 – Formula de estrutura, formula molecular e peso molecular da Nifedipina.

Apresenta-se na forma de um pó amarelo, sem odor, termo estável, não higroscópico, com um ponto de fusão entre 171 – 175 °C. É facilmente solúvel em acetona, cloreto de metileno, clorofórmio, solúvel em acetato de etilo, ligeiramente solúvel em metanol e etanol e praticamente insolúvel em água. Além disso apresenta solubilidades baixas ligeiramente diferentes em soluções tampão de diferentes pH [18].

A Nifedipina é electroquimicamente activa apresentando respostas voltamétricas de redução e oxidação [19]. Não apresenta fluorescência e apresenta absorvância abaixo dos 450 nm na zona do ultravioleta (UV) e do visível (Vis) próximo. Na Fig. 1.5 é apresentado o espectro de UV-Vis da Nifedipina em metanol na gama de 190 a 820 nm.

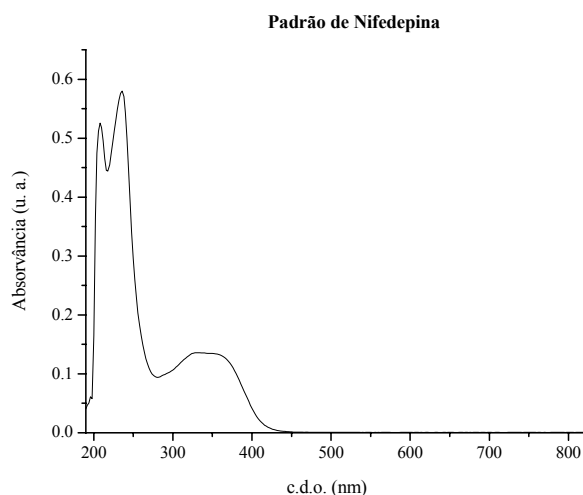


Fig. 1.5 – Espectro de UV-Vis de um padrão 10.000 ppm de Nifedipina em metanol.

É um composto relativamente sensível à exposição à luz, altas temperaturas e agentes oxidantes dando origem predominantemente a dois produtos de degradação. Ambos os produtos de degradação resultam da oxidação do anel de dihidropiridina a piridina e também para um deles da redução do grupo nitro em nitroso. A instabilidade da molécula é mais importante em solução do que na forma de cristais. A substância é sensível à luz na forma sólida e extremamente sensível à luz quando em solução. Quando exposta à luz do dia ou a certos c.d.o. da luz artificial converte-se no derivado da nitrosifenilpiridina enquanto a exposição a luz ultravioleta conduz à formação do derivado de nitrofenilpiridina.

Os dois produtos de degradação e o 2-nitrobenzaldeído, composto utilizado na síntese, considerados como impurezas, os diferentes excipientes que acompanham a Nifedipina nas diferentes formas farmacêuticas e os três principais metabolitos identificados (nitrofenilpiridina e derivados), bem como a lactona de um deles, são os seus compostos relacionados e que podem interferir na sua determinação. Além destes compostos apresenta formas polimórficas [20] e não são referidos isómeros.

A aplicação terapêutica principal da Nifedipina é no tratamento da hipertensão e da angina de peito [15]. Na Tabela 1.2 são apresentadas as suas aplicações terapêuticas, contra-indicações e efeitos secundários da Nifedipina bem como o seu grau de utilização na presença dos efeitos secundários referidos.

Tabela 1.2 – Aplicação terapêutica, contra-indicações e efeitos secundários da Nifedipina.*

Aplicações terapêuticas		Contra-indicações		Efeitos secundários	
Angina de esforço	×	Estenose aórtica	×	Edema dos tornozelos	++
Angina instável	–	Defeitos de condução aurículo ventricular	–	Obstipação	–
PSVST	–	Insuficiência cardíaca	×	Náuseas e tonturas	++
Fibrilação atrial e flutter	–	Hipotensão	×	Rubor facial	+++
Hipertensão	×	Bradicardia sinusal	–	Cefaleias	++
Desordens vasculares periféricas (Raynaud)	×	Doença do síndrome sinusal	–	Isquemia	+
Vasopasma cerebral (pós hemorrágico)	×			Erupção cutânea	–
				Taquicardia	++

* Tem aplicação terapêutica ou é contra-indicado a sua utilização (×) ou não tem aplicação terapêutica e não é contra-indicado a sua utilização (–). Grau de utilização na presença dos efeitos secundários referidos – pouco utilizado (+), muito utilizado (+++) e não utilizado (–).

É administrada fundamentalmente por via oral na forma de comprimidos ou cápsulas na dosagem de 5, 10, 20, 30, 60 mg. Em solução oral cada mL tem 20 mg de Nifedipina. Apresenta concentrações máximas plasmáticas que dependendo da forma farmacêutica administrada varia entre 0.011 e 0.201 ppm [15,18].

Quantificação

Tal como na análise da maioria dos compostos farmacêuticos também para a análise da Nifedipina a maioria dos métodos analíticos utilizados na sua quantificação são métodos separativos. Na Tabela 1.3 são apresentados os métodos analíticos encontrados na literatura na determinação da Nifedipina e compostos relacionados na matéria-prima, formas farmacêuticas e materiais biológicos.

Tabela 1.3 – Métodos analíticos utilizados na determinação da Nifedipina.*

a) Matéria-prima			
Técnica	Condições	Outras amostras analisadas / Outros compostos analisados	Ref.
HPLC-UV	Fase reversa, 250 nm	--- / Amlodipina, nitrendipina, nimodipina, felodipina e atenolol	21
HPLC-UV	Fase reversa, 238 nm	--- / Amlodipina, nitrendipina, nimodipina, felodipina, nicardipina, nisoldipina, lacidipina e isradipina	22
HPLC-UV	Fase reversa, 210, 216, 230 e 237 nm	--- / Nitrofenilpiridina, nitrendipina, Diltiazem, desacetil diltiazem, demetil diltiazem, Verapamil e norverapamil	23
GC-ECD	Gradiente de temperatura	--- / Amlodipina, nitrendipina, nimodipina, felodipina, nisoldipina e isradipina	24
HPLC-UV e Espectrofotometria	Fase reversa, 238 nm / 200 a 600 nm, 1ª derivada	Microemulsão / ---	25
Espectrofotometria	237 e 280 nm, método de duas equações a duas incógnitas	--- / Nitrosofenilpiridina	26
CE-UV	25 °C, 200 e 236 nm	--- / Amlodipina, nicardipina, nimodipina e felodipina	27
b) Formas farmacêuticas			
Técnica	Condições	Outras amostras analisadas / Outros compostos analisados	Ref.
HPLC-UV	Fase reversa, 254 nm, extracção prévia	--- / Nitrosofenilpiridina	28
HPLC-UV	Fase reversa, 265 nm	--- / Nitrofenilpiridina e nitrosofenilpiridina	29
HPTLC-UV	Extracção prévia	Matéria prima / ---	30
HPLC-UV	Fase reversa, 238 nm	--- / Atenolol	31
HPLC-UV, GC-FID e Espectrofotometria	Fase reversa, 260 nm / Gradiente de temperatura /250 a 450 nm, 1ª derivada	--- / Acebutolol	32
Espectrofotometria	340 nm, extracção prévia	--- / ---	33
Espectrofotometria	1ª derivada	--- / Metoprolol	34
Espectrofotometria	250 a 450 nm, 1ª derivada	--- / Nitrofenilpiridina e nitrosofenilpiridina	35
Espectrofotometria	205 a 300 nm e 200 a 350 nm, 2ª derivada	--- / Atenolol, aspirina e dipiridamole	36
Espectrofotometria	Derivatização, 625 nm, extracção prévia	Matéria-prima / ---	37
Espectrofotometria	Derivatização, 490 nm	Matéria-prima / ---	38
Espectrofotometria	Derivatização, 310 nm, extracção prévia	--- / ---	39
Espectrofotometria	Derivatização, 510 nm, extracção prévia	Matéria-prima / ---	40
Espectrofotometria	Derivatização, 525 nm	--- / ---	41
Espectrofotometria	Derivatização, 415 e 520 nm, extracção do produto corado	--- / ---	42
¹ H RMN	Transformadas de Fourier, temperatura constante	--- / Nitrofenilpiridina e nitrosofenilpiridina	43

(Continua)

Tabela 1.3 (Continuação)

c) Materiais biológicos			
Técnica	Material biológico / Condições	Outras amostras analisadas / Outros compostos analisados	Ref.
HPLC-UV	Plasma fortificado / Fase reversa, 338 nm, extracção	--- / ---	44
HPLC-UV	Plasma de gato / Fase reversa, 350 nm, extracção	--- / ---	45
HPLC-UV	Plasma / Fase reversa, 238 nm, extracção	--- / ---	46
HPLC-UV	Plasma, soro / Fase reversa, 235 nm, extracção	--- / Metabolito	47
HPLC-UV	Plasma / Fase reversa, 240 nm	--- / ---	48
HPLC-UV	Plasma / Fase reversa, 238 nm, extracção	--- / ---	49
HPLC-DE	Plasma / Fase reversa, eléctrodo de carbono, extracção	--- / ---	50
HPLC-DE	Plasma fortificado / Fase reversa, eléctrodo de carbono, extracção	--- / Nimodipina, felodipina, nicardipina, nisoldipina e lacidipina	51
HPLC-DE	Plasma fortificado / Fase reversa, eléctrodo de carbono, extracção	--- / Nicardipina e pindolol	52
HPLC-DE	Plasma de cão fortificado / Fase reversa, eléctrodo de carbono, extracção	--- / ---	53
HPLC-MS-MS	Plasma / Fase reversa, extracção	--- / Nitrofenilpiridina	54
HPLC-MS-MS e FIA-MS-MS	Plasma / Fase reversa, extracção	--- / ---	55
GC-ECD	Plasma / Extracção	--- / Metabolito principal e produtos de degradação	56
GC-ECD	Plasma / Extracção	--- / ---	57
Espectrofotometria	Plasma / 237 e 278 nm, extracção prévia	Formas farmacêuticas / Verapamil	58
SW-ASV	Plasma fortificado / Eléctrodo de mercúrio, extracção	--- / Nitrofenilpiridina	59

* A espectrofotometria de UV-Vis é designada unicamente por espectrofotometria.

Na matéria prima e nas formas farmacêuticas um maior número de métodos espectrofotométricos de UV-Vis foi utilizado para a determinação da Nifedipina [25,26,32-42]. A maioria destes métodos envolve uma reacção de derivatização e uma extracção da Nifedipina prévia à obtenção do produto corado ou então uma extracção do produto corado obtido. Na determinação simultânea da Nifedipina e outros compostos na matéria prima e em formas farmacêuticas por espectrofotometria de UV-Vis foi também utilizada a quantificação recorrendo a métodos matemáticos. Na matéria prima foi utilizado o método de determinação de duas substâncias recorrendo ao método de duas equações a duas incógnitas [26] e em formas farmacêuticas foram utilizados métodos que recorrem a primeira e segunda derivada dos espectros obtidos [32,34-36].

Para os três tipos de amostras para a determinação da Nifedipina foi encontrado um grande número de métodos de HPLC com detecção de UV [21-23,28-31,44-49]. Na matéria prima e nas formas farmacêuticas foram também utilizados um método de HPTLC [30] e dois métodos de CG, um na matéria prima [24] e outra numa forma farmacêutica [32].

Em materiais biológicos, exceptuando um método espectrofotométrico, todos os outros métodos analíticos encontrados para a determinação da Nifedipina são métodos separativos [44-57,59]. Só dois destes métodos recorrem à GC [56,57] e todos os outros são métodos de HPLC. Para a detecção da Nifedipina são também utilizadas detecção electroquímica e MS [50-55]. Quer nas formas farmacêuticas quer em materiais biológicos e devido a natureza das amostras a maioria dos métodos analíticos separativos envolve uma extracção prévia da Nifedipina.

Os restantes tipos de métodos analíticos encontrados na quantificação da Nifedipina são: na matéria prima um método de EC [27]; em formas farmacêuticas de RMN [43]; e em materiais biológicos um método de FIA [55] e de ASV [59].

1.3.2. Diltiazem

O Diltiazem é uma benzotiazepina e apresenta-se na forma de cloridrato de Diltiazem. O seu nome químico aceite é cloridrato de (2S-cis) -3-acetoxi-5- [2-(dimetilamino)etil]-2,3-dihidro-2-(4-metoxifenil)-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona. Outras designações são cloridrato de (+)-cis-3-(acetoxi-5-[2-(demetilamino)etil]-2,3-dihidro-2-(4-metoxifenil)-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona e cloridrato de acetato de (+)-5-[2-(dimetilamino)etil]-cis-2,3-dihidro-3-hidroxi-2-(p-metoxifenil)-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona.

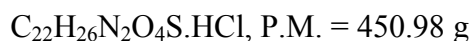
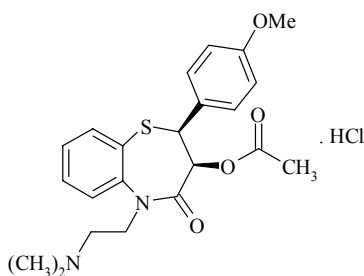


Fig. 1.6 – Formula de estrutura, formula molecular e peso molecular do Diltiazem.

Apresenta-se na forma de um pó cristalino branco, sem odor e com um ponto de fusão de cerca de 210 °C (207.50 – 212.00 °C) com decomposição a altas temperaturas. É facilmente solúvel em clorofórmio, ácido fórmico, metanol e água, ligeiramente solúvel em álcool, praticamente insolúvel em benzeno e insolúvel em éter. Devido a possuir dois carbonos assimétricos é opticamente activo e é fornecido na forma dextrógira do seu isómero cis que é sua forma biologicamente mais activa [60].

O Diltiazem apresenta respostas voltamétricas tanto de oxidação como de redução [60]. Não apresenta fluorescência e apresenta absorvância na zona do UV abaixo dos 300 nm. Na Fig. 1.7 é apresentado o espectro de UV-Vis do Diltiazem em metanol na gama de 190 a 820 nm.

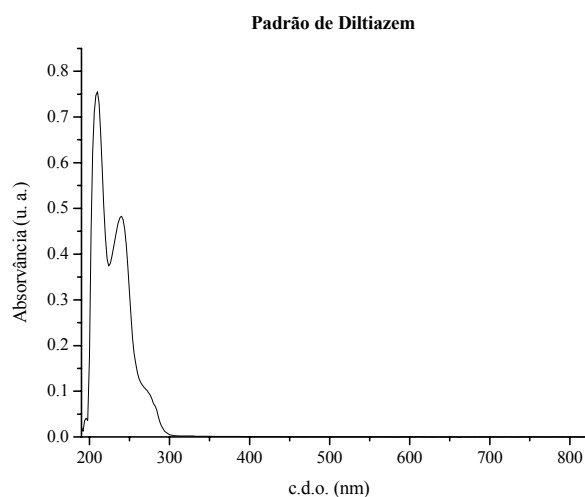


Fig. 1.7 – Espectro de UV-Vis de um padrão 10.000 ppm de Diltiazem em metanol.

No estado sólido o Diltiazem é bastante estável. Em solução aquosa é menos estável e apresenta hidrólise dando origem ao desacetil diltiazem. A hidrólise do Diltiazem depende do pH da solução e é acelerada por exposição a luz. O pH 5 é referido como o pH de maior estabilidade do Diltiazem [60].

O Diltiazem apresenta isomerismo cis e trans e cada um destes têm isómeros ópticos. Não são referidas formas polimórficas do Diltiazem. Além do desacetil diltiazem, seu produto de degradação principal, são também consideradas impurezas o Diltiazem na forma de não cloridrato e o seu isómero trans. Os outros produtos considerados relacionados são os diferentes excipientes que acompanham o Diltiazem nas diferentes formas farmacêuticas e os seis metabolitos já identificados no homem. Os metabolitos

encontrados no homem são o desacetil diltiazem, N-monodemetil diltiazem, desacetil N-monodemetil diltiazem, desacetil N,O-didimetil diltiazem, desacetil O-demetil diltiazem e desacetil diltiazem N-óxido.

A aplicação terapêutica principal do Diltiazem é no tratamento da angina de peito, da arritmia cardíaca e da hipertensão [15]. Na Tabela 1.4 são apresentadas as suas aplicações terapêuticas, contra-indicações e efeitos secundários do Diltiazem bem como o seu grau de utilização na presença dos efeitos secundários referidos.

Tabela 1.4 – Aplicação terapêutica, contra-indicações e efeitos secundários do Diltiazem.*

Aplicações terapêuticas		Contra-indicações		Efeitos secundários	
Angina de esforço	×	Estenose aórtica	×	Edema dos tornozelos	++
Angina instável	×	Defeitos de condução aurículo ventricular	×	Obstipação	+
PSVST	×	Insuficiência cardíaca	×	Náuseas e tonturas	++
Fibrilação atrial e flutter	×	Hipotensão	×	Rubor facial	+
Hipertensão	×	Bradicardia sinusal	-,×	Cefaleias	+
Desordens vasculares periféricas (Raynaud)	-	Doença do síndrome sinusal	×	Isquemia	-
Vasopasma cerebral (pós hemorrágico)	-			Erupção cutânea	+
				Taquicardia	-

* Ver rodapé da Tabela 1.2.

É administrado fundamentalmente por via oral na forma de comprimidos ou cápsulas na dosagem de 60, 90, 120, 180, 200, 240 e 300 mg. Apresenta concentrações máximas plasmáticas que dependendo da forma farmacêutica administrada varia entre 0.050 e 0.200 ppm [15,60].

Quantificação

Tal como na análise da maioria dos compostos farmacêuticos também para a análise do Diltiazem a maioria dos métodos analíticos utilizados na sua quantificação são métodos separativos. Na Tabela 1.5 são apresentados os métodos analíticos encontrados na literatura na determinação do Diltiazem e compostos relacionados na matéria prima, formas farmacêuticas e materiais biológicos.

Tabela 1.5 – Métodos analíticos utilizados na determinação do Diltiazem.*

a) Matéria prima			
Técnica	Condições	Outras amostras analisadas / Outros compostos analisados	Ref.
HPLC-UV	Fase reversa, 239 nm	--- / ---	61
b) Formas farmacêuticas			
Técnica	Condições	Outras amostras analisadas / Outros compostos analisados	Ref.
HPLC-UV	Fase reversa, 220, 240, 250 e 275 nm	--- / ---	62
HPLC-UV	Fase reversa, 240 nm	Matéria prima / Compostos relacionados	63
HPTLC-Densitometria	238 nm	Matéria prima / ---	64
Espectrofotometria	Derivatização, 415 nm, extracção do produto corado	--- / ---	65
Espectrofotometria	Derivatização, 495 e 520 nm	--- / ---	66
Espectrofotometria	Derivatização, 420 e 630 nm, extracção do produto corado	--- / ---	67
Espectrofotometria	Derivatização, 440 e 490 nm, extracção do produto corado	--- / ---	68
Espectrofotometria	Derivatização, 404, 410, 420 e 510 nm, extracção do produto corado	--- / ---	69
Espectrofotometria	Derivatização, 405, 410 e 430 nm, extracção do produto corado	--- / ---	70
NIR-FT-Raman	Gama de 1625 cm ⁻¹ até 1560 cm ⁻¹	--- / ---	71
Titulação	Tensioactivos aniónicos, Amarelo de metilo	--- / ---	72
FIA-VD	Eléctrodo de carbono	--- / Nimesulide	73
c) Materiais biológicos			
Técnica	Material biológico / Condições	Outras amostras analisadas / Outros compostos analisados	Ref.
HPLC-UV	Plasma / Fase reversa, 237 nm, extracção	--- / ---	74
HPLC-UV	Urina / Fase reversa, 210 nm, extracção	--- / Seis metabolitos	75
HPLC-UV	Plasma / Fase reversa, 238 nm, extracção	--- / Desacetil diltiazem	76
HPLC-UV	Plasma / Fase reversa, 214 nm, extracção	--- / Seis metabolitos	77
HPLC-UV	Soro fortificado / Fase reversa, 220 nm, extracção	--- / Verapamil e β bloqueantes	78
HPLC-UV	Plasma / Fase reversa, 238 nm, extracção	--- / Três metabolitos	79
HPLC-UV	Plasma e plasma fortificado/ Fase reversa, 247 e 270 nm, extracção	--- / Quinidina	80
ASV	Urina / Eléctrodo de mercúrio	Formas farmacêuticas / ---	81

* Ver rodapé da Tabela 1.3.

Nas formas farmacêuticas foram também utilizados para a determinação do Diltiazem um maior número de métodos espectrofotométricos de UV-Vis [65-70]. A maioria destes métodos envolve uma reacção de derivatização e uma extracção do Diltiazem prévio à

obtenção do produto corado ou então uma extracção do produto corado obtido. Os outros métodos também utilizados são métodos de HPLC com detecção de UV [62,63], um de HPTLC [64], um método espectrofotométrico no IV próximo [71], uma titulação [72] e um método de FIA [73].

Para a matéria prima e em materiais biológicos a maioria dos métodos analíticos encontrados recorrem à HPLC com detecção de UV [61,74-80]. As únicas excepções são na determinação do Diltiazem na matéria prima a utilização de um método de HPTLC [64] e na sua determinação em materiais biológicos a utilização de um método com recurso a ASV [81]. Em materiais biológicos, e devido a natureza das amostras, a maioria dos métodos analíticos separativos envolve uma extracção prévia da Nifedipina.

1.3.3. Verapamil

O Verapamil é uma difenilalquilamina também designada por cloridrato de 5-[(3,4-dimetoxifenietil)metilamino]-2-(3,4-dimetoxifenil)-2-isopropilvaleronitrilo e cloridrato de α -[3-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]-metilamino]propil]-3,4-dimetoxi-(1-metiletil)benzeno-acetonitrilo.

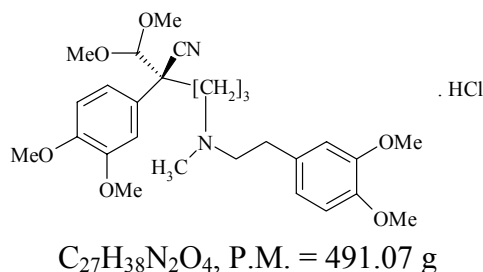


Fig. 1.8 – Formula de estrutura, formula molecular e peso molecular da Verapamil.

Apresenta-se na forma de um pó cristalino branco, sem odor, bastante estável em condições extremas térmicas ou fotoquímicas, com um ponto de fusão entre 140 e 144 °C. É facilmente solúvel em metanol, etanol a 95 %, dimetilformamida (DMF) e cloreto de metileno, solúvel em propileno glicol e água, ligeiramente solúvel em etanol a 90 %, pouco solúvel em 2-propanol e acetato de etilo e praticamente insolúvel em hexano. Além disso apresenta uma solubilidade decrescente a medida que o pH aumenta [82].

É electroquimicamente activo apresentando respostas voltamétricas de redução. Apresenta fluorescência quando excitado por luz na zona do UV e apresenta absorvância

abaixo dos 300 nm na zona do UV. Na Fig. 1.9 é apresentado o espectro de UV-Vis do Verapamil em metanol na gama de 190 a 820 nm e o espectro de emissão do Verapamil na gama de 252 à 715 nm ao c.d.o. de excitação máximo de 262.84 nm.

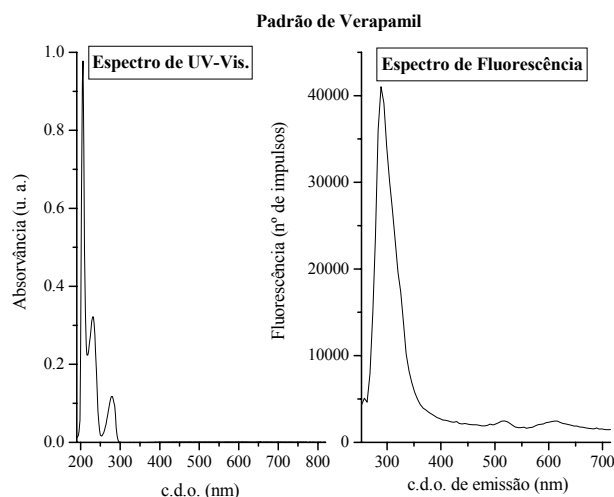


Fig. 1.9 – Espectro de emissão de fluorescência e UV-Vis de um padrão 10.000 ppm de Verapamil em metanol.

Tanto no estado sólido como em solução o Verapamil é bastante estável mesmo em condições extremas térmicas ou fotoquímicas. No estado sólido é estável a condições extremas térmicas e degradativas fotoquímicas. Em solução é bastante estável em soluções aquosas neutras, ácidas e básicas sob refluxo. No entanto, em solução metanólica e quando exposto a radiação UV durante duas horas apresenta degradação rápida (52 %).

Várias impurezas, como por exemplo produtos secundários de síntese e eventualmente produtos de degradação, são referidas na literatura. Além dos excipientes presentes nas formas farmacêuticas os outros compostos relacionados são os metabolitos. A desalquilação é a principal via metabólica. São obtidos por metabolização sete metabolitos quirais. Em maior quantidade obtêm-se uma amina primária e secundária. O produto N demetilado (norverapamil) é o principal metabolito activo. Além destes compostos, não apresenta formas polimórficas e são referidos os enantiómeros S e R. O Verapamil é fornecido e administrado na forma racémica dos seus enantiómeros S e R [82].

A aplicação terapêutica principal do Verapamil é no tratamento da arritmia cardíaca, da angina de peito e da hipertensão [15]. Na Tabela 1.6 são apresentadas as suas aplicações terapêuticas, contra-indicações e efeitos secundários do Verapamil bem como o seu grau de utilização na presença dos efeitos secundários referidos.

Tabela 1.6 – Aplicação terapêutica, contra-indicações e efeitos secundários do Verapamil.*

Aplicações terapêuticas		Contra-indicações		Efeitos secundários	
Angina de esforço	×	Estenose aórtica	×	Edema dos tornozelos	++
Angina instável	×	Defeitos de condução aurículo ventricular	×	Obstipação	+++
PSVST	×	Insuficiência cardíaca	×	Náuseas e tonturas	++
Fibrilação atrial e flutter	×	Hipotensão	×	Rubor facial	++
Hipertensão	×	Bradicardia sinusal	-,×	Cefaleias	+
Desordens vasculares periféricas (Raynaud)	-	Doença do síndrome sinusal	×	Isquemia	-
Vasopasma cerebral (pós hemorrágico)	-			Erupção cutânea	+
				Taquicardia	-

* Ver rodapé da Tabela 1.2.

É administrada fundamentalmente por via oral na forma de comprimidos ou cápsulas na dosagem de 40, 80, 120, 240 mg. Em solução injectável cada 2 mL contém 5 mg de Verapamil. Apresenta concentrações máximas plasmáticas que dependendo da forma farmacêutica administrada varia entre 0.010 e 0.200 ppm [15,82].

Quantificação

Tal como na análise da maioria dos compostos farmacêuticos também para a análise do Verapamil a maioria dos métodos analíticos utilizados na sua quantificação são métodos separativos. Na Tabela 1.7 são apresentados os métodos analíticos encontrados na literatura na determinação do Verapamil e compostos relacionados na matéria prima, formas farmacêuticas e materiais biológicos.

Tabela 1.7 – Métodos analíticos utilizados na determinação do Verapamil.*

a) Matéria prima

Técnica	Condições	Outras amostras analisadas / Outros compostos analisados	Ref.
HPLC-UV	Fase reversa, 278 nm	--- / Compostos relacionados	83
HPLC-UV	Fase reversa, 278 nm	--- / Compostos relacionados	84

b) Formas farmacêuticas

Técnica	Condições	Outras amostras analisadas / Outros compostos analisados	Ref.
HPLC-UV	Fase reversa, 280 nm	--- / ---	85
HPLC-UV	Fase reversa, 220 nm, extracção	--- / Trandolapril	86
HPLC-UV e HPLC-FL	Fase reversa, 276 nm, exc.–280 nm e emi.–313 nm	--- / ---	87
Espectrofotometria	1ª derivada	--- / Pentobarbital	88
Espectrofotometria	Derivatização, 420 nm, extracção do produto corado	--- / ---	89
Espectrofotometria	Derivatização, 570 nm, extracção do produto corado	Matéria prima / Procainamida e acebutolol	90
Espectrofotometria	Derivatização, 445, 510, 515, 527 e 528 nm, extracção do produto corado	--- / ---	91
Espectrofotometria	Derivatização, 340 nm, extracção do produto corado	--- / ---	92
Espectrofotometria	Derivatização, 530 e 546 nm, extracção do produto corado	--- / ---	93
Espectrofotometria	Derivatização, 456 e 640 nm, extracção do produto corado	--- / Carbocromen, acebutolol, carazolol e propanolol	94
Espectrofotometria	Derivatização, 483, 602 e 627 nm, extracção do produto corado	--- / Oxifedrina	95
DCP-AES	Determinação indirecta pelos metais após complexação com tiocianatos de vários metais	Matéria prima / ---	96

c) Materiais biológicos

Técnica	Material biológico / Condições	Outras amostras analisadas / Outros compostos analisados	Ref.
HPLC-UV	Plasma, plasma fortificado / Fase reversa, 210 nm, extracção	--- / Norverapamil	97
HPLC-UV	Plasma fortificado de porco/ Fase reversa, 230 nm, extracção	--- / Norverapamil	98
HPLC-UV	Plasma fortificado / Fase reversa, 280 nm, coluna quirál, 230 nm, extracção	--- / Três metabolitos	99
HPLC-UV	Plasma de rato fortificado / Fase reversa, 235 nm, extracção	--- / ---	100
HPLC-UV	Células humanas / Fase reversa, 237 nm, extracção	--- / Adriamicina, daunorubicina e vincristina	101
HPLC-UV e HPLC-MS	Plasma, urina, cultura de células / Fase reversa, extracção	--- / Norverapamil, galopamil e metabolitos	102
HPLC-FL	Soro / Fase reversa, exc.–278 nm e emi.–320 nm, extracção	--- / ---	103
HPLC-FL	Plasma / Fase reversa, exc.–275 nm e emi.–310 nm, extracção	--- / Norverapamil	104
HPLC-FL	Plasma / Fase reversa, exc.–204 nm e emi.–314 nm, extracção	--- / Norverapamil	105

(Continua)

Tabela 1.7 (Continuação)

c) Materiais biológicos			
Técnica	Material biológico / Condições	Outras amostras analisadas / Outros compostos analisados	Ref.
HPLC-FL	Plasma / Fase reversa, exc.–280nm e emi.–313 nm	--- / Três metabolitos	106
HPLC-FL	Plasma / Fase reversa, exc.–203nm e emi.–310 nm	--- / ---	107
HPLC-FL	Soro / Fase reversa, exc.–278nm e emi.–320 nm	--- / Norverapamil	108
HPLC-FL	Plasma de coelho fortificado / Fase reversa, exc.–214 nm e emi.–300 a 400 nm	--- / ---	109
HPLC-FL	Plasma / Fase reversa, exc.–275 nm e emi.–310 nm, extracção	--- / Norverapamil	110
HPLC-FL	Soro / Fase reversa, coluna quirial, exc.–276 nm e emi.–310 nm, extracção	--- / Sete metabolitos	111
HPLC-FL	Plasma e plasma fortificado / Fase reversa ligada a coluna quirial, exc.–272 nm e emi.–317 nm, extracção	--- / Norverapamil	112
HPLC-FL	Plasma e plasma fortificado / Coluna quirial, exc.–280 nm e emi.–315 nm, extracção	--- / Norverapamil	113
HPLC-FL	Soro / Fase reversa, 209 nm e espectro de emissão / coluna quirial, exc.–230 nm e emi.–295 nm, extracção	--- / Norverapamil	114
HPLC-FL	Soro / Coluna quirial, exc.–223 nm e espectro de emissão, extracção	--- / Norverapamil e galopamil	115
HPLC-FL	Plasma e tecidos de rato / Coluna quirial, exc.–272 nm e emi.–312 nm, extracção	--- / Disopiramida e flecainida	116
HPLC-FL	Urina / Coluna quirial, exc.–230 nm e emi.–312 nm, extracção	--- / Norverapamil	117
HPLC-FL e GC-MS	Soro / Fase reversa, exc.–203 nm e emi.–320 nm, extracção	--- / Norverapamil	118
HPLC-MS	Plasma e fluido intestinal / Fase reversa, extracção	--- / Metabolitos	119
EC-DC	Soro / Extracção	Formas farmacêuticas / ---	120
ASV	Urina fortificada / Eléctrodo de mercúrio, extracção	Formas farmacêuticas / ---	121

* Ver rodapé da Tabela 1.3.

Os métodos encontrados para a determinação do Verapamil na matéria prima foram: um método espectrofotométrico de UV-Vis com extracção do produto corado [90]; um método de AES [96]; e dois métodos de HPLC com detecção de UV [83,84].

Nas formas farmacêuticas um maior número de métodos espectrofotométricos de UV-Vis foi utilizado para a determinação do Verapamil [88-95]. A maioria destes métodos envolve uma reacção de derivatização e uma extracção do Verapamil prévia à obtenção do

produto corado ou então uma extracção do produto corado obtido. Num dos métodos que envolve a determinação espectrofotométrica de UV-Vis simultânea do Verapamil e um outro fármaco em formas farmacêuticas a quantificação dos compostos é feita recorrendo a um método que recorre à primeira derivada dos espectros obtidos [88]. Além destes, os outros métodos encontrados são métodos de HPLC com detecção de UV [85-87], um com detecção de fluorescência [87] um método de AES [96], EC [120] e ainda ASV [121].

Foi encontrado um grande número de métodos analíticos para a determinação do Verapamil e do seu metabolito principal, norverapamil, em materiais biológicos [97-98,104,105,108,110,112-114,117,118]. Excepto em um método de determinação do Verapamil que utiliza a ASV [121] todos os outros métodos são métodos separativos. Com excepção de dois dos métodos, um que recorre à CE [120] e outro à CG [118], todos os outros métodos são métodos de HPLC. Devido ao facto do Verapamil apresentar fluorescência este é o modo de detecção de eleição para a detecção do Verapamil na maior parte dos métodos de HPLC [103-117]. Outros modos de detecção escolhidos são a detecção por UV [97-102] e ainda em poucos métodos a MS [102,119].

1.4. Espectrofotometria

A espectroscopia, electroquímica e cromatografia são as três principais categorias onde se situam a maioria das técnicas instrumentais. A interacção da radiação electromagnética com o analito é o princípio inerente a todas as técnicas espectroscópicas. Diferentes técnicas espectroscópicas com utilização intensa e diversa na análise qualitativa e quantitativa estão disponíveis em análise química.

De entre todas as técnicas espectroscópicas foram escolhidas para este estudo a espectroscopia de UV-Vis e a de fluorescência. A primeira atendendo a sua vasta aplicação na análise química quantitativa, nomeadamente na análise química farmacêutica, e a segunda, além da sua grande utilização, atendendo também a sua selectividade e sensibilidade analítica com limites de detecção mais baixos [122,123]. Além destas duas técnicas, em análise quantitativa e na análise química farmacêutica, também a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) é muito utilizada em análise em tempo real na análise química de processos [124].

Nas técnicas de UV-Vis, fluorescência ou fosforescência a radiação que interage com a matéria encontra-se na região do UV-Vis. É também utilizada em técnicas de fluorescência molecular radiação na zona do infravermelho próximo. Estas técnicas espectroscópicas, também designadas por técnicas espectrofotométricas, baseiam-se em princípios diferentes. A espectrofotometria de UV-Vis é uma técnica baseada na absorção de radiação enquanto a fluorescência e a fosforescência são técnicas baseadas na emissão de radiação.

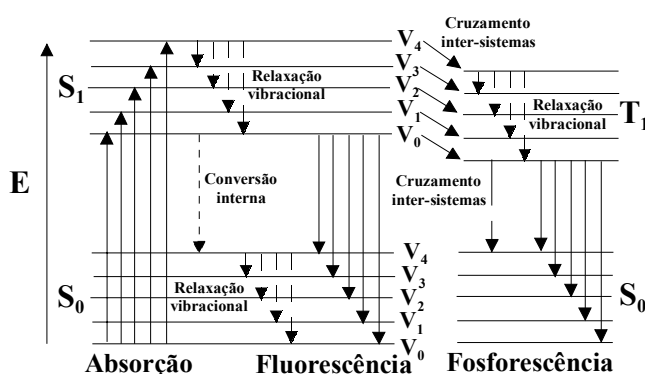


Fig. 1.10 – Diagrama de energia representando a absorção de radiação, a emissão de radiação por fluorescência e fosforescência bem como a perda de energia por processos sem emissão de radiação.

Tanto a espectrofotometria de UV-Vis como a de fluorescência permitem também a obtenção de dados de ordem zero, primeira ordem e de segunda ordem. Tanto na espectrofotometria de UV-Vis como na espectrofotometria de fluorescência a medição do sinal analítico e consequente determinação da concentração do composto em análise vem afectado de vários factores instrumentais e químicos que podem ser causas de erro.

De forma à obtenção de uma matriz de dados por amostra diferentes métodos analíticos espectrofotométricos de UV-Vis e fluorescência foram desenvolvidos. Nos sub capítulos seguintes são apresentadas uma revisão do fundamento das técnicas espectrofotométricas utilizadas, influências e possíveis problemas na determinação bem como a forma de obtenção dos diferentes tipos de dados analíticos.

1.4.1. Ultravioleta-visível

A absorção da radiação electromagnética a c.d.o. na região do UV entre 190 e 380 nm e na região do Vis entre 380 e 800 nm por moléculas com electrões em orbitais π ou com átomos possuindo pares de electrões não partilhados é a base da espectrofotometria de UV-Vis.

A base física e matemática da absorção de radiação por compostos em solução na região do UV-Vis encontra-se descrita na forma da lei de Lambert-Beer (1.9):

$$A = \varepsilon bc \quad (1.9)$$

Em espectrofotometria de UV-Vis A é a absorvância, parâmetro óptico sem unidades, medida num espectrofotómetro, b é a espessura da solução atravessada pelo feixe de radiação, c é a concentração do composto em moles/L e ε o coeficiente de absorção molar a um determinado c.d.o.. Normalmente a espessura da solução é 1 cm e assim as unidades do coeficiente de absorção molar é $M^{-1}.cm^{-1}$.

A lei de Lambert-Beer baseia-se na hipótese de Lambert de que a Intensidade I de um feixe de radiação monocromática decresce de dI_x , variação negativa, ao passar através de uma espessura d_x (1.2) de um material com um coeficiente de absorção K assim:

$$-\frac{dI}{dx} = KI_x \quad (1.10)$$

Se I_0 representar a intensidade do feixe de radiação monocromático incidente antes de passar através de um meio de espessura b com um coeficiente de absorção K , a intensidade do feixe de radiação transmitida I será dado pela forma integrada (1.12) da equação (1.10):

$$[\ln I_x]_{I_0}^I = -K[x]_0^b \quad (1.11)$$

$$\ln \frac{I}{I_0} = -Kb \quad (1.12)$$

$$I = I_0 \exp(-Kl) \quad (1.13)$$

Em 1850, Beer aplicou a equação (1.13) a soluções diluídas de compostos dissolvidos num meio transparente. Propôs que K fosse proporcional a concentração molar c do composto. Assim a equação (1.13) é mais conhecida na forma (1.9) onde a absorvância A é representada por (1.14) com a transmitância T dada por (1.15):

$$A = -\log \frac{I}{I_0} \text{ ou } A = \log \frac{1}{T} \quad (1.14)$$

$$T = \frac{I}{I_0} \text{ ou } \% T = \left(\frac{I}{I_0} \right) \times 100 \quad (1.15)$$

A relação entre a concentração do composto de interesse e a intensidade de luz absorvida dada pela lei de Lambert-Beer é a base das aplicações quantitativas da espectrofotometria de UV-Vis. A lei de Lambert-Beer é aplicável nas seguintes condições [122]:

- A luz deve ser monocromática.
- A concentração do composto deve ser baixa.
- A solução não deve apresentar fluorescência e ser homogénea.
- O composto em solução não deve apresentar reacções fotoquímicas.
- O composto em solução não deve formar associações variáveis com o solvente.

Na determinação da concentração através da espectrofotometria de UV-Vis podem ser obtidos resultados afectados de erro devido a varias causas de erro de origem instrumental e química.

Na maioria da instrumentação analítica existem três causas independentes de erro instrumental que afectam a transmitância. O ruído de fundo da fonte de radiação, o ruído do detector e a reflexão e dispersão da luz no caminho óptico no instrumento. Estas fontes de erro são aditivas o que acusa uma variação do erro total da determinação de

concentração com máximos a valores elevados de absorvância e um mínimo por volta de uma absorvância de 0.7. A gama ideal de absorvância para a maioria das determinações em instrumentos modernos é entre 0.5 e 1.5 [125,126].

Outros factores instrumentais que podem afectar a determinação da concentração em alguns espectrofotómetros são a largura das fendas espectrais e a velocidade de varrimento de obtenção de espectros importante quando todo o espectro é empregue. Com larguras de fendas maiores perde-se a estrutura fina das bandas espectrais e o feixe de radiação deixa de ser monocromático. Com o aumento da velocidade de varrimento dos espectros há tendência para a distorção do espectro na direcção do varrimento com alteração dos máximos, mínimos assim como a diminuição da intensidade dos picos [122].

Causas de erro de origem química configuram geralmente desvios à lei de Lambert-Beer e podem ser controladas se forem reconhecidas como potenciais fontes de erro. Interações soluto-soluto que podem levar a uma aparente diminuição da concentração do composto. Presença de substâncias na solução do composto que possam absorver ao mesmo c.d.o., consideradas interferentes. Agregação a altas concentrações de compostos aromáticos policíclicos hidrofóbicos, dimerização ou mesmo polimerização ou ainda no caso de amostras de origem natural que podem conter partículas micelares em solução que causam uma dispersão do feixe de radiação designada por efeito de Tyndall [122].

Em espectrofotometria de UV-Vis são obtidos dados de ordem zero quando uma leitura é efectuada a um c.d.o. único, dados de primeira ordem quando um espectro de absorvância é obtido e dados de segunda ordem com a obtenção de vários espectros de absorvância por variação de um parâmetro experimental. O parâmetro experimental pode ser o pH quando as características das substâncias em análise variam com o pH ou a concentração das substâncias presentes por alteração das propriedades do equilíbrio químico ou o tempo quando a cinética de uma reacção química é acompanhada pela variação de absorvância com o tempo.

Para os mesmos pressupostos a relação (1.9) que relaciona a A com a concentração c é também válida para os dados obtidos de primeira ordem e de segunda ordem em que respectivamente um vector e uma matriz de dados de absorvâncias estão linearmente relacionados com a concentração por um vector ou uma matriz de ϵb .

1.4.2. Fluorescência

Após a absorção de energia de um feixe de radiação por certos compostos, a relaxação da energia pode acontecer através da emissão de radiação ou através de transições que não emitem radiação. As transições que emitem radiação são a fluorescência e a fosforescência. A emissão de radiação ocorre frequentemente em moléculas cíclicas, rígidas que contêm electrões π (aromáticas).

De acordo com a lei de Stokes a banda de emissão espectral máxima está localizada a um c.d.o. maior do que o c.d.o. da banda de excitação máxima do feixe de radiação incidente. Após a excitação a intensidade do feixe de radiação decai exponencialmente de acordo com a equação (1.16) que relaciona a intensidade instantânea com o tempo:

$$I_f = I_0 \exp(-K_f t) \quad (1.16)$$

A fluorescência tem uma emissão de radiação rápida (10^{-8} s) e a fosforescência a emissão de radiação é retardada no tempo.

Nem toda a intensidade de radiação absorvida é emitida na forma de fluorescência. Processos de conversão interna, cruzamento inter-sistemas e de extinção competem com a fluorescência. Em solução, o rendimento quântico de fluorescência Φ_f (com valores entre 0 e 1 inclusive) é independente da radiação emitida pela fonte de radiação e é definido através da fracção da radiação incidente absorvida I_a que é reemitida como fluorescência I_f (1.17):

$$\phi_f = \frac{I_f}{I_a} \quad (1.17)$$

Com $I_a = I_0 - I_t$ em que I_t é a intensidade de radiação transmitida então a equação relativa a I_f é dada por:

$$I_f = \phi_f (I_0 - I_t) \quad (1.18)$$

$$I_f = \phi_f I_0 \left(1 - \frac{I_t}{I_0} \right) \quad (1.19)$$

Sabendo que a absorvância de radiação é definida pela equação (1.14), e se encontra relacionada com a concentração pela lei de Lambert-Beer, então a equação (1.18) é dada por:

$$I_f = \phi_f I_0 (1 - 10^{-A}) \text{ com } \frac{I_f}{I_0} = 10^{-A} \text{ e } A = \varepsilon bc \quad (1.20)$$

Esta equação indica que a intensidade de fluorescência está relacionada com a concentração do composto que absorve a radiação pela lei de Lambert-Beer. A intensidade de fluorescência não varia linearmente mas exponencialmente com a concentração do composto. O termo exponencial pode ser transformado numa série de potências:

$$I_f = \left(2.303\varepsilon bc - \frac{(2.303\varepsilon bc)^2}{2!} + \frac{(2.303\varepsilon bc)^3}{3!} - \dots \right) \phi_f I_0 \quad (1.21)$$

No limite, para concentrações baixas do composto $A \leq 0.02$, os termos superiores na equação (1.21) podem ser negligenciados (dentro de 2.303% de erro) [123]. A expressão em parêntesis da equação (1.21) pode ser simplificada com o termo entre parêntesis equivalente à $2.303A$ e assim a equação (1.18) vem:

$$I_f = 2.303\phi_f I_0 \varepsilon bc \quad (1.22)$$

Em que I_0 é a intensidade do feixe de radiação de excitação, c é a concentração molar do composto, b é a espessura da solução atravessada pelo feixe de radiação, ε o coeficiente de absorção molar do composto e Φ_f o rendimento quântico de fluorescência.

Se todos os parâmetros devidos ao instrumento e a maioria dos do composto forem englobados numa constante K então a equação (1.22) pode ser escrita da seguinte forma:

$$I_f = KI_0 c \quad (1.23)$$

Esta equação é válida para concentrações baixas do composto. Para se obterem bons resultados em fluorescência devem ser utilizadas soluções diluídas.

Também, a intensidade de fluorescência é influenciada por diversos factores de origem instrumental e do meio em que é feita a determinação.

A intensidade de fluorescência depende da posição de onde a emissão do feixe de radiação ocorre relativamente ao detector. Efeitos de filtro em que parte da radiação incidente é absorvida antes de chegar ao ponto de emissão e efeitos de filtro em que parte da radiação emitida durante a fluorescência é retida dentro da célula. O primeiro tipo de efeitos é designado por primário e advém do facto de parte da célula que contém o composto estar escudada do detector pelo recipiente que suporta a célula e pela parte óptica instrumental. O segundo tipo de efeitos é designado por secundário e advém do

facto de parte da radiação emitida ser novamente absorvida pela amostra no percurso para o detector [125].

Diferentes tipos de factores como o solvente, pH, temperatura, viscosidade e alta concentração influenciam a fluorescência. A polaridade do solvente desempenha um papel importante na determinação das posições espectrais e intensidades em que ocorrem as bandas de fluorescência. O pH ao provocar dissociação de grupos ácidos funcionais ou protonação de grupos básicos funcionais associados com as porções aromáticas das moléculas fluorescentes influencia a fluorescência. A temperatura e a viscosidade da solução influenciam a velocidade dos processos competitivos da fluorescência. A alta concentração do composto principal além de desvios a linearidade devido a sua grande absorvância podem ocorrer também interações soluto-soluto numa gama ampla de concentrações do composto que devem também ser tomadas em consideração na diminuição de intensidade de fluorescência por aumento da concentração [123,125].

Os dois tipos de efeitos de dispersão de luz que interferem na determinação da intensidade de fluorescência são o efeito de Rayleigh e o efeito de Raman. Ambos acontecem a c.d.o. de excitação e de emissão próximos. O efeito de Rayleigh é a emissão por parte das moléculas de solvente de parte do feixe de radiação de excitação. Essa emissão ocorre ao mesmo c.d.o. de excitação (dispersão de primeira ordem) e ao dobro do (c.d.o. de excitação) dispersão de segunda ordem, e é independente do ângulo de observação. O efeito de Raman, 100 a 1000 vezes mais fraco do que o anterior, acontece pela transferência de parte da radiação do feixe de radiação de excitação para as moléculas de solvente na forma de energia vibracional. Esta banda de emissão encontra-se ligeiramente desviada para c.d.o. de emissão superiores relativamente ao c.d.o. do feixe de radiação de excitação [125].

Uma causa de erro de origem química nas medições de fluorescência pode ser a existência de outros compostos que interferem com a fluorescência do composto principal. Ao fenómeno de diminuição da intensidade de radiação por efeito de filtro está associado um fenómeno de extinção química da fluorescência do composto principal por parte de outros compostos em solução que pode também causar sub estimação da fluorescência. Além deste tipo de interferência alguns dos compostos presentes podem emitir na banda de emissão do composto o que provoca uma sobre-estimação da sua fluorescência.

Em espectrofotometria de fluorescência obtém-se dados de ordem zero quando uma leitura é efectuada a um determinado c.d.o. de excitação e de emissão, dados de primeira ordem quando é obtido um espectro de fluorescência fixando um c.d.o. de excitação ou de emissão e dados de segunda ordem quando são obtidos vários espectros de emissão de fluorescência a diferentes c.d.o. de excitação (MEE).

Também em espectrofotometria de fluorescência com medição de tempo de vida dados de segunda ordem podem ser obtidos recolhendo a um determinado c.d.o. de excitação ou de emissão diferentes espectros de emissão ou excitação a tempos diferentes de decaimento de fluorescência. Ainda é possível, com espectrofotometria de fluorescência com medição de tempo de vida, obter dados de terceira ordem recolhendo MEE a tempos diferentes de decaimento de fluorescência.

Para os mesmos pressupostos a relação (1.22) que relaciona a I_f com a concentração c é também válida para os dados obtidos de primeira ordem e de segunda ordem em que respectivamente um vector e uma matriz de dados de intensidades de fluorescência estão linearmente relacionados com a concentração por um vector e uma matriz de KI_0 .

1.5. Técnicas quimiométricas

Diversos autores definem genericamente a quimiometria como sendo a disciplina que aplica os métodos estatísticos e matemáticos à química. A definição mais aceite pela maioria dos autores é a definição dada por Massart que define a quimiometria como uma disciplina química que utiliza a matemática, estatística e lógica formal para a) delinear e seleccionar procedimentos experimentais, b) fornecer a máxima informação química relevante através da análise dos dados químicos e c) obter o conhecimento dos sistemas químicos [127].

A química analítica é provavelmente a área da química que mais beneficia com a quimiometria. Na química analítica a quimiometria trata essencialmente de estratégias de amostragem, do procedimento analítico e da interpretação dos resultados. As áreas principais de aplicação da quimiometria passam pelo planeamento ou selecção de métodos analíticos e procedimentos óptimos assim como pela extracção da máxima informação possível pela análise dos dados.

Ao longo do tempo observaram-se alterações no campo da química analítica e estatística que ajudaram a determinar novos campos e objectivos da quimiometria [128]. As grandes alterações na química analítica estão relacionados com o grande incremento no número e sofisticação da instrumentação química tornando disponível uma grande quantidade de dados. As alterações na estatística estão relacionadas com o aumento da sofisticação dos computadores permitindo uma maior capacidade de cálculo.

Desde que a quimiometria se tem desenvolvido como uma nova área da química que diversos artigos de revisão têm sido publicados em diversas revistas científicas. Tal facto permite ter uma ideia da própria evolução da quimiometria e das suas técnicas. Uma das últimas revisões no ano de 2003 foca preferencialmente a calibração multivariada, reconhecimento de padrão e resolução de misturas [128].

A revista *Analytical Chemistry* tem, desde 1980, publicado artigos de revisão com o título de quimiometria. Os quatro últimos artigos de revisão que cobrem o período de 1995 até a última revisão em 2004 focam diversas áreas da quimiometria. O primeiro artigo de revisão de 1998 é mais abrangente englobando áreas como a estatística, optimização, processamento de sinal, resolução de misturas, calibração multivariada, cálculo de parâmetros, estudo de relações estrutura actividade, reconhecimento de padrão, pesquisa de

bibliotecas (“library searching”) e inteligência artificial [129]. O segundo artigo de revisão de 2000 foca essencialmente a área da quimiometria relacionada com a estrutura multivariada dos dados focando a resolução de curvas multivariada, calibração multivariada, análise multivariada e reconhecimento de padrão [130]. Outra área focada é a relação estrutura propriedade. O terceiro artigo de revisão de 2002 continuando a focar a característica multivariada dos dados foca no entanto preferencialmente áreas como a análise de imagem, quimiometria aplicada a sensores e quimioinformática (“chemoinformatics”) [131]. O último artigo de revisão de 2004, após referir as diferentes áreas de aplicação e os recursos disponíveis, foca preferencialmente a aplicação da quimiometria a análise de imagem, sensores e a micro estruturas [132]. Qualquer um destes artigos foca nalgum ponto a aplicação da quimiometria à análise química farmacêutica.

Têm também sido publicados desde os anos oitenta em diversas revistas artigos de revisão focando especificamente a aplicação da quimiometria à análise química farmacêutica [133-136]. Dois dos artigos de revisão publicados recentemente referem especificamente métodos de estatística multivariada aplicada a análise química farmacêutica nomeadamente planeamento experimental [137] e métodos de calibração multivariada [137,138]. Outro artigo também recentemente publicado aborda a aplicação da quimiometria à pesquisa, desenvolvimento e produção na indústria farmacêutica com exemplos dessa aplicação na pesquisa farmacêutica e na modelação de processos [139].

No desenvolvimento do trabalho efectuado foram utilizadas técnicas de optimização por planeamento experimental dos métodos analíticos utilizados e técnicas de calibração multivariada. Nas próximas duas secções será dada particular atenção às técnicas quimiométricas utilizadas.

1.5.1. Planeamento experimental

De forma à obtenção de métodos analíticos sensíveis, rápidos e simples, a optimização das metodologias utilizadas deve sempre que possível, ser feita através de técnicas de planeamento experimental.

O planeamento experimental é uma maneira de organizar a realização das experiências de uma forma sistemática. O seu objectivo é saber como o sistema se comporta, como

reage a variações de diferentes variáveis ou como determinar que variáveis têm realmente influência no sistema. Ao planejar de uma maneira sistemática as experiências é possível obter mais informação com o mínimo possível de experiências. Algumas aplicações são:

- Determinar quais das possíveis variáveis realmente tem influência no desempenho de um método analítico e sua gama de variação.
- Otimização de procedimentos analíticos, por determinação da influência das variáveis do modelo nos resultados analíticos, e determinação do ótimo do modelo.
- Avaliar a fiabilidade de um método analítico avaliando a sua estabilidade ou fiabilidade.

Para cada uma das diferentes situações existem muitos tipos de planeamentos de base do qual se destacam os seguintes [3,133]:

- 1) Plackett-Burman.
- 2) Factorial fraccionado.
- 3) Factorial total.
- 4) Compósito central.
- 5) Box Behnken.
- 6) Planeamento D-ótimo para não mistura.
- 7) Planeamentos de mistura (Simplex de grade e centróide, axial e D-ótimo) .

Os primeiros cinco tipos de planeamentos podem ser utilizados na maioria das situações. Os planeamentos experimentais Plackett-Burman, factorial fraccionado e factorial total são planeamentos experimentais de varrimento enquanto os planeamentos experimentais Box Behnken e compósito central são planeamentos experimentais de optimização. Os planeamentos de D-ótimo para não mistura e planeamentos de mistura podem ser planeamentos de varrimento ou optimização e são utilizados num determinado tipo de situações particulares. É de notar que o planeamento experimental factorial total com três ou mais níveis de resposta de variáveis contínuas é também usado como planeamento de optimização.

Nos planeamentos experimentais de varrimento um modelo linear é avaliado em toda a gama de variação das variáveis do desenho permitindo através da avaliação dos seus efeitos principais verificar quais as variáveis do desenho mais importantes. Neste tipo de planeamentos é também possível avaliar interacções possíveis entre as diferentes variáveis.

Os planeamentos experimentais de varrimento Plackett-Burman, factoriais fraccionados e totais aplicam-se a variáveis contínuas ou de categorias. O planeamento experimental de Plackett-Burman pode ser utilizado com um número de variáveis de planeamento entre 4 e 32 com dois níveis e permite avaliar só os efeitos principais. O planeamento experimental factorial fraccionado pode ser utilizado com um número de variáveis de desenho entre 3 e 15 com dois níveis e permite avaliar os efeitos principais e interacções com níveis diferentes de resolução atendendo ao número de experiências efectuado. O planeamento experimental factorial total pode ser utilizado com um número de variáveis de planeamento entre 2 e 6 com possibilidade entre dois e vinte níveis de cada variável e permite avaliar os efeitos principais e interacções [3,140]. Estes limites constituem uma indicação uma vez que um maior número de níveis poderiam ser estudados mas levaria a um número de experiências mais elevado.

Quando já se conhecem as variáveis mais importantes podem ser avaliados modelo quadráticos através dos planeamentos experimentais de optimização. Estes planeamentos permitem estudar os efeitos dessa variáveis com maior detalhe. Além de se poder avaliar os efeitos quadráticos podem também ser encontrados o máximo ou o mínimo de uma variável de resposta (ótimo), região de estabilidade de variáveis de resposta, encontrar um compromisso entre várias variáveis de resposta e descrever variações na resposta.

Os planeamentos experimentais de optimização de compósito central e Box Behnken aplicam-se a variáveis contínuas. O planeamento experimental de compósito central pode ser utilizado para um número de variáveis entre 2 e 6 com cinco níveis cada variável e o planeamento experimental Box Behnken pode ser utilizado para um número de variáveis entre 3 e 6 com três níveis cada variável [3,140].

O planeamento D-ótimo para não mistura é utilizado em situações em que só existam variáveis de processo contínuas e em que algumas variáveis apresentem restrições de multilinearidade para um número de variáveis do desenho de 2 a 12 como desenho de varrimento e de 2 a 6 como desenho de optimização. Os planeamentos experimentais de mistura são utilizados no caso de existirem variáveis de mistura contínuas ou de categorias, com a possibilidade de algumas variáveis serem de processo e de algumas variáveis poderem ser restringidas para um número de variáveis do planeamento de 3 a 15 ou 32 (axial) como planeamento de varrimento e de 3 a 16 como planeamento de optimização [3,140].

A estratégia geral num processo de optimização através de técnicas de planeamento experimental encontra-se esquematizada na Fig. 1.11.

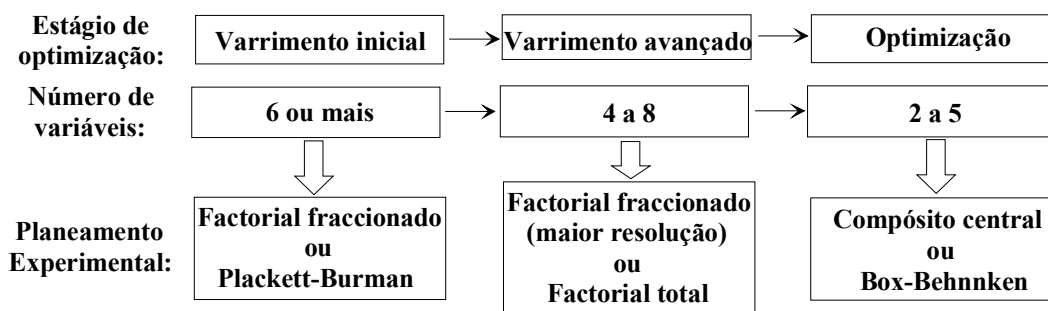


Fig. 1.11 – Representação esquemática de um processo de optimização através de técnicas de planeamento experimental.

A escolha do planeamento experimental tem que ser compatível com o objectivo definido, número de variáveis do planeamento, precisão das medições e ter um custo razoável. No âmbito desta dissertação qualquer um dos cinco primeiros tipos de planeamento experimental pode ser utilizado na optimização dos métodos analíticos desenvolvidos. Destes cinco só o planeamento experimental de Plackett-Burman, como planeamento de varrimento inicial com utilização específica para um número de variáveis superior a dez, não foi utilizado.

1.5.2. Métodos de calibração multivariada de segunda ordem

A calibração e conseqüente quantificação recorrendo a estruturas de dados tridimensionais pode ser feita recorrendo a métodos de decomposição tridimensional também designados por métodos de calibração multivariada de segunda ordem. Nesta dissertação foram utilizados métodos de calibração multivariada de segunda ordem. A utilização destes modelos de calibração irá permitir uma estimativa adequada de concentração com o mínimo de tratamento da amostra na presença de interferências químicas ou instrumentais. A aplicação a matrizes tridimensionais exige o conhecimento adequado da ordem da matriz. A ordem de uma matriz tridimensional corresponde ao menor número de componentes de um determinado modelo de calibração multivariada que origina o melhor ajuste.

Após o ajuste do modelo a calibração é efectuada atendendo as estimativas obtidas na dimensão de concentração. As estimativas de concentração obtidas são relacionadas com

as concentrações do padrão conhecidas por qualquer um dos métodos de calibração univariada ou de ordem zero como o método de calibração padrão, de adição de padrão ou factor de calibração.

O método de adição de padrão apresenta, como já referido, a vantagem de eliminar os efeitos da matriz na amostra relativamente ao conjunto de calibração externa. Além desse facto, quando a determinação instrumental esta sujeita a interferências (perfis de resposta instrumental do analito, a sensibilidade do instrumento ou os perfis de resposta instrumental de outras espécies estão dependentes de espécies presentes na amostra que não sejam o analito) os modelos trilineares são inapropriados para descrever a resposta instrumental de uma série de amostras. O modelo trilinear é aplicável se as amostras e os conjuntos de calibração são sujeitos às mesmas concentrações de espécies interferentes. A quantificação do analito é então possível com o método de adição de padrão. No entanto, a quantificação por este método não é possível na presença de algum tipo de “offset” instrumental (“offset” diferente de zero) pois assim não se distingue o sinal do analito do “offset”. Também a quantificação por este método não é possível se a função é não linear no que respeita à concentração do analito pois há uma perda de robustez na extrapolação por métodos não lineares. Assim, na avaliação do método e para aplicar o método de adição de padrão, há que garantir os pressupostos de “offset” 0 e que a função seja linear [5].

Os métodos de calibração multivariada de segunda ordem podem ser directos ou iterativos. De entre estes dois tipos de métodos de calibração multivariada de segunda ordem optou-se nesta dissertação pela aplicação dos métodos iterativos em detrimento dos métodos directos. Com os métodos iterativos é possível a aplicação de restrições durante o processo iterativo. Estes apresentam uma maior flexibilidade e robustez a pequenos erros do modelo. Além disso, com todos estes métodos é obtida uma estimativa de concentração para cada matriz de dados e assim é possível a aplicação posterior do método de adição de padrão.

Entre os métodos calibração multivariada de segunda ordem iterativos destacam-se os seguintes métodos [141,142]:

- Análise de factores paralelos (PARAFAC).
- Análise de factores paralelos dois (PARAFAC2).
- Resolução de curvas multivariada – mínimos quadrados alternados (MCR-ALS).

— Modelos Tucker (TUCKER1, TUCKER2 e TUCKER3)

De entre os modelos Tucker o modelo TUCKER3 de aplicação mais geral é considerado o mais importante. O modelo PARAFAC, de aplicação mais restrita, é considerado um caso especial dos modelos TUCKER. O modelo PARAFAC2 é uma generalização do modelo PARAFAC e, apesar de apresentar uma posição intermédia entre os modelos TUCKER3 e PARAFAC, não é facilmente obtido como um caso especial do modelo TUCKER3 [141]. Os modelos PARAFAC, PARAFAC2 e TUCKER aplicam-se a estruturas de dados tridimensionais. O modelo MCR-ALS aplica-se a dados bidimensionais sendo aplicado à matriz tridimensional após desconvolução da matriz tridimensional [142].

Os métodos MCR-ALS e TUCKER3 não assumem uma estrutura trilinear dos dados, sofrem de um problema de liberdade rotacional e não apresentam soluções únicas. O modelo PARAFAC assume uma estrutura trilinear dos dados, não apresenta essa liberdade rotacional e apresenta soluções únicas. O modelo PARAFAC2 assume desvios à trilinearidade em uma das dimensões mas pode, em determinadas condições, apresentar também soluções únicas. Tanto MCR-ALS como TUCKER3, atendendo ao conhecimento externo da estrutura dos dados necessitam da aplicação de restrições para estreitar ao máximo o número possível de soluções. Estes modelos apresentam, no entanto, uma maior flexibilidade de soluções.

A trilinearidade indica-nos que a estrutura de dados tem nas três dimensões o mesmo número de componentes enquanto uma estrutura de dados não trilinear tem nas três dimensões um número diferente de componentes que está relacionado com a sua ordem em cada uma das dimensões. Vários procedimentos matemáticos são possíveis de utilizar para avaliar a trilinearidade. A igualdade de ordem em cada uma das dimensões permite esta avaliação de trilinearidade, só não se aplicando se em uma das dimensões houver deficiência ou sobreposição de ordem.

Se houver igualdade de formas nas três dimensões estaremos na presença de dados que apresentam uma estrutura trilinear. Os dados espectrofotométricos como o espectro de UV-Vis ou espectros de fluorescência usualmente não variam para cada um dos compostos. No entanto, possíveis desvios a essa trilinearidade podem ser verificados tanto na avaliação de cinética de reacção por UV-Vis como nas MEE a diferentes concentrações por fluorescência. Na avaliação da cinética de reacção por UV-Vis, na dimensão dos espectros

de absorvância, diferenças no c.d.o. de absorvância máxima e na dimensão do tempo de reacção no tempo de reacção máximo podem ser considerados desvios à trilinearidade. Na obtenção das MEE a presença da dispersão de Rayleigh de primeira e segunda ordem, diferenças no c.d.o. de excitação e emissão máximo e desvios de forma devido ao ruído podem também configurar desvios à linearidade.

Além de outras referências, a seguir indicadas, que comparam a capacidade de resolução de dados tridimensionais de vários métodos de calibração multivariada, duas referências indicam especificamente os modelos acima indicados. Numa delas são comparados os modelos PARAFAC, TLD, PARAFAC2, TUCKER3 e MCR-ALS [143]. Numa outra são comparados os modelos PARATUCK2, TUCKER3 restringido e MCR-ALS [144]. Na primeira referência [143] a comparação é efectuada entre os modelos que assumem uma estrutura trilinear dos resultados e os que não o fazem na modelação de conjuntos não trilineares enquanto na segunda referência [144] os modelos acima indicados são comparados na modelação de estruturas de dados complexas. Na primeira referência o modelo MCR-ALS é considerado a melhor opção para lidar com estruturas de dados não trilineares e na segunda referência não foi possível a definição de um modelo mais adequado para modelar as estruturas de dados avaliadas. Fica no entanto claro em ambas as referências que o conhecimento da estrutura dos dados é essencial para a escolha do modelo mais adequado.

De entre os modelos de calibração multivariada de segunda ordem foram utilizados modelos que assumem graus diferentes de trilinearidade. Utilizou-se o modelo PARAFAC que assume a trilinearidade nas três dimensões, o modelo PARAFAC2 que permite desvios à trilinearidade em uma das dimensões e o modelo de calibração MCR-ALS, não trilinear mas com possibilidade de aplicação de restrição de trilinearidade em alguns dos componente. Os modelos TUCKER não foram utilizados.

PARAFAC

O algoritmo simultaneamente conhecido como PARAFAC (factores paralelos) e CAMDECOMP (decomposição canónica) que permite a análise de factores de estruturas tridimensionais foi proposto independentemente em 1970 por Carroll e Chang [145] e Harshman [146]. O método de calibração multivariada PARAFAC é um método de

decomposição para estruturas de três ou mais dimensões [140] e pode ser visto como uma generalização da análise de componentes principais (PCA) a estruturas de ordem superior.

Na Fig. 1.12 é representado esquematicamente o processo de decomposição de uma matriz tridimensional através do modelo PARAFAC de três componentes. O modelo adequado é encontrado através do mínimo do quadrado da soma dos resíduos \mathbf{E}_{ijk} do modelo.

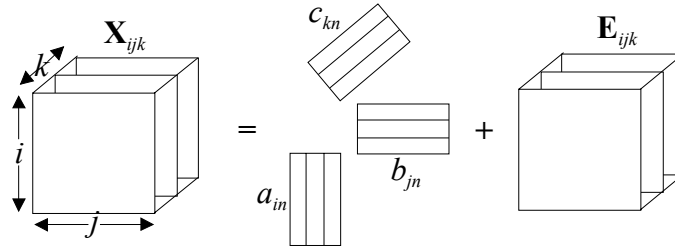


Fig. 1.12 – Representação esquemática de um processo de decomposição de uma matriz tridimensional com o modelo PARAFAC de três componentes.

O modelo PARAFAC de uma estrutura tridimensional $\underline{\mathbf{X}}$ ($i \times j \times k$) com elementos x_{ijk} é dado pelo produto de três matrizes \mathbf{A} ($i \times n$), \mathbf{B} ($j \times n$) e \mathbf{C} ($k \times n$) mais a matriz tridimensional dos resíduos $\underline{\mathbf{E}}$ ($i \times j \times k$) com elementos respectivamente a_{in} , b_{jn} , c_{kn} e e_{ijk} (1.24).

$$x_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + e_{ijk} \quad (1.24)$$

Em notação matricial o modelo é definido como em (1.25). Em que \mathbf{X}_k é a k matriz, \mathbf{D}_k é a matriz diagonal contendo a linha k de \mathbf{C} na sua diagonal, com elementos de 1 até n de \mathbf{C}_k , e \mathbf{E}_k é a matriz dos resíduos.

$$\mathbf{X}_k = \mathbf{A} \mathbf{D}_k \mathbf{B}^T + \mathbf{E}_k \quad (1.25)$$

Introduzindo o produto de Khatri-Rao e representando a matriz $\underline{\mathbf{X}}$ na forma de uma matriz de linha aumentada \mathbf{X} ($i \times m$), com $m = j \times k$, então a equação (1.25) pode ser representada na forma da equação (1.26) e (1.27), mais simplificada, com a matriz \mathbf{E} dos resíduos de dimensões ($i \times m$).

$$\mathbf{X} = \mathbf{A}(\mathbf{C} \odot \mathbf{B})^T + \mathbf{E} \quad (1.26)$$

$$\mathbf{X} = \mathbf{A} \mathbf{B}^T + \mathbf{E} \quad (1.27)$$

Num artigo de revisão os algoritmos mais recentes propostos para ajustar o modelo PARAFAC foram objecto de uma revisão crítica [147]. O modelo de análise de factores paralelos iterativo mais utilizado é o que recorre ao algoritmo de ALS [146,148]. Com este algoritmo o modelo PARAFAC mais adequado é encontrado assumindo sucessivamente

que as soluções em duas das dimensões são conhecidas e estimando a solução na outra dimensão [149]. Atendendo a (1.26) a estimativa de \mathbf{A} pelos mínimos quadrados é dada por (1.28), $\mathbf{Z} = \mathbf{C} \odot \mathbf{B}$.

$$\mathbf{A} = \mathbf{X}(\mathbf{Z}^T)^+ + \mathbf{E} = \mathbf{XZ}(\mathbf{ZZ}^T)^{-1} + \mathbf{E} \quad (1.28)$$

$$\min_{\mathbf{A}, \mathbf{B}, \mathbf{C}} \left\| \mathbf{X} - \mathbf{A}(\mathbf{C} \odot \mathbf{B})^T \right\|_F^2 \quad (1.29)$$

Assim a sequência de operações no modelo PARAFAC de decomposição de uma matriz tridimensional através do algoritmo de ALS é a seguinte:

1. Decidir o número de componentes (n).
2. Inicializar com \mathbf{B} e \mathbf{C} .
3. Estimar \mathbf{A} a partir de \mathbf{X} , \mathbf{B} e \mathbf{C} ($\mathbf{Z} = \mathbf{C} \odot \mathbf{B}$ e $\mathbf{A} = \mathbf{XZ}(\mathbf{Z}^T \mathbf{Z})^+$).
4. Estimar \mathbf{B} como em 3.
5. Estimar \mathbf{C} como em 3.
6. Optimização por ALS a partir de 2 até satisfazer o critério de convergência.

O ajuste pelo modelo PARAFAC encontra-se descrito em algumas publicações [149-151]. No ajuste deste modelo, podem ser utilizados métodos de inicialização e restrições à solução diferentes. Os métodos de inicialização mais habituais são DTLD ou GRAM, vectores de decomposição de valor singular (SVD), valores aleatórios ortogonalizados ou ainda resultados prévios de ajuste. Restrições de não negatividade, unimodalidade, ortogonalidade e fixação da solução de alguma das dimensões podem ser utilizadas nas matrizes estimadas para melhorar a interpretação e estabilidade da solução. A ponderação através de uma regressão ponderada pode ser efectuada se uma matriz de ponderação de tamanho igual a matriz tridimensional for indicada.

Na Tabela 1.8 são apresentadas as referências encontradas na literatura em que se procede a análise química por decomposição tridimensional recorrendo ao modelo PARAFAC. Nalguns casos é efectuada unicamente a identificação dos analitos e noutros é também efectuada a quantificação. A técnica instrumental utilizada, outros métodos de calibração utilizados e as amostras e compostos analisados são aí indicados.

Tabela 1.8 – Análise química por PARAFAC.*

Técnica instrumental	Métodos de calibração	Amostras analisadas / Compostos analisados	Ref.
Análise farmacêutica			
HPLC-DAD	PARAFAC	Matéria prima e formulação farmacêutica / Lidocaína e prilocaína	152
GC-MS	PARAFAC, DTLT, PARAFAC2, TUCKER3 e 3-PLS	Matrizes biológicas / Piroxicam	153
Espectrofotometria (variação de pH)	PARAFAC, PLS2 e N-PLS	Amostras sintéticas e formulações farmacêuticas / Ácido acetilsalicílico e ascórbico	154
Espectrofluorimetria (MEE)	PARAFAC e TLD	Matéria prima e formulação farmacêutica / Verapamil	155
Espectrofluorimetria (MEE e sincronizada)	PARAFAC, IRGRAM, SWATLD e PLS	Soro diluído e urina humanas fortificadas / Naproxeno, ácido salicílico e ácido salicílico	156
Espectrofluorimetria (MEE)	PARAFAC e BLLS	Urina humana diluída fortificada e não fortificada / Ciprofloxacina	157
Espectrofluorimetria (MEE)	PARAFAC, N-PLS e PLS1	Soro diluído humano fortificado / Norfloxacina, enoxacina e ofloxacina	158
Espectrofluorimetria (MEE/estado sólido)	PARAFAC, N-PLS, SWATLD e PLS1	Amostras sintéticas, formulações farmacêuticas e soro humano fortificado / Carbamazepina e principal metabolito	159
Espectrofluorimetria (MEE/solução e estado sólido)	PARAFAC e SWATLD	Soro humano fortificado e não fortificado / Piroxicam	160
Espectrofluorimetria (sincronizada/ variação de pH)	PARAFAC	Amostras sintéticas / Ácido acetilsalicílico e metabolitos	161
Espectrofluorimetria (MEE)	PARAFAC e N-PLS	Amostras de soro fortificadas / Doxorubicina	162
FIA-Cromatografia-DAD	PARAFAC e 3-PLS	Amostras sintéticas / Heparina, dextrano e hexacianoferrato (III) de potássio	163
Análise clínica			
Espectrofotometria (cinética de reacção)	PARAFAC e TLD	Soro humano e amostras sintéticas / Creatinina	164
Espectrofluorimetria (MEE/FIA)	PARAFAC e N-PLS	Amostras sintéticas / Adrenalina e noradrenalina	165
Análise Alimentar			
GC-FID / Painel sensorial	PARAFAC, N-PCA e TUCKER3	Amostra sintética / Amino ácidos e açúcares	166
Espectrofluorimetria (MEE)	PARAFAC e N-PLS	Açúcar e produto intermédio / Amino ácidos	167
Espectrofluorimetria (MEE) / HPLC	PARAFAC	Açúcar e produto intermédio / Amino ácidos	168
Espectrofluorimetria (MEE)	PARAFAC e N-PCA	Azeite / Clorofilas, produtos de oxidação e vitamina E	169

(Continua)

Tabela 1.8 (Continuação)

Técnica instrumental	Métodos de calibração	Amostras analisadas / Compostos analisados	Ref.
Análise ambiental			
HPLC-DAD	PARAFAC2, PARAFAC, TUCKER3 e MCR-ALS	Dados simulados e Água / Pesticidas organofosforados	143
HPLC-DAD	PARAFAC, GRAM e MCR-ALS	Amostras sintéticas e água / Compostos fenólicos e pesticidas	170
GC-GC/TOFMS	PARAFAC e TLD	Amostra complexa ambiental / Compostos da gasolina, pesticidas e produtos naturais	171
Espectrofotometria (cinética de reacção)	PARAFAC, N-PLS e ANN	Amostras de vegetais e fruta fortificadas / Carbamatos	172
Espectrofotometria (cinética de reacção)	PARAFAC, MCR-ALS e N-PLS	Amostras sintéticas e formulações comerciais / Pesticidas	173
Espectrofotometria (cinética de reacção)	PARAFAC	Extracto de pétalas de flores / Antocianinas e produtos de degradação	174
Espectrofotometria (cinética de reacção)	PARAFAC	Amostras sintéticas / Misturas binárias ou ternárias de metais	175
Espectrofluorimetria (MEE)	PARAFAC	Amostras de água do oceano / Hidrocarbonetos poliaromáticos	176
Espectrofluorimetria (MEE)	PARAFAC	Amostras sintéticas em metanol / Carbamatos	177
Espectrofluorimetria (MEE)	PARAFAC, PLS1, PLS2, 3-PLS1 e 3-PLS2	Amostras sintéticas e de água fortificada / Hidrocarbonetos poliaromáticos	178
Espectrofluorimetria (MEE)	PARAFAC	Amostras sintéticas / Pesticidas	179
Espectrofluorimetria (MEE)	PARAFAC, PLS e N-PLS	Óleos de peixe / Dioxinas	180
Espectrofluorimetria (MEE)	PARAFAC	Amostras sintéticas e água / Clorofilas e produtos de degradação	181
Espectrofluorimetria (MEE/resolução de tempo)	PARAFAC e N-PLS	Amostras sintéticas / Hidrocarbonetos poliaromáticos	182
Espectrofluorimetria (MEE)	PARAFAC	Espinafres / Clorofilas e produtos de degradação	183
Espectrofluorimetria (MEE)	PARAFAC	Água do oceano fortificada / Hidrocarbonetos poliaromáticos	184
Espectrofluorimetria (MEE)	PARAFAC	Amostras sintéticas / Hidrocarbonetos poliaromáticos e carbamatos	185
Espectrofluorimetria (MEE)	PARAFAC	Amostras sintéticas / Hidrocarbonetos poliaromáticos, pesticida (tipo DDT) e carbamatos	186
Outras aplicações			
GC-GC	PARAFAC, PARAFAC2 e N-PLS	Perfumes / Essências	187

* Ver rodapé da Tabela 1.3.

É de notar que o maior número de aplicações nas diferentes áreas da análise química que geram dados tridimensionais modelados por PARAFAC recorre a espectrofotometria de fluorescência [155-162,165, 167-169, 176-186]. Numa aplicação em análise ambiental as matrizes de dados com quatro dimensões são modeladas por PARAFAC [182]. As outras técnicas analíticas utilizadas são técnicas cromatográficas [143,152,153,163,166,170,171] e espectrofotometria de UV-Vis seguindo a cinética de um reacção [164,172-175] ou com variação do pH [154]. De entre as técnicas cromatográficas utilizadas duas são técnicas de HPLC com detecção de fila de díodos [143,152,170] e três são de CG [153,166,171,187] sendo duas delas com sistemas de duas CG acopladas (GC-GC) e todas com sistemas de detecção diferentes.

A nível das amostras e compostos analisados, verifica-se que na análise química farmacêutica diversos compostos terapêuticamente activos são analisados na matéria prima, formulações farmacêuticas, amostras sintéticas e amostras biológicas (soro sanguíneo e urina). É de notar que a análise em matrizes biológicas é normalmente feita após diluição da amostra e/ou fortificação da amostra. Na análise química ambiental é de notar também o grande número de aplicações com hidrocarbonetos poliaromáticos e pesticidas analisados em amostras sintéticas e amostras de água.

São encontradas na bibliografia, além das anteriormente citadas, algumas referências que focam especificamente a modelação por PARAFAC. Algumas referindo aspectos gerais da modelação por PARAFAC como a determinação do número de componentes [188,189] e o pré processamento das matrizes [190]. Outras referindo especificamente a modelação por PARAFAC de dados tridimensionais obtidos por fluorescência [191-193] e por HPLC-DAD [192,194]. São encontradas ainda algumas referências focando áreas de aplicação específicas como a análise de processos químicos [195,196] e a análise de imagem [197] comparando a modelação de PARAFAC com a obtida com outros métodos de análise multivariada.

PARAFAC2

O modelo PARAFAC2 foi inicialmente proposto em 1972 por Harshman [198]. Tal como já referido, este modelo é uma generalização do modelo PARAFAC e permite desvios a trilinearidade em uma das dimensões [141]. Em conjuntos de dados idealmente

trilineares podem acontecer desvios à trilinearidade. Tais desvios podem advir de problemas de amostragem ou artefactos físicos ou ainda de diferentes dimensões de linha ou coluna do conjunto das matrizes [150]. Assim o modelo PARAFAC2 é um dos modelos que permite um melhor ajuste destas estruturas de dados.

Na Fig. 1.13 é representado esquematicamente o processo de decomposição de uma matriz tridimensional através do modelo PARAFAC2 de três componentes. O modelo adequado é encontrado através do mínimo dos quadrados da soma dos resíduos \mathbf{E}_{ijk} do modelo.

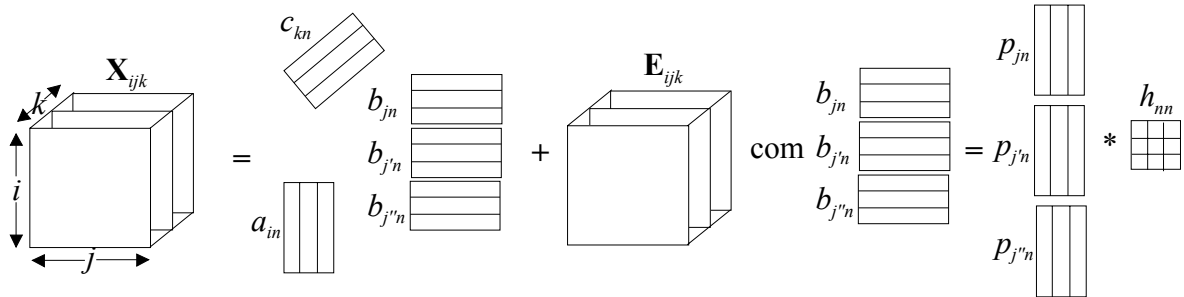


Fig. 1.13 – Representação esquemática de um processo de decomposição de uma matriz tridimensional com o modelo PARAFAC2 de três componentes.

O modelo PARAFAC2 de uma estrutura tridimensional $\underline{\mathbf{X}}$ ($i \times j \times k$) com elementos x_{ijk} é dado pelo produto das matrizes \mathbf{A} ($i \times n$), \mathbf{A} ($j \times n'$), \mathbf{C} ($k \times n$), \mathbf{C} ($k \times n'$) e da matriz \mathbf{H} ($n \times n'$) mais a matriz tridimensional dos resíduos $\underline{\mathbf{E}}$ ($i \times j \times k$) com elementos respectivamente a_{in} , $a_{jn'}$, b_{jn} , c_{kn} , $c_{kn'}$, $h_{nn'}$ e e_{ijk} (1.30). Em notação matricial o modelo é definido como em (1.31).

$$x_{ijk} = \sum_{n=1}^N \sum_{n'=1}^{N'} a_{in} a_{jn'} h_{nn'} c_{kn} c_{kn'} + e_{ijk} \quad (1.30)$$

$$\mathbf{X}_k = \mathbf{A}_k \mathbf{D}_k \mathbf{B}^T + \mathbf{E}_k \quad (1.31)$$

No modelo PARAFAC2, considerando o modelo de PARAFAC válido, e se em vez de se modelar directamente a matriz \mathbf{X}_k , se modelar uma estrutura consistindo das matrizes $\mathbf{X}_k \mathbf{X}_k^T$ então o modelo PARAFAC2 vem dado por (1.32), ou na sua forma simplificada por (1.33) com $\mathbf{Y}_k = \mathbf{X}_k \mathbf{X}_k^T$ e $\mathbf{H} = \mathbf{B}^T \mathbf{B}$.

$$\mathbf{X}_k \mathbf{X}_k^T = \mathbf{A} \mathbf{D}_k \mathbf{B}^T \mathbf{B} \mathbf{D}_k \mathbf{A}^T + \mathbf{E}_k \mathbf{E}_k^T \quad (1.32)$$

$$\mathbf{Y}_k = \mathbf{A} \mathbf{D}_k \mathbf{H} \mathbf{D}_k \mathbf{A}^T + \mathbf{E}_k \mathbf{E}_k^T \quad (1.33)$$

Introduzindo o produto de Khatri-Rao e rearranjando a matriz \mathbf{Y} ($i \times ik$) em uma matriz \mathbf{Y} ($k \times ii$) é possível estabelecer o modelo de PARAFAC2 como em (1.34). Com $\mathbf{H} = \mathbf{B}^T \mathbf{B}$ a

equação (1.34) pode ser dada por (1.35). Esta equação é equivalente a assumir o modelo $\hat{\mathbf{X}}_k$ em que \mathbf{B} ($n \times n$) e \mathbf{P}_k é uma matriz coluna ortogonal de dimensão ($j \times n$) com $j \geq n$.

$$\mathbf{Y} = (\mathbf{C}^T \odot \mathbf{C}^T) \text{diag}(\text{vec} \mathbf{H}) (\mathbf{A}^T \odot \mathbf{A}^T) + \mathbf{E} \quad (1.34)$$

$$\hat{\mathbf{X}}_k = \mathbf{A} \mathbf{D}_k (\mathbf{B}_k)^T + \hat{\mathbf{E}}_k = \mathbf{A} \mathbf{D}_k (\mathbf{P}_k \mathbf{B})^T + \hat{\mathbf{E}}_k \quad (1.35)$$

Uma vez que só \mathbf{Y}_k é modelado e não \mathbf{X}_k , é possível ter \mathbf{X}_k matrizes de diferentes dimensões de coluna. Também, só \mathbf{H} é estimado e não \mathbf{B} em si mesmo. Assim o modelo só requer que \mathbf{H} seja o mesmo e não requer que os perfis de \mathbf{B} sejam idênticos podendo então estes ser diferentes.

Apesar de na altura em que o modelo PARAFAC2 foi proposto ser referido o trabalho efectuado para se encontrar a maneira mais eficiente de ajustar o modelo só em 1993 foi publicado um algoritmo para ajustar o modelo [199] e só em 1998 o mesmo autor propôs um algoritmo mais simples de ajuste directo do modelo [200]. O algoritmo de ajuste directo do modelo PARAFAC2 que recorre ao algoritmo de ALS encontra-se descrito [150,200].

Com este algoritmo o modelo PARAFAC2 mais adequado é encontrado estimando para cada k a matriz \mathbf{Y}_k e determinando as matrizes \mathbf{A} , \mathbf{B} e \mathbf{C} . O modelo mais adequado é encontrado não minimizando os resíduos \mathbf{E}_k , mas encontrando o mínimo da função (1.35) para cada k . O mínimo da função é encontrado na forma (1.36) ou equivalente (1.37).

$$\min_{\mathbf{A}, \mathbf{C}, \mathbf{B}, \mathbf{P}_k} \sum_{k=1}^K \left\| \mathbf{X}_k - \mathbf{A} \mathbf{D}_k (\mathbf{P}_k \mathbf{B})^T \right\|_F^2 \quad (1.36)$$

$$\min_{\mathbf{A}, \mathbf{C}, \mathbf{B}, \mathbf{P}_k} \sum_{k=1}^K \left\| \mathbf{X}_k \mathbf{P}_k - \mathbf{A} \mathbf{D}_k \mathbf{B}^T \right\|_F^2 \quad (1.37)$$

Assim a sequência de operações no modelo PARAFAC2 de decomposição de uma matriz tridimensional através do algoritmo de ALS directo é a seguinte:

1. Decidir o número de componentes (n).
2. Inicializar com \mathbf{A} , \mathbf{B} e \mathbf{C} .
3. Para cada k estimar $\mathbf{Q}_k = \mathbf{X}_k^T \mathbf{A} \mathbf{D}_k \mathbf{B}^T$ e $\mathbf{P}_k = \mathbf{Q}_k (\mathbf{Q}_k^T \mathbf{Q}_k)^{-1}$.
4. Para cada k estimar $\mathbf{Y}_k = \mathbf{X}_k \mathbf{P}_k$.
5. Determinar as matrizes em cada uma das dimensões a partir de $\underline{\mathbf{Y}}$.
6. Optimização por ALS a partir de 3 até satisfazer o critério de convergência.

No ajuste deste modelo, podem ser utilizados métodos de inicialização e restrições a solução diferentes. Os métodos de inicialização mais habituais são SVD, valores aleatórios ou ainda resultados prévios de ajuste. Restrições de não negatividade, unimodalidade, ortogonalidade da solução na primeira e terceira dimensões podem ser utilizados nas matrizes estimadas para melhorar a interpretação e estabilidade da solução [150,200].

Na Tabela 1.9 são apresentadas as referências encontradas na literatura em que se procede a análise química por decomposição tridimensional recorrendo ao modelo PARAFAC2. Nalguns caso é efectuada unicamente a identificação dos analitos e noutros é também efectuada a quantificação. A técnica instrumental utilizada, outros métodos de calibração utilizados e as amostras e compostos analisados são aí indicados.

Tabela 1.9 – Análise química por PARAFAC2.*

Técnica instrumental	Métodos de calibração	Amostras analisadas / Compostos analisados	Ref.
Análise farmacêutica			
GC-MS	PARAFAC2, PARAFAC, DTLTD, TUCKER3 e 3-PLS	Matrizes biológicas / Piroxicam	153
Análise Alimentar			
HPLC-DAD	PARAFAC2	Dados simulados e produto intermédio da produção da refinação do açúcar / Açúcares, amino ácidos e fenóis	201
GC-MS	PARAFAC2	Amostras sintéticas / Estrogénios	202
Análise ambiental			
HPLC-DAD	PARAFAC2, PARAFAC, TUCKER3 e MCR-ALS	Dados simulados e Água / Pesticidas organofosforados	143
Outras aplicações			
GC-GC	PARAFAC2, PARAFAC e N-PLS	Perfumes / Essências	187
Espectrofotometria (tempo de reacção)	PARAFAC2 e PARAFAC	Amostras sintéticas / Isómeros do aminofenol	203

* Ver rodapé da Tabela 1.3.

Como se pode ver na Tabela 1.9 poucas referências são encontradas na literatura envolvendo a modelação por PARAFAC2 em análise química. Das referências encontradas três delas já foram anteriormente referidas [143,153,187]. Um artigo que envolve a comparação entre vários métodos de decomposição tridimensional com aplicação a dados cromatográficos simulados e reais ambientais [143], uma aplicação em análise farmacêutica recorrendo a GC-MS [153] e uma análise de essências em perfumes por GC-GC [187]. São encontradas amostras e compostos analisados idênticos aos analisados por

PARAFAC e na maioria das referências os mesmos conjuntos de dados são também modelados por este modelo.

Além destas referências mais quatro referências são encontradas. Duas são aplicações em análise alimentar, uma que envolve a modelação de dados cromatográficos com desvios do tempo de retenção [201] e outra com determinação de estrogénios por GC-MS [202]. Das outras duas referências uma envolve a espectrofotometria de UV-Vis seguindo a cinética de um reacção para a resolução de misturas de isómeros [203] e ainda uma terceira referência, não indicada na Tabela 1.9, que é uma aplicação em análise de processos químicos de semi-condutores que modela dados obtidos com tempos diferentes de processo químico [204].

MCR-ALS

O modelo de MCR-ALS faz parte de uma série de metodologias de resolução que têm o seu início nos anos 70 e 80 [205,206]. Nestes métodos de resolução uma resposta instrumental é decomposta matematicamente nas contribuições de cada componente no sistema. Metodologias de resolução de curvas iterativas tal como a análise de factores emergentes (EFA) baseadas no algoritmo de ALS como a que usa o modelo MCR-ALS começaram a ser utilizadas nos anos 80 [207,208]. O método de calibração multivariada MCR-ALS é um método iterativo de decomposição para estruturas de dados bidimensionais que foi alargado para a decomposição de dados tridimensionais [142,209-210]. Em dados tridimensionais o modelo MCR-ALS, tal como já referido, não assume a trilinearidade dos dados permitindo no entanto a aplicação de uma restrição de trilinearidade em todas ou só em algumas das espécies presentes [142].

Na Fig. 1.14 é representado esquematicamente o processo de decomposição de uma matriz tridimensional após desconvulsão numa matriz de coluna aumentada através do modelo MCR-ALS de três componentes. O modelo adequado é encontrado através do mínimo do quadrado da soma dos resíduos do modelo $\mathbf{E}_{(k \times i)j}$.

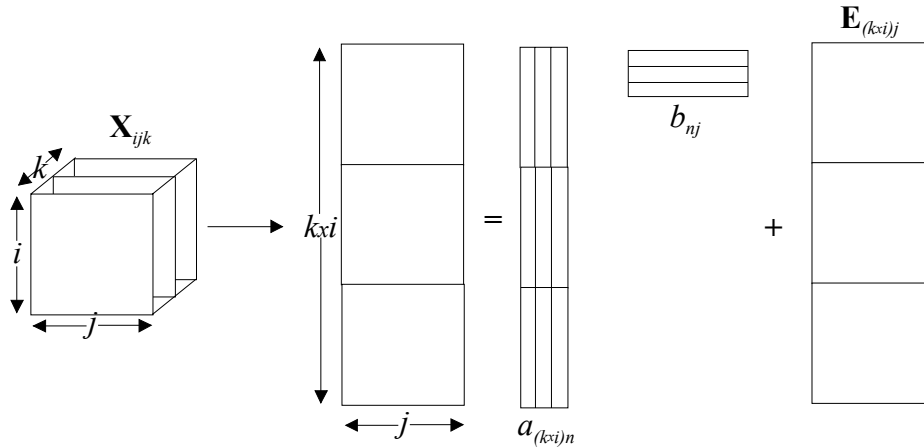


Fig. 1.14 – Representação esquemática de um processo de decomposição de uma matriz tridimensional com o modelo MCR-ALS de três componentes.

O modelo MCR-ALS na decomposição de uma estrutura tridimensional $\underline{\mathbf{X}}$ ($i \times j \times k$), após desconvulsão numa matriz bidimensional \mathbf{X} ($l \times j$) com $l = k \times i$ e com elementos x_{lk} , é dado pelo produto de duas matrizes \mathbf{A} ($l \times n$) e \mathbf{B} ($n \times j$) mais a matriz bidimensional dos resíduos \mathbf{E} ($l \times j$) com elementos respectivamente a_{ln} , b_{nj} , e e_{ijk} (1.38).

$$x_{lj} = \sum_{n=1}^N a_{ln} b_{nj} + e_{lj} \quad (1.38)$$

Em notação matricial o modelo é definido como em (1.39). Em que \mathbf{X}_k é a matriz de dados originais contendo k sub-matrizes, \mathbf{A}_k é a matriz de dados estimados contendo k sub-matrizes com elementos de 1 até n , \mathbf{B} ($n \times j$) e \mathbf{E}_k é a matriz dos resíduos contendo k sub-matrizes.

$$\mathbf{X}_k = \mathbf{A}_k \mathbf{B}^T + \mathbf{E}_k \quad (1.39)$$

Se se considerar \mathbf{A}_k , matriz que contém os perfis de variação, como a matriz de concentrações e \mathbf{B} , matriz de estimativas iniciais, como a matriz de espectros, então \mathbf{A}_k e \mathbf{B} são representados respectivamente por \mathbf{C}_k e \mathbf{S} e a expressão (1.38) pode ser representada por (1.40).

$$\mathbf{X}_k = \mathbf{C}_k \mathbf{S}^T + \mathbf{E}_k \quad (1.40)$$

O modelo de MCR iterativo mais utilizado é o que recorre ao algoritmo de ALS [142]. Na decomposição de uma matriz tridimensional pelo algoritmo de mínimos quadrados e atendendo a (1.40) \mathbf{S}^T é estimado com estimativa inicial de \mathbf{C}_k (1.41) ou \mathbf{C}_k é estimado com estimativa inicial de \mathbf{S}^T (1.42). As estimativas iniciais são optimizadas iterativamente por

ALS. As estimativas mais adequadas são encontradas em cada iteração através de (1.40) e (1.41) a partir da estimativa inicial e da matriz inicial $\hat{\mathbf{X}}_k$ reproduzida por PCA [142].

$$\mathbf{C}_k^+ \hat{\mathbf{X}}_k = \mathbf{C}_k^+ \mathbf{C}_k \mathbf{S}^T = \mathbf{S}^T \quad (1.41)$$

$$\hat{\mathbf{X}}_k (\mathbf{S}^T)^+ = \mathbf{C}_k \mathbf{S}^T (\mathbf{S}^T)^+ = \mathbf{C}_k \quad (1.42)$$

O critério de convergência é dado pela mudança relativa do desvio padrão relativo (RSD) dos resíduos entre iterações consecutivas. A optimização da decomposição é conseguida através da minimização do erro dado pelas equações (1.43) e (1.44)

$$\min_{\mathbf{S}^T} \|\mathbf{X}_k - \mathbf{C}\mathbf{S}^T\| \quad (1.43)$$

$$\min_{\mathbf{C}_k} \|\mathbf{X}_k - \mathbf{C}\mathbf{S}^T\| \quad (1.44)$$

Assim a sequência de operações no modelo MCR-ALS de decomposição de uma matriz tridimensional através do algoritmo de ALS é a seguinte:

1. Determinação do número de componentes (n).
2. Construção da matriz inicial de perfil de espectros \mathbf{S} ou de concentração \mathbf{C}_k .
3. Selecção de restrições a aplicar em cada iteração.
4. Optimização de estimativas iniciais (ALS) em cada iteração por (1.41) e (1.42).
5. Reprodução de \mathbf{X}_k em cada iteração a partir \mathbf{S} e \mathbf{C}_k .
6. Repetição dos passos 4 e 5 até o critério de convergência ser satisfeito.
7. Determinação de matriz dos perfis de concentração e dos espectros.

O ajuste pelo modelo MCR-ALS encontra-se descrita em algumas publicações [142,209]. O Ajuste a matrizes tridimensionais é efectuado após desconvolução da matriz tridimensional em matrizes bidimensionais de linha, coluna ou linha e coluna aumentadas.

No ajuste deste modelo, podem ser utilizados métodos de inicialização e restrições à solução diferentes. Os métodos de inicialização mais habituais são as obtidas por SIMPLISMA (selecção de variáveis puras), técnicas baseadas em EFA ou ainda resultados prévios de ajuste. Restrições de, não negatividade, unimodilidade, sistema fechado, igualdade, forma, trilinearidade, zonas de selectividade e correspondência entre espécies podem ser utilizadas nas matrizes estimadas para diminuir a ambiguidade rotacional e diminuir o número de soluções possíveis. Dependendo das restrições a aplicar estas podem ser aplicadas a uma ou às duas dimensões, podem ou não ser aplicadas a todas as sub-

matrizes da matriz de dados tridimensional desconvolucionada bem como podem ser aplicadas a todos ou só a alguns componentes.

Na Tabela 1.10 são apresentadas as referências encontradas na literatura em que se procede a análise química por decomposição tridimensional recorrendo ao modelo MCR-ALS. Nalguns caso é efectuada unicamente a identificação dos analitos e noutros é também efectuada a quantificação. A técnica instrumental utilizada, outros métodos de calibração utilizados e as amostras e compostos analisados são aí indicados.

Quatro aplicações são encontradas em análise farmacêutica. Uma com análise do composto activo e impurezas com HPLC-DAD [211] e as outras três com análise de compostos activos em formulações farmacêuticas com sistemas de análise de fluxo com detecção de DAD [212-214]. Uma referência é encontrada em análise alimentar [215] com espectroscopia de RAMAN na análise de biopolímeros.

É de notar que é na análise ambiental que um grande número de aplicações com obtenção de dados tridimensionais é modelado por MCR-ALS [142,143,170,210,216-226]. A maioria dos dados tridimensionais é obtida por HPLC-DAD [142,143,170,210,216,217] e espectrofotometria de fluorescência [219-222]. São também obtidos dados tridimensionais por LC-MS [218], espectrofotometria de UV-Vis seguindo a cinética de uma reacção [173,223] e RMN [225] bem como, fazendo variar o pH, por FTIR [224], espectrofotometria de UV-Vis [210] e ASV [226]. A nível dos compostos analisados verifica-se algumas aplicações com análise de pesticidas, ácidos húmicos, fúlvicos, organoestanhados, fenóis e hidrocarbonetos clorados. Além de simulação de dados, as amostras analisadas são amostras sintéticas, água e solos. Outras referências são encontradas com aplicações e técnicas analíticas utilizadas diversas [227-235].

São encontradas na bibliografia, além das anteriormente citadas, algumas referências que focam especificamente a modelação por MCR-ALS sobretudo no que diz respeito a ambiguidade rotacional e à aplicação de restrições durante o procedimento de ALS [236-238]. É de referir as aplicações com MCR-ALS na modelação de dados obtidos com determinadas técnicas específicas [239-244], com estudos cinéticos com a finalidade de obter informação acerca da cinética de reacções [245-249], estudos conformacionais de proteínas [250,251] e ainda na análise de processos químicos [252-254].

Tabela 1.10 – Análise química por MCR-ALS.*

Técnica instrumental	Métodos de calibração	Amostras analisadas / Compostos analisados	Ref.
Análise farmacêutica			
HPLC-DAD	MCR-ALS, OPA FSWEFA	Amostras sintéticas / Tetraciclina e impurezas	211
SIA-DAD (variação de pH)	MCR-ALS, PCA e SIMPLISMA	Formulações farmacêuticas / Amoxicilina	212
SIA-DAD (variação de pH)	MCR-ALS	Formulações farmacêuticas / Amoxicilina	213
FIA ou CCF-DAD (variação de pH)	MCR-ALS	Amostras sintéticas e Formulação farmacêutica / Nucleosídeos	214
Análise Alimentar			
RAMAN	MCR-ALS	Misturas sintéticas / Biopolímeros	215
Análise ambiental			
HPLC-DAD	MCR-ALS e TLD	Dados simulados e misturas sintéticas / Pesticidas	142
HPLC-DAD	MCR-ALS, PARAFAC, PARAFAC2 e TUCKER3	Dados simulados e Água / Pesticidas organofosforados	143
HPLC-DAD	MCR-ALS, PARAFAC e GRAM	Amostras sintéticas e água / Compostos fenólicos e pesticidas	170
HPLC-DAD/ Espectrofotometria (variação de pH)	MCR-ALS	Dados simulados e misturas sintéticas / Pesticidas	210
HPLC-DAD	MCR-ALS	Dados simulados e amostras reais / Fenóis	216
HPLC-DAD	MCR-ALS	Amostras sintéticas e fortificadas de águas residuais e sedimentos / Biocidas	217
LC-MS	MCR-ALS	Amostras sintéticas / Pesticidas	218
Espectrofluorimetria Emi./sincronizada (variação de pH)	MCR-ALS	Solos / Ácidos fúlvicos	219
Espectrofluorimetria (MEE)	MCR-ALS	Amostras sintéticas e Água do mar / Trifenilestanho	220
Espectrofluorimetria (MEE)	MCR-ALS	Água do mar / Trifenilestanho	221
Espectrofluorimetria (MEE)	MCR-ALS	Água do mar / Trifenilestanho	222
Espectrofotometria (cinética de reacção)	MCR-ALS, PARAFAC e N-PLS	Amostras sintéticas e formulações comerciais / Pesticidas	173
Espectrofotometria (cinética de reacção)	MCR-ALS	Amostras sintéticas / Hidrocarbonetos clorados	223
FTIR (variação de pH)	MCR-ALS	Amostras sintéticas / Ácidos húmicos e chumbo	224
RMN	MCR-ALS	Amostras sintéticas / Herbicida, seu produto e intermediário de hidrólise	225
ASV	MCR-ALS	Substancias húmicas / Ácidos fúlvicos e cádmio	226

(Continua)

Tabela 1.10 (Continuação)

Técnica instrumental	Métodos de calibração	Amostras analisadas / Compostos analisados	Ref.
Outras aplicações			
LC-NMR	EFA, WFA, HELP, CKVR e MCR-ALS	Misturas sintéticas / Compostos aromáticos	227
LC-VD	MCR-ALS	Amostras sintéticas / Compostos de cisteína	228
Espectrofotometria (variação de pH)	FA, EFA, PCA e MCR-ALS	Misturas sintéticas / Histidina e cobre	229
Espectrofluorimetria / Espectrofotometria / Dicroísmo circular	MCR-ALS	Misturas / Ácidos Nucleicos e brometo de etidium	230
FTIR (variação de tempo)	MCR-ALS	Misturas / Proteína e intermediários de fotólise	231
FIA-DAD (variação de pH)	MCR-ALS	Misturas sintéticas / Amino ácidos e sulfonato de naftoquinona	232
FIA-DAD (variação de pH)	MCR-ALS e TLD	Misturas sintéticas / Amino ácidos e sulfonato de naftoquinona	233
FIA-DAD (variação de pH)	MCR-ALS	Dados simulados / Sulfonato de naftoquinona	234
Polarografia	MCR-ALS	Misturas sintéticas / Glutaciona e cádmio	235

* Ver rodapé da Tabela 1.3.

1.6. Objectivo

O objectivo principal desta dissertação é o desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas em técnicas espectrofotométricas acopladas a técnicas quimiométricas para análise de antihipertensores antagonistas dos canais de cálcio em formulações farmacêuticas. Os antagonistas dos canais de cálcio Nifedipina, Diltiazem e Verapamil foram detectados e quantificados em formulações farmacêuticas e dosagens diversas utilizadas na prática clínica corrente.

Do ponto de vista experimental, as metodologias baseiam-se em técnicas de UV-Vis e fluorescência molecular, quer por análise directa quer associadas a reacções de derivatização. Nas reacções de derivatização os analitos podem ser reagentes ou catalizadores homogéneos. Estes métodos permitirão adquirir matrizes de dados experimentais multidimensionais.

Do ponto de vista quimiométrico, pretende-se implementar técnicas de análise multivariadas segundo modelos lineares e não lineares. Serão desenvolvidas metodologias baseadas em modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS.

1.7. Organização da dissertação

Esta dissertação encontra-se organizada em nove partes. O primeiro capítulo é a introdução geral à dissertação onde é apresentada uma revisão bibliográfica sobre os métodos de análise química farmacêutica de antihipertensores antagonistas dos canais de cálcio e dos fundamentos e aplicações das técnicas quimiométricas utilizadas ao longo do trabalho.

O segundo capítulo descreve os procedimentos experimentais e quimiométricos, comuns a todos os métodos analíticos desenvolvidos bem como a instrumentação e os materiais utilizados.

No terceiro capítulo apresenta-se a caracterização das amostras utilizadas nesta dissertação utilizando métodos de análise química farmacêutica de referência indicados pela Farmacopeia Americana. Os resultados obtidos neste capítulo serão utilizados nas fases subsequentes desta dissertação com o objectivo de comparação com as estimativas de concentração obtidas com as metodologias propostas.

Nos cinco capítulos seguintes são apresentados os fundamentos, procedimentos experimentais, resultados obtidos e discussão tanto nas fases de optimização e quantificação com cada um dos métodos desenvolvidos. A estrutura de apresentação destes resultados está organizada com base nas diferentes metodologias experimentais utilizadas.

A nona, e última parte é o capítulo com a conclusão global da dissertação.

1.8. Referências

- [1] – Tyson, J., Modern analytical chemistry. *Analytical Proceedings* **26** (1989) 251 – 254.
- [2] – Booksh, K. e Kowalski, B., Theory of analytical chemistry. *Analytical Chemistry* **66** (1994) 782 A – 791 A.
- [3] – Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, Å., Pettersen, J. e Bergman, R., Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **42** (1998) 3 – 40.
- [4] – Martens, H. e Naes, T., *Multivariate Calibration*, John Willey & Sons, Ltd, Chichester (1996).
- [5] – Booksh, K. e Kowalski, B., Calibration method choice by comparison of model basis functions to the theoretical instrumental response function. *Analytica Chimica Acta* **348** (1997) 1 – 9.
- [6] – Nadig, D., Preparation of Drug Samples for Analysis, in *Handbook of Pharmaceutical Analysis. Drugs and Pharmaceutical Sciences, Vol. 117*. Lena O. e Anthony J. S., Marcel Dekker, Nova Iorque (2002) pp. 59 – 86.
- [7] – Bro, R., Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemist? *Analytica Chimica Acta* **500** (2003) 185 – 194.
- [8] – Forina, M., Casolino, M. e Martinez, C., Multivariate calibration: applications to pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **18** (1998) 21 – 33.
- [9] – De Leenheer, A. e Nelis, H., Development and evaluation of selected assays for drugs and drug metabolites in biological materials. *The Analyst* **106** (1981) 1025 – 1035.
- [10] – Gilpin, R. e Pachla, L., Pharmaceutical and related drugs. *Analytical Chemistry* **67** (1995) 295R – 313R.
- [11] – Gilpin, R. e Pachla, L., Pharmaceutical and related drugs. *Analytical Chemistry* **71** (1999) 217R – 233R.
- [12] – Gilpin, R. e Pachla, L., Pharmaceutical and related drugs. *Analytical Chemistry* **75** (2003) 2097R – 2918R.
- [13] – Lüscher, T. e Cosentino, F., The classification of calcium antagonists and their selection in the treatment of hypertension. A reappraisal. *Drugs* **55** (1998) 509 – 517.
- [14] – Snyder, S. e Reynolds, I., Calcium antagonists drugs. Receptor interactions that clarify therapeutic effects. *The new England journal of medicine* **313** (1985) 995 – 1002.
- [15] – Goodman & Gilman, *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, Joel G. Hardman e Lee E. Limbord., McGraw Hill, Rio de Janeiro (2003).
- [16] – Triggle, D., The pharmacology of ion channels: with particular reference to voltage-gated Ca²⁺ channels. *European Journal of Pharmacology* **375** (1999) 311 – 325.
- [17] – Striessnig, J., Grabner, M., Mitterdorfer, J., Hering, S., Sinnegger, M. e Glossman, H., Structural basis of drug binding to L Ca²⁺ channels. *TiPS* **19** (1998) 108 – 115.
- [18] – Ali, S., Nifedipine, in *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, Vol. 18*. Academic Press, New York, 1989, pp. 221 – 287.

-
- [19] – Sentürk, Z., Özkan, S. e Özkan, Y., Electroanalytical study of Nifedipine using activated glassy carbon electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **16** (1998) 801 – 807.
- [20] – Burger, A. e Koller, K., Polimorphism and pseudopolimorfism on Nifedipine. *Sci. Pharm.* **64** (1996) 293 – 301.
- [21] – Patel, Y., Patil, S., Bhoir, I. e Sundaresan, M., Isocratic, simultaneous reversed-phase estimation of six drugs for combined hypertension therapy. *Journal of Chromatography A*. **828** (1998) 283 – 286.
- [22] – Barbato, F., Cappelo, B., Grumetto, L. e Morrica, P., Analysis of calcium channel blocking dihidropyridines by high performance liquid chromatography. *Il Farmaco*. **48** (1993) 417 – 426.
- [23] – Garcia, M., Soláns, C., Aramayona, J., Fraile, L., Bregante, M. e Castillo, J., A common method for the determination of several calcium channel blockers using an HPLC system with ultraviolet detection. *Talanta* **47** (1998) 1245 – 1254.
- [24] – Barbato, F., Grumetto, L. e Morrica, P., Analysis of calcium channel blocking dihidropyridines and their degradation products by Gas chromatography. *Il Farmaco*. **49** (1994) 461 – 466.
- [25] – Castro, D., Moreno, M. e Lastres, J., First-derivative spectrophotometric and LC determination of Nifedipine in brij® 96 based oil/water/oil multiple microemulsions on stability studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **26** (2001) 563 – 572.
- [26] – Al-Turck, W., Othman, S., Majeed, I., Murray, W. e Newton, D., Analytical study of Nifedipine and its photo-oxidized form. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **15** (1989) 223 – 233.
- [27] – Martínez, V., López, J., Alonso, R. e Jiménez, R., Micellar electrokinetic chromatography as a fast screening method for the determination of 1,4-dihidropyridine calcium antagonists. *Journal of Chromatography A* **836** (1999) 189 – 199.
- [28] – Ohkubo, T., Noro, H. e Sugawara, K., High-performance liquid chromatographic determination of Nifedipine and trace photodegradation product in hospital prescriptions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **10** (1992) 67 – 70.
- [29] – Bammi, R., Nayak, V., Bhate, V., Dhumal, S., Purandare, S., Dikshit, P. e Gaitonde, C., Analysis of Nifedipine and related compounds in soft gelatine capsules by liquid chromatography. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **17** (1991) 2239 – 2244.
- [30] – Patravale, V., Nair, V. e Gore, S., High performance thin layer chromatographic determination of Nifedipine from bulk drug and from pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **23** (2000) 623 – 627.
- [31] – Jain, R. e Jain, C., Simultaneous microquantification of Nifedipine and Atenolol in multicomponent dosage forms using High performance liquid chromatography. *Microchemical Journal* **44** (1991) 187 – 192.
- [32] – El Walily, A., Analysis of Nifedipine-Acebutolol hydrochloride combination in tablets using UV-derivative spectroscopy, Capillary gas chromatography and High performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **16** (1997) 21 – 30.
- [33] – Vyas, S. e Goswami, S., A rapid colorimetric method for the estimation of Nifedipine. *Indian Drugs* **30** (1993) 342 – 344.
- [34] – Abdine, A., El-Yazbi, F., Shaalan, R. e Blaih, S., Direct-, differential solubility- and compensatory-derivative methods for resolving and subsequently determining binary mixtures of some antihypertensive drugs. *S.T.P. Pharma Sciences* **9** (1999) 587 – 591.

- [35] – El Walily, A., Korani, M., El-Anwar, F. e Zamel, S., Stability indicating first derivative spectrophotometric assay for Nifedipine in its pharmaceutical preparations on a diode array spectrophotometer. *Analytical Letters* **25** (1992) 81 – 85.
- [36] – Umapathi, P., Determination of atenolol, nifedipine, aspirin and dipyridamole in tablet preparations by second-order derivative spectrophotometric. *International Journal of Pharmaceutics* **108** (1994) 11 – 19.
- [37] – Patel, R., Gandhi, T., Patel, A., Patel, V., Patel, S. e Gilbert, R., A rapid colorimetric method for the estimation of Nifedipine. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **46** (1984) 126 – 128.
- [38] – Agrawal, Y. e Shah, K., Colorimetric determination of Nifedipine. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **51** (1989) 77 – 78.
- [39] – Mahadik, K., Byale, G., More, H. e Kadam, S., Spectrophotometric estimation of Nifedipine and it's formulation. *The Eastern Pharmacist* **34** (1991) 121 – 122.
- [40] – Shingbal, D. e Khandeparkai, A., Colorimetric estimation of Nifedipine and its dosage forms. *Indian Drugs* **24** (1987) 415 – 416.
- [41] – Rahman, N. e Hoda, M., Spectrophotometric method for the determination of Nifedipine with 4-(methylamino)phenol and potassium dichromate. *Il Farmaco* **57** (2002) 435 – 441.
- [42] – Rahman, N., Khan, N., e Azmi, S., Extractive spectrophotometric methods for the determination of Nifedipine in pharmaceutical formulations using bromocresol green, bromophenol blue, bromothymol blue and eriochrome black T. *Il Farmaco* **59** (2004) 47 – 54.
- [43] – Sadana, G. e Ghogare, A., Quantitative proton magnetic resonance spectroscopic determination of Nifedipine and its photodecomposition products from pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **80** (1991) 895 – 898.
- [44] – Yritia, M., Parra, P., Iglesias, A. e Barbanoj, J., Quantification of Nifedipine in human plasma by on-line solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **870** (2000) 115 – 119.
- [45] – Nakamura, I., Takahashi, M. e Izumi, I., Sensitive high-performance liquid chromatographic determination of Nifedipine in cat plasma following improved sample treatment. *Journal of Chromatography B* **729** (1999) 265 – 270.
- [46] – Qato, M. e Mohamed, F., An improved HPLC method for determination of Nifedipine in human plasma after oral administration of Adalat. *S.T.P Pharma Sciences* **9** (1999) 203 – 210.
- [47] – Bach P., Determination of Nifedipine in serum or plasma by reversed-phase liquid chromatography. *Clinical Chemistry* **29** (1983) 1344 – 1348.
- [48] – Abou-Auda, H., Najjar, T., Al-Khamis, K., Al-Hadiya, B., Ghilzai, N. e Al-Fawzan, N., Liquid chromatographic assay of Nifedipine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **22** (2000) 241 – 249.
- [49] – Niopas, J. e Daftsios, A., Determination of Nifedipine in human plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography: validation and application to pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **32** (2003) 1213 – 1218.
- [50] – Tolokán, A., Gödötházy, L., Horváth, V., Hrabéczy-Páll, A., Niegreisz, Z., Kocsi, E., Horvai, G., Klebovich, I. e Balogh-Nemes, K., Economic approach to robotic sample pretreatment in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **771** (1997) 35 – 43.

-
- [51] – López, J., Martínez, V., Alonso, R. e Jiménez, R., High-performance liquid chromatography with amperometric detection applied to the screening of 1,4-dihydropyridines in human plasma. *Journal of Chromatography A* **870** (2000) 105 – 114.
- [52] – Telting-Diaz, M., Kelly, M., Smyth, C. e Smyth, M., High-performance liquid chromatographic determination of Nifedipine, Nicardipine and Pindolol using a carbon fibre flow-through amperometric detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **9** (1991) 889 – 893.
- [53] – Horváth, V., Hrabéczy-Páll, A., Niegreisz, Z., Kocsi, E., Horvai, G., Gödörhazy, L., Tolokán, A., Klebovich, I. e Balogh-Nemes, K., Sensitive high-performance liquid chromatographic determination of Nifedipine in dog plasma using an automated sample preparation system with laboratory robot. *Journal of Chromatography B* **686** (1996) 211 – 219.
- [54] – Streeb, B., Zimmer, C., Sibenaler, R. e Ceccato, A., Simultaneous determination of Nifedipine and dehydronifedipine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **720** (1998) 119 – 128.
- [55] – Dankers, J., Elsout, J., Ahr, G., Brendel, E. e Heiden, C., Determination of Nifedipine in human plasma by flow injection tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **710** (1998) 115 – 120.
- [56] – Hamann, R. e McAllister, G., Measurement of Nifedipine in plasma by gas-liquid chromatography and electron-capture detection. *Clinical Chemistry* **29** (1983) 158 – 160.
- [57] – Seth, P. e Seth, P., An in-vivo bioequivalence study of a new Nifedipine extended release dosage form, 'opticaps'. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **20** (1994) 1605 – 1612.
- [58] – Mallick, S., Gupta, B. e Ghosal, S., Extractive spectrophotometric determination of Nifedipine and Verapamil Hydrochloride. *The Eastern Pharmacist* **41** (1998) 129 – 130.
- [59] – Özaltın, N., Yardımcı, C. e Süslü, I., Determination of Nifedipine in human plasma by square wave adsorptive stripping voltametry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **30** (2002) 573 – 582.
- [60] – Mazzo, D., Obetz, C. e Shuster, J., Diltiazem Hydrochloride, in *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, Vol. 23*. Academic Press, New York, 1994, pp. 53 – 98.
- [61] – Abdel-Hamid, M., Suleiman, M., Najib, N. e Muti, H., Stability high performance liquid chromatographic determination of Diltiazem hydrochloride. *Analytical Letters* **21** (1988) 2263 – 2275.
- [62] – Andrisano, V., Hrelia, P., Gotti, R., Leoni, A. e Cavrini, A., Photostability and phototoxicity studies on Diltiazem. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **25** (2001) 589 – 597.
- [63] – Lacroix, P., Bealieu, N., Cyr, T., e Lovering, E., High-performance liquid chromatography of Diltiazem hydrochloride and its related compounds in bulk drug and finished tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **78** (1989) 243 – 246.
- [64] – Devarajan, P. e Dhavse, V., High-performance thin-layer chromatographic of Diltiazem hydrochloride as bulk drug and in pharmaceutical preparations. *Journal of Chromatography B* **706** (1998) 362 – 366.
- [65] – Rahman, N., e Hejaz-Azmi, S., Extractive spectrophotometric methods for the determination of Diltiazem HCl in pharmaceutical formulations using bromothymol blue, bromophenol blue and bromocresol green. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **24** (2000) 33 – 41.

- [66] – Sastry, C., Sreedhar, K., Reddy, M. e Sankar, D., Visible spectrophotometric methods for the determination of Diltiazem hydrochloride. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **57** (1995) 170 – 172.
- [67] – Agrawal, Y., Shivramachandra, K. e Rao, B., Spectrophotometric methods for the determination of Diltiazem in pharmaceutical preparations. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **54** (1992) 218 – 221.
- [68] – Sreedhar, K., Sastry, C., Reddy, M. e Sankar, D., Extractive spectrophotometric determinations of Diltiazem hydrochloride. *Indian Drugs* **32** (1995) 90 – 92.
- [69] – Kamath, B. e Shivram, K., Extractive spectrophotometric method for the determinations of Diltiazem hydrochloride in its dosage forms. *Indian Drugs* **29** (1991) 50 – 52.
- [70] – Kamath, B. e Shivram, K., Extractive spectrophotometric method for the determinations of Diltiazem hydrochloride in its dosage forms. *The Eastern Pharmacist* **35** (1992) 121 – 122.
- [71] – Vergote, G., Vervaet, C., Remon, J., Haemers, T. e Verpoort, F., Near-infrared FT-Raman spectroscopic as a rapid analytical tool for the determination of Diltiazem hydrochloride in tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **16** (2002) 63 – 67.
- [72] – Agrawal, Y., Shivramachandra, B. e Singh, G., New titrimetric methods for the estimation of Diltiazem in dosage forms. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **23**(1991) 214 – 216.
- [73] – Catarino, R., Conceição, A., Garcia, B., Gonçalves, M., Lima, J. e Santos, M., Flow amperometric determination of pharmaceuticals with on-line electrode surface renewal. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **33**(2003) 571 – 580.
- [74] – Neves, H., Silva, M. e Rocha, M., Bioequivalence assessment of Diltiazem preparations by means of discriminant analysis of data solid-phase extraction and liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **9** (1991) 941 – 947.
- [75] – Clozel, J., Gaillé, G., Taeymans, Y., Théroux, P., Biron, P. e Trudel, F., High-performance liquid chromatographic determination of Diltiazem and six of its metabolites in human urine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **73** (1984) 771 – 773.
- [76] – Hubert, P., Chiap, P., e Crommen, J., Automatic determination of Diltiazem and desacetyl diltiazem in human plasma using liquid-solid extraction on disposable cartridges coupled to HPLC – Part I: optimization of the HPLC system and method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **9** (1991) 877 – 882.
- [77] – Hussain, M., Tam, Y., Finegan, B. e Coutts, R., Simple and sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of Diltiazem and six of its metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B* **582** (1992) 203 – 209.
- [78] – Mangani, F., Luck, G., Fraudeau, C. e Vérette, E., On-line column-switching high-performance liquid chromatography analysis of cardiovascular drugs in serum with automated sample clean-up and zone-cutting technique to perform chiral separation. *Journal of Chromatography A* **762** (1997) 235 – 241.
- [79] – Christensen, H., Carlson, E., Åsberg, A., Schram, L. e Berg, K., A simple and sensitive high-performance liquid chromatography assay of Diltiazem and main metabolites in renal transplanted patients. *Clinica Chimica Acta* **283** (1999) 63 – 75.
- [80] – Carigan, G., Carrier, K., Laganière, S. e Lessard, M., Simultaneous determination of Diltiazem and quinidine in human plasma by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **672** (1995) 261 – 269.

-
- [81] – Ghandour, M., Kasim, E., Ali, A., El-Haty, M. e Ahmed, M., Adsorptive stripping voltametric determination of antihypertensive agent: Diltiazem. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **25** (2001) 443 – 451.
- [82] – Chang, Z., Verapamil, in *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, Vol. 17*. Academic Press, New York, 1988, pp. 646 – 674.
- [83] – Lacroix, P., Graham, S. e Lovering, E., High-performance liquid chromatographic method for the assay of Verapamil hydrochloride and related compounds in raw material. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **9** (1991) 817 – 822.
- [84] – Valvo, L., Alimenti, R., Alimonti, S., Raimondi, S., Foglieta, F. e Campana, F., Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of related substances in Verapamil hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **15** (1997) 989 – 996.
- [85] – Tsilifonis, D., Wilk, K., Reisch Jr., R. e Daly, R., High performance liquid chromatographic assay of Verapamil hydrochloride in dosage forms. *Journal of Liquid Chromatography* **8** (1985) 499 – 511.
- [86] – Gumieniczek, A. e Hopkala, H., Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of trandolapril and Verapamil in capsules. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **24** (2001) 393 – 400.
- [87] – Özkan, Y., Yilmaz, N., Özkan, S. e Biryol, İ., High-performance liquid chromatographic analysis of Verapamil and its application to determination in tablet dosage forms and to drug dissolution studies. *IL Farmaco* **55** (2000) 376 – 382.
- [88] – Erk, N., Simultaneous determination of Verapamil hydrochloride and pentobarbital in sugar-coated tablets by spectrophotometric methods. *S. T. P. Pharma Sciences* **6** (1996) 349 – 352.
- [89] – Sane, A., Malkar, V., Nayak, V. e Nadkarni, A., Extractive spectrophotometric method for the determination of Verapamil hydrochloride from pharmaceutical preparations. *Indian Drugs* **20** (1982) 78 – 79.
- [90] – Sastry, C., Rao, T., Sailaja, A. e Prasad, T., Extraction spectrophotometric determination of some antiarrhythmics agents with supracen violet 3 B. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **54** (1992) 125 – 128.
- [91] – Sane, R., Kubal, M., Nayac, V. e Nadkarni, A., Spectrophotometric determination of Verapamil hydrochloride from pharmaceutical preparations. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **45** (1983) 88 – 89.
- [92] – Emmanuel, J. e Mathew, R., Spectrophotometric estimation of Verapamil hydrochloride. *The Eastern Pharmacist* **27** (1984) 133 – 134.
- [93] – Issa, Y., Salem, A. e Bahbouh, R., Charge transfer complex formation in spectrophotometric determination of Verapamil hydrochloride. *Analytical Letters* **30** (1997) 1153 – 1166.
- [94] – Elsayed, M., Barary, M., Abdel-Salam, M. e Mohamed, S., Spectrophotometric assay of certain cardiovascular drugs through charge transfer reactions. *Analytical Letters* **22** (1989) 1665 – 1684.
- [95] – Sane, R., Kubal, M., Nayak, V., Malkar, V. e Banawalikar, V., Extractive spectrophotometric determination of Verapamil hydrochloride from pharmaceutical preparations. *Indian Drugs* **22** (1984) 25 – 27.
- [96] – Khalil, S., e Kelzieh, A., Determination of Verapamil in pharmaceutical formulations using atomic emission spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **27** (2002) 123 – 131.

- [97] – Garcia, M., Aramayona, J., Bregante, M., Fraile, L. e Solans, C., Simultaneous determination of Verapamil and norverapamil in biological samples by high-performance liquid chromatography using ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B* **693** (1997) 377 – 382.
- [98] – Cheng, Y., Neue, U. e Bean, L., Straightforward solid-phase extraction method for the determination of Verapamil and its metabolite in plasma in a 96-well extraction plate. *Journal of Chromatography A* **828** (1998) 273 – 281.
- [99] – Oda, Y., Asakawa, N., Kajima, T., Yoshida, Y. e Sato, T., Column switching high-performance liquid chromatography for on-line simultaneous determination and resolution of enantiomers of Verapamil and its metabolites in plasma. *Pharmaceutical Research* **8** (1991) 997 – 1001.
- [100] – Laucam, C. e Piemontese, D., Simplified reversed-phase HPLC method with spectrophotometric detection for the assay of Verapamil in rat plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **16** (1998) 1029 – 1035.
- [101] – Tassin, J., Dubois, J., Atassi, G. e Hanocq, M., Simultaneous determination of cytotoxic (adriamycin, vincristine) and modulator of resistance (verapamil, S 9788) drugs in human cells by high-performance liquid chromatography and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B* **691** (1997) 449 – 456.
- [102] – Walles, M., Mullet, W., Levsen, K., Morlak, J., Wunsch, G. e Pawliszyb, J., Verapamil drug metabolism studies by in-tube solid phase microextraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **30** (2002) 307 – 319.
- [103] – Jankwski, A., Marzec, A. e Lamparczyk, H., Comparative bioavailability of Verapamil from rapidly absorbed and slow release preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **10** (1992) 1101 – 1103.
- [104] – Hubert, H., Chiap, P., Ceccato, A., Bechet, I., Sibenaler-Deschamps, R. e Crommen, J., Determination of Verapamil and norverapamil in human plasma by liquid chromatography: comparison between a liquid-liquid extraction procedure and an automated liquid-solid extraction method for sample preparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **10** (1992) 937 – 942.
- [105] – Sawicki, W., A validated method for the determination of Verapamil and norverapamil in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **25** (2001) 689 – 695.
- [106] – Köppel, C. e Wageman, A., Plasma level monitoring of D,L-verapamil and three of its metabolites by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications* **570** (1991) 229 – 234.
- [107] – Tsang, Y., Pop, R., Gordon, P., Hems, J. e Spino, M., High variability in drug pharmacokinetics complicates determination of bioequivalence experiences with verapamil. *Pharmaceutical Research* **13** (1996) 846 – 850.
- [108] – Lim, C., Rideout, J. e Sheldon, J., Determination of Verapamil and norverapamil in serum by high-performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* **6** (1983) 887 – 893.
- [109] – Niazy, E. e Jun, H., Rapid quantification of Verapamil in plasma by high-performance liquid chromatography. *Analytical Letters* **18** (1985) 1103 – 1112.
- [110] – Hubert, Ph. e Crommen, J., HPLC determination of Verapamil and Norverapamil in plasma using automated solid phase extraction for sample preparation and fluorimetric detection. *Journal of Liquid Chromatography* **17** (1994) 2147 – 2170.

-
- [111] – Brandšteterova, E. e Wainer, I., Achiral and chiral high-performance liquid chromatography of Verapamil and its metabolites in serum samples. *Journal of Chromatography B* **732** (1999) 395 – 404.
- [112] – Shibukawa, A. e Wainer, I., Simultaneous direct determination of the enantiomers of Verapamil and Norverapamil in plasma using a derivatized amylase high-performance liquid chromatographic chiral stationary phase. *Journal of Chromatography* **574** (1992) 85 – 92.
- [113] – Ho, P., Saville, D. e Wanwimolruk, S., Simultaneous HPLC analysis of S- and R- verapamil and metabolites, S- and R- norverapamil in human plasma. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **23** (2000) 1711 – 1723.
- [114] – Rasyrnas, A., Boudoulas, H. e Kichan, J., Determination of verapamil enantiomers in serum following racemate administration using HPLC. *Journal of Liquid Chromatography* **15** (1992) 3013 – 3029.
- [115] – Fiegger, H. e Blaschke, G., Direct determination of the enantiomeric ratio of verapamil, its major metabolite norverapamil and gallopamil in plasma by chiral high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications* **575** (1992) 255 – 260.
- [116] – Hanada, K., Akimoto, S., Mitsui, K., Hashiguchi, M. e Ogata, H., Quantitative determination of disopyramide, Verapamil and flecainide enantiomers in rat plasma and tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **710** (1998) 129 – 135.
- [117] – Asafu-Adjye, E. e Shiu, G., Solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography determination of Verapamil and norverapamil enantiomers in urine. *Journal of Chromatography B* **707** (1998) 161 – 167.
- [118] – Hyning, P., Anderson, P., Bondesson, U. e Boréus, L., Liquid-chromatographic quantification compared with gas-chromatographic-mass-spectrometry determination of Verapamil and norverapamil in plasma. *Clinical Chemistry* **34** (1988) 2502 – 2503.
- [119] – Von Richter, O., Eichelbaum, M., Schönberger, F. e Hofman, U., Rapid and highly sensitive method for the determination of Verapamil, [²H₇]verapamil and metabolites in biological fluids by liquid chromatography-mass-spectrometry. *Journal of Chromatography B* **738** (2000) 137 – 147.
- [120] – Buzinkaiová, T., Skačani, I. e Netriova, J., Quantitative assay of Verapamil in drugs and serum by capillary isotachopheresis. *Pharmazie* **50** (1995) 799 – 800.
- [121] – Kasim, E., Ghandour, M., El-Haty, M. e Ahmed, M., Determination of verapamil by adsorptive stripping voltametry in urine and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis* **30** (2002) 921 – 929.
- [122] – Miyawa, J. e Sculman, S., Ultraviolet-Visible spectrophotometry, in *Handbook of Pharmaceutical Analysis. Drugs and Pharmaceutical Sciences, Vol. 117*. Lena O. e Anthony J. S., Marcel Dekker, Nova Iorque (2002) pp. 187 – 224.
- [123] – Miyawa, J. e Sculman, S., Luminescence spectroscopy, in *Handbook of Pharmaceutical Analysis. Drugs and Pharmaceutical Sciences, Vol. 117*. Lena O. e Anthony J. S., Marcel Dekker, Nova Iorque (2002) pp. 427 – 466.
- [124] – Workman, J., Koch, M. e Veltkamp, J., Process analytical chemistry. *Analytical Chemistry* **75** (2003) 2859 – 2876.
- [125] – Rouessac, F. e Rouessac, A., *Chemical Analysis, Modern Instrumentation Methods and Techniques*, John Willey & Sons, Ltd, Chichester (2002).

- [126] – Currell, G., *Analytical instrumentation, Performance Characteristics and Quality*, John Willey & Sons, Ltd, Chichester (2000).
- [127] – Massart, D., Vandeginste, B., Buydens, L., De Jong, S., Lewi, P. e Smeyers-Verbeke, J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A*, Elsevier Science, Amsterdão (1997).
- [128] – Hopke, P., Review, The evolution of chemometrics. *Analytical Chimica Acta* **500** (2003) 365 – 377.
- [129] – Lavine, B., Chemometrics. *Analytical Chemistry* **70** (1998) 209R – 228R.
- [130] – Lavine, B., Chemometrics. *Analytical Chemistry* **72** (2000) 91R – 97R.
- [131] – Lavine, B. e Workman Jr., J., Chemometrics. *Analytical Chemistry* **74** (2002) 2763 – 2770.
- [132] – Lavine, B. e Workman Jr., J., Chemometrics. *Analytical Chemistry* **76** (2004) – 3365-3372.
- [133] – Berridge, J., Chemometrics in pharmaceutical analysis. *Analyst* **112** (1987) 385 – 389.
- [134] – Castañeda-Méndez, K., Chemometrics: measurement reliability. *Clinical Chemistry* **34** (1988) 2494 – 2498.
- [135] – Berridge, J., Chemometrics in pharmaceutical analysis. *Analytica Chimica Acta* **223** (1989) 149 – 159.
- [136] – Berridge, J., Jones, P. e Roberts-Mcintosh, A. Chemometrics in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **9** (1991) 597 – 604.
- [137] – Gabrielsson, J., Nils-Olof, L. e Torbjörn, L. Multivariate methods in pharmaceutical applications. *Journal of Chemometrics* **16** (2002) 141 – 160.
- [138] – Forina, M., Casolino, M. e Martinez, C. Multivariate calibration: applications to pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **18** (1998) 21 – 33.
- [139] – Wold, S., Berglund, A. e Kettaneh, N. New and old trends in chemometrics. How to deal with the increasing data volumes in R&D&P (research, development and production) – with examples from pharmaceutical research and process modelling. *Journal of Chemometrics* **16** (2002) 377 – 386.
- [140] – Esbensen, K., *Multivariate Data Analysis – In Practice, An Introduction to Multivariate Data Analysis and Experimental Design*, Camo, Noruega (2001).
- [141] – Law, H., Snyder, Jr., C., Hattie, J. e McDonald, R. *Research Methods for Multimode Analysis*, Praeger Publishers, Estados Unidos da América (1984).
- [142] – Tauler, R., Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **30** (1997) 133 – 146.
- [143] – Juan, A. e Tauler, R. Comparison of three-way resolution methods for non-trilinear chemical data sets. *Journal of Chemometrics* **15** (2001) 749 – 772.
- [144] – Smilde, A., Tauler, R., Saurina, X. e Bro, R. Calibration methods for complex second order data. *Analytica Chimica Acta* **398** (1999) 237 – 251.
- [145] – Carroll, J. e Chang, J., Analysis of individual differences in multidimensional scaling via an N-way generalization of “Eckart-Young” decomposition. *Psychometrika* **35** (1970) 283 – 319.
- [146] – Harshman, R., Foundations of the PARACAC Procedure: models and conditions for an “explanatory” multimodal factor analysis. *UCLA Working Papers in Phonetics* **16** (1970) 1 – 84.

-
- [147] – Faber, N., Bro, R. e Hopke, P., Recent developments in CAMDECOMP /PARAFAC algorithms: a critical review. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **65** (2003) 119 – 137.
- [148] – Kroonenberg, P. *Three-mode principal component analysis. Theory and applications*, DSWO press, Holanda (1983).
- [149] – Bro, R., PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **38** (1997) 149 – 171.
- [150] – Bro, R., *Multi-way Analysis in Food Industry Models, Algorithms and Applications*, Tese de doutoramento, Universidade de Amesterdão, Holanda (1998).
- [151] – Smilde, A., Bro, R. e Geladi, P. *Multy-way Analysis with Applications in the Chemical Sciences*, John Wiley & Sons, Inglaterra (2004).
- [152] – Wiberg, K. e Jacobson, S., Parallel factor analysis of HPLC-DAD for binary mixtures of lidocaine and prilocaine with different levels of separation *Analytica Chimica Acta* **514** (2004) 203 – 209.
- [153] – García, I., Sarabia, L., Ortiz, M. e Aldama, J., Three way models and detection of a gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of Clenbuterol in several biological matrices: the 2002/657/EC European decision *Analytica Chimica Acta* **515** (2004) 55 – 63.
- [154] – Sena, M., Fernandes, J., Rover Jr., L., Poppi, R. e Kubota, L., Application of two- and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid using ultraviolet spectrophotometry *Analytica Chimica Acta* **409** (2000) 159 – 170.
- [155] – Silva, J., Leitão, J., Costa, F. e Ribeiro, J., Detection of Verapamil drug by fluorescence and trilinear decomposition techniques *Analytica Chimica Acta* **435** (2002) 105 – 115.
- [156] – Arancibia, J., Olivieri, A. e Escandar, A., First- and second-order multivariate calibration applied to biological samples: determination of anti-inflammatories in serum and urine *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **374** (2002) 471 – 459.
- [157] – Damiani, P., Nepote, A., Bearzotti, M. e Olivieri, A., A test field for the second-order advantage in bilinear least-squares and parallel factor analysis: fluorescence determination of ciprofloxacin in human urine *Analytical Chemistry* **76** (2004) 2798 – 2806.
- [158] – La Peña, A., Mansilla, A., Gómez, D., Olivieri, A. e Goicoechea, H., Interference-free analysis using three-way fluorescence data and the parallel factor model. Determination of fluorquinolone antibiotics in human serum *Analytical Chemistry* **75** (2003) 2640 – 2646.
- [159] – Escandar, G., Gómez, D., Mansilla, A., La Peña, A. e Goicoechea, H., Determination of carbamazepine in serum and pharmaceutical preparations on a nylon support and fluorescence detection *Analytica Chimica Acta* **506** (2004) 161 – 170.
- [160] – Arancibia, J. e Escandar, G. Two different strategies for the fluorimetric determination of Piroxicam in serum *Talanta* **60** (2003) 1113 – 1121.
- [161] – Silva, J. e Novais, S. Trilinear PARAFAC decomposition of synchronous fluorescence spectra of mixtures of the major metabolites of acetylsalicylic acid *Analyst* **123** (1998) 2067 – 2070.
- [162] – Trevisan, M. e Poppi, R. Determination of doxorubicin in human plasma by excitation-emission matrix fluorescence and multi-way analysis *Analytica Chimica Acta* **493** (2003) 69 – 81.
- [163] – Bechmann, I., Second-order data by flow injection analysis with spectrophotometric diode-array detection and incorporated gel-filtration chromatographic column *Talanta* **44** (1997) 585 – 591.

- [164] – Guterres, M., Volpe, P. e Ferreira, M., Multiway calibration for creatinine determination in human serum using the Jaffé reaction *Applied Spectroscopy* **58** (2004) 54 – 58.
- [165] – Nikolajsen, R., Booksh, K., Hansen, Å. e Bro, R., Quantifying catecholamines using multiway kinetic modelling *Analytica Chimica Acta* **475** (2003) 137 – 150.
- [166] – Pravdova, V., Boucon, C., de Jong, S., Walczak, B. e Massart, D., Three-way principal component analysis applied to food analysis: an example *Analytica Chimica Acta* **462** (2002) 133 – 148.
- [167] – Bro, R., Exploratory study of sugar production using fluorescence spectroscopy and multiway analysis *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **46** (1999) 133 – 147.
- [168] – Baunsgaard, D., Andersson, C., Arndal, A. and Munck, L. Multy-way chemometrics for mathematical separation of fluorescent colorants and colour precursors from spectrofluorimetry of beet sugar thick juice as validated by HPLC analysis *Food Chemistry* **70** (2000) 113 – 121.
- [169] – Guimet, F., Ferré, J., Boqué, R. and Rius, F. Application of unfold principal component analysis and parallel factor analysis to the exploratory analysis of olive oils by means of excitation-emission fluorescence spectroscopy *Analytica Chimica Acta* **515** (2004) 75 – 85.
- [170] – Comas, E., Gimeno, R., Ferré, J., Marcé, R., Borrull, F. e Rius, F., Quantification from highly drifted and overlapped chromatographic peaks using second order calibration methods. *Journal of Chromatography A* **1035** (2004) 195 – 202.
- [171] – Sinha, A., Fraga, A., Prazen, B. e Synovec, R., Trilinear chemometric analysis of two-dimensional comprehensive gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry data. *Journal of Chromatography A* **1027** (2004) 269 – 277.
- [172] – Ni, Y., Huang, C. e Kokot, S., Application of multivariate calibration and artificial neural networks to simultaneous kinetic-spectrophotometric determination of carbamate pesticides. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **71** (2004) 177 – 193.
- [173] – Mansilla-Espinosa, A., La Peña, A., Goicoechea, H. e Olivieri, A., Two multivariate strategies applied to three-way kinetic spectrophotometric data for the determination of mixtures of the pesticides Carbaryl and Chlorpyrifos *Applied Spectroscopy* **58** (2004) 83 – 90.
- [174] – Levi, M., Scarminio, I., Poppi, R. e Trevisan, M., Three-way chemometric method study and UV-Vis absorbance for the study of simultaneous degradation of anthocyanins in flowers of the Hibiscus rosa-sinensis species *Talanta* **62** (2004) 299 – 305.
- [175] – Silva, J. e Oliveira, C., PARAFAC decomposition of three-way kinetic-spectrophotometric spectral matrices corresponding to mixtures of heavy metal ions *Talanta* **49** (1999) 889 – 897.
- [176] – Booksh, K., Muroski, A. e Myrick, M., Single-measurement excitation/emission matrix spectrofluorometer for determination of hydrocarbons in ocean water. 2. Calibration and quantification of Naphtalene and Styrene *Analytical Chemistry* **68** (1996) 3539 – 3544.
- [177] – Booksh, K. e JiJi, R., Mitigation of Rayleigh and Raman spectral interferences in multiway calibration of excitation-emission matrix fluorescence spectra *Analytical Chemistry* **72** (2000) 718 – 725.
- [178] – Beltrán, J., Ferrer, R. e Guiteras, J., Multivariate calibration of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures from excitation-emission fluorescence spectra *Analytica Chimica Acta* **373** (1998) 311 – 319.
- [179] – Rodríguez-cuesta, M., Boqué, R., Rius, F., Zamora, D., Galera, M. e Frenich, A. G., Determination of carbendazim, fuberidazole and thiabendazole by three dimensional excitation-emission matrix fluorescence and parallel factor analysis *Analytica Chimica Acta* **491** (2003) 47 – 56.

-
- [180] – Pedersen, D., Munk, L. e Engelsen, S., Screening for dioxin contamination in fish oil by PARAFAC and N-PLSR analysis of fluorescence landscapes *Journal of Chemometrics* **16** (2002) 451 – 460.
- [181]– Moberg, L., Robertsson, G. e Karlberg, B., Spectrofluorimetric determination of chlorophylls and pheopigments using PARAFAC *Talanta* **54** (2001) 161 – 170.
- [182] – Selli, E., Zacaria, C., Sena, F., Tomasi, G. e Bidoglio, G., Application of multi-way models to the time resolved fluorescence of polycyclic aromatics hydrocarbons mixtures in water *Water Research* **38** (2004) 2269 – 2276.
- [183] – Tan, Y., Jiang, J., Wu, H., Cui, H. e Yu, R., Resolution of kinetic system of simultaneous degradations of chlorophyll a and b by PARAFAC *Analytica Chimica Acta* **412** (2000) 193 – 202.
- [184] – Murosky, A., Booksh, K. e Myrick, M., Single-measurement excitation/emission matrix spectrofluorometer for determination of hydrocarbons in ocean water. 1. Instrumentation and background correction *Analytical Chemistry* **68** (1996) 3354 – 3358.
- [185] – JiJi, R., Cooper, G. e Booksh, K., Excitation-emission matrix fluorescence based determination of carbamate pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons *Analytica Chimica Acta* **397** (1999) 61 – 72.
- [186] – JiJi, R., Andersson, G. e Booksh, K., Application of PARAFAC for calibration with excitation-emission matrix fluorescence spectra of three classes of environmental pollutants *Journal of Chemometrics* **14** (2000) 171 – 185.
- [187] – Mispelaar, V., Tas, A., Smilde, A., Schoemakers, P. e Asten, A., Quantitative analysis of target components by comprehensive two-dimensional gas chromatography *Journal of Chromatography A* **1019** (2003) 15 – 29.
- [188] – Chen, Z., Liu, Z., Cao, Y. e Yu, R. Efficient way to estimate de number of factors for trilinear decomposition *Analytica Chimica Acta* **444** (2001) 295 – 307.
- [189]– Kiers, H. e Bro, R. A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models *Journal of Chemometrics* **17** (2003) 274 – 286.
- [190] – Smilde, A. e Bro, R. Centering and scaling in component analysis *Journal of Chemometrics* **17** (2003) 16 – 33.
- [191] – Andersen, C. e Bro, R. Review. Practical aspects of PARAFAC modelling fluorescence excitation-emission data *Journal of Chemometrics* **17** (2003) 200 – 215.
- [192] – Chen, Z. e Yu, R. Mitigating model deficiency in three-way data analysis by the combination of background constraints and iterative correcting techniques *Analytica Chimica Acta* **487** (2003) 171 – 180.
- [193]– Thygesen, L., Rinnan, Å., Barsberg, S. e Møller, J. Stabilizing the PARAFAC decomposition of fluorescence spectra by insertion of zeros outside the data area *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **71** (2004) 97 – 106.
- [194] – Andersson, G., Dable, B. e Booksh, K. Weighted parallel factor analysis for calibration of HPLC-UV/Vis spectrometers in the presence of Beer's law deviations *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **49** (1999) 195 – 213.
- [195] – Stordrange, L., Rajalahti, T. e Libnan, F. Multiway methods to explore and model NIR data from a batch process *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **70** (2004) 137 – 145.

- [196] – Louwse, D. e Smilde, A. Multivariate statistical process control of batch processes on three-way models *Chemical Engineering Science* **55** (2000) 1225 – 1235.
- [197] – Huang, J., Wium, H., Qvist, K. e Esbensen, K. Multy-way methods in image analysis – relationships and applications *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **66** (2003) 141 – 158.
- [198] – Harshman, R., PARACAC2: Mathematical and technical notes. *UCLA Working Papers in Phonetics* **22** (1972) 30 – 44.
- [199] – Kiers, H., An alternating least squares algorithm for PARAFAC2 and three-way DEDICOM *Computer Statistics Data Analysis* **16** (1993) 103 – 117.
- [200] – Kiers, H., Berge, J. e Bro, R. PARACAC2 – Part I. A direct fitting algorithm for the PARAFAC2 model *Journal of Chemometrics* **13** (1999) 275 – 294.
- [201] – Bro, R., Andersson, C. e Kiers, H. PARACAC2 – Part II. Modelling chromatographic data with retention time shifts *Journal of Chemometrics* **13** (1999) 295 – 309.
- [202] – García, I., Sarabia, L., Ortiz, M. e Aldama, J. Building robust calibration models for the analysis of estrogens by gas chromatography with mass spectrometry detection *Analytica Chimica Acta* **526** (2004) 139 – 146.
- [203] – Cueva, J., Rossi, A. e Poppi, R. Modelling kinetic spectrophotometric data pf aminophenol isomers by PARAFAC2 *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **55** (2001) 125 – 132.
- [204] – Wise, B., Gallagher, N. M. e Martin, E. B. Application of PARACAC2 to fault detection and diagnosis in semiconductor etch *Journal of Chemometrics* **15** (2001) 285 – 298.
- [205] – Lawton, W. e Silvestre, E. Self modelling curve resolution *Techometrics* **13** (1971) 617 – 633.
- [206] – Borgen, O. e Kowalsky, B. An extension of the multivariate component resolution method to three components *Analytica Chimica Acta* **174** (1985) 1 – 26.
- [207] – Gampp, H., Maeder, M. e Meyer, C. Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data. IV. Model free least squares refinement by use of evolving factor analysis *Talanta* **33** (1986) 943 – 951.
- [208] – Tauler, R. e Cassacas, E. PCA applied to the study of successive complex formation data in CU (II)-etanolamine systems *Journal of Chemometrics* **3** (1988) 151 – 161.
- [209] – Juan, A. e Tauler, R. Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures. Revisiting latest trends in multivariate resolution *Analytica Chimica Acta* **500** (2003) 195 – 210.
- [210] – Tauler, R., Smilde, A. e Kowalsky, B. Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution *Journal of chemometrics* **9** (1995) 31 – 58.
- [211] – Braekeleer, K., Juan, A. e Massart, D. Purity assessment and resolution of tetracycline hydrochloride samples using high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of chromatography A* **832** (1999) 67 – 86.
- [212] – Pasamontes, A. e Callao, M. Determination of amoxicilin in pharmaceuticals using sequential injection analysis (SIA) Evaluation of the presence of interferents using multivariate curve resolution. *Analytica Chimica Acta* **485** (2003) 195 – 204.
- [213] – Pasamontes, A. e Callao, M. Determination of amoxicilin in pharmaceuticals using sequential injection analysis (SIA) and multivariate curve resolution. *Analytica Chimica Acta* **515** (2004) 159 – 165.

-
- [214] – Saurina, X., Hernández-Cassou, S., Izquierdo-Ridorsa, A. e Tauler, R. pH-gradient spectrophotometric data files from flow-injection and continuous flow systems for two and three-way data analysis. *Chemometric and Intelligent Laboratory Systems* **50** (2000) 263 – 271.
- [215] – Pudney, P., Hancewicz, T., Gunningham, D. e Gray, C. A novel method for measuring concentrations of phase separated biopolymers: the use of confocal Raman spectroscopy with self-modelling curve resolution *Food Hydrocolloids* **17** (2003) 345 – 353.
- [216]– Rodríguez-Cuesta, M., Boqué, R. e Rius, X. Influence of selectivity and sensitivity parameters on detection limits in multivariate curve resolution of chromatographic second-order data *Analytica Chimica Acta* **476** (2003) 111 – 122.
- [217] – Peré-Trepat, E., Hildebrandt, A., Barceló, D., Lacorte, S. e Tauler, R. Fast chromatography of complex biocide mixtures using diode array detection and multivariate curve resolution. *Chemometric and Intelligent Laboratory Systems* **74** (2004) 293 – 303.
- [218] – Salau, J., Horning, M., Tauler, R. e Barceló, S. Resolution and quantitative determination of coeluted pesticide mixtures in liquid chromatography-thermospray mass spectrometry by multivariate curve resolution. *Journal of Chromatography A* **795** (1998) 3 – 12.
- [219]– Casassas, E., Marqués, I. e Tauler, R. Study of acid-base properties of fulvic acids using fluorescence spectrometry and multivariate curve resolution methods *Analytica Chimica Acta* **310** (1995) 473 – 484.
- [220]– Saurina, X., Leal, C., Compañó, R., Granados, M., Prat, M. e Tauler, R. Estimation of figures of merit using univariate statistics for quantitative second-order multivariate curve resolution *Analytica Chimica Acta* **432** (2001) 241 – 251.
- [221] – Saurina, X., Leal, C., Compañó, R., Granados, M., Tauler, R. e Prat, M. Determination of triphenyltin in sea-water by excitation-emission matrix fluorescence and multivariate curve resolution *Analytica Chimica Acta* **409** (2000) 237 – 245.
- [222] – Saurina, X., Leal, C. e Tauler, R. Strategies for solving matrix effects in the analysis of triphenyltin in sea-water samples by three way multivariate curve resolution *Analyst* **125** (2000) 2038 – 2043.
- [223] – Tauler, R., Smilde, A., Henshaw, J., Burguess, L. e Kowalski, B. Multicomponent determination of chlorinated hydrocarbons using a reaction-based chemical sensor. 2. Chemical speciation using multivariate curve resolution *Analytical Chemistry* **66** (1994) 3337 – 3344.
- [224] – Gossart, P., Semmoud, A., Ruckebusch, C., e Huvenne, J. Multivariate curve resolution applied to Fourier transform infrared spectra of macromolecules: structural characterization of the acid form of humic acids in interaction with lead *Analytica Chimica Acta* **477** (2003) 201 – 209.
- [225] – Bezemer, E., e Rutan, S. Resolution of overlapped NMR spectra by two-way multivariate curve resolution alternating least squares with imbedded kinetic fitting *Analytica Chimica Acta* **459** (2002) 277 – 289.
- [226] – Antunes, M., Simão, J., Duarte, A., Esteban, M. e Tauler, R. Application of multivariate curve resolution to the voltametric study of the complexation of fulvic acids with cadmium (II) ion *Analytica Chimica Acta* **459** (2002) 291 – 304.
- [227] – Shen, H., Airiau, C. e Brereton, R. Resolution of on-flow LC/NMR data by multivariate methods – a comparison *Journal of Chemometrics* **16** (2002) 469 – 481.
- [228] – González-García, O., Ariño, C., Díaz-Cruz, J. e Esteban, M. Comparison of voltametric detection assisted by multivariate curve resolution with amperometric detection in liquid chromatographic analysis of cysteine containing products *Journal of Chromatography A* **1062** (2005) 95 – 101.

- [229] – Appaspour, A. e Kamyabi, M. Characterization and determination of stability constants of copper(II)-L-histidine complexation system by using multivariate curve resolution method of visible spectra and two hard modelling methods in aqueous solutions *Analytica Chimica Acta* **512** (2004) 257 – 269.
- [230] – Vives, M., Gargallo, R. e Tauler, R. Study of intercalation equilibrium between the polynucleotide poly(adenylic)-poly(uridylic) acid and the ethidium bromide dye by means of multivariate curve resolution and the multivariate extension of the continuous variation and mole ratio methods *Analytical Chemistry* **71** (1999) 4328 – 4337.
- [231] – Ruckebusch, C., Duponchel, L., Huvenne, J. e Saurina, J. Matrix merging arrangements for the study protein dynamics by time-resolved step-scan Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate curve resolution *Analytica Chimica Acta* **515** (2004) 183 – 190.
- [232] – Saurina, J., Hernández-Cassou, S. e Tauler, R. Second order multivariate curve resolution applied to the flow injection analysis of mixtures of amino acids *Analytica Chimica Acta* **335** (1996) 41 – 49.
- [233] – Saurina, J., Hernández-Cassou, S. e Tauler, R. Multivariate curve resolution and trilinear decomposition methods in the analysis of stopped-flow kinetic data for binary amino acid mixtures *Analytical Chemistry* **69** (1997) 2329 – 2336.
- [234] – Saurina, J., Hernández-Cassou, S., Tauler, R. e Izquierdo-Ridora, A. multivariate resolution of rank-deficient spectrophotometric data from first-order kinetic decomposition reactions *Journal of Chemometrics* **12** (1998) 183 – 203.
- [235] – Mendieta, J., Díaz-Cruz, M., Tauler, R. e Esteban, M. Application of multivariate curve resolution to voltametric data. II study of metal-binding properties of the peptides *Analytical Biochemistry* **240** (1996) 134 – 141.
- [236] – Benthem, M., Keenan, M. e Haaland, D. Application of equality constraints on variables during alternating least squares procedures *Journal of Chemometrics* **16** (2002) 613 – 622.
- [237] – Smilde, A., Hoefsloot, H., Kiers, H., Bijlsma, S. e Boelens, H. Sufficient conditions for unique solutions within a certain class of curve resolution procedures *Journal of Chemometrics* **15** (2001) 405 – 411.
- [238] – Juan, A., Heyden, Y., Tauler, R. e Massart, D. Assessment of new constraints applied to the alternating least squares methods *Analytica Chimica Acta* **346** (1997) 307 – 318.
- [239] – Jaumot, J., Montserrat, V., Gargallo, R. e Tauler, R. Multivariate resolution of NMR signals by means of hard- and soft-modelling methods *Analytica Chimica Acta* **490** (2003) 253 – 264.
- [240] – Gallagher, N., Shaver, J., Martin, E., Morris, J., Wise, B. e Windig, W. Curve resolution for multivariate images with applications to TOF-SIMS and RAMAN *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **73** (2004) 105 – 117.
- [241] – Huo, R., Wehrens, R., Duynhoven, J. e Buydens, L. Assessment of techniques for DOSY NMR data processing *Analytica Chimica Acta* **490** (2003) 231 – 251.
- [242] – Huo, R., Wehrens, R. e Buydens, L. Improved DOSY NMR data processing by data enhancement and combination of multivariate curve resolution with non-linear least square fitting *Journal of Magnetic Resonance* **169** (2004) 257 – 269.
- [243] – Schoonover, J., Marx, R. e Nichols, W. Application of multivariate curve resolution analysis to FTIR kinetics data *Vibrational Spectroscopy* **35** (2004) 239 – 245.
- [244] – Ruckebusch, C., Duponchel, L., Huvenne, J. e Saurina, J. Multivariate curve resolution of step-scan FTIR spectral data *Vibrational Spectroscopy* **35** (2004) 21 – 26.

-
- [245] – Thurston, T., Brereton, R., Foord, D. e Escott, R. Monitoring of second-order reaction by electronic absorption spectroscopy using combined chemometric and kinetic models *Journal of Chemometrics* **17** (2003) 313 – 322.
- [246] – Bezemer, E. e Rutan, S. Multivariate curve resolution with non-linear fitting of kinetic profiles *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **59** (2001) 19 – 31.
- [247] – Bijlsma, S., Boelens, H., Hoefsloot, H. e Smilde, A. Constrained least squares methods for estimating reaction rates from spectroscopic data *Journal of Chemometrics* **16** (2002) 28 – 40.
- [248] – Juan, A., Maeder, M., Martínez, M. e Tauler, R. Combining hard- and soft-modelling to solve kinetic problems *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **54** (2000) 123 – 141.
- [249] – Juan, A., Maeder, M., Martínez, M. e Tauler, R. Application of a novel resolution approach combining hard- and soft-modelling features to investigate temperature-dependent kinetic processes *Analytica Chimica Acta* **442** (2001) 337 – 350.
- [250] – Navea, S., Juan, A. e Tauler, R. Three-way data analysis applied to multispectroscopic monitoring of protein folding *Analytica Chimica Acta* **446** (2001) 187 – 197.
- [251] – Vives, M., Tauler, R. e Gargallo, R. Study of the influence of metal ions on tRNA^{Phe} thermal unfolding equilibria by UV spectroscopy and multivariate curve resolution *Journal of Inorganic Biochemistry* **89** (2002) 115 – 122.
- [252] – Larrechi, M. e Rius, F. Spectra and concentration profiles throughout the reaction of curing epoxy resins from spectroscopy and multivariate curve resolution methods *Applied Spectroscopy* **58** (2004) 47 – 53.
- [253] – Garrido, M., Lázaro, I., Larrechi, M. e Rius, F. Multivariate resolution of rank-deficient near-infrared spectroscopy data from the reaction of curing epoxy resins using the rank augmentation strategy and multivariate curve resolution alternating least squares approach *Analytica Chimica Acta* **515** (2004) 65 – 73.
- [254] – Tauler, R. e Kowalski, B. Multivariate curve resolution applied to spectral data from multiple runs of an industrial process *Analytical Chemistry* **65** (1993) 2040 – 2047.

2. EXPERIMENTAL

Neste capítulo referem-se os materiais utilizados no processo experimental, os métodos analíticos desenvolvidos para a determinação da Nifedipina, Diltiazem e Verapamil nas diferentes amostras, o procedimento experimental comum a todos os métodos analíticos utilizados e a instrumentação utilizada. Descrevem-se ainda as estratégias utilizadas tanto no processo de otimização como de quantificação.

2.1. Materiais

Os compostos químicos utilizados como matéria prima para análise e na preparação das diferentes soluções padrão utilizadas na calibração foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich Química SA (Madrid, Espanha). Outros reagentes utilizados nos métodos analíticos desenvolvidos foram também obtidos da empresa Sigma-Aldrich Química SA (Madrid, Espanha). Alguns compostos de utilização mais frequente e todos os solventes foram obtidos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). Na preparação de soluções aquosas foi utilizada água desionizada.

As amostras reais utilizadas neste estudo foram escolhidas, atendendo a sua disponibilidade, de entre todas os medicamentos existentes comercialmente. Medicamentos de laboratórios diferentes e medicamentos do mesmo laboratório mas com diferentes formas farmacêuticas foram avaliados. De entre as diferentes dosagens do mesmo medicamento, da mesma forma farmacêutica e do mesmo laboratório foi escolhida a dosagem de utilização clínica mais frequente.

2.1.1. Nifedipina

Padrão

O padrão de Nifedipina da Sigma apresenta-se na forma de um pó cristalino amarelo e com um grau de pureza mínimo indicado de 98 %. Nos solventes avaliados a Nifedipina apresenta solubilidades em dimetilsulfóxido (DMSO) de 50 g/L, em metanol de 26 g/L, e em etanol de 17 g/L, sendo praticamente insolúvel em água [1].

Tal como já referido a Nifedipina quando exposta à luz do dia ou a certos c.d.o. de luz artificial converte-se no derivado de nitrosfenilpiridina enquanto a exposição à luz UV conduz à formação do derivado de nitrofenilpiridina. Assim, a Nifedipina foi armazenada em recipientes bem fechados e ao abrigo da luz e soluções padrão da Nifedipina recentes foram frequentemente preparadas.

Amostras

De um total de dezoito medicamentos contendo Nifedipina nas suas diferentes formas farmacêuticas, dosagens e de apresentação disponíveis comercialmente, foram escolhidos oito medicamentos. Os diferentes medicamentos que contêm Nifedipina analisados e a designação de cada um deles utilizada durante este estudo são apresentadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Características dos medicamentos contendo Nifedipina estudados e respectiva designação durante o estudo efectuado.*

Medicamento	Designação	Dosagem	Forma farmacêutica	Apresentação (massa unitária)	Laboratório
Nifedipina 10 Ratiopharm®	Ni10ra	10 mg	Cápsulas de gelatina mole	60 unidades (cont. líquido)	Ratiopharm
Zenusin® - 20 SR	Ze20sr	20 mg	Comprimidos retard	60 unidades (0.095 g)	Mepha
Nifedate® gotas	Nigt	20mg/mL	Solução oral	Frasco-30 mL (solução)	Euro-labor
Nifedate®	Ni10ca	10 mg	Cápsulas	50 unidades (0.175 g)	Euro-labor
Nifedate® A.P.	Ni20ap	20 mg	Comprimidos de acção prolongada	60 unidades (0.110 g)	Euro-labor
Adalat® 10	Ad10ca	10 mg	Cápsulas de gelatina mole	50 unidades (cont. líquido)	Bayer
Adalat® A.P.	Ad20ap	20 mg	Comprimidos revestidos	50 unidades (0.085 g)	Bayer
Adalat® CR 30	Ad30cr	30 mg	Comprimidos de libertação prolongada	28 unidades (0.300 g)	Bayer

* A massa unitária apresentada entre parêntesis corresponde a média de 20 unidades excepto para os medicamentos Nigt, Ni10ra e Ad10ca em que não é possível calcular a massa unitária por o primeiro medicamento ser uma solução e o conteúdo de cada cápsula das duas outras amostras ser líquido.

2.1.2. Diltiazem

Padrão

O padrão cloridrato de Diltiazem da Sigma apresenta-se na forma de um pó cristalino branco com um grau de pureza indicado no mínimo de 99 %. Nos solventes avaliados o Diltiazem é muito solúvel em água, metanol e ligeiramente solúvel em etanol [2].

Como já referido, o Diltiazem é bastante estável no estado sólido e em solução aquosa apresenta hidrólise em desacetil diltiazem acelerada pela exposição à luz. Assim as soluções padrão de Diltiazem foram armazenadas ao abrigo da luz e soluções padrão aquosas recentes foram frequentemente preparadas. Tal como referido na Farmacopeia Americana o padrão de Diltiazem foi utilizado na preparação das soluções padrão após secagem em forno à temperatura de 105 °C durante duas horas.

Amostras

De um total de cinquenta medicamentos contendo Diltiazem nas suas diferentes formas farmacêuticas, dosagens e de apresentação disponíveis comercialmente foram escolhidos nove medicamentos. Os diferentes medicamentos que contêm Diltiazem analisados e a designação de cada um deles utilizada durante este estudo são apresentadas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Características dos medicamentos contendo Diltiazem estudados e respectiva designação durante o estudo efectuado.*

Medicamento	Designação	Dosagem	Forma farmacêutica	Apresentação (massa unitária)	Laboratório
Alandiem®	Al60co	60 mg	Comprimidos	60 unidades (0.114 g)	Zimaia
Dilfar®	Df60co	60 mg	Comprimidos de acção prolongada	60 unidades (0.302 g)	Fournier
Balcor® Retard	Ba90re	90 mg	Cápsulas	60 unidades (0.291 g)	Baldacci
Diltiem® 60	Dt60co	60 mg	Comprimidos	60 unidades (0.223 g)	Sanofi
Diltiem® AP 200	Dtap	200 mg	Cápsulas de libertação prolongada	60 unidades (0.265 g)	Sanofi
Diltiazem Merck® 60	Di60me	60 mg	Comprimidos	30 unidades (0.378 g)	Merck
Diltiazem Merck® 120	Di120me	120 mg	Cápsulas retard	60 unidades (0.297 g)	Merck
Herbesser®	He60co	60 mg	Comprimidos de acção retard	60 unidades (0.380 g)	Delta
Herbesser® SR 120	He120sr	120 mg	Cápsulas de libertação prolongada	60 unidades (0.206 g)	Delta

* A massa unitária apresentada entre parêntesis corresponde a média de 20 unidades.

2.1.3. Verapamil

Padrão

O Verapamil é fornecido na forma racémica dos seus enantiómeros R e S. O padrão (\pm) cloridrato de Verapamil da Sigma apresenta-se na forma de um pó cristalino branco com um grau de pureza indicado no mínimo de 99 %. Nos solventes avaliados o Verapamil é muito solúvel em metanol e etanol (>100 g/L) e solúvel em água (83 g/L) [3].

Quando exposto a radiação UV apresenta degradação rápida em solução metanólica. Assim as soluções padrão de Verapamil foram armazenadas ao abrigo da luz e soluções padrão recentes foram frequentemente preparadas. Tal como referido na Farmacopeia Americana o padrão de Verapamil foi utilizado na preparação das soluções padrão após secagem em forno à temperatura de 105 °C durante duas horas.

Amostras

De um total de catorze medicamentos contendo Verapamil nas suas diferentes formas farmacêuticas, dosagens e de apresentação disponíveis comercialmente foram escolhidos cinco medicamentos. Os diferentes medicamentos que contêm Verapamil analisados e a designação de cada um deles utilizada durante este estudo são apresentadas na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Características dos medicamentos contendo Verapamil estudados e respectiva designação durante o estudo efectuado.*

Medicamento	Designação	Dosagem	Forma farmacêutica	Apresentação (massa unitária)	Laboratório
Verapamil 40 Ratiopharm®	Ve40ra	40 mg	Comprimidos revestidos	60 unidades (0.116 g)	Ratiopharm
Isoptin® Inj.	Isinj	5mg/2mL	Solução injectável	6 ampolas, cada 2 mL (líquido)	Knoll
Isoptin®	Is40co	40 mg	Comprimidos revestidos	60 unidades (0.144 g)	Knoll
Isoptin® Retard	Isret	120 mg	Comprimidos revestidos de acção prolongada	30 unidades (0.407 g)	Knoll
Isoptin® HTA	Ishta	240 mg	Comprimidos revestidos de acção prolongada	30 unidades (0.740 g)	Knoll

* A massa unitária apresentada entre parêntesis corresponde a média de 20 unidades excepto para o medicamento Isinj em que o conteúdo de cada ampola é uma solução injectável.

2.2. Métodos analíticos

Foram desenvolvidos e utilizados na sua quantificação métodos analíticos diferentes baseados nas propriedades químicas de cada um dos compostos. Na determinação da Nifedipina foram desenvolvidos dois métodos analíticos:

- (i) Hidrólise alcalina de Nifedipina.
- (ii) Redução da Nifedipina e reacção com OPA.

O primeiro método analítico é baseado na determinação espectrofotométrica de UV-Vis e o segundo é baseado na determinação espectrofotométrica de fluorescência.

Na determinação do Diltiazem foram desenvolvidos três métodos analíticos:

- (i) Reacção de Diltiazem com hidroxilamina e sal férrico.
- (ii) Reacção do ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem.
- (iii) Reacção do ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem.

O primeiro método analítico é baseado na determinação espectrofotométrica de UV-Vis e os outros dois são baseados na determinação espectrofotométrica de fluorescência.

Na determinação do Verapamil foram desenvolvidos três métodos analíticos:

- (i) Análise de fluorescência do Verapamil.
- (ii) Reacção do ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil.
- (iii) Reacção do ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil.

Os três métodos analíticos são baseados na determinação espectrofotométrica de fluorescência.

Do ponto de vista experimental, e no caso da fluorescência molecular, as matrizes de dados foram geradas usando apenas as medições espectroscópicas ou no caso de UV-Vis estudando a cinética dos processos químicos por acoplamento da medição espectroscópica com o tempo. Em todos os casos a terceira dimensão escolhida de forma a obter-se estruturas de dados tridimensionais, foi a concentração do composto principal obtida por análise da amostra e das diferentes concentrações de padrão.

O método de calibração usado foi o método de adição de padrão após análise directa a análise multivariada das matrizes de dados tridimensionais. Normalmente foram efectuadas três adições de padrão, na gama linear avaliada, a um branco, uma solução padrão, uma solução amostra e a uma solução amostra fortificada. Todas as soluções avaliadas foram preparadas por adição do volume adequado de amostra para a concentração a estimar. De

acordo com o método utilizado este foi efectuado por adições sucessivas de solução padrão numa mesma cuvete de quartzo de 1 cm ou por adições de volumes diferentes de solução padrão em diferentes cusetes de quartzo, balões volumétricos de diluição ou em frascos de amostra às diferentes soluções a avaliar.

O método de HPLC-UV referido na Farmacopeia Americana foi também efectuado para comparação dos resultados obtidos. A quantificação foi efectuada pelo método da curva de calibração padrão na gama de trabalho avaliada e a estimativa de concentração é obtida pela média de três determinações repetidas.

2.2.1. Instrumentação

A instrumentação utilizada nas determinações espectrofotométricas de UV-Vis e de fluorescência foi instrumentação que permitisse uma obtenção rápida da estrutura de dados requerida.

Ultravioleta e Visível

As medições de absorvância molecular foram feitas num espectrofotómetro Hewlett Packard HP 8452A com detecção de fila de díodos em modo avançado com um intervalo de 2 nm. O registo é feito utilizando cusetes de quartzo de 1 cm. Dependendo do método utilizado diferentes gamas de c.d.o., tempos de registo, tempos de ciclo e tempos de integração são utilizados.

Todas as medições de absorvância são feitas com recurso a agitação mecânica da solução na cuvete de quartzo. Também algumas das medições de absorvância molecular são efectuadas com controlo de temperatura na cuvete recorrendo a um banho termostaticado.

Fluorescência

As medições de fluorescência molecular são feitas em cusetes de quartzo de 1 cm num espectrofluorímetro Spex 3D, com lâmpada de Xenon de 75 W e detector CCD (“Charged coupled Device”), numa gama de c.d.o. de excitação de 250 – 550 nm e emissão de 250 –

750 nm, num intervalo de 5 nm para as duas gamas de c.d.o. e 1 acumulação. As fendas de excitação e emissão e os tempos de integração variam de acordo com o método utilizado. Fendas de excitação e emissão de 0.05, 0.1 e 0.25 mm e tempos de integração desde 0.001 s até 60 s podem ser utilizados. O detector é constituído por uma matriz de um material semiconductor contendo pequenos elementos muito sensíveis a luz. Cada elemento, ou pixel, regista um valor proporcional a intensidade da luz.

Algumas medições de fluorescência molecular, são feitas com recurso a agitação mecânica da solução na cuvete de quartzo.

HPLC-UV

As determinações por HPLC-UV foram efectuadas num sistema de HPLC com uma bomba isocrática HP1100, uma válvula de injeção manual Rheodyne, modelo 7752i, um loop de 20 µL Rheodyne, uma pré coluna Agilent® (20mm ×4mm) e uma coluna Supelco (100mm×4.6mm) Hypersil® ODS com partículas de 3 µm e um detector de filas de díodos UV-Vis modelo Ati Unicam Crystal 250.

Foram utilizadas as condições de registo adequadas ao registo dos espectros e cromatogramas obtidos na determinação com cada um dos compostos. Também foram utilizadas fases móveis na determinação da Nifedipina, Diltiazem e Verapamil segundo o método oficial da Farmacopeia Americana.

2.2.2. Optimização

No processo de optimização dos métodos analíticos desenvolvidos, além da avaliação e da obtenção das condições de reacção mais adequadas os procedimentos experimentais foram também optimizados de forma a obtenção de métodos analíticos rápidos e simples.

As condições de reacção dos processos cinéticos para a obtenção de compostos corados e de obtenção de derivados fluorescentes foram optimizadas recorrendo a estratégias diferentes de optimização. As estratégias de optimização seguidas foram escolhidas de acordo com os métodos analíticos a desenvolver. Procedimentos de optimização clássicos, variando um parâmetro de cada vez, quando conveniente ou quando não foi necessário avaliar muitos parâmetros e, procedimentos de planeamento experimental, variando os

diferentes parâmetros ao mesmo tempo, seguindo um determinado modelo matemático, quando foi necessário avaliar muitos parâmetros de reacção. Em todos os processos de optimização, estes foram efectuados de forma que os resultados do planeamento experimental ou da variação de um factor experimental anterior fossem utilizados para estabelecer as condições do passo seguinte de optimização.

Nos procedimentos de planeamento experimental, e por aproximações sucessivas, inicialmente foram utilizados modelos de planeamento experimental de varrimento (factorial fraccionado e/ou factorial total) e planeamento experimental de optimização (Box Behnken e de compósito central). Os modelos de planeamento de varrimento (modelos lineares) permitiram avaliar os efeitos principais das variáveis experimentais nas variáveis de resposta. Os modelos de planeamento experimental de optimização (modelos quadráticos) permitiram avaliar com mais detalhe a função de resposta nomeadamente avaliando os máximos ou os mínimos das variáveis de resposta ou o melhor compromisso entre as diferentes variáveis de resposta. Tanto os modelos de planeamento experimental de varrimento como de optimização permitiram também avaliar interacções possíveis das variáveis experimentais. Os modelos de planeamento experimental utilizados foram implementados com o software Unscrambler[®] Designer [4].

A optimização das reacções de obtenção de derivados corados foi feita avaliando a intensidade de absorvância, c.d.o. e tempo de reacção ($t_{\text{reacção}}$) quando se atinge o máximo de absorvância. A optimização das reacções de obtenção de derivados fluorescentes foi feita avaliando a intensidade de fluorescência, c.d.o. de excitação, c.d.o. de emissão assim como o tempo de reacção. Dentro dos condicionalismos próprios de cada reacção procurou-se, em ambos os casos, uma intensidade de absorvância ou fluorescência máxima, aos c.d.o. máximos (absorvância ou c.d.o. de excitação e emissão máximos) com tempos de reacção mínimos. Foram também avaliados outros parâmetros como o limite de detecção, qualidade da função linear obtida bem como para alguns métodos analíticos desenvolvidos, a estimativa obtida de um padrão de concentração conhecida.

2.2.3. Quantificação

A quantificação, baseada nos procedimentos otimizados, por análise directa e pelos modelos de calibração multivariada, foi avaliada para todos os métodos analíticos desenvolvidos. Foram analisadas para avaliar a qualidade da estimativa, além de um branco e do padrão, amostras não fortificadas e fortificadas de diferentes formulações farmacêuticas. Foram avaliadas a função linear, recuperações obtidas e o desvio padrão relativo, calculado através do valor do desvio padrão do valor de concentração extrapolado, nas adições de padrão das diferentes amostras. Foi também efectuada a comparação da dosagem estimada para cada uma das formulações farmacêuticas com a dosagem estimada pelo método oficial, HPLC-UV, da Farmacopeia Americana.

A avaliação da estimativa através da recuperação encontrada, é feita por comparação da concentração estimada (C_{estimada}) por análise directa e por análise dos diferentes modelos de calibração multivariada de segunda ordem com a concentração esperada (C_{esperada}) das amostras fortificadas e não fortificadas. Nas amostras fortificadas a recuperação da concentração esperada é obtida por comparação com a concentração total esperada dada pela soma da concentração da amostra não fortificada e a concentração da fortificação esperadas. É ainda avaliada para as formulações farmacêuticas a recuperação da fortificação efectuada. Para cálculo da recuperação da fortificação, a concentração da fortificação estimada é encontrada por diferença entre a concentração da amostra fortificada e a concentração da amostra não fortificada estimadas previamente por análise directa e pelos modelos avaliados.

Para cada amostra não fortificada analisada a comparação da dosagem estimada de cada formulação farmacêutica e a dosagem obtida por HPLC-UV é efectuada através do cálculo do erro previsão (EP) equação (2.1)

$$EP(\%) = \sqrt{\frac{(D_i - \hat{D}_i)^2}{(D_i)^2}} \times 100 \quad (2.1)$$

Para o conjunto das amostras não fortificadas analisadas a avaliação da qualidade das estimativas de dosagem obtidas é efectuada através do cálculo da média do erro de previsão (EPM), determinada a partir dos erros de previsão de cada uma das amostras não

fortificadas dados pela equação (2.1), do cálculo do erro de previsão total (EPT) equação (2.2) e do cálculo da raiz quadrada da média dos erros de previsão (RMSEP) equação (2.3).

$$\text{EPT}(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (D_i - \hat{D}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (D_i)^2}} \times 100 \quad (2.2)$$

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (D_i - \hat{D}_i)^2}{n}} \quad (2.3)$$

Nas equações (2.1), (2.2) e (2.3) D_i é a dosagem de cada formulação farmacêutica estimada por HPLC-UV considerada a dosagem verdadeira, \hat{D}_i é a dosagem estimada por análise directa e por cada um dos modelos de calibração multivariada e n é o número de formulações farmacêuticas analisadas.

Além destes parâmetros são ainda calculados a média do limite de detecção (LDM), para cada um dos modelos avaliados e análise directa, e a média da percentagem de ajuste do modelo (AjMM), para cada um dos modelos avaliados, ambas as médias são calculadas a partir do valor de cada um destes parâmetros das amostras não fortificadas.

Previamente à quantificação procedeu-se ainda à comparação da função linear obtida pelo padrão com as diferentes funções lineares obtidas pelas diferentes formas farmacêuticas na gama linear estudada. Desta forma consegue-se avaliar da possível existência de interferências positivas se o declive de uma função linear obtida com uma determinada forma farmacêutica é maior, ou negativas se o declive for menor que o declive da função linear obtida com o padrão. Consegue-se ainda inferir da possível presença de desvios absolutos e relativos. Se um valor de ordenada na origem é diferente de zero tal pode indicar a possível presença de desvios absolutos ou sistemáticos. Os possíveis desvios relativos, ou fortuitos, podem também ser avaliados pela diferença do declive a uma função linear obtida por uma forma farmacêutica, relativamente a uma função linear obtida com um padrão. Estas avaliações não serão úteis se a função em análise for inerentemente não linear.

Análise directa

A quantificação por análise directa com cada um dos métodos analíticos desenvolvidos foi efectuada, no caso de métodos de UV-Vis ao c.d.o. de absorvância máxima, ou no caso de fluorescência molecular ao c.d.o. de excitação e de emissão de fluorescência máxima da banda principal de absorvância ou fluorescência. Os c.d.o. de absorvância ou de excitação e de emissão de fluorescência máxima foram escolhidos na banda principal em cada uma das matrizes de dados obtida.

Análise multivariada

Os modelos de calibração multivariada mais adequados na quantificação foram avaliados no que diz respeito tanto ao número de componentes esperados assim como as condições de aplicação mais adequadas dos diferentes modelos de calibração multivariada.

Condições de ajuste

Foram utilizadas as seguintes condições de ajuste para cada modelo:

- (i) No ajuste do modelo PARAFAC foram utilizadas como estimativas iniciais as estimativas obtidas por TLD ou as obtidas por um modelo PARAFAC sem restrições, um critério de convergência de 1×10^{-6} e um número máximo de iterações de 2500.
- (ii) No ajuste do modelo PARAFAC2 estimativas iniciais por SVD, números aleatórios ou estimativas prévias obtidas por um modelo PARAFAC2 sem restrições, critério de convergência de 1×10^{-7} e um número máximo de iterações de 2000.
- (iii) No ajuste do modelo MCR-ALS estimativas iniciais obtidas por SIMPLISMA ou as obtidas por um modelo de MCR-ALS sem restrições, critério de convergência de 0.1 % e um número máximo de iterações de 50.

De forma a obter estimativas iniciais sem restrições e para verificação do número de componentes adequados foram efectuados pelos diferentes modelos ajustes iniciais sem restrições. Excepto no ajuste pelo modelo PARAFAC2 na segunda dimensão as

quantificações inicialmente avaliadas foram efectuadas com restrições de não negatividade em todas as dimensões.

Salvo indicação em contrário, em espectrofotometria de UV-Vis as matrizes analisadas pelos modelos PARAFAC e PARAFAC2 foram matrizes tridimensionais [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] e pelo modelo MCR-ALS matrizes bidimensionais de coluna aumentada [(concentração \times $t_{\text{reação}}$) \times espectro]. Em fluorescência, e também salvo indicação em contrário, as matrizes analisadas pelos modelos PARAFAC e PARAFAC2 foram respectivamente as matrizes tridimensionais [excitação \times emissão \times concentração] e [emissão \times excitação \times concentração] e, pelo modelo MCR-ALS, matrizes bidimensionais de coluna aumentada [(concentração \times excitação) \times emissão]. A dimensão de cada uma das estruturas de dados analíticos analisados é referida em cada um dos capítulos seguintes.

Número de componentes

De forma a ter-se uma ideia inicial do número de componentes esperado para cada estrutura de dados foi efectuada uma avaliação prévia do número de componentes recorrendo a uma análise de SVD bem como da variância explicada com cada um dos componentes através da análise de PCA. Esta análise prévia por SVD foi feita para as adições de padrão com o solvente, padrão e uma amostra não fortificada em cada uma das matrizes de dados obtidas e nas matrizes aumentadas em cada uma das dimensões avaliadas. A análise por PCA foi efectuada também para as adições de padrão com o solvente, padrão e uma amostra não fortificada na matriz sem adição de padrão e numa matriz de linha aumenta por espectrofotometria de UV-Vis na dimensão do tempo de reacção e por fluorescência na dimensão do espectro de excitação.

A avaliação do número de componentes para cada um dos modelos estudados foi ainda efectuada na quantificação do padrão e do solvente por comparação da soma dos quadrados dos resíduos, comparação da percentagem de ajuste do modelo, do número de iterações necessárias e da semelhança ou dissimilitude das estimativas obtidas. A equação seguinte (2.4) dá a percentagem de ajuste do modelo obtida com os modelos avaliados.

$$\text{Ajuste (\%)} = 100 \times \left(1 - \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K (x_{ijk} - \hat{x}_{ijk})^2}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K (x_{ijk})^2}} \right) \quad (2.4)$$

No cálculo da percentagem de ajuste do modelo (2.4), \hat{x}_{ijk} é o elemento ijk da matriz tridimensional estimada e x_{ijk} é o elemento ijk da matriz tridimensional obtida experimentalmente. No modelo MCR-ALS, cada elemento da matriz estimada é dado por \hat{x}_{ij} e da matriz bidimensional de coluna aumentada é dado por x_{lj} com $l = k \times i$.

Além do cálculo percentagem de ajuste do modelo, e atendendo a especificidade de cada um deles, para cada um dos modelos avaliados foram efectuadas outras avaliações que permitem validar a escolha do número de componentes do modelo. Para o modelo PARAFAC, o teste de consistência do núcleo (CORCONDIA), equação (2.5), e para o modelo MCR-ALS foram também avaliados os parâmetros relacionados com a perda de ajuste do modelo MCR-ALS relativamente ao PCA ($LOF_{MCR \text{ vs } PCA}$) e do modelo MCR-ALS relativamente ao experimental ($LOF_{MCR \text{ vs } Exp}$), equação (2.6). A equação seguinte (2.5) dá a percentagem do teste de consistência do núcleo obtida com o modelo PARAFAC.

$$\text{Corcondia (\%)} = 100 \times \left(1 - \sqrt{\frac{\sum_{e=1}^N \sum_{f=1}^N \sum_{g=1}^N (g_{efg} - t_{efg})^2}{\sum_{e=1}^N \sum_{f=1}^N \sum_{g=1}^N (t_{efg})^2}} \right) \quad (2.5)$$

Na equação (2.5) o g_{efg} é o elemento do núcleo calculado no ajuste do modelo por PARAFAC, t_{efg} é o elemento do núcleo da super diagonal intrínseca e n é o número de componentes do modelo. Se g_{efg} for igual a t_{efg} a consistência do núcleo é perfeita e o valor do teste de consistência é de 100 %. A equação seguinte (2.6) dá a perda de ajuste do modelo obtida com o modelo MCR-ALS.

$$\text{Perda de Ajuste (\%)} = 100 \times \left(\sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L \sum_{j=1}^J (x_{lj} - \hat{x}_{lj})^2}{\sum_{l=1}^L \sum_{j=1}^J (x_{lj})^2}} \right) \quad (2.6)$$

No cálculo da perda de ajuste do modelo (2.6) \hat{x}_{lj} o elemento lj da matriz bidimensional de coluna aumentada estimada pelo modelo MCR-ALS e x_{lj} é o elemento lj da matriz obtida experimentalmente no cálculo de $LOF_{MCR \text{ vs } Exp}$ e a estimada por PCA no cálculo de $LOF_{MCR \text{ vs } PCA}$. De forma a uma avaliação rápida da diferença de ordem de grandeza dos

valores encontrados por cada uma destes parâmetros foi ainda calculada a diferença entre $LOF_{MCR\ vs\ PCA}$ e $LOF_{MCR\ vs\ Exp}$ [$\Delta_{LOFMCR\ (PCA - Exp)}$].

Para os modelos PARAFAC e PARAFAC2 procedeu-se ainda à validação do modelo adequado através de técnicas de validação cruzada. A validação cruzada foi efectuada no ajuste pelos dois modelos sem restrições no número de componente previamente avaliado na análise inicial por SVD e as matrizes foram sete vezes segmentadas.

Qualidade das estimativas

A qualidade das estimativas obtidas, e conseqüentemente da quantificação efectuada, foi avaliada em cada uma das dimensões da estrutura dos dados através do cálculo do coeficiente de correlação linear das estimativas do componente principal obtidas pelos modelos de calibração e as experimentais.

Na dimensão da concentração, a qualidade da estimativa foi avaliada através do cálculo do coeficiente de correlação linear do ajuste da função linear entre as estimativas de concentração obtidas para o componente principal e as experimentais. O critério de qualidade da estimativa obtida para a concentração foi o de um maior valor de coeficiente de correlação linear.

Nas outras duas dimensões, e de acordo com a técnica espectrofotométrica utilizada, as estimativas obtidas são diferentes, com critérios de qualidade das estimativas que também podem ser diferentes. Na espectrofotometria de UV-Vis, foram comparadas as estimativas do componente principal com os espectros e os perfis de tempo de reacção obtidos experimentalmente ao máximo de absorvância considerado por análise directa das matrizes do solvente, padrão, amostras fortificadas e não fortificadas. Para o espectro o critério de qualidade da estimativa obtida foi o de um maior valor de coeficiente de correlação linear e para os perfis de tempo de reacção o critério foi de uma forma geral o de um menor valor. Na espectrofotometria de fluorescência foram comparadas as estimativas dos espectros de excitação e de emissão do componente principal com os obtidos experimentalmente ao máximo de intensidade de fluorescência considerado por análise directa das matrizes do solvente, padrão, amostras fortificadas e não fortificadas. Tanto para os espectros de excitação como de emissão o critério de qualidade da estimativa obtida foi de uma forma geral o de um maior valor de coeficiente de correlação linear.

Comparação dos modelos

A avaliação do modelo mais adequado com cada um dos modelos de calibração multivariada para cada um dos métodos analíticos desenvolvidos foi inicialmente efectuada na quantificação do padrão e do solvente. As condições foram avaliadas através da estimativa de concentração obtida para o padrão e para o solvente e também pela avaliação dos diferentes parâmetros de cada ajuste do modelo. A avaliação da estimativa de concentração obtida para o padrão foi efectuada por avaliação da recuperação obtida e para o solvente pela proximidade da estimativa de concentração nula esperada.

Após a avaliação do modelo mais adequado para cada um dos modelos de calibração multivariada com o solvente e padrão uma avaliação posterior foi efectuada para todas as formulações farmacêuticas com cada uma das amostras não fortificadas e fortificadas. Além da avaliação dos parâmetros de cada modelo previamente indicados outros parâmetros foram comparados para as diferentes amostras. Como já referido para cada uma das amostras não fortificadas foi calculado o EP e para cada uma das amostras fortificadas foi calculada a recuperação da fortificação considerando o valor de concentração das amostras não fortificadas previamente obtido. Através da avaliação da recuperação de fortificação foi possível confirmar, de entre os modelos que permitem obter estimativas de concentração das amostras não fortificadas adequadas, o modelo de calibração multivariada mais adequado.

Com cada um dos modelos de calibração procedeu-se ainda a uma avaliação global do modelo mais adequado. Procedeu-se à comparação da percentagem de ajuste do modelo encontrada para o solvente e padrão com número de componentes diferente. Com as amostras não fortificadas procedeu-se à comparação dos coeficientes de correlação linear obtidas com o componente principal em cada uma das dimensões, da recuperação de concentração total, do EP, bem como do EPT, da RMSEP, do EPM, do AjMM e do LDM obtidos pelos modelos da calibração.

Os modelos de decomposição tridimensional, outros métodos utilizados assim como todos os cálculos foram implementados com o software Matlab [5]. Alguns dos algoritmos utilizados são efectuados segundo a PLS toolbox [6], os algoritmos PARAFAC e PARAFAC2 segundo a N-Way toolbox de Rasmus Bro [7] e o algoritmo MCR-ALS segundo Romá Tauler [8].

2.3. Referências

- [1] – Ali, S., Nifedipine, in *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, Vol. 18*. Academic Press, New York, 1989, pp. 221 – 287.
- [2] – Mazzo, D., Obetz, C. e Shuster, J., Diltiazem hydrochloride, in *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, Vol. 23*. Academic Press, New York, 1994, pp. 53 – 98.
- [3] – Chang, Z., Verapamil, in *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, Vol. 17*. Academic Press, New York, 1988, pp. 646 – 674.
- [4] – Unscrambler Designer versão 7.51, CAMO incorporation® (1999).
- [5] – MATLAB versão 5.3, The Mathworks incorporation® (1999).
- [6] – PLS toolbox versão 2.0, Eigenvector Research incorporation® (2000).
- [7] – N-Way toolbox versão 2.10, obtido de <http://www.models.kvl.dk/source/nwaytoolbox/>.
- [8] – MCR-Als, obtido de <http://www.ub.es/gesq/mcr/>.

3. DETERMINAÇÃO POR HPLC

3.1. Fundamento

Os métodos analíticos de referência considerados na determinação quantitativa de drogas na matéria prima e para cada uma das drogas nas formas farmacêuticas de apresentação mais comuns são os métodos descritos nas diferentes farmacopeias [1,2,3,4].

A Nifedipina, o Diltiazem e o Verapamil são drogas oficiais nas Farmacopeia Portuguesa, Europeia, Britânica e Americana. Na determinação quantitativa da Nifedipina, Diltiazem e Verapamil só na Farmacopeia Americana são descritos métodos analíticos para a quantificação de cada uma destas drogas na matéria prima e nas diferentes formas farmacêuticas. Para a Nifedipina é descrita a determinação quantitativa em cápsulas, para o Diltiazem em comprimidos e cápsulas de libertação prolongada e para o Verapamil em injectáveis, comprimidos e comprimidos de libertação prolongada.

Na Farmacopeia Americana o método proposto para o doseamento das três drogas na matéria prima e nas diferentes formas farmacêuticas atrás referidas é um método de HPLC-UV de fase reversa com detecção ao c.d.o. máximo de cada uma das drogas [1].

Na Farmacopeia Portuguesa e Europeia são descritas titulações idênticas para a determinação quantitativa de cada uma destas três drogas na matéria prima. Para o doseamento da Nifedipina é proposta uma titulação de oxidação-redução e do Diltiazem e Verapamil são propostas titulações ácido base com detecção potenciométrica do ponto de equivalência [2,3].

Na Farmacopeia Britânica são descritos métodos analíticos para a determinação quantitativa da Nifedipina e do Verapamil. Para o doseamento da Nifedipina na matéria prima é proposta uma titulação indirecta e para o Verapamil é proposta uma titulação não aquosa. Só para o Verapamil em injectáveis e em comprimidos é proposto um método analítico para a sua determinação por espectrofotometria de UV-Vis ao máximo de absorvância a 278 nm [4].

Assim, como método de referência na determinação quantitativa de Nifedipina, Diltiazem e Verapamil quer na matéria prima quer nas diferentes formas farmacêuticas de apresentação é considerado o método analítico de HPLC com detecção de UV para cada uma das drogas descrito na Farmacopeia Americana [1].

3.2. Procedimento experimental

Foram utilizadas na determinação com cada um dos compostos as condições de registo adequadas ao registo dos espectros e cromatogramas obtidos. As condições idênticas de registo de espectros e cromatogramas utilizadas para os três compostos foram um tempo de registo de 10 min, um tempo de amostragem de 50 ms, velocidade de 0.8 s, tempo constante de 8 s, sem tempo de espera inicial e uma resolução de 2 nm. Foram utilizadas para cada um dos compostos gamas de c.d.o. diferentes. Para a Nifedipina uma gama de c.d.o. de 200 a 452 nm, para o Diltiazem uma gama de 220 a 472 nm e para o Verapamil uma gama de 230 a 482 nm. As velocidades de fluxo utilizadas foram para a Nifedipina de 1.0 mL/min e para o Verapamil e Diltiazem de 1.6 mL/min.

As fases móveis utilizadas na determinação dos três compostos foram preparadas através de uma mistura adequada de três solventes nas proporções indicadas.

Para a Nifedipina água desionizada, acetonitrilo e metanol (50:25:25).

Para o Diltiazem uma solução tampão (1.16 g de ácido (\pm) 10-camfor sulfônico em 1000 mL de solução de acetato de sódio 0.1 M ajustada a pH 6.2 por adição de uma solução de hidróxido de sódio 0.1 N), acetonitrilo e metanol (50:25:25).

Para o Verapamil uma solução aquosa (1000 ml de solução de acetato de sódio de concentração 0.015 N contendo 33 mL ácido acético glacial), acetonitrilo e 2-aminoheptano (70:30:0.5).

Nestas condições o c.d.o. máximo verificado experimentalmente e utilizado na quantificação da Nifedipina, Diltiazem e Verapamil foi respectivamente de 236, 240 e de 280 nm.

As soluções padrão dos três compostos foram preparadas por pesagem rigorosa no solvente respectivo para a concentração final requerida. As soluções padrão de hidrocloreto Diltiazem e de (\pm) Verapamil foram preparadas após secagem prévia dos compostos a 105 °C num forno durante duas horas. A solução padrão de Nifedipina foi preparada imediatamente antes do ensaio cromatográfico e protegida da luz. O solvente utilizado na preparação da solução padrão de Verapamil 2000 ppm foi a fase móvel e o utilizado na preparação das soluções padrão de Nifedipina e Diltiazem respectivamente 1000 e 2000 ppm foi o metanol.

A massa a pesar das diferentes formas farmacêuticas, para uma concentração estimada em Nifedipina de 1000 ppm, em Diltiazem de 2000 ppm e em Verapamil de 2000 ppm foi calculada de acordo com a respectiva dosagem de cada um dos compostos nas diferentes formas farmacêuticas. Atendendo à dosagem, e só nos casos em que não foi possível obter uma solução amostra na concentração requerida, foram preparadas soluções de concentração diferente. As soluções amostras foram preparadas por pesagem rigorosa do pó, de 20 comprimidos ou cápsulas, correspondente a um comprimido. No caso da amostra Nigt, que é uma solução oral, um volume adequado de solução foi medido para se obter a concentração requerida. Para as amostras Ni10ra e Ad10ca o conteúdo líquido de 10 cápsulas foi diluído para um volume de total solução de forma a obter-se a concentração requerida. No caso da amostra Isinj, que é uma solução injectável, o volume de solução de uma ampola foi adicionado para um volume total de solução de forma a ser obtida a concentração requerida. Excepto para estas quatro amostras todas as soluções amostra foram posteriormente decantadas e centrifugadas a 13000 rpm durante 10 min.

Soluções padrão e de amostra de menores concentrações foram preparadas por diluição rigorosa das respectivas soluções padrão ou amostra de maior concentração com cada um dos solventes utilizados na gama adequada de concentrações para a determinação quantitativa. Para a Nifedipina uma gama de 10 a 50 ppm com uma concentração esperada de concentração da amostra de 30 ppm e fortificação de 10 ppm; para o Diltiazem de 25 a 200 ppm com uma concentração esperada de concentração da amostra de 100 ppm e fortificação de 50 ppm; e para o Verapamil de 50 a 500 ppm com uma concentração esperada de concentração da amostra de 250 ppm e fortificação de 100 ppm.

3.3. Quantificação

A quantificação de cada um dos compostos foi efectuada na gama linear avaliada para cada um dos compostos pelo método de calibração da curva de calibração padrão. A curva de calibração padrão da área em função da concentração da solução padrão foi obtida com cinco pontos experimentais. Cada uma das concentrações estimadas das amostras não fortificadas e fortificadas das formulações farmacêuticas estudadas foi obtida com três determinações repetidas para cada uma das amostras.

3.3.1. Curvas de calibração padrão

Na Tabela 3.1 são apresentados os valores dos parâmetros de regressão linear encontrados pelo método dos mínimos quadrados das curvas de calibração padrão obtidas com a Nifedipina, Diltiazem e Verapamil nas condições atrás descritas por HPLC-UV.

Tabela 3.1 – Curvas de calibração padrão típicas, obtidas para o padrão de Nifedipina, Diltiazem e Verapamil por HPLC-UV.*

Parâmetros obtidos	Nifedipina	Diltiazem	Verapamil
Gama de trabalho (ppm)	10 – 50	25 – 200	62.5 – 500
m	5	5	5
Ordenada na origem (a)	0.055 (0.025)	-0.559 (0.289)	0.009 (0.157)
Declive (b)	0.107 (0.001)	0.067 (0.002)	0.020 (0.001)
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.665	14.982	27.100
Desvio padrão dos residuais ($S_{y/x}$)	0.024	0.337	0.183
R	0.9999	0.9982	0.9990

* Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão de cada um dos parâmetros avaliados.

Como se pode ver pela Tabela 3.1 foram obtidos parâmetros adequados de regressão linear para os três compostos. Outras curvas de calibração padrão obtidas para cada um dos compostos apresentaram também parâmetros de regressão linear adequados que permitiram considerar a quantificação por este método.

É de notar no entanto que é obtido na determinação com o Diltiazem uma ordenada na origem com valor absoluto maior e um pior ajuste e que na determinação com o Verapamil é obtido um declive menor e um limite de detecção superior.

3.3.2. Nifedipina

Na Fig. 3.1 são apresentados um cromatograma e um espectro de um padrão de Nifedipina 30.049 ppm obtidos respectivamente ao tempo de retenção máximo e ao c.d.o. máximo verificados experimentalmente.

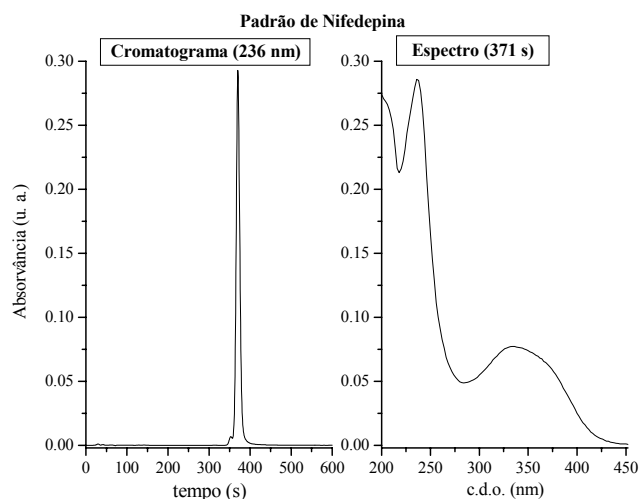


Fig. 3.1 – Espectro e cromatograma típicos obtidos com um padrão de Nifedipina com concentração de 30.049 ppm.

Da análise de todos os cromatogramas obtidos verificou-se que a Nifedipina apresenta um tempo de retenção máximo em dias diferentes entre os 371 s e os 378 s. Verificou-se ainda que os picos dos produtos de degradação principais da Nifedipina, nitro e nitrosofenilpiridina, aparecem adequadamente separados do pico principal da Nifedipina.

Da análise de todos os espectros obtidos verificou-se que o c.d.o. de absorvância máxima encontrado experimentalmente para a Nifedipina é de 236 nm.

Na Tabela 3.2 são apresentados as estimativas de concentração de Nifedipina para o solvente, padrão, amostras não fortificadas e fortificadas obtidas por HPLC-UV.

Tabela 3.2 – Estimativas de concentração do a) solvente, padrão, amostras não fortificadas e b) amostras fortificadas de Nifedipina obtidas por HPLC-UV.*

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas (n = 3)				
	Solvente	Padrão	Ni10ra	Ze20sr	Nigt
$C_{estimada}$ (ppm)	0.479 (0.008)	29.275 (0.471)	25.878 (0.364)	28.054 (0.208)	33.338 (0.420)
$C_{esperada}$ (ppm)	0.000	30.049	30.000	30.088	30.000
Recuperação (%)	----	97.426	86.261	93.237	111.125
RSD (%)	-1.699	1.608	1.406	0.741	1.401
$DOS_{esperada}$ (mg)	----	----	10.000	20.000	20.000
$DOS_{estimada}$ (mg)	----	----	8.626	18.647	22.225

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas (n = 3)				
	Ni10ca	Ni20ap	Ad10ca	Ad20ap	Ad30cr
$C_{estimada}$ (ppm)	30.147 (0.140)	30.169 (0.338)	28.384 (0.097)	31.523 (0.013)	38.101 (0.954)
$C_{esperada}$ (ppm)	30.015	30.063	30.000	30.049	30.035
Recuperação (%)	100.438	100.351	94.613	104.905	126.855
RSD (%)	0.464	1.119	0.342	0.041	2.504
$DOS_{esperada}$ (mg)	10.000	20.000	10.000	20.000	30.000
$DOS_{estimada}$ (mg)	10.044	20.070	9.461	20.981	38.057

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas (n = 3)			
	Ni10ra	Ze20sr	Nigt	Ni10ca
$C_{estimada}$ (ppm)	30.416 (0.044)	33.100 (0.738)	39.653 (0.528)	35.969 (0.334)
$C_{esperada}$ (ppm)	35.075	35.163	35.075	35.090
Recuperação (%)	86.718	94.134	113.052	102.504
RSD (%)	0.145	2.199	1.506	0.928

Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)

$C_{estimada}$ (ppm)	4.538	5.046	6.315	5.822
$C_{esperada}$ (ppm)	5.075	5.075	5.075	5.075
Recuperação (%)	89.428	99.438	124.446	114.731
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	-0.537	-0.029	+1.240	+0.747

b) amostras fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas (n = 3)			
	Ni20ap	Ad10ca	Ad20ap	Ad30cr
$C_{estimada}$ total (ppm)	36.019 (0.546)	35.545 (0.111)	37.230 (0.047)	43.836 (0.578)
$C_{esperada}$ total (ppm)	35.138	35.075	35.124	35.110
Recuperação (%)	102.509	101.340	105.996	124.855
RSD (%)	1.515	0.312	0.127	1.319

Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)

$C_{estimada}$ (ppm)	5.850	7.161	5.977	5.735
$C_{esperada}$ (ppm)	5.075	5.075	5.075	5.075
Recuperação (%)	115.282	141.117	117.785	113.016
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	+0.775	+2.086	+0.903	+0.660

* A dosagem esperada e estimada é dada em massa de composto por comprimido excepto para Nigt em que a dosagem vem em massa de composto por mL; O valor entre parêntesis corresponde ao desvio padrão da concentração estimada.

São encontrados para todas as determinações efectuadas, excepto para a amostra não fortificada Ad30cr e a amostra fortificada Ze20sr, desvios padrão relativos inferiores a 2.000 %.

Foram obtidas por este método estimativas adequadas de concentração de Nifedipina no solvente, próxima de zero, e na solução padrão, próxima de 30 ppm. Na matéria prima, e atendendo a farmacopeia americana, uma recuperação entre 98.000 e 102.000 % é esperada para o padrão de Nifedipina. Para o padrão foi encontrada uma recuperação de 97.426 % próxima do limite inferior desse intervalo.

Da avaliação das estimativas de concentração total obtida com as amostras não fortificadas e fortificadas verifica-se que, excepto para a amostra Ni10ra com estimativas inferiores e, para as amostras Nigt e Ad30cr com estimativas superiores, todas as outras amostras apresentam estimativas dentro do esperado.

Considerando o intervalo de $\pm 10\%$ para a dosagem obtida, intervalo recomendado pela Farmacopeia Americana, verifica-se que só para a amostra não fortificada Ad30cr é obtida uma estimativa de dosagem do fármaco superior ao recomendado. As estimativas da dosagem encontradas com as amostras Ni10ra e Nigt encontram-se respectivamente no limite inferior e superior dos limites do intervalo de variação de dosagem recomendado.

São de uma forma geral encontradas estimativas da concentração da fortificação de uma forma geral superiores à concentração esperada. As únicas excepções são as formulações farmacêuticas Ni10ra e Ze20sr. Tal pode dever-se ao facto de o nível de concentração de fortificação poder ser relativamente baixo.

3.3.3. Diltiazem

Na Fig. 3.2 são apresentados um cromatograma e um espectro de um padrão de Diltiazem 100.171 ppm obtidos respectivamente ao tempo de retenção máximo e ao c.d.o. máximo verificados experimentalmente.

Da análise de todos os cromatogramas obtidos verificou-se que o Diltiazem apresenta tempos de retenção obtidos em dias diferentes compreendidos entre os 339 s e os 538 s. Verificou-se ainda que o pico do produto de degradação principal do Diltiazem, desacetil diltiazem, aparece adequadamente separado do pico principal do Diltiazem.

Da análise dos espectros obtidos verificou-se que o c.d.o. de absorvância máxima encontrado experimentalmente para o Diltiazem é de 240 nm.

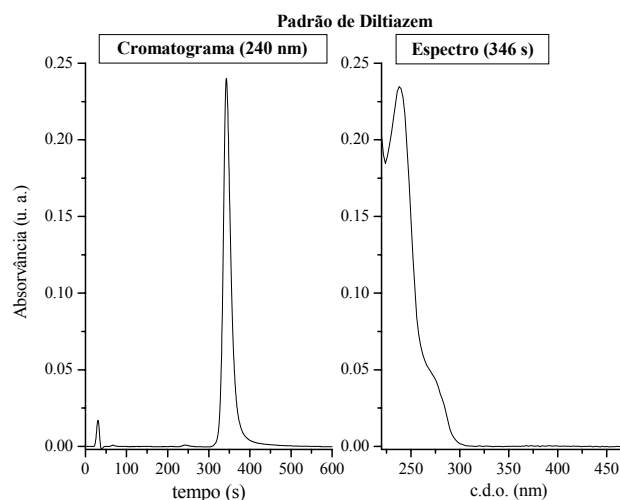


Fig. 3.2 – Espectro e cromatograma típicos obtidos com um padrão de Diltiazem com concentração de 100.171 ppm.

Na Tabela 3.3 são apresentadas as estimativas de concentração do Diltiazem para o solvente, padrão, amostras não fortificadas e fortificadas obtidas por HPLC-UV.

Nesta determinação um número razoável de amostras apresenta desvios padrão relativos superiores a 2.0 %. As amostras não fortificadas Dtap e He60co e fortificadas Df60coFo, Ba90reFo e Di60meFo com desvios da ordem dos 3.0 %, as amostras não fortificadas Ba90re, Dt60co e Di60co com desvios da ordem dos 4.0 % e as amostras fortificadas Di120meFo, He60coFo e He120srFo com desvios da ordem dos 5.0 %. Tal facto pode ser entendido como sendo devido ao número de determinações efectuadas para cada amostra não ser muito grande.

Foram obtidas por este método estimativas adequadas de concentração de Diltiazem no solvente, que atendendo ao nível de concentração da determinação é próxima de zero, e na solução padrão, próxima de 100 ppm. É esperada na matéria prima, e atendendo a Farmacopeia Americana, uma recuperação entre 98.500 e 101.500 % para o padrão de Diltiazem. Foi encontrado uma recuperação dentro deste intervalo de 98.800 %.

Da avaliação das estimativas de concentração total obtida com as amostras não fortificadas e fortificadas verifica-se que todas as amostras apresentam estimativas dentro do esperado. Considerando o intervalo de ± 10 % para a dosagem obtida, intervalo recomendado pela Farmacopeia Americana, verifica-se que com todas as amostras não fortificadas a dosagem encontrada se encontra dentro deste intervalo.

Tabela 3.3 – Estimativas de concentração do a) solvente, padrão, amostras não fortificadas e b) amostras fortificadas de Diltiazem obtidas por HPLC-UV.*

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas (n = 3)					
	Solvente	Padrão	Al60co	Df60co	Ba90re	Dt60co
$C_{estimada}$ (ppm)	8.443 (0.070)	98.801 (0.646)	91.268 (1.030)	95.208 (0.780)	90.764 (3.879)	95.481 (3.530)
$C_{esperada}$ (ppm)	0.000	100.000	100.212	100.186	100.087	100.183
Recuperação (%)	----	98.801	91.076	95.032	90.686	95.306
RSD (%)	0.832	0.654	1.129	0.819	4.274	3.698
DOS _{esperada} (mg)	----	----	60.000	60.000	90.000	60.000
DOS _{estimada} (mg)	----	----	54.645	57.019	81.617	57.184

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas (n = 3)				
	Dtap	Di60me	Di120me	He60co	He120sr
$C_{estimada}$ (ppm)	99.217 (3.085)	96.261 (3.571)	96.043 (2.026)	91.668 (3.119)	92.368 (1.723)
$C_{esperada}$ (ppm)	100.038	100.117	100.087	100.238	100.202
Recuperação (%)	99.180	96.148	95.960	91.450	92.183
RSD (%)	3.110	3.710	2.110	3.403	1.919
DOS _{esperada} (mg)	200.000	60.000	120.000	60.000	120.000
DOS _{estimada} (mg)	198.360	57.689	115.152	54.870	110.619

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas (n = 3)				
	Al60coFo	Df60coFo	Ba90reFo	Dt60coFo	DtapFo
$C_{estimada}$ (ppm)	143.003 (2.824)	148.411 (4.839)	140.604 (4.175)	154.316 (7.035)	155.754 (0.396)
$C_{esperada}$ (ppm)	150.212	150.186	150.087	150.183	150.038
Recuperação (%)	95.201	98.818	93.682	102.752	103.810
RSD (%)	1.975	3.261	2.969	2.224	0.254

Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)

$C_{estimada}$ (ppm)	51.735	53.203	49.840	58.835	56.537
$C_{esperada}$ (ppm)	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000
Recuperação (%)	103.470	106.406	99.680	117.670	113.074
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	+1.735	+3.203	-0.016	+8.835	+6.537

b) amostras fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas (n = 3)			
	Di60meFo	Di120meFo	He60coFo	He120srFo
$C_{estimada}$ (ppm)	156.582 (4.775)	155.421 (7.392)	156.088 (7.787)	153.942 (8.106)
$C_{esperada}$ (ppm)	150.117	150.087	150.238	150.202
Recuperação (%)	104.307	103.554	103.894	102.490
RSD (%)	3.050	4.756	4.989	5.266

Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)

$C_{estimada}$ (ppm)	60.321	59.378	64.420	61.574
$C_{esperada}$ (ppm)	50.000	50.000	50.000	50.000
Recuperação (%)	120.642	118.756	128.840	123.148
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	+10.321	+9.378	+14.420	+11.574

* A dosagem esperada e estimada é dada em massa de composto por comprimido; O valor entre parêntesis corresponde ao desvio padrão da concentração estimada.

Tal como na determinação da Nifedipina por HPLC-UV foram também encontradas na determinação do Diltiazem por HPLC-UV estimativas da concentração da fortificação de uma forma geral superiores à concentração esperada. As exceções são as formulações

farmacêuticas Al60Co, Df60co e Ba90re. Aqui ao contrário da determinação da Nifedipina por HPLC-UV o nível de fortificação é relativamente maior.

3.3.4. Verapamil

Na Fig. 3.3 são apresentados um cromatograma e um espectro de um padrão de Verapamil 250.400 ppm obtidos respectivamente ao tempo de retenção máximo e ao c.d.o. máximo verificados experimentalmente.

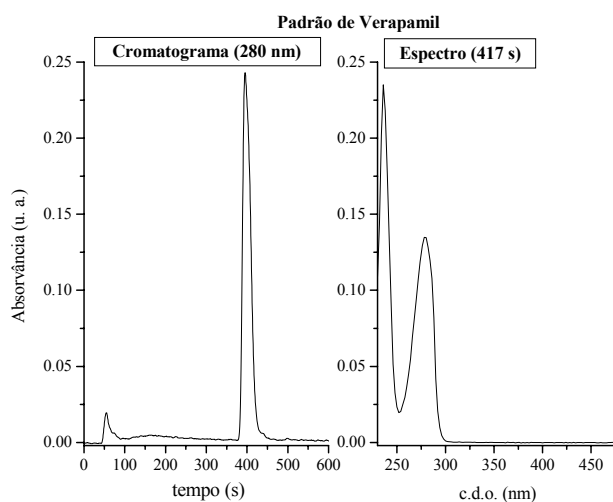


Fig. 3.3 – Espectro e cromatograma típicos obtidos com um padrão de Verapamil com concentração de 250.400 ppm.

Da análise de todos os cromatogramas obtidos verificou-se que o Verapamil apresenta tempos de retenção encontrados em dias diferentes entre os 413 s e os 454 s.

Da análise dos espectros obtidos verificou-se que o c.d.o. de absorvância máxima encontrado experimentalmente para o Verapamil é de 280 nm.

Na Tabela 3.4 são apresentadas as estimativas de concentração do Verapamil para o solvente, padrão, amostras não fortificadas e fortificadas obtidas por HPLC-UV. Excepto para o solvente e a amostra não fortificada Ve40ra são encontrados para todas as determinações desvios padrão relativos inferiores a 2.000 %.

Tabela 3.4 – Estimativas de concentração do a) solvente, padrão, amostras não fortificadas e b) amostras fortificadas de Verapamil obtidas por HPLC-UV.*

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas (n = 3)						
	Solvente	Padrão	Ve40ra	Isinj	Is40co	Isret	Ishta
$C_{estimada}$ (ppm)	0.132 (0.181)	245.339 (0.442)	243.702 (8.703)	233.958 (3.312)	233.635 (5.649)	231.732 (5.086)	230.053 (1.236)
$C_{esperada}$ (ppm)	0.000	250.400	250.085	250.000	250.182	250.109	250.144
Recuperação (%)	----	97.979	97.447	93.583	93.406	92.653	91.968
RSD (%)	137.080	0.180	3.571	1.416	2.418	2.195	0.537
$DOS_{esperada}$ (mg)	----	----	40.000	5.000	40.000	120.000	240.000
$DOS_{estimada}$ (mg)	----	----	38.979	4.679	37.362	111.183	220.724

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas (n = 3)				
	Ve40raFo	IsinjFo	Is40coFo	IsretFo	IshtaFo
$C_{estimada}$ (ppm)	332.890 (4.800)	342.579 (5.479)	326.076 (3.352)	344.164 (9.284)	308.943 (2.993)
$C_{esperada}$ (ppm)	350.245	250.160	350.288	350.269	350.304
Recuperação (%)	95.045	97.835	93.088	98.257	88.193
RSD (%)	1.442	1.599	1.028	2.698	0.969
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)					
$C_{estimada}$ (ppm)	89.188	108.981	92.441	112.392	78.890
$C_{esperada}$ (ppm)	100.160	100.160	100.160	100.160	100.160
Recuperação (%)	89.046	108.807	92.293	112.213	78.764
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	-10.972	+8.821	-7.719	+12.232	-21.27

* A dosagem esperada e estimada é dada em massa de composto por comprimido excepto para Isinj em que a dosagem vem em massa de composto por 2 mL; O valor entre parêntesis corresponde ao desvio padrão da concentração estimada.

Foram obtidas por este método estimativas adequadas de concentração do Verapamil no solvente, próxima de zero, e na solução padrão, próxima de 250.000 ppm. Na matéria prima, e atendendo a farmacopeia americana, é esperada para o padrão de Verapamil uma recuperação entre 99.000 e 100.500 %. Uma recuperação de 97.979 % ligeiramente abaixo do limite inferior desse intervalo foi encontrada.

Da avaliação das estimativas de concentração total obtida com as amostras não fortificadas e fortificadas verifica-se que, excepto para a amostra fortificada IshtaFo com uma estimativa inferior ao esperado, todas as outras amostras apresentam estimativas dentro do esperado. Considerando o intervalo de ± 10 % para a dosagem obtida, intervalo recomendado pela Farmacopeia Americana, verifica-se com as amostras não fortificadas todas as estimativas da dosagem se encontram dentro do intervalo de variação de dosagem recomendado.

Na avaliação das estimativas da concentração da fortificação verifica-se que uma estimativa inferior ao esperado é encontrada para a amostra Ishta e uma estimativa ligeiramente superior ao esperado é obtida para a amostra Isret.

3.4. Avaliação global

Uma avaliação global da metodologia experimental de HPLC-UV permite verificar que, de uma forma geral, foram encontradas estimativas de concentração das amostras não fortificadas adequadas. No entanto para a maioria das amostras fortificadas verificaram-se estimativas da concentração total superiores ao esperado.

Na Tabela 3.5 são apresentadas a dosagem estimada, recuperação de fortificação e limite de detecção obtidos pelo método de HPLC-UV com cada um dos compostos estudados.

Tabela 3.5 – Dosagem estimada, recuperação de fortificação e limite de detecção obtidos na quantificação de Nifedipina, Diltiazem e Verapamil com cada um dos métodos de HPLC-UV recomendados pela Farmacopeia Americana.*

Quantificação por HPLC-UV								
Nifedipina (LD = 0.665 ppm)			Diltiazem (LD = 14.982 ppm)			Verapamil (LD = 27.100 ppm)		
For. Farmac.	DOS _{estimada} (mg)	Recup. (%)	For. Farmac.	DOS _{estimada} (mg)	Recup. (%)	For. Farmac.	DOS _{estimada} (mg)	Recup. (%)
Ni10ra	8.626	89.428	Al60co	54.645	103.470	Ve40ra	38.979	89.046
Ze20sr	18.647	99.438	Df60co	57019	106.406	Isinj	4.679	108.807
Nigt	22.225	124.446	Ba90re	81.617	99.680	Is40co	37.362	92.293
Ni10ca	10.044	114.731	Dt60co	57.184	117.670	Isret	111.183	112.213
Ni20ap	20.070	115.282	Dtap	198.360	113.074	Ishta	220.724	78.764
Ad10ca	9.461	141.117	Di60me	57.689	120.642			
Ad20ap	20.981	117.785	Di120me	115.152	118.756			
Ad30cr	38.057	113.016	He60co	54.870	128.840			
			He120sr	110.619	123.148			

* For. Farm. – Formulação farmacêutica e Recup. – Recuperação de fortificação.

Como é possível verificar-se na Tabela 3.5 são encontradas estimativas de dosagem adequadas para a maioria das formulações farmacêuticas. Atendendo as recuperações superiores com as amostras fortificadas são obtidas para a maioria das formulações farmacêuticas recuperações de fortificação superiores a 110 %. Tal facto é mais evidente para as formulações farmacêuticas de Nifedipina e Diltiazem.

Tal como para a maioria das quantificações através de metodologias analíticas baseadas em técnicas de HPLC, e apesar das suas vantagens devido a sua capacidade separativa, são encontrados por estes métodos alguns problemas que devem ser considerados. Um desses problemas tem a ver com tempos de análise longos. Considerando a calibração efectuada, com cinco padrões, e a quantificação posterior da amostra são encontrados por estes métodos tempos de análise de no mínimo de 50 min. Outros problemas potenciais têm a ver com o grande consumo de solventes e consequentes custos económicos e ambientais.

3.5. Referências

- [1] – United States Pharmacopeial Convention Ed. USP 24.NF 19-The United States Pharmacopeia. The national Formulary (1999)
- [2] – Farmacopeia Portuguesa VII Ed. Ministério da Saúde, Infarmed 1º e 2º Volume (2002)
- [3] – European Pharmacopeia Ed. Council of Europe, 1º Volume e suplemento 4.1 (2001)
- [4] – HMSO Her Magesty's Stationary Office Ed. *British Pharmacopeia* (1993)

4. HIDRÓLISE ALCALINA DA NIFEDIPINA

4.1. Fundamento

Uma solução da Nifedipina em DMSO ou DMF com hidróxido de sódio dá origem a um composto que apresenta uma banda de absorção com c.d.o. máximo superior ao c.d.o. da banda de absorção da Nifedipina nestes solventes. A hipótese mais provável para a obtenção deste composto é a quebra dos grupos ésteres por hidrólise alcalina presentes na molécula da Nifedipina [1]. Como a Nifedipina é pouco solúvel em água esta reacção em meio aquoso é muito lenta e a utilização de solventes não aquosos permitirá então acelerar a reacção. Esta reacção de desenvolvimento de cor em DMSO ou DMF tanto pode ser utilizada na sua identificação [2] como na sua quantificação [3].

O procedimento na reacção de identificação da Nifedipina é o seguinte [2]: 50 mg de Nifedipina são dissolvidos em 1 mL de DMSO e são adicionadas 5 gotas de uma solução de hidróxido 2 M. A cor inicialmente amarela da solução de Nifedipina em DMSO, com absorvância máxima a 330 nm, altera-se para uma coloração vermelho tomate com absorvância máxima a 450 nm.

O procedimento na quantificação da Nifedipina em DMF em meio básico é o seguinte [3]: a aliquotas de uma solução padrão a 200 ppm são adicionados 0.1 mL de uma solução de hidróxido de sódio 2 % (m/V) para um volume final de 10 mL de DMF. Tal como na reacção de identificação é indicada a obtenção de um composto com absorvância máxima superior (425 nm), com coloração estável por 50 min. É referida uma gama linear de resposta entre 6 a 30 ppm e não são referidas interferências. Na preparação das soluções

amostra procede-se à extracção de uma quantidade de pó correspondente a 20 mg de Nifedipina com água destilada. O pó resultante dessa extracção é filtrado e lavado abundantemente com água destilada. O resíduo obtido é então dissolvido quantitativamente em DMF.

A possibilidade de quantificação espectrofotométrica da Nifedipina a c.d.o. mais altos, na presença de possíveis interferentes, e a obtenção de estruturas de dados seguindo a cinética da reacção adequadas à utilização de métodos de decomposição tridimensional, levou a considerar a possibilidade de quantificação da Nifedipina através desta reacção.

4.2. Procedimento experimental

O registo de cada uma das matrizes obtidas seguindo a cinética da reacção foi efectuado na gama de c.d.o. de 240 a 800 nm com um tempo de registo de 35 s, tempo de ciclo de 0.5 s, tempo de integração de 0.1 s e com o obliterador aberto.

As soluções padrão de Nifedipina foram preparadas em DMSO por pesagem rigorosa para a concentração final pretendida. Foram utilizadas concentrações entre 250 e 500 ppm na fase de optimização e de 400 ppm na fase de quantificação. Soluções padrão de menores concentrações foram preparadas por diluição rigorosa desta solução padrão com DMSO.

A massa a pesar das diferentes formas farmacêuticas, para uma concentração estimada em Nifedipina de 400 ppm, foi calculada de acordo com a respectiva dosagem da Nifedipina nas diferentes formas farmacêuticas. Atendendo à dosagem, e só nos casos em que não foi possível obter uma solução amostra desta concentração, foram preparadas soluções de concentrações diferentes. A maioria das soluções amostras foram preparadas por pesagem rigorosa do pó correspondente a um comprimido a partir de uma mistura de 20 comprimidos ou cápsulas. Para o volume de solução requerido, e de forma a ser obtida a concentração pretendida, com a amostra Nigt foi medido um volume adequado de solução e com as amostras Ni10ra e Ad10ca foi adicionado o conteúdo líquido de 10 cápsulas. Excepto para as amostras Nigt, Ni10ra e Ad10ca as soluções amostra foram posteriormente decantadas e centrifugadas a 13000 rpm durante 10 min

Tal como na preparação das soluções anteriores, as soluções de hidróxido de sódio de diferentes concentrações foram também preparadas por pesagem rigorosa do sólido para a concentração pretendida. Foram utilizadas na fase de optimização soluções de hidróxido de sódio com concentrações entre 8×10^{-4} e 9×10^{-1} M e na fase de quantificação soluções de concentração da ordem de 5×10^{-2} M (0.02 % em m/V).

Tanto na fase de optimização como na fase de quantificação a avaliação do método foi feita numa cuvete de quartzo de 1 cm para um volume total de solução de 2.5 mL por adição sucessiva dos reagentes utilizados. Em primeiro lugar adicionou-se o volume de DMSO adequado para 2.5 mL, em seguida adicionou-se o volume de solução a determinar (branco, padrão, amostra ou amostra fortificada) e finalmente, após o início do registo, procedeu-se ao início da reacção por adição do volume adequado da solução de hidróxido de sódio.

Para a obtenção do composto corado adicionou-se, numa cuvete de quartzo de 1 cm, um volume de cerca de 0.070 mL de uma solução de hidróxido de sódio 0.05 M a 2.5 mL solução de Nifedipina a determinar. A relação de número de moles de hidróxido de sódio para número de moles de Nifedipina utilizada foi de 100 vezes para a concentração de Nifedipina de 5 ppm e de 17 vezes para a concentração de 100 ppm.

4.3. Optimização

Na fase de optimização dos procedimentos do método analítico pretendeu-se avaliar as condições adequadas da reacção, verificando nomeadamente, a concentração de hidróxido de sódio a utilizar tanto no que diz respeito à concentração máxima a utilizar como à relação adequada de número de moles de hidróxido de sódio para número de moles de Nifedipina.

A avaliação da relação mais adequada de número de moles de hidróxido de sódio para número de moles de Nifedipina foi efectuada através da análise dos espectros obtidos, da absorvância máxima, do c.d.o. de absorvância máxima, do tempo de reacção de absorvância máxima, da função linear obtida e do limite de detecção obtido por variação do número de moles de hidróxido de sódio presentes em solução. Foram efectuados dois tipos de avaliações: (i) um tipo de avaliação com um volume igual de hidróxido de sódio adicionado mas com relações de número de moles de hidróxido de sódio diferentes para as diferentes concentrações de Nifedipina; (ii) um segundo tipo de avaliação, com volumes diferentes de soluções de concentrações diferentes de hidróxido de sódio, mas com uma relação de número de moles de hidróxido de sódio para Nifedipina igual nas diferentes concentrações. Para isso, variou-se tanto a concentração de hidróxido de sódio como o volume de solução de hidróxido de sódio adicionados durante a optimização.

A possibilidade de utilização desta reacção com solventes diferentes foi também avaliada. Além do DMSO, esta reacção foi também inicialmente avaliada em metanol. Devido a pouca solubilidade da Nifedipina em água não se procedeu a sua avaliação nem neste solvente nem em solução tampão de pH 7.

4.3.1. Resultados

Avaliação prévia

Como já seria de esperar o metanol não se revelou um solvente adequado para a determinação com este método. Verificou-se que a reacção não acontecia e, portanto, não era possível detectar a Nifedipina. Só em DMSO a reacção aconteceu. Também, numa avaliação prévia de fluorescência feita com uma concentração alta de Nifedipina em

DMSO e com uma relação de número de moles de hidróxido de sódio para número de moles de Nifedipina de 24 vezes verificou-se que não apresentava fluorescência.

Após a adição de hidróxido de sódio a uma solução de Nifedipina em DMSO verificou-se, em determinadas condições, o aparecimento de um precipitado. Este facto deve-se à precipitação do hidróxido de sódio, e aconteceu com concentrações demasiado elevadas de hidróxido de sódio quando no início se avaliaram concentrações elevadas de Nifedipina ou então quando, com concentrações mais baixas de Nifedipina, se utilizaram concentrações elevadas de hidróxido de sódio para se obterem relações de número de moles elevadas.

Uma avaliação do número mínimo de moles de hidróxido de sódio presentes em 2.5 mL de DMSO que provocava essa precipitação foi feita em frascos de amostra. Essa avaliação foi efectuada visualmente após adição de volumes diferentes de uma solução de hidróxido de sódio 0.905 M a um volume de DMSO adequado para perfazer 2.5 mL. Desta avaliação verificou-se que, para um número de moles de hidróxido de sódio superior a 3×10^{-5} moles presentes em 2.5 mL de solução, ou concentração de hidróxido de sódio superior a 0.012 M, ocorria precipitação. Assim, um número de moles de hidróxido de sódio de 3×10^{-5} moles presentes em 2.5 mL solução, ou uma solução de hidróxido de sódio com concentração de 0.012 M presente na cuvete onde se deu a reacção, foi o limite superior que se encontrou para o concentração de hidróxido de sódio a utilizar na reacção.

Na Fig. 4.1 representa-se a absorvância obtida em função da relação de número de moles de hidróxido de sódio adicionado a um determinado número de moles de Nifedipina. Desta forma verificou-se o efeito da adição de quantidades sucessivamente maiores de hidróxido de sódio a duas concentrações de Nifedipina diferentes. Uma concentração de 5 ppm, um pouco acima do limite de detecção, e uma segunda concentração de 30 ppm no limite superior da gama linear. Apesar de só estar representado a variação da absorvância, o efeito do aumento de número de moles de hidróxido de sódio, e consequentemente da relação de número de moles de hidróxido de sódio para um determinado número de moles de Nifedipina, foi também avaliado no que diz respeito ao tempo de reacção e ao c.d.o. de absorvância máxima. No entanto verificou-se que, para estes dois parâmetros, esta variação não era significativa.

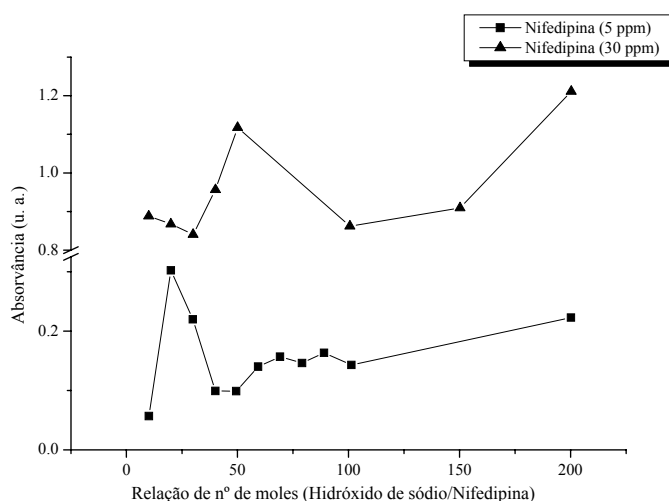


Fig. 4.1 – Avaliação da relação de número de moles de hidróxido de sódio para número de moles de Nifedipina com concentrações de Nifedipina de 5 e 30 ppm.

Como se pode ver na Fig. 4.1 a zona de maior estabilidade para a concentração de Nifedipina de 5 ppm situa-se entre uma relação de número de moles 40 e 100 vezes, e para a concentração de 30 ppm encontra-se a relações de número de moles mais baixas, entre 10 e 30 vezes, e mais altas entre 100 e 150 vezes.

Verificaram-se também picos de absorvância, a 5 ppm para uma relação de número de moles de 20 vezes e, a 30 ppm para uma relação de número de moles de 50 vezes. É de notar ainda que para a concentração de Nifedipina de 30 ppm, e para uma relação de número de moles de 200 vezes, o número de moles presentes em solução, 4×10^{-5} moles, está acima do limite máximo de número de moles encontrado para o hidróxido de sódio e daí o aumento brusco de intensidade de absorvância verificado no gráfico.

Relações de número de moles superiores às apresentadas na Fig. 4.1 foram também avaliadas para a concentração de Nifedipina de 5 e 30 ppm. Com estas relações de número de moles verificou-se um aumento contínuo de absorvância e esse aumento foi mais abrupto para relações superiores de número de moles. Foi ainda avaliado o efeito deste aumento de hidróxido de sódio adicionado numa concentração abaixo do limite de detecção. Verificou-se, à concentração de 1 ppm de Nifedipina, que para relações mais baixas de número de moles obtêm-se um valor de absorvância próxima de zero, para uma relação de número de moles de 50 vezes um aumento ligeiro e para relações maiores um decréscimo ligeiro.

Da avaliação dos registos obtidos para a Nifedipina a 5 e 30 ppm a diferentes relações de números de moles de hidróxido de sódio para a Nifedipina, e como se pode ver na Fig. 4.2, verificou-se uma maior dispersão dos espectros a relações de número de moles mais baixas (≤ 40 vezes). Esta dispersão é mais evidente para a concentração de 5 ppm do que nas mesmas condições para a concentração de Nifedipina 30 ppm.

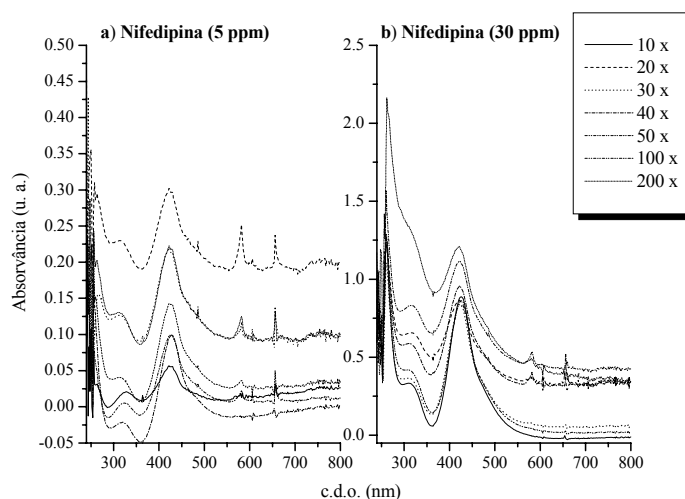


Fig. 4.2 – Avaliação dos espectros obtidos padrão de Nifedipina de a) 5 ppm e b) 30 ppm variando a relação de número de moles de hidróxido de sódio para número de moles de Nifedipina.

Tendo em atenção estes resultados iniciais verificou-se a necessidade de utilizar uma concentração de hidróxido de sódio na cuvete, abaixo de 0.012 M, bem como de uma relação de número de moles de hidróxido de sódio para número de moles de Nifedipina adequada para uma quantificação correcta da Nifedipina.

Avaliação de funções lineares

O estabelecimento da relação de número de moles mais adequada teve como base os resultados obtidos na avaliação prévia inicial. Assim, foram utilizadas relações de número de moles fixas e relações de número de moles variáveis na gama de concentrações de Nifedipina. A escolha da relação de número de moles mais adequada teve como base os parâmetros de reacção e da função linear obtidos. Os resultados obtidos deste estudo são apresentados na Tabela 4.1.

Verificou-se uma certa semelhança nos parâmetros de reacção e na função linear obtidos na gama de concentrações indicada. Foi obtida, para a maioria das relações de número de moles estudadas, uma reacção muito rápida com tempos de reacção entre 1.5 e 5 s. As únicas excepções foram encontradas na avaliação de uma relação de 100 vezes em toda a gama de concentrações, para as concentrações de Nifedipina de 20 e 25 ppm, com tempos de reacção superiores aos normalmente obtidos da ordem dos 35 s.

Tabela 4.1 – Resultados obtidos no processo de optimização da determinação da Nifedipina em DMSO por adição de hidróxido de sódio.*

Condições de reacção						
Hidróxido de sódio / Nifedipina (nº de vezes)	10	50	100	120 - 20	600 - 100	
Hidróxido de sódio	Concentração (M)	9.046×10^{-3}	$9.046 \times 10^{-3} - 9.046 \times 10^{-2}$	$8.170 \times 10^{-4} - 4.179 \times 10^{-1}$	4.179×10^{-1}	9.046×10^{-1}
	Volume (mL)	0.008 – 0.240	0.020 – 0.120	0.009 – 0.240	0.010	0.024
	Gama avaliada (ppm)	1 – 30	1 – 30	1 – 30	1 – 40	1 – 30
Parâmetros de reacção						
Variacão de $t_{\text{reacção}}$ (s)		2.5 – 4.5	1.5 – 5.5	1.5 – 34.5	2 - 5	2 – 5
ϵ ($M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)		11 498	12 120	11 491	8 984	8 740
Nifedipina (30 ppm)	Absorvância (u. a.)	1.059	1.108	1.115	0.755	0.857
	c.d.o. (nm)	422	422	424	428	426
	$t_{\text{reacção}}$ (s)	3	1.5	4	2	4
Função linear ($y = bx + a$, $m = 6$)						
Gama linear (ppm)		5 - 30	5 - 30	5 - 30	5 - 30	5 - 30
a		0.071	-0.080	0.098	0.000	0.122
		(0.060)	(0.043)	(0.037)	(0.037)	(0.024)
b		0.033	0.037	0.033	0.026	0.025
		(0.003)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.001)
$s_{y/x}$		0.064	0.047	0.040	0.040	0.026
R		0.9834	0.9928	0.9935	0.9894	0.9952
LD ($3S_{y/x}/b$)		5.776	3.770	3.607	4.627	3.090

* Na relação hidróxido de sódio/Nifedipina quando um único valor é indicado esse valor corresponde a uma relação de moles igual em toda a gama de concentrações de Nifedipina e quando dois valores são indicados o primeiro corresponde a uma concentração de Nifedipina de 5 ppm e o segundo valor corresponde a uma concentração de 30 ppm. Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão de cada um dos parâmetros avaliados.

Salvo para algumas determinações, onde foram encontrados c.d.o. ligeiramente maiores, na maioria das determinações o c.d.o. máximo encontrado situou-se num intervalo estreito entre 422 e 424 nm. Valores ligeiramente mais baixos de absorvidades molares foram encontrados para as funções lineares obtidas com relações de números de moles variáveis ao longo da gama de concentrações. Esta constatação deve-se ao facto de relações de número de moles maiores a concentrações baixas de Nifedipina provocar um aumento de absorvância, como se pôde verificar na Fig. 4.1.

Salvo algumas excepções na avaliação dos parâmetros das funções lineares na gama de 1 a 30 ppm verificou-se a obtenção de valores de ordenada na origem próximos de zero, declives de valor aproximadamente igual ($\cong 0.03$) e valores de coeficiente de correlação linear de aproximadamente 0.990. Também, foram encontrados limites de detecção da ordem de 4 ppm. Limites ligeiramente mais altos foram encontrados para relações menores a concentrações baixas de Nifedipina e limites ligeiramente mais baixos para relações maiores.

Um valor de ordenada na origem ligeiramente maior foi encontrado na função linear obtida com uma relação de número de moles variáveis de 600 a 100 vezes. Este facto deve-se também ao aumento brusco de absorvância por a relação de número de moles de hidróxido de sódio para a de Nifedipina ser bastante alta a concentrações baixas. O valor ligeiramente superior para o declive, encontrado com uma relação de moles de 50 vezes, é explicado, como se pôde observar na Fig. 4.1, pela maior diferença de absorvâncias entre a absorvância encontrada a uma concentração de Nifedipina 30 ppm e 5 ppm.

Não havendo diferenças apreciáveis nas avaliações efectuadas optou-se pela adição de um volume fixo de uma solução de hidróxido de sódio, pois assim eliminou-se um factor de variabilidade na determinação. De forma a que uma relação de número de moles variáveis para a concentração de Nifedipina de 5 e 30 ppm permitisse a determinação destes dois níveis de concentração em zonas de maior estabilidade de absorvância, e de forma a obter-se relações de número de moles de hidróxido de sódio para número de moles de Nifedipina de cerca de 100 vezes para uma concentração de Nifedipina de 5 ppm e de cerca de 20 vezes para uma concentração de 30 ppm, optou-se pela adição de um volume fixo de hidróxido de sódio 0.05 M (0.070 mL). O número de moles de hidróxido de sódio assim adicionado foi aproximadamente 8 vezes menor do que o limite máximo avaliado de 3×10^{-5} moles (concentração de hidróxido de sódio obtida de 1.4×10^{-3} M).

4.4. Quantificação

Na quantificação, o método de calibração de adição de padrão foi efectuado por adição de volumes diferentes ($\approx 30, 60$ e $90 \mu\text{L}$) da solução padrão de Nifedipina 400 ppm para um volume final de 2.50 mL em DMSO. A avaliação de solução padrão e das soluções amostra foi efectuada para uma concentração estimada de 10 ppm . A fortificação avaliada foi de 2.5 ppm . As soluções padrão preparadas encontravam-se numa gama de 5 a 15 ppm .

A comparação das funções lineares obtidas com a solução padrão e com as soluções amostra foi efectuada na gama de 5 a 25 ppm .

Análise de registos

Da análise dos registos obtidos verificou-se que inicialmente a Nifedipina em DMSO apresentava uma banda larga com máximo de absorvância aos 334 nm e que após a adição de hidróxido de sódio o c.d.o. de absorvância máximo da Nifedipina em DMSO passava dos 334 nm para os 422 nm . A banda de absorvância obtida também se alterava para uma banda de absorvância mais estreita e de maior altura.

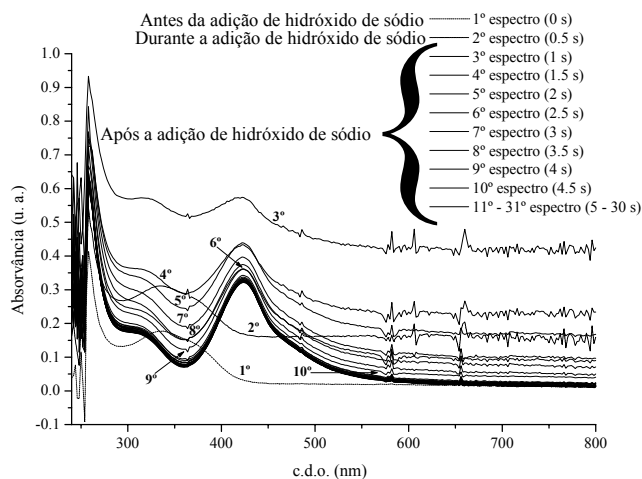


Fig. 4.3 – Evolução da reacção uma solução padrão de Nifedipina de 10 ppm antes, durante e após a adição de 0.070 mL de uma solução de hidróxido de sódio 0.05 M .

No início da reacção (Fig. 4.3) observou-se que durante algum tempo os espectros apresentavam desvios tanto na linha de base como na banda de absorvância da Nifedipina. Esses espectros, aos quais se designou de anormalmente altos, encontravam-se acima do

registro normal. Além disso, também o próprio registro destes espectros se encontrava alterado com um ligeiro ruído. Verificou-se ainda que esse ligeiro ruído era mais acentuado na linha de base, acima de 560 nm, e menor na banda de absorvância da Nifedipina. Outro problema encontrado no registro dos espectros, e que é necessário ter em consideração, foi a existência, em alguns registros, de conjuntos de espectros bem delimitados que se encontram separados pela sua absorvância máxima semelhante.

A escolha de absorvância máxima utilizada na determinação por análise directa teve em consideração sobretudo a existência de espectros anormalmente altos e que têm a ver com o desenvolvimento de cor inicial antes da estabilização ao ser adicionada a solução aquosa de hidróxido de sódio à solução de Nifedipina em DMSO.

Curvas de calibração padrão

Na Tabela 4.2 são apresentados os valores dos parâmetros de regressão linear encontrados pelo método dos mínimos quadrados das curvas de calibração padrão obtidas com o padrão e com as amostras analisadas. Para o padrão são apresentados o valor mínimo e máximo dos parâmetros obtidos de quatro regressões lineares obtidas nas mesmas condições em dias diferentes.

Tabela 4.2 – Comparação da curva de calibração padrão de um padrão e das amostras farmacêuticas obtidas no máximo de absorvância.*

Parâmetros avaliados	Calibração Padrão ($y = bx + a$, $m = 5$ e Gama - 5 a 25 ppm)				
	Padrão	Ni10ra	Ze20sr	Nigt	Ni10ca
a	0.018-0.157	0.118 (0.021)	0.074 (0.034)	0.116 (0.031)	0.206 (0.010)
b	2.582×10^{-2} - 2.775×10^{-2}	2.039×10^{-2} (1.275×10^{-3})	2.885×10^{-2} (2.041×10^{-3})	3.089×10^{-2} ($1,879 \times 10^{-3}$)	2.230×10^{-2} (5.702×10^{-4})
ϵ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	8900-9600	7061	9990	10697	7842
$s_{y/x}$	0.014-0.041	0.020	0.032	0.030	0.009
R	0.9871-0.9984	0.9942	0.9926	0.9945	0.9990

(continuação)

Parâmetros avaliados	Calibração Padrão ($y = bx + a$, $m = 5$ e Gama - 5 a 25 ppm)			
	Ni20ap	Ad10ca	Ad20ap	Ad30cr
a	0.185 (0.041)	0.074 (0.019)	0.073 (0.024)	0.074 (0.034)
b	$2,553 \times 10^{-2}$ (2.490×10^{-3})	2.350×10^{-2} (1.119×10^{-3})	2.635×10^{-2} (1.434×10^{-3})	2.795×10^{-2} (2.048×10^{-3})
ϵ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	8837	8137	9125	9680
$s_{y/x}$	0.040	0.018	0.023	0.032
R	0.9860	0.9966	0.9956	0.9920

* Ver rodapé da Tabela 3.1

De uma forma geral são encontradas para todas as amostras ajustes lineares com coeficientes de correlação linear próximos aos obtidos com o padrão, de ordem de grandeza igual ou superior a 0.990, o que torna possível a sua comparação. Um melhor ajuste linear, é obtido para a amostra Ni10ca, $s_{y/x} = 0.009$, e um ajuste ligeiramente pior, $s_{y/x} = 0.040$, é obtido para Ni20ap.

Excepto para as amostras Ni20ap e Ni10ca, os valores de ordenada na origem estão de uma forma geral dentro do intervalo de valores obtidos para o padrão. Apesar dos valores de ordenada na origem obtidos não serem altos, todos os valores são superiores a zero. Assim é possível que algum tipo de desvio sistemático positivo inerente ao próprio método possa existir. O maior erro avaliado pelo desvio padrão associado à ordenada na origem é encontrado com a amostra Ni20ap e o menor é encontrado para a amostra Ni10ca.

Por comparação das absorvidades molares, há quatro amostras com valores que se podem considerar apresentar valores diferentes do valor de absorvidade encontrado com o padrão. As amostras Ni10ra, Ni10ca e Ad10ca com valores inferiores, possíveis interferências negativas e, Nigt com valor superior, possível interferência positiva.

4.4.1. Análise directa

Da avaliação de todas as adições de padrão efectuadas confirmou-se, como já verificado na fase de optimização, alguma variabilidade dos tempos de reacção (2.5 s a 11.5 s) e um intervalo estreito dos c.d.o. (422 a 424 nm) encontrados ao máximo de intensidade de absorvância.

As estimativas de concentração do solvente, padrão, amostras não fortificadas e amostras fortificadas obtidas por análise directa ao máximo de absorvância são apresentadas na Tabela 4.3 a) e b).

Tabela 4.3 – Estimativas de concentração obtidas do a) solvente, padrão, amostras não fortificadas e b) amostras fortificadas por análise directa ao c.d.o. de absorvância máxima.*

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Solvente	Padrão	Ni10ra	Ze20sr	Nigt
C_{estimada} (ppm)	1.968 (1.277)	11.112 (0.769)	12.118 (0.273)	11.374 (2.226)	14.805 (1.686)
C_{esperada} (ppm)	0.000	10.053	10.080	9.955	10.080
Recuperação (%)	----	110.540	120.216	114.264	146.874
LD (3S_{y/x}/b)	3.903	1.331	0.449	3.783	2.460
DOS_{estimada} (mg)	----	----	12.022	22.853	29.375
DOS_{estimada} HPLC (mg)	----	----	8.626	18.647	22.225
EP (%)	----	10.534	39.369	22.556	32.171
t_{reacção} (s)	6.5-3.5-4-5	8-9.5-4-4.5	4-5-3.5-11.5	2.5-5-7.5-7.5	5.5-4.5-2.5-3
c.d.o. (nm)	422 (3) e 424	424 (4)	422 (4)	422(2) e 424(2)	422(2) e 424(2)
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.060 (0.033)	0.345 (0.011)	0.308 (0.003)	0.324 (0.030)	0.413 (0.019)
b	3.027×10 ⁻² (3.515×10 ⁻³)	3.100×10 ⁻² (1.227×10 ⁻³)	2.538×10 ⁻² (3.391×10 ⁻⁴)	2.851×10 ⁻² (3.226×10 ⁻³)	2.791×10 ⁻² (2.049×10 ⁻³)
S_{y/x}	0.039	0.014	0.004	0.036	0.023
R	0.9868	0.9984	0.9998	0.9874	0.9947

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Ni10ca	Ni20ap	Ad10ca	Ad20ap	Ad30cr
C_{estimada} (ppm)	13.516 (1.091)	16.324 (2.644)	10.222 (0.705)	11.117 (2.568)	13.130 (1.188)
C_{esperada} (ppm)	9.929	9.956	10.080	9.939	10.102
Recuperação (%)	136.123	163.960	101.408	111.851	129.969
LD (3S_{y/x}/b)	1.683	3.612	1.275	4.439	1.867
DOS_{estimada} (mg)	13.612	32.921	10.141	22.370	39.153
DOS_{estimada} HPLC (mg)	10.044	20.070	9.461	20.981	38.057
EP (%)	35.524	64.031	7.187	6.620	2.880
t_{reacção} (s)	6-4.5-3.5-3.5	4.5-5.5-4.5-5	4-5-4.5-4	5-5-2.5-6.5	2.5-5-5.5-4.5
c.d.o. (nm)	422 (4)	422 (4)	424 (4)	422 (3) e 424	422(2) e 424(2)
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.403 (0.014)	0.443 (0.027)	0.295 (0.010)	0.329 (0.037)	0.384 (0.015)
b	2.983×10 ⁻² (1.498×10 ⁻³)	2.714×10 ⁻² (2.934×10 ⁻³)	2.886×10 ⁻² (1.094×10 ⁻³)	2.961×10 ⁻² (3.911×10 ⁻³)	2.927×10 ⁻² (1.627×10 ⁻³)
S_{y/x}	0.017	0.033	0.012	0.044	0.018
R	0.9975	0.9885	0.9986	0.9830	0.9969

(Continua)

Tabela 4.3 (Continuação)

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Ni10raFo	Ze20srFo	NigtFo	Ni10caFo
$C_{estimada}$ (ppm)	14.358 (0.555)	15.165 (0.476)	19.553 (0.210)	15.797 (1.971)
$C_{esperada}$ (ppm)	12.552	12.397	12.540	12.839
Recuperação (%)	114.388	122.328	155.930	127.508
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.826	0.681	0.255	2.760
$t_{reacção}$ (s)	3.5, 3, 3 e 3.5	5, 4.5, 6 e 6	5.5, 4.5, 13.5 e 1.5	4, 3.5, 4.5 e 3
c.d.o. (nm)	422 e 424 (3)	422 (2) e 424 (2)	422 (4)	422 (3) e 424
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)				
$C_{estimada}$ (ppm)	2.240	3.791	4.748	2.281
$C_{esperada}$ (ppm)	2.472	2.442	2.460	2.460
Recuperação (%)	90.615	155.242	193.040	92.739
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	- 0.232	+ 1.349	+ 2.284	- 0.179
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	0.386 (0.006)	0.408 (0.005)	0.516 (0.002)	0.483 (0.023)
b	2.687×10^{-2} (6.605×10^{-4})	2.691×10^{-2} (5.485×10^{-4})	2.637×10^{-2} (2.009×10^{-4})	3.055×10^{-2} (2.516×10^{-3})
$S_{y/x}$	0.007	0.006	0.002	0.028
R	0.9994	0.9996	0.9999	0.9933

b) amostras fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Ni20apFo	Ad10caFo	Ad20apFo	Ad30crFo
$C_{estimada}$ (ppm)	19.367 (1.921)	13.847 (0.760)	14.749 (1.141)	15.604 (1.295)
$C_{esperada}$ (ppm)	12.398	12.552	12.411	12.574
Recuperação (%)	156.209	110.317	118.838	124.097
LD ($3S_{y/x}/b$)	2.340	1.157	1.671	1.831
$t_{reacção}$ (s)	1.5, 6.5, 9.5 e 6.5	8,9,5,4 e 4,5	4,5,2,5,4,5 e 2,5	4,5,3,3,5 e 4
c.d.o. (nm)	422 (3) e 424	422 e 424 (3)	422 (4)	422 (2) e 424 (2)
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)				
$C_{estimada}$ (ppm)	3.043	3.625	3.632	2.474
$C_{esperada}$ (ppm)	2.442	2.472	2.472	2.472
Recuperação (%)	124.611	146.642	146.926	100.081
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	+ 0.601	+ 1.153	+ 1.160	+ 0.002
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	0.490 (0.017)	0.380 (0.009)	0.421 (0.013)	0.469 (0.015)
b	2.529×10^{-2} (1.771×10^{-3})	2.745×10^{-2} (9.454×10^{-4})	2.855×10^{-2} (1.420×10^{-3})	3.006×10^{-2} (1.638×10^{-3})
$S_{y/x}$	0.020	0.011	0.016	0.018
R	0.9951	0.9988	0.9975	0.9970

* A dosagem é dada em massa de composto por comprimido excepto para Nigt em que a dosagem vem em massa de composto por mL; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados, excepto na avaliação do c.d.o. em que o valor entre parêntesis corresponde ao número de vezes que é encontrado um determinado c.d.o. de absorvância máxima. Os tempos de reacção e os c.d.o. apresentados correspondem aos obtidos nas quatro determinações de cada uma das adições de padrão.

Para todas as amostras foram encontrados ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza superior a 0.990. A única exceção foi encontrada para a amostra Ad20ap com um coeficiente de correlação linear da ordem de 0.980. Devido aos níveis de concentração mais altos avaliados, e conseqüente maior intensidade de sinal, foram obtidos melhores ajustes lineares na determinação da concentração total nas amostras fortificadas.

Excepto para as amostras Ze20sr, Ni20ap e Ad20ap e Ni10caFo, são obtidos para a maioria das amostras desvios padrão relativos inferiores a 10 %. Também, atendendo ao nível de concentração ligeiramente mais alto, o desvio padrão relativo associado à determinação de concentração das amostras fortificadas é de uma forma geral inferior ao desvio padrão relativo associado à determinação das amostras não fortificadas.

A Tabela 4.3 a) permite verificar que na determinação no solvente e no padrão foram obtidas estimativas mais altas do que as esperadas. Para o solvente uma estimativa da ordem dos 2 ppm para uma concentração esperada de 0 ppm e para o padrão uma estimativa da ordem dos 11 ppm para uma concentração esperada de 10 ppm. No entanto, para as duas determinações, a concentração estimada aproxima-se da concentração esperada considerando o desvio padrão associado.

Da avaliação da quantificação da Nifedipina nas amostras não fortificadas e fortificadas das formulações farmacêuticas estudadas, Tabela 4.3 a) e b), verificou-se que também foram obtidas estimativas da concentração total e de fortificação mais altas do que as esperadas com recuperações acima de 100 %. São obtidas recuperações acima dos 120 % para cinco amostras não fortificadas (Ni10ra, Nigt, Ni10ca, Ni20ap e Ad30cr) e cinco amostras fortificadas (Ze20srFo, NigtFo, Ni20apFo, Ad10caFo e Ad20apFo). Para a maioria das formulações farmacêuticas são obtidas recuperações de fortificação acima dos 110 %. As únicas exceções verificam-se para as formulações Ni10ra, Ni10ca e Ad30cr.

São encontrados erros de previsão para a maioria das amostras superiores a 10 %. As exceções, são as amostras não fortificadas Ad10ca, Ad20ap e Ad30cr, com erros de previsão de 7 % para as duas primeiras amostras e de 3% para a última das amostras referidas. Ao serem consideradas todas as amostras na avaliação de quantificação por análise directa é obtido um valor de EPM de 26.292 %, de EPT de 27.759 % e de RMSEP de 5.721. Atendendo ao valor de recuperação elevado encontrado com a amostra Ad30cr pelo método de referência de HPLC-UV esta amostra pode não ser considerada nesta

avaliação. Ao não ser considerada a amostra Ad30cr é obtido um valor de EPM de 29.637%, de EPT de 36.563 % e de RMSEP de 6.102. Verifica-se no entanto que, ao não ser considerada a amostra Ad30cr, são encontrados valores de uma forma geral mais elevados do que os obtidos ao serem consideradas todas as amostras.

De uma forma geral, uma possível sobre estimativa da concentração é obtida por análise directa ao valor máximo de c.d.o. de absorvância. Esta sobre estimativa pode ser devida a uma interferência positiva. No entanto, esta não é confirmada, para a maioria das amostras, nem por comparação das suas funções lineares com a função linear obtida para o padrão e nem pela estimativa de concentração do padrão obtida. Só para a amostra Nigt tal hipótese parece apresentar uma maior consistência. A estimativa de Nifedipina no solvente de cerca de 2 ppm associada a alguns valores de ordenada na origem nas funções lineares obtidas com as amostras pode indiciar um possível desvio sistemático associado ao método analítico.

4.4.2. Análise multivariada

Para a análise multivariada todas as matrizes de dados obtidas foram previamente reduzidas, atendendo ao tempo de reacção máximo e a zonas do espectro que possam não ser consideradas relevantes para esta análise.

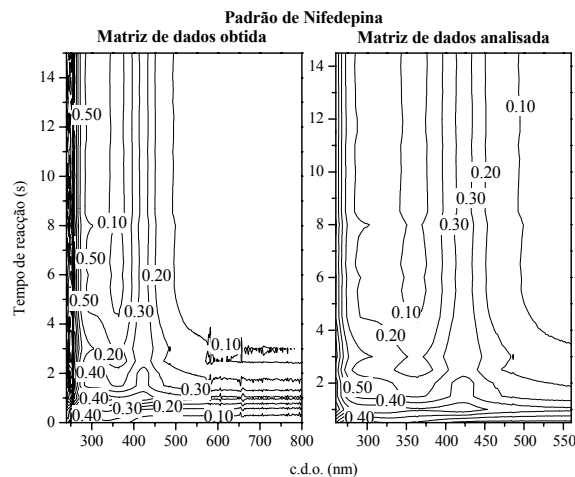


Fig. 4.4 – Gráficos de contorno de níveis da matriz obtida (tempo de reacção 15 s) e matriz reduzida (tempo de reacção 14.5 s) da solução padrão de Nifedipina de 10 ppm.

As matrizes, com um tempo de registo de 35 s (71 tempos de reacção) numa gama de c.d.o. de 240 a 800 nm (281 c.d.o.), foram reduzidas para matrizes com um tempo de reacção de 14 s (29 tempos de reacção) e uma gama de c.d.o. de 260 a 560 nm (151 c.d.o.). Foi analisado um total de 4379 pontos espectrais.

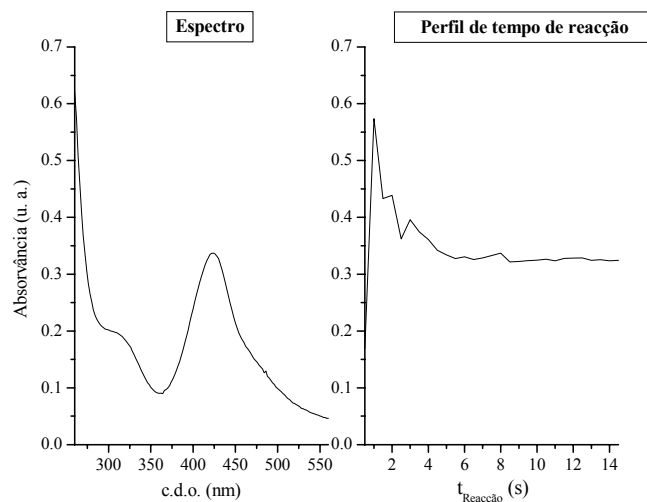


Fig. 4.5 – Espectro e perfil de variação da intensidade de absorvância com o tempo experimentais do padrão de Nifedipina 10.053 ppm ao máximo de absorvância (tempo de reacção de 8 s e c.d.o. de 424 nm).

Na Fig. 4.5 são apresentados o espectro e o perfil de tempo de reacção experimentais obtidos a intensidade de absorvância máxima.

Atendendo ao espectro obtido, e excepto para a avaliação do solvente, o critério de avaliação na comparação das diferentes estimativas obtidas pelos métodos de decomposição tridimensional é um critério de maior semelhança possível, ou seja um coeficiente correlação linear positivo alto.

Uma menor intensidade de absorvância com um aumento até ao máximo de reacção e eventual estabilização ou ligeiro decréscimo é o perfil esperado para o tempo de reacção. Atendendo ao perfil de tempo de reacção esperado para o tempo de reacção, o critério de avaliação foi de uma forma geral o de menor semelhança e com uma variação oposta ao obtido experimentalmente, ou seja, um menor coeficiente correlação linear negativo. Ao contrário dos espectros experimentais obtidos em que uma menor variação está presente, no que respeita aos perfis de tempo de reacção experimentais uma maior variação é encontrada, assim o critério pode ser o de maior semelhança e com uma variação oposta ao experimental obtido ou seja um maior coeficiente de correlação negativo.

Análise inicial

A representação gráfica (Fig. 4.6) dos valores singulares normalizados obtidos por decomposição de valor singular para os três tipos de amostras estudadas mostra que, excepto para a matriz singular de DMSO, no mínimo dois e no máximo quatro componentes são necessários para a análise do tipo de matrizes avaliadas.

Para as matrizes de linha aumentada na dimensão do espectro, três componentes parecem ser necessários. A diferença de ordem da matriz linha aumentada na dimensão do tempo de reacção e na dimensão da concentração indica claramente um desvio a trilinearidade. O número de componentes encontrado para estes dois tipos de matrizes é, no mínimo de quatro componentes e no máximo de seis componentes.

Tabela 4.4 – Variância explicada pelos primeiros cinco componentes obtidos por análise de componentes principais.*

Número de componentes	Variância explicada por PCA (%)					
	DMSO	DMSO [t _{rx.} ×(conc.×esp.)]	Padrão	Padrão [t _{rx.} ×(conc.×esp.)]	Nigt	Nigt [t _{rx.} ×(conc.×esp.)]
1	99.57	89.54	96.81	95.96	96.96	95.14
2	0.25	6.81	3.05	3.25	2.94	3.12
3	0.17	3.27	0.13	0.70	0.06	1.41
4	0.01	0.22	0.01	0.06	0.03	0.19
5	0.00	0.11	0.00	0.03	0.00	0.10

* [t_{rx.}×(conc.×esp.)] – Matriz linha aumentada em que as linhas são o número de tempos de reacção e as colunas os espectros obtidos nas quatro matrizes.

Na Tabela 4.4 é também possível verificar na avaliação das matrizes de linha aumentada na dimensão do tempo de reacção de DMSO e Nigt parecem ser necessários três componentes para explicar quase 100 % de variância e do padrão de Nifedipina dois componentes. Ainda é possível verificar claramente o aumento de ordem das matrizes singulares para as matrizes de linha aumentada. Para as matrizes de DMSO de um para três e para as matrizes de padrão e Nigt de dois para três.

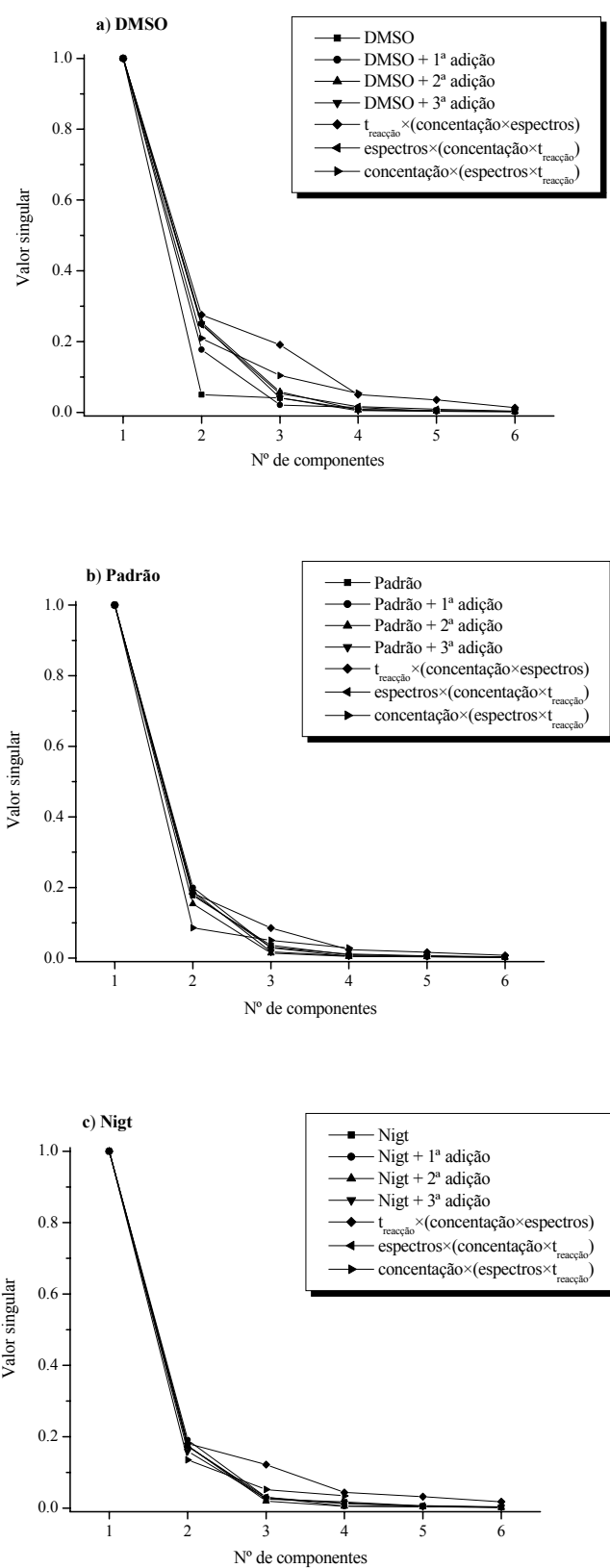


Fig. 4.6 – Gráficos de valor singular de cada uma das matrizes singulares e das respectivas matrizes aumentadas de a) DMSO, b) padrão de Nifedipina e c) amostra Nigt.

4.4.2.1 - PARAFAC

No ajuste pelo modelo PARAFAC, foi de uma forma geral utilizada a matriz tridimensional [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] ($151 \times 29 \times 4$). As condições geralmente utilizadas para o ajuste foram a aplicação de restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições.

Solvente

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 4.5 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC, de um a cinco componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por TLD na análise da matriz tridimensional do solvente DMSO.

Como se pode verificar na Tabela 4.5, por validação cruzada as menores diferenças de valores de ajuste foram encontradas para os modelos de três a cinco componentes. Exceptuando os modelos de um e dois componentes, foi ainda encontrado para o modelo de três componentes um número de iterações baixo. No entanto os valores do teste de consistência do núcleo indicam claramente que o modelo mais adequado é o modelo de dois componentes.

Tabela 4.5 – Validação cruzada do modelo PARAFAC, de 1 a 5 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por TLD na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] do solvente DMSO. São apresentados a diferença dos ajustes obtidos por validação cruzada entre os modelos na análise da matriz segmentada e total, o número de iterações e o valor do teste de consistência do núcleo (corcondia).

	Número de componentes				
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco
Número de Iterações	5	2	120	886	2500
Corcondia (%)	100	100	-6.387	2.296	5.628
$\Delta_{\text{AjMS-AjMT}}$	-0.723	-0.505	-0.127	-0.075	-0.029

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 4.6 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC na análise da matriz tridimensional do solvente DMSO. Na Tabela 4.6 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições. Na Tabela

4.6 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

É possível verificar pela Tabela 4.6 b), que a melhor estimativa de concentração, com uma concentração de 0.095 ppm, com um ajuste adequado e teste de consistência válido, é obtida com a matriz centrada na dimensão dos espectros de absorvância. Note-se, no entanto, que é encontrada a pior estimativa do componente principal na dimensão do espectro com um coeficiente de correlação linear baixo. Só para a matriz centrada na dimensão dos espectros, e normalizada na dimensão dos perfis de tempos de reacção, é encontrada uma melhor estimativa de concentração. No entanto, associado a esta estimativa de concentração é encontrado um limite de detecção baixo e um valor de percentagem de ajuste do modelo negativo que não permite considerar a estimativa de concentração obtida por este modelo.

É notório por análise da Tabela 4.6 a), que o modelo de PARAFAC de três componentes é o que tem o maior valor de percentagem ajuste do modelo mas, tal como no procedimento de validação cruzada, a validade deste modelo não é confirmado pelo teste de consistência do núcleo. Este facto, associado a um número de iterações também baixo, indica que apesar deste modelo poder ser o mais adequado há claramente uma dificuldade de ajuste. No entanto, tal como na avaliação por validação cruzada, o valor obtido pelo teste de consistência revela que o modelo mais adequado é o modelo de dois componentes.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de PARAFAC de dois componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC de dois componentes sem restrições na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reacção}}$ \times concentração].

Tabela 4.6 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC na análise da matriz [espectro × $t_{\text{reação}}$ × concentração] de DMSO com a) restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por PARAFAC sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) não negatividade nas três dimensões

	Número de componentes			
	Dois	Três	Quatro	Cinco
C_{estimada} (ppm)	0.536 (0.173)	0.398 (0.137)	0.283 (0.719)	4.734 (1.465)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{v/x}/b)	0.592	0.477	2.521	3.659
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	80.601	92.182	86.037	86.747
SSQ_{resíduos}	39.249	6.375	20.335	18.319
Iterações	16	20	2500 (máx.)	128
Corcondia (%)	99.434	-15.862	0.504	1.101
R_{Espectro}	+0.576	+0.579	+0.534	+0.600
R_{t_{reação}}	-0.856	-0.516	-0.591	+0.496
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.027 (0.008)	0.021 (0.007)	0.015 (0.036)	0.176 (0.038)
b	5.104×10 ⁻² (8.998×10 ⁻⁴)	5.164×10 ⁻² (7.322×10 ⁻⁴)	5.120×10 ⁻² (3.841×10 ⁻³)	3.709×10 ⁻² (4.038×10 ⁻³)
S_{y/x}	0.010	0.008	0.043	0.045
R	0.9997	0.9998	0.9944	0.9884

b) não negatividade nas três dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	2 componentes (matriz centrada na primeira dimensão)	2 componentes (matriz normalizada na segunda dimensão)	2 componentes (matriz centrada na primeira e normalizada na segunda dimensão)	2 componentes (sem restrições e ponderação com inverso da divisão de residuais pela média de residuais)
C_{estimada} (ppm)	0.095 (0.052)	0.398 (0.257)	0.054 (0.028)	0.403 (0.177)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{v/x}/b)	0.186	0.892	0.101	0.615
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	78.555	7.364	-80.986	93.404
SSQ_{resíduos}	47.967	895.024	3416.400	4.538
Iterações	14	18	16	210
Corcondia (%)	96.941	99.995	96.089	-49479
R_{Espectro}	+0.493	+0.575	+0.547	+0.573
R_{t_{reação}}	-0.712	-0.878	-0.614	-0.843
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.005 (0.003)	0.021 (0.013)	0.003 (0.001)	0.021 (0.009)
b	5.299×10 ⁻² (2.926×10 ⁻⁴)	5.163×10 ⁻² (1.371×10 ⁻³)	5.317×10 ⁻² (1.596×10 ⁻⁴)	5.162×10 ⁻² (9.451×10 ⁻⁴)
S_{y/x}	0.003	0.015	0.002	0.011
R	1.0000	0.9993	1.0000	0.9997

* máx. – corresponde a indicação de que o número máximo de iterações definido no ajuste do modelo foi atingido. Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de DMSO pelo modelo de PARAFAC de dois componentes, o primeiro componente é a absorvância de fundo com absorvância inicial elevada e o segundo componente é o composto principal corado.

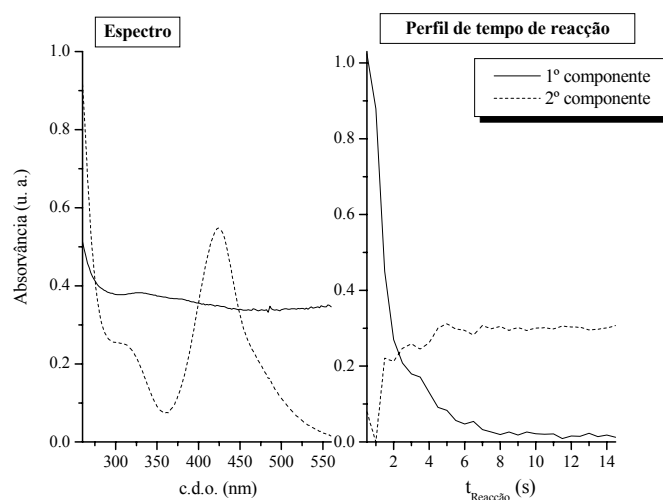


Fig. 4.7 – Espectro e perfil de variação da intensidade de absorvância com o tempo estimados pelo modelo PARAFAC de 2 componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC de 2 componentes sem restrições na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reacção}}$ \times concentração] do solvente DMSO.

Padrão

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 4.7 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC, de um a cinco componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por TLD na análise da matriz tridimensional do padrão de Nifedipina 10.053 ppm.

Pode verificar-se na Tabela 4.7 que, por validação cruzada, é para o modelo de três componentes que foi encontrada a menor diferença dos valores de ajuste associada um número menor de iterações. No entanto, o teste de consistência do núcleo não confirma esta avaliação e, tal como na avaliação com a matriz de DMSO, o modelo de dois componentes parece ser o mais adequado.

Tabela 4.7 – Validação cruzada do modelo PARAFAC, de 1 a 5 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por TLD na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] de padrão de Nifedipina 10.053 ppm. São apresentados a diferença dos ajustes obtidos por validação cruzada entre os modelos na análise da matriz segmentada e total, o número de iterações e o valor do teste de consistência do núcleo (corcondia).

	Número de componentes				
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco
Número de Iterações	2	2	96	590	1622
Corcondia (%)	100	100	1.758	-0.326	-3.501
$\Delta_{\text{AIMS-AJMT}}$	-0.118	-0.144	-0.081	-0.164	-0.031

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 4.8 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC na análise da matriz tridimensional do padrão de Nifedipina 10.053 ppm. Na Tabela 4.8 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições. Na Tabela 4.8 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

As melhores estimativas de concentração são obtidas com os ajustes efectuados e apresentados na Tabela 4.8 b). São no entanto, encontrados com estes modelos valores de percentagem de ajuste do modelo inferiores ou ainda testes de consistência não válidos.

Na Tabela 4.8 a) verifica-se que o valor mais alto de percentagem de ajuste do modelo é obtido para o ajuste com o modelo de quatro componentes. É também, com o modelo de três componentes que é obtido um número de iterações baixo. No entanto, tal como na avaliação por validação cruzada e na análise da matriz de DMSO, o valor obtido pelo teste de consistência revela que o modelo mais adequado é o modelo de dois componentes.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de PARAFAC de dois componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC de dois componentes sem restrições na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração].

Tabela 4.8 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] de padrão de Nifedipina 10.053 ppm com a) restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por PARAFAC sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) Não negatividade nas três dimensões

	Número de componentes			
	Dois	Três	Quatro	Cinco
C_{estimada} (ppm)	13.210 (0.641)	15.493 (1.313)	18.039 (4.414)	14.275 (0.802)
Recuperação (%)	131.402	154.117	179.439	142.005
LD (3S_{y/x}/b)	1.003	1.865	5.674	1.199
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	90.675	92.673	93.805	93.834
SSQ_{resíduos}	21.218	13.099	9.363	9.276
Iterações	12	57	2500 (max.)	91
Corcondia (%)	99.991	14.842	-1.503	39.832
R_{Espectro}	+0.997	+0.998	+0.997	+0.998
R_{t_{reação}}	+0.063	-0.138	-0.004	-0.190
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.308 (0.007)	0.327 (0.327)	0.345 (0.030)	0.317 (0.007)
b	2.331 $\times 10^{-2}$ (6.959 $\times 10^{-4}$)	2.113 $\times 10^{-2}$ (1.172 $\times 10^{-3}$)	1.910 $\times 10^{-2}$ (3.224 $\times 10^{-3}$)	2.224 $\times 10^{-2}$ (7.933 $\times 10^{-4}$)
S_{y/x}	0.008	0.013	0.036	0.009
R	0.9991	0.9969	0.9727	0.9987

b) não negatividade nas três dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	2 componentes (matriz centrada na primeira dimensão)	2 componentes (matriz normalizada na segunda dimensão)	2 componentes (matriz centrada na primeira e normalizada na segunda dimensão)	2 componentes (sem restrições e ponderação com inverso de média de residuais)
C_{estimada} (ppm)	11.945 (0.237)	12.002 (0.771)	11.924 (0.278)	11.854 (0.974)
Recuperação (%)	118.821	119.382	118.611	117.920
LD (3S_{y/x}/b)	0.394	1.277	0.463	1.624
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	72.702	55.288	-43.007	78.157
SSQ_{resíduos}	181.814	487.813	4.990 $\times 10^3$	116.423
Iterações	8	60	8	66
Corcondia (%)	49.784	99.951	9.367	-169.411
R_{Espectro}	+0.921	+0.995	+0.920	+0.995
R_{t_{reação}}	+0.160	+0.021	-0.160	-0.104
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.295 (0.003)	0.296 (0.009)	0.295 (0.003)	0.294 (0.011)
b	2.471 $\times 10^{-2}$ (2.900 $\times 10^{-4}$)	2.464 $\times 10^{-2}$ (9.360 $\times 10^{-4}$)	2.473 $\times 10^{-2}$ (3.406 $\times 10^{-4}$)	2.481 $\times 10^{-2}$ (1.199 $\times 10^{-3}$)
S_{y/x}	0.003	0.010	0.004	0.013
R	0.9999	0.9986	0.9998	0.9977

* Ver rodapé da Tabela 4.6.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de padrão pelo modelo PARAFAC de dois componentes, o primeiro componente corresponde ao composto principal corado e o segundo componente corresponde ao composto inicial.

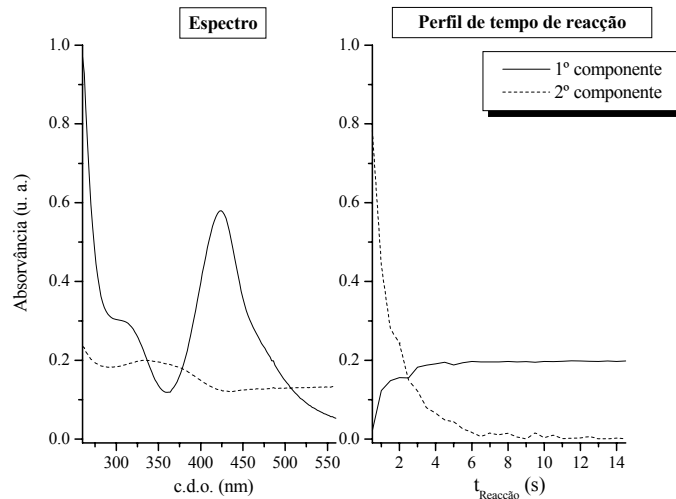


Fig. 4.8 – Espectro e perfil de variação da intensidade de absorvância com o tempo estimados pelo modelo PARAFAC de 2 componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC de 2 componentes sem restrições na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] do padrão de Nifedipina 10.053 ppm.

Formulações Farmacêuticas

Para todas as formulações farmacêuticas foram analisadas matrizes [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] pelo modelo PARAFAC de dois componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC de dois componentes sem restrições.

Na Tabela 4.9 são apresentados os resultados da análise pelo modelo PARAFAC das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas das formulações farmacêuticas.

Para todas as amostras são obtidos ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.990. Devido aos níveis de concentração mais altos avaliados, são obtidos na determinação da concentração nas amostras fortificadas coeficientes de correlação linear de ajuste de uma forma geral mais elevados. Para a maioria das amostras são obtidos desvios padrão relativos ligeiramente superiores a 10 %.

As únicas exceções são a amostra não fortificada Ad20ap e Ad30cr e as amostras fortificadas Ad20apFo, Ze20srFo e Ad10caFo.

É possível verificar pelas Tabelas 4.9 a) e b) que para a maioria das amostras são encontradas recuperações próximas de 100 %. Assim mesmo são encontradas recuperações acima dos 110 % para as amostras fortificadas NigtFo, Ni10caFo, Ni20apFo e Ad30crFo e acima dos 130 % para as amostras não fortificadas Nigt, Ni10ca, Ni20ap. É também encontrada uma recuperação abaixo dos 90 % para a amostra Ze20sr. Recuperações de fortificação não de acordo com o esperado, são encontradas para a maioria das formulações farmacêuticas. Somente para a formulação Ni10ra é encontrada uma recuperação próxima de 100 %. Para as formulações Ze20sr, Ni20ap, Ad10ca, Ad20ap e Ad30cr são encontradas recuperações acima dos 140 % e para as formulações Nigt e Ni10ca são encontradas recuperações abaixo dos 20 %. Para todas as análises efectuadas são obtidos testes de consistência do núcleo válidos. Só com as amostras não fortificadas Ze20sr e Nigt são obtidos valores de concordância abaixo dos 80 %.

Para as amostras não fortificadas são só encontrados erros de previsão inferiores a 10 % para as amostras Ad10ca e Ad20ap. Na avaliação da quantificação por este modelo, com todas as amostras não fortificadas, é obtido um valor de EPM de 32.010 %, de EPT de 31.087 % e de RMSEP de 6.407. Ao não ser considerada a amostra Ad30cr é obtido um valor de EPM de 34.569 %, de EPT de 39.203 % e de RMSEP de 6.542. Tal como por análise directa, ao não ser considerada a amostra Ad30cr, são encontrados valores ligeiramente superiores aos encontrados com todas as amostras.

É também de realçar que estimativas de dosagem mais próximas da dosagem estimada por HPLC-UV, do que as apresentadas na Tabela 4.9 a), são obtidas para as amostras Ni10ra e Ad20ap com o modelo de PARAFAC de dois componentes com a matriz centrada na primeira dimensão e normalizada na segunda dimensão, com testes de consistência válidos mas percentagens de ajuste do modelo negativas.

Pelo modelo PARAFAC são encontradas com a maioria das amostras estimativas de concentração próximas às obtidas por análise directa. De uma forma geral são encontradas piores recuperações de fortificação. Pelo já verificado por análise preliminar algum tipo de desvio de trilinearidade é esperado e de uma forma geral não são encontradas por este modelo estimativas de concentração adequadas.

Tabela 4.9 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas obtidas pelo modelo PARAFAC.*

a) amostras

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Ni10ra	Ze20sr	Nigt	Ni10ca
C_{estimada} (ppm)	9.815 (1.791)	5.925 (1.081)	14.015 (2.654)	20.494 (3.478)
C_{esperada} (ppm)	10.080	9.955	10.080	9.929
Recuperação (%)	97.373	59.525	139.034	206.396
LD (3S_{y/x}/b)	3.309	2.488	4.006	4.086
DOS_{estimada} (mg)	9.737	11.904	27.808	20.640
DOS_{estimada} HPLC (mg)	8.626	18.647	22.225	10.044
EP (%)	12.880	36.161	25.120	105.496
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	87.002	89.761	86.432	88.910
SSQ_{resíduos}	29.811	24.120	48.227	40.788
Iterações	8	32	10	12
Corcondia (%)	97.666	62.650	78.600	89.489
R_{Espectro}	+0.997	+0.990	+0.998	+0.991
R_{t_{reacção}}	-0.906	-0.931	+0.462	-0.377
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.269 (0.025)	0.204 (0.024)	0.315 (0.025)	0.359 (0.020)
b	2.745×10 ⁻² (2.702×10 ⁻³)	3.440×10 ⁻² (2.560×10 ⁻³)	2.250×10 ⁻² (2.690×10 ⁻³)	1.752×10 ⁻² (2.137×10 ⁻³)
S_{y/x}	0.030	0.029	0.030	0.024
R	0.9904	0.9945	0.9860	0.9855

a) amostras (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Ni20ap	Ad10ca	Ad20ap	Ad30cr
C_{estimada} (ppm)	15.239 (2.169)	9.246 (1.572)	9.722 (1.009)	11.009 (1.059)
C_{esperada} (ppm)	9.956	10.080	9.939	10.102
Recuperação (%)	153.061	91.728	97.816	108.978
LD (3S_{y/x}/b)	3.098	2.993	1.872	1.841
DOS_{estimada} (mg)	30.613	9.173	19.564	32.693
DOS_{estimada} HPLC (mg)	20.070	9.461	20.981	38.057
EP (%)	52.531	3.044	6.754	14.095
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	90.857	88.086	90.940	91.031
SSQ_{resíduos}	27.060	29.378	16.053	20.659
Iterações	2	8	8	16
Corcondia (%)	100.000	95.684	97.473	89.655
R_{Espectro}	+0.960	+0.996	+0.999	+0.960
R_{t_{reacção}}	-0.346	-0.875	-0.784	-0.944
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.325 (0.018)	0.262 (0.024)	0.268 (0.014)	0.285 (0.013)
b	2.136×10 ⁻² (1.980×10 ⁻³)	2.829×10 ⁻² (2.520×10 ⁻³)	2.760×10 ⁻² (1.538×10 ⁻³)	2.585×10 ⁻² (1.416×10 ⁻³)
S_{y/x}	0.022	0.028	0.017	0.016
R	0.9915	0.9922	0.9969	0.9970

(Continua)

Tabela 4.9 (Continuação)

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Ni10raFo	Ze20srFo	NigtFo	Ni10caFo
$C_{estimada}$ (ppm)	12.085 (1.853)	13.385 (0.488)	14.355 (1.865)	20.911 (3.020)
$C_{esperada}$ (ppm)	12.552	12.397	12.540	12.839
Recuperação (%)	96.276	107.975	114.474	168.784
LD ($3S_{y/x}/b$)	3.058	0.755	2.773	3.498
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	89.936	91.435	92.492	90.777
$SSQ_{resíduos}$	24.352	19.728	19.937	31.269
Iterações	2	30	18	16
Corcondia (%)	100	83.217	99.988	99.878
$R_{Espectro}$	+0.997	+0.977	+0.959	+0.987
$R_{t_{reacção}}$	-0.923	-0.774	-0.832	+0.768
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)				
$C_{estimada}$ (ppm)	2.270	7.460	0.340	0.417
$C_{esperada}$ (ppm)	2.472	2.442	2.460	2.460
Recuperação (%)	91.829	305.487	13.821	16.951
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	-0.202	+5.018	-2.120	-2.043
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	0.296 (0.021)	0.310 (0.005)	0.318 (0.017)	0.361 (0.017)
b	2.453×10^{-2} (2.232×10^{-3})	2.314×10^{-2} (5.226×10^{-4})	2.218×10^{-2} (1.836×10^{-3})	1.728×10^{-2} (1.803×10^{-3})
$S_{y/x}$	0.025	0.006	0.021	0.020
R	0.9918	0.9995	0.9932	0.9893

b) amostras fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Ni20apFo	Ad10caFo	Ad20apFo	Ad30crFo
$C_{estimada}$ (ppm)	23.825 (3.474)	13.489 (0.658)	13.237 (0.916)	14.672 (1.917)
$C_{esperada}$ (ppm)	12.398	12.552	12.411	12.574
Recuperação (%)	192.163	107.466	106.658	116.684
LD ($3S_{y/x}/b$)	3.650	1.018	1.433	2.818
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	89.502	92.252	94.017	92.618
$SSQ_{resíduos}$	42.682	15.959	9.376	18.351
Iterações	8	14	2	34
Corcondia (%)	88.518	98.985	100	93.999
$R_{Espectro}$	+0.992	+0.993	+0.996	+0.998
$R_{t_{reacção}}$	-0.835	-0.440	-0.870	-0.921
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)				
$C_{estimada}$ (ppm)	8.586	4.243	3.515	3.663
$C_{esperada}$ (ppm)	2.442	2.472	2.472	2.472
Recuperação (%)	351.597	171.642	142.193	148.180
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	+6.144	+1.771	+1.043	+1.191
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	0.374 (0.016)	0.310 (0.007)	0.308 (0.009)	0.321 (0.017)
b	1.572×10^{-2} (1.716×10^{-3})	2.302×10^{-2} (6.968×10^{-4})	2.328×10^{-2} (9.925×10^{-4})	2.186×10^{-2} (1.833×10^{-3})
$S_{y/x}$	0.019	0.008	0.011	0.021
R	0.9883	0.9991	0.9982	0.9930

* A dosagem é dada em massa de composto por comprimido excepto para Nigt em que a dosagem vem em massa de composto por mL; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

4.4.2.2 - PARAFAC2

No ajuste pelo modelo PARAFAC2 foi de uma forma geral utilizada a matriz tridimensional [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] ($151 \times 29 \times 4$). As condições geralmente utilizadas para o ajuste foram a aplicação de restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD.

Solvente

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 4.10 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC2, de um a cinco componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SVD na análise da matriz tridimensional do solvente DMSO.

Como se pode ver na Tabela 4.10, apesar do número de iterações necessários para atingir o critério de convergência no modelo de três componentes estar próximo do limite definido, é possível verificar, pela menor diferença de ajuste, que este modelo parece ser o mais adequado.

Tabela 4.10 – Validação cruzada do Modelo PARAFAC2, de 1 a 5 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] de DMSO. São apresentados os ajustes obtidos na análise da matriz segmentada e na matriz total, diferença de ajustes e o número de iterações necessários.

	Número de componentes				
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco
Número de Iterações	2	491	1720	2000	2000
AjMS (%)	72.509	92.141	96.623	84.383	76.077
AjMT (%)	75.394	94.335	97.848	98.576	99.074
$\Delta_{\text{AjMS-AjMT}}$	-2.885	-2.194	-1.225	-14.193	-22.997

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 4.11 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC2 na análise da matriz tridimensional do solvente DMSO. Na Tabela 4.11 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a cinco componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas obtidas por SVD. Na Tabela 4.11 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC2, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Pode ver-se na Tabela 4.11 b) que a estimativa de concentração mais próxima de zero, com uma concentração de 0.122 ppm, é obtida na análise da matriz [concentração \times $t_{\text{reacção}}$ \times espectro], não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD. É também encontrada, com este modelo uma boa estimativa do componente principal na dimensão de concentração. No entanto, é obtida uma percentagem de ajuste do modelo menor quando se compara com a análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reacção}}$ \times concentração] com as mesmas condições de ajuste.

A melhor estimativa de concentração obtida na análise da matriz [concentração \times $t_{\text{reacção}}$ \times espectro] pode ser devida ao aumento de resolução do modelo pelo facto de com este tipo de matriz ser estimado um perfil de tempo de reacção por c.d.o. do espectro.

Como se pode ver na Tabela 4.11 a), é obtido com o modelo de três componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reacção}}$ \times concentração] uma percentagem de ajuste do modelo elevada associada a um número de iterações baixo quer com estimativas iniciais por SVD quer por PARAFAC2 sem restrições. Apesar de uma pior estimativa de concentração mas tendo em atenção a maior percentagem de ajuste do modelo o modelo mais adequado é o modelo de três componentes na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reacção}}$ \times concentração].

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de PARAFAC2 de três componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reacção}}$ \times concentração]. Posteriormente, a análise da matriz [concentração \times $t_{\text{reacção}}$ \times espectro] foi também considerada.

Tabela 4.11 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC2 na análise da matriz [espectro $\times t_{\text{reação}} \times \text{concentração}$] do solvente DMSO com a) restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões

Número de componentes				
	Dois	Três	Quatro	Cinco
C_{estimada} (ppm)	0.471 (0.162)	0.362 (0.192)	1.095 (0.219)	0.703 (0.875)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.558	0.668	0.716	2.961
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	94.306	97.848	98.679	99.154
SSQ_{resíduos}	3.382	0.483	0.182	0.075
Iterações	64	1017	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Espectro}	+0.590	+0.554	-0.365	+0.007
R_{t_{reação}}	-0.197 - -0.576	-0.544 - -0.594	-0.547 - -0.451	-0.017 - -0.669
	-0.224 - -0.406	-0.334 - -0.484	-0.315 - -0.386	-0.195 - -0.315
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.024 (0.008)	0.019 (0.010)	0.053 (0.010)	0.037 (0.044)
b	5.133 $\times 10^{-2}$ (8.517 $\times 10^{-4}$)	5.180 $\times 10^{-2}$ (1.030 $\times 10^{-3}$)	4.873 $\times 10^{-2}$ (1.039 $\times 10^{-3}$)	5.307 $\times 10^{-2}$ (4.676 $\times 10^{-3}$)
S_{y/x}	0.010	0.012	0.012	0.052
R	0.9997	0.9996	0.9995	0.9923

b) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e outras avaliações

Outras avaliações				
	3 componentes (estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições)	3 componentes (estimativas iniciais por números aleatórios)	3 componentes (matriz conc. $\times t_{\text{reação}} \times \text{esp.}$)	3 componentes (matriz conc. $\times t_{\text{reação}} \times \text{esp.}$ e estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições)
C_{estimada} (ppm)	0.362 (0.192)	0.290 (0.175)	0.122 (0.145)	0.123 (0.146)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.668	0.613	0.515	0.519
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	97.848	97.765	94.307	94.309
SSQ_{resíduos}	0.483	0.521	3.380	3.378
Iterações	2	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Espectro}	+0.555	+0.585	+0.499	+0.500
R_{t_{reação}}	-0.544 - -0.594	-0.696 - -0.601	-0.340 (máx.)	-0.339 (máx.)
	-0.334 - -0.484	-0.632 - -0.662		
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.019 (0.010)	0.015 (0.009)	0.006 (0.008)	0.007 (0.008)
b	5.180 $\times 10^{-2}$ (1.030 $\times 10^{-3}$)	5.211 $\times 10^{-2}$ (9.498 $\times 10^{-4}$)	5.286 $\times 10^{-2}$ (8.103 $\times 10^{-4}$)	5.286 $\times 10^{-2}$ (8.155 $\times 10^{-4}$)
S_{y/x}	0.012	0.011	0.009	0.009
R	0.9996	0.9997	0.9998	0.9998

* máx. – corresponde a indicação de que o número máximo de iterações definido no ajuste do modelo foi atingido ou de que o coeficiente de correlação linear apresentado corresponde ao calculado com a estimativa do espectro ou tempo de reação respectivamente ao tempo de reação ou ao c.d.o. de absorvância máximo. Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de DMSO pelo modelo PARAFAC2 de três componentes, o primeiro componente é a linha de base com absorvância de fundo, o segundo componente é o composto inicial e o terceiro componente é o composto principal corado.

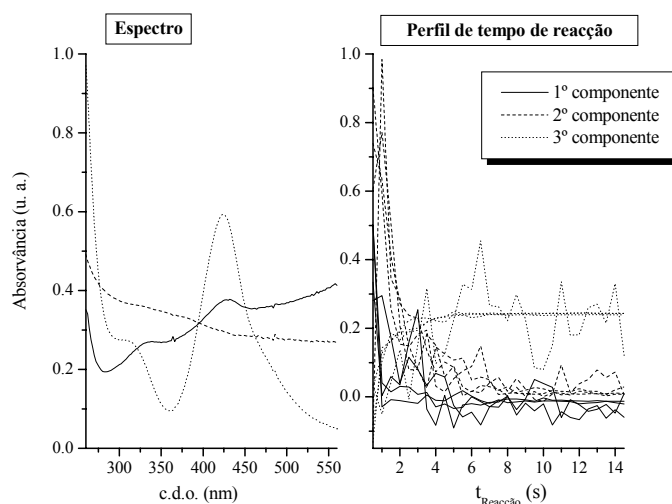


Fig. 4.9 – Espectro e os perfis de variação da intensidade de absorvância com o tempo estimados pelo modelo PARAFAC2 de 3 componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] do solvente DMSO.

Padrão

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 4.12 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC2, de um a cinco componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SVD na análise da matriz tridimensional do padrão de Nifedipina 10.053 ppm.

É possível verificar pela Tabela 4.12 que, por validação cruzada foram obtidas para os modelos de dois a quatro componentes pequenas diferenças de ajuste. Também, foi obtido com estes três modelos um número igual de iterações. Percentagens de ajuste do modelo mais elevadas foram obtidas para os modelos de três e quatro componentes. Relativamente ao modelo de quatro componentes, é obtido com o modelo de três componentes uma menor diferença de ajuste e uma percentagem de ajuste do modelo próxima. O modelo mais adequado parece ser o modelo de três componentes.

Tabela 4.12 – Validação cruzada do Modelo PARAFAC2, de 1 a 5 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] de padrão de Nifedipina 10.053 ppm. São apresentados os ajustes obtidos na análise da matriz segmentada e na matriz total, diferença de ajustes e o número de iterações necessários.

	Número de componentes				
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco
Número de Iterações	2	2000	2000	2000	2000
AjMS (%)	80.947	96.207	98.054	98.534	87.543
AjMT (%)	81.856	96.442	98.529	99.011	99.331
$\Delta_{\text{AjMS-AjMT}}$	-0.909	-0.236	-0.475	-0.477	-49.677

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 4.13 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC2 na análise da matriz tridimensional do padrão de Nifedipina 10.053 ppm. Na Tabela 4.13 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a cinco componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas obtidas por SVD. Na Tabela 4.13 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC2, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como é possível verificar na Tabela 4.13 a), é já obtido com o modelo de três componentes uma percentagem de ajuste do modelo alta e próxima à obtida com o modelo de quatro componentes.

Na análise da matriz do padrão de Nifedipina pelo modelo PARAFAC2, a melhor estimativa de concentração com uma concentração de 10.646 ppm é obtida na análise da matriz [concentração \times $t_{\text{reação}}$ \times espectro] com um modelo de três componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD. Tal como na análise da matriz de DMSO, é obtida uma menor percentagem de ajuste do modelo quando se compara com a análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] nas mesmas condições de ajuste. São obtidas pelo modelo de três componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] uma melhor estimativa do componente principal na dimensão de concentração e piores estimativas na dimensão do espectro e perfis de tempo de reação. Com as mesmas condições de ajuste e estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições é obtida uma estimativa de concentração próxima e melhor estimativa do componente principal na dimensão de concentração.

Apesar de uma pior estimativa de concentração mas atendendo a maior percentagem de ajuste do modelo o modelo mais adequado é o modelo de três componentes e estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração].

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de PARAFAC2 de três componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC2 de três componentes sem restrições na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração]. Posteriormente, a análise da matriz [concentração \times $t_{\text{reação}}$ \times espectro] foi também considerada.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de padrão pelo modelo PARAFAC2 de três componentes, o terceiro componente é o composto principal corado, o segundo componente é o composto inicial e o primeiro componente são os espectros iniciais mais elevados.

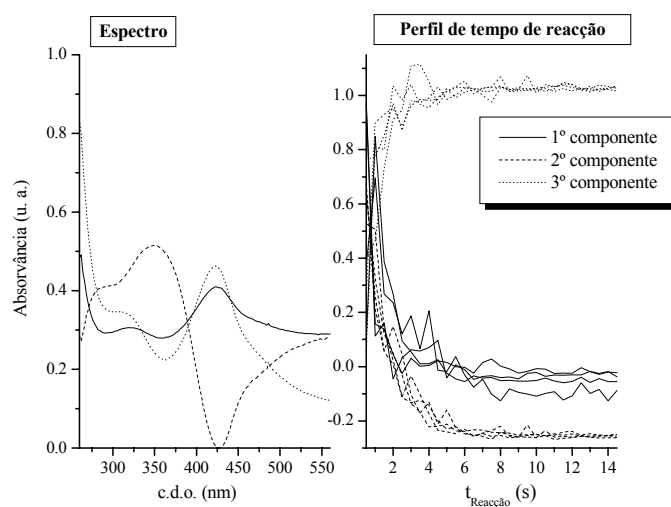


Fig. 4.10 – Espectro e os perfis de variação da intensidade de absorvância com o tempo estimados pelo modelo PARAFAC2 de 3 componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais de PARAFAC2 de 3 componentes sem restrições na análise da matriz da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] do padrão de Nifedipina 10.053 ppm.

Tabela 4.13 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC2 na análise da matriz [espectro $\times t_{\text{reação}} \times \text{concentração}$] de padrão de Nifedipina 10.053 ppm com a) restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões

Número de componentes				
	Dois	Três	Quatro	Cinco
C_{estimada} (ppm)	12.315 (0.682)	12.306 (0.369)	4.598 (0.682)	4.559 (0.400)
Recuperação (%)	122.505	122.418	45.735	45.353
LD (3S_{y/x}/b)	1.113	0.602	1.719	1.012
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	96.501	98.428	98.958	99.319
ssq_{resíduos}	2.988	0.569	0.265	0.113
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Espectro}	+0.999	+0.981	+0.989	+0.986
R_{t_{reação}}	-0.407 - +0.052	-0.173 - +0.304	+0.664 - -0.460	+0.609 - -0.473
	-0.093 - -0.034	-0.290 - +0.326	-0.108 - -0.726	-0.289 - -0.277
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.299 (0.008)	0.299 (0.004)	0.172 (0.018)	0.171 (0.011)
b	2.428 $\times 10^{-2}$ (8.039 $\times 10^{-4}$)	2.429 $\times 10^{-2}$ (4.352 $\times 10^{-4}$)	3.749 $\times 10^{-2}$ (1.917 $\times 10^{-3}$)	3.760 $\times 10^{-2}$ (1.132 $\times 10^{-3}$)
S_{y/x}	0.009	0.005	0.021	0.013
R	0.9989	0.9997	0.9974	0.9991

b) restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e outras avaliações

Outras avaliações				
	3 componentes (estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições)	4 componentes (estimativas iniciais por números aleatórios)	3 componentes (matriz conc. $\times t_{\text{reação}} \times \text{esp.}$)	3 componentes (matriz conc. $\times t_{\text{reação}} \times \text{esp.}$ e estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições)
C_{estimada} (ppm)	12.270 (0.291)	10.993 (2.249)	10.646 (1.352)	10.651 (1.353)
Recuperação (%)	122.697	109.352	105.901	105.951
LD (3S_{y/x}/b)	0.004	3.913	2.393	2.394
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.478	98.682	96.926	96.926
ssq_{resíduos}	0.565	0.424	2.306	2.306
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	810	382
R_{Espectro}	+0.979	+0.999	+0.996	+0.996
R_{t_{reação}}	-0.397 - +0.311	-0.828 - +0.389	-0.500 (máx.)	-0.431 (máx.)
	-0.327 - +0.310	+0.173 - -0.379		
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.299 (0.003)	0.284 (0.028)	0.280 (0.018)	0.280 (0.018)
b	2.433 $\times 10^{-2}$ (3.452 $\times 10^{-4}$)	2.585 $\times 10^{-2}$ (3.010 $\times 10^{-3}$)	2.632 $\times 10^{-2}$ (1.874 $\times 10^{-3}$)	2.631 $\times 10^{-2}$ (1.874 $\times 10^{-3}$)
S_{y/x}	0.004	0.034	0.021	0.021
R	0.9998	0.9867	0.9950	0.9950

* Ver rodapé da Tabela 4.11.

Formulações Farmacêuticas

Para todas as formulações farmacêuticas foram analisadas matrizes [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] pelo modelo PARAFAC2 de três componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD. Análises com outras condições de ajuste do modelo se consideradas mais adequadas foram efectuadas.

Na Tabela 4.14 são apresentadas as condições de ajuste do modelo PARAFAC2 consideradas mais adequadas na análise das matrizes obtidas com cada amostra analisada.

Tabela 4.14 – Condições de ajuste do modelo PARAFAC2 utilizadas na análise das matrizes obtidas com as amostras não fortificadas e fortificadas.

Matriz analisada	Condições de ajuste			Amostras analisadas
	Número de componentes	Restrições (1ª e 3ª dimensões)	Estimativas iniciais	
Espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração	Dois	Não negatividade	SVD	Ni10ra, Ni10raFo e Ad30crFo
	Três			Ad10ca
	Três		PARAFAC2 sem restrições	Ni20ap, Ad20ap e Ad10caFo
	Quatro			Ze20sr e Ni20apFo
	Três			Ad30cr
	Quatro			Ze20srFo
Concentração \times $t_{\text{reação}}$ \times espectro	Quatro	SVD	Nigt	
	Três	PARAFAC2 sem restrições	Ad20apFo	
	Três	Números aleatórios	Ni10ca e Ni10caFo	
	Cinco		NigtFo	

Como se pode verificar na Tabela 4.14, foram obtidas para algumas das amostras analisadas melhores estimativas com a matriz [concentração \times $t_{\text{reação}}$ \times espectro] assim como com estimativas iniciais diferentes da inicialmente considerada. Uma vez que são obtidos um maior número de perfis de tempo de reacção, igual ao número de c.d.o. do espectro, a matriz [concentração \times $t_{\text{reação}}$ \times espectro] permite lidar com maiores desvios da trilinearidade. Também, com estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC2 sem restrições pode ser uma vantagem, uma vez que mais facilmente o critério de convergência pode ser atingido. É de notar também que um número maior de estimativas adequadas com estimativas iniciais por números aleatórios é obtido com a matriz [concentração \times $t_{\text{reação}}$ \times

espectro]. Tal acontece devido a que, com estimativas iniciais por números aleatórios e com estas matrizes mais números são utilizados para a obtenção das estimativas iniciais.

Só para as formulações Ni10ra e Ni10ca foram utilizadas as mesmas condições de ajuste na análise das amostras não fortificadas e fortificadas. Para as formulações Ad30cr e Nigt é utilizado um número de componentes e estimativas iniciais diferentes. Na análise das amostras fortificadas é utilizado um número de componentes maior com Nigt e menor com Ad30cr. Para as formulações Ad10ca e Ze20sr são utilizadas estimativas iniciais diferentes. Para a formulação Ad20ap são analisadas tipos diferentes de matrizes e para a formulação Ni20ap é utilizado um número de componentes menor com a amostra fortificada.

Na Tabela 4.15 são apresentados os resultados da análise pelo modelo PARAFAC2 das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas.

Excepto para as amostras Ze20sr, Ni10ca e Ni20apFo, são obtidos para a maioria das amostras ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.990. De uma forma geral, são obtidos ajustes de ordem de grandeza próxima para as amostras não fortificadas e fortificadas. Para a maioria das amostras são obtidos desvios padrão relativos de uma forma geral mais baixos do que os encontrados com o modelo PARAFAC. No entanto, para as amostras não fortificadas Ze20sr e Ni10ca e para a amostra fortificada Ni20apFo são obtidos desvios padrão relativos por volta de 30%.

Recuperações dentro do esperado são obtidas para todas as amostras não fortificadas e fortificadas. Para a amostra Ad30cr, ao contrário do que acontece por análise directa e na análise por PARAFAC, é encontrada uma estimativa mais de acordo com o esperado. São também obtidas, para a maioria das formulações, recuperações de fortificação por volta de 100 %. As excepções com recuperações ligeiramente mais baixas são encontradas para as formulações Nigt e Ni20ap.

Para a maioria das amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas das dosagens estimadas por HPLC-UV. Excepto para a amostra não fortificada Ad30cr, são obtidos com todas as outras amostras não fortificadas erros de previsão iguais ou inferiores 10 %. Os erros de previsão encontrados variam desde 0.3 a 22 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Ad20ap e o mais alto para a amostra Ad30cr.

Na avaliação da quantificação por este modelo, com todas as amostras não fortificadas, é obtido um valor de EPM de 6.532 %, de EPT de 14.846 % e de RMSEP de 3.060. Ao não ser considerada a amostra Ad30cr é obtido um valor de EPM de 4.323 %, de EPT de 4.979 % e de RMSEP de 0.831. Ao não ser considerada a amostra Ad30cr há uma diminuição significativa no valor encontrado de EPM, de EPT e de RMSEP.

É ainda de referir que, com um baixo coeficiente de correlação linear do ajuste linear, é encontrada para a formulação Nigt uma recuperação de fortificação de 94.853 %, com três componentes e estimativas iniciais por números aleatórios na análise da matriz [concentração \times $t_{\text{reação}}$ \times espectro] da amostra fortificada.

São encontradas pelo modelo PARAFAC2 melhores estimativas de concentração, relativamente as obtidas por análise directa e por PARAFAC. Também de uma forma geral são encontradas melhores recuperações de fortificação.

Tabela 4.15 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas obtidas pelo modelo PARAFAC2.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Ni10ra	Ze20sr	Nigt	Ni10ca
C_{estimada} (ppm)	8.862 (0.563)	9.759 (3.861)	11.674 (1.660)	11.026 (3.532)
C_{esperada} (ppm)	10.080	9.955	10.080	9.929
Recuperação (%)	87.918	98.028	115.812	111.050
LD (3S_{y/x}/b)	1.095	7.118	2.789	6.125
DOS_{estimada} (mg)	8.792	19.607	23.163	11.104
DOS_{estimada} HPLC (mg)	8.626	18.647	22.225	10.044
EP (%)	1.924	5.148	4.221	10.554
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	96.761	98.266	99.143	96.463
SSQ_{resíduos}	1.851	0.692	0.193	4.148
Iterações	1095	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Espectro}	+0.996	+0.996	+0.996	+0.970
R_t_{reação}	-0.988 - -0.957 -0.960 - -0.682	-0.747 - +0.074 +0.817 - -0.727	+0.242 (máx.)	-0.429 (máx.)
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.256 (0.009)	0.268 (0.055)	0.295 (0.020)	0.284 (0.044)
b	2.891×10 ⁻² (9.416×10 ⁻⁴)	2.747×10 ⁻² (5.851×10 ⁻³)	2.525×10 ⁻² (2.102×10 ⁻³)	2.580×10 ⁻² (4.716×10 ⁻³)
S_{y/x}	0.011	0.065	0.023	0.053
R	0.9989	0.9575	0.9931	0.9682

a) amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Ni20ap	Ad10ca	Ad20ap	Ad30cr
C_{estimada} (ppm)	10.670 (1.167)	9.660 (0.294)	10.392 (0.294)	9.996 (0.374)
C_{esperada} (ppm)	9.956	10.080	9.939	10.102
Recuperação (%)	107.175	95.829	104.553	98.947
LD (3S_{y/x}/b)	2.053	0.547	0.527	0.684
DOS_{estimada} (mg)	21.434	9.583	20.912	29.687
DOS_{estimada} HPLC (mg)	20.070	9.461	20.981	38.057
EP (%)	6.796	1.290	0.329	21.993
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	97.771	98.345	98.534	98.479
SSQ_{resíduos}	1.608	0.567	0.420	0.632
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Espectro}	+0.956	+0.991	+0.999	+0.968
R_t_{reação}	-0.688 - -0.319 -0.496 - -0.375	+0.967 - -0.804 -0.751 - -0.912	-0.432 - -0.678 -0.673 - -0.657	-0.981 - -0.934 -0.918 - -0.839
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.281 (0.015)	0.268 (0.004)	0.277 (0.004)	0.282 (0.011)
b	2.631×10 ⁻² (1.617×10 ⁻³)	2.770×10 ⁻² (4.505×10 ⁻⁴)	2.667×10 ⁻² (4.185×10 ⁻⁴)	2.617×10 ⁻² (1.228×10 ⁻³)
S_{y/x}	0.018	0.005	0.005	0.014
R	0.9962	0.9997	0.9998	0.9978

(Continua)

Tabela 4.15 (Continuação)

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Ni10raFo	Ze20srFo	NigtFo	Ni10caFo
C_{estimada} (ppm)	11.342 (0.768)	12.098 (0.804)	13.475 (1.986)	13.646 (1.833)
C_{esperada} (ppm)	12.552	12.397	12.540	12.839
Recuperação (%)	90.364	97.586	107.452	110.148
LD (3S_{v/x}/b)	1.312	1.319	3.069	2.812
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	97.101	98.937	99.272	96.883
SSQ_{resíduos}	2.020	0.304	0.187	3.571
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	1494
R_{Espectro}	+0.997	+0.961	+0.954	+0.988
R_{treação}	-0.884 - -0.939 -0.901 - -0.846	-0.502 - -0.823 -0.662 - -0.685	-0.284 (máx.)	+0.777
Fortificação (C_{estimada amostra fortificada} - C_{estimada amostra não fortificada})				
C_{estimada} (ppm)	2.480	2.339	1.801	2.620
C_{esperada} (ppm)	2.472	2.442	2.460	2.460
Recuperação (%)	100.324	95.782	73.211	106.504
Δ = C_{estimada} - C_{esperada}	+0.008	-0.103	-0.659	+0.160
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.288 (0.009)	0.297 (0.009)	0.311 (0.020)	0.312 (0.018)
b	2.543×10 ⁻² (9.932×10 ⁻⁴)	2.455×10 ⁻² (9.693×10 ⁻⁴)	2.305×10 ⁻² (2.111×10 ⁻³)	2.288×10 ⁻² (1.920×10 ⁻³)
S_{y/x}	0.011	0.011	0.024	0.021
R	0.9985	0.9984	0.9917	0.9930

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Ni20apFo	Ad10caFo	Ad20apFo	Ad30crFo
C_{estimada} (ppm)	12.777 (4.122)	12.261 (0.269)	12.909 (1.724)	12.659 (0.191)
C_{esperada} (ppm)	12.398	12.552	12.411	12.574
Recuperação (%)	103.056	97.679	104.013	100.671
LD (3S_{v/x}/b)	6.555	0.441	2.738	0.307
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.848	98.470	96.813	97.495
SSQ_{resíduos}	0.505	0.623	2.660	2.113
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	479
R_{Espectro}	+0.998	+0.994	+0.997	+0.990
R_{treação}	-0.804 - -0.871 -0.863 - -0.869	-0.217 - -0.438 -0.386 - -0.333	-0.231 (máx.)	-0.460 - -0.896 -0.818 - -0.897
Fortificação (C_{estimada amostra fortificada} - C_{estimada amostra não fortificada})				
C_{estimada} (ppm)	2.107	2.601	2.517	2.663
C_{esperada} (ppm)	2.442	2.472	2.472	2.472
Recuperação (%)	86.282	105.219	101.820	107.727
Δ = C_{estimada} - C_{esperada}	-0.335	+0.129	+0.045	-0.191
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.303 (0.043)	0.298 (0.003)	0.305 (0.018)	0.303(0.002)
b	2.373×10 ⁻² (4.654×10 ⁻³)	2.434×10 ⁻² (3.194×10 ⁻⁴)	2.362×10 ⁻² (1.924×10 ⁻³)	2.390×10 ⁻² (2.182×10 ⁻⁴)
S_{y/x}	0.052	0.004	0.022	0.002
R	0.9636	0.9998	0.9934	0.9999

* máx. - corresponde à indicação de que o número máximo de iterações definido no ajuste do modelo foi atingido ou de que o coeficiente de correlação linear apresentado corresponde ao calculado com a estimativa do espectro ou tempo de reação respectivamente ao tempo de reação ou ao c.d.o. de absorvância máximo; A dosagem é dada em massa de composto por comprimido excepto para Nigt em que a dosagem vem em massa de composto por mL; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

4.4.2.3 - MCR-ALS

No ajuste pelo modelo MCR-ALS foi de uma forma geral utilizada a matriz bidimensional [(concentração \times $t_{\text{reação}}$) \times espectro] (116 \times 151). As condições geralmente utilizadas para o ajuste foram a aplicação de restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições.

Solvente

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 4.16 são apresentados os valores de perda de ajuste do modelo MCR-ALS e do número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS de um a cinco componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SIMPLISMA (estimativas puras) na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada do solvente DMSO.

É possível verificar na Tabela 4.16 que, foram obtidas perdas de ajuste de MCR vs. PCA próximas com os modelos de dois a cinco componentes. As menores perdas de ajuste de MCR vs Exp. foram encontradas a partir do modelo de três componentes com um decréscimo menor na perda de ajuste do modelo de quatro para cinco componentes. Um menor número de iterações foi obtido com o modelo de quatro componentes. O modelo mais adequado parece ser o de quatro componentes.

Tabela 4.16 – Perda de ajuste de MCR-ALS vs. PCA, de MCR-ALS vs. experimental e número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS, de 1 a 5 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz [(concentração \times $t_{\text{reação}}$) \times espectro] do solvente DMSO.

	Número de componentes				
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco
Número de Iterações	4	11	2	1	3
$LOF_{\text{MCR vs. PCA}} (\times 10^{-14})$	2.801	3.229	3.616	4.110	3.561
$LOF_{\text{MCR vs Exp}}$	24.606	5.519	1.961	1.092	0.693

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 4.17 são apresentados os resultados obtidos por pelo modelo MCR-ALS na análise matriz bidimensional de coluna aumentada do solvente DMSO. Na Tabela 4.17 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a cinco componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem

restrições. Na Tabela 4.17 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo MCR-ALS, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como se pode verificar na Tabela 4.17 a) um aumento da percentagem de ajuste do modelo ainda apreciável se verifica do modelo de três para o de quatro componentes com estabilização posterior para um número maior de componentes. Tal facto que confirma que o modelo de quatro componentes é o que melhor ajusta a estrutura de dados analisada. Para o modelo de quatro componentes é encontrado um valor de perda de ajuste de MCR vs. PCA mais baixo do que o encontrado para o modelo de três componentes e próxima do obtido com cinco componentes. É também encontrado por este modelo uma diferença de perda de ajuste entre MCR vs PCA e MCR vs Exp. próximas às obtidas com os modelos de três e cinco componentes. O menor número de iterações verificado por validação cruzada confirma que o ajuste com modelo de quatro componentes é obtido mais facilmente.

Como se pode ver na Tabela 4.17 c), as melhores estimativas do componente principal, quer na dimensão do perfil de tempo de reacção, avaliado pela maior diferença relativamente ao experimental, quer na dimensão de estimativa de concentração, são obtidas com o ajuste em que se indica que o componente principal na primeira matriz não está relacionado com o componente principal nas outras matrizes. Estimativas de zero são obtidas para o componente principal na primeira matriz com estes modelos. A melhor estimativa de concentração é obtida com o modelo de quatro componentes com uma concentração de 0.152 ppm. É também com este modelo que claramente se verifica que o ajuste do modelo com quatro componentes é o mais adequado.

Com o modelo de quatro componentes sem a indicação de ausência do componente principal é obtida uma estimativa de concentração mais alta com uma concentração de 0.647 ppm. São também encontradas piores estimativas do componente principal na dimensão perfil de tempo de reacção com perfis de tempo de reacção não de acordo com o esperado. Só com a restrição de trilinearidade no componente principal é obtida uma estimativa mais próxima de zero com uma concentração de 0.172 ppm.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de MCR-ALS de quatro componentes, não negatividade nas duas dimensões, componente principal da primeira matriz não relacionado com o componente principal das outras matrizes e estimativas iniciais por estimativas do modelo MCR-ALS de quatro componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração \times $t_{\text{reacção}}$) \times espectro].

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de DMSO pelo modelo de MCR-ALS de quatro componentes, o primeiro componente é a linha de base com absorvância de fundo com algum ruído, o segundo componente é o composto principal corado, o terceiro componente é o composto inicial e o quarto componente são os espectros iniciais mais elevados.

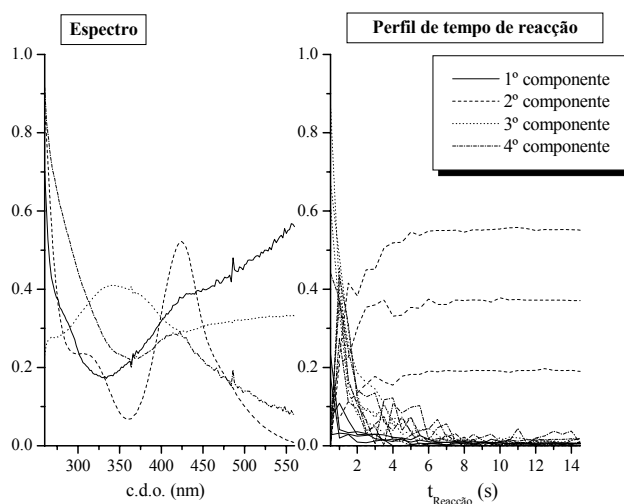


Fig. 4.11 – Espectro e perfis de variação da intensidade de absorvância com o tempo estimados pelo modelo MCR-ALS de 4 componentes, não negatividade nas duas dimensões, componente principal da primeira matriz não relacionado e estimativas iniciais por MCR-ALS de 4 componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração × $t_{\text{reacção}}$) × espectro] do solvente DMSO.

Tabela 4.17 – Estimativas de concentração obtidas por MCR-ALS na análise da matriz [(concentração × $t_{\text{reação}}$) × espectro] do solvente DMSO com a) tridimensionalidade, restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por MCR-ALS sem restrições, b) o mesmo que em a) e outras avaliações e c) o mesmo que em a) mas com indicação de ausência de componente principal na primeira matriz.*

a) com restrição de não negatividade nas duas dimensões

Número de componentes				
	Dois	Três	Quatro	Cinco
C_{estimada} (ppm)	1.586 (0.699)	1.117 (0.370)	0.647 (0.230)	0.564 (0.134)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	2.200	1.209	0.780	0.460
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	94.481	97.798	98.848	99.142
SSQ_{resíduos}	3.177	0.506	0.138	0.077
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	0.082	1.000	0.365	0.506
Δ_{LOFMCR} (PCA - Exp.)	-5.437	-1.202	-0.787	-0.352
R_{Espectro}	+0.600	+0.482	+0.564	+0.555
R_{t_{reação}}	+0.998 - +0.613 +0.903 - +0.705	+0.988 - +0.604 +0.958 - +0.203	+0.987 - +0.508 +0.746 - -0.218	+0.990 - +0.535 +0.659 - -0.453
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.035 (0.014)	0.024 (0.007)	0.013 (0.004)	0.011 (0.002)
b	2.237×10 ⁻² (1.464×10 ⁻³)	2.110×10 ⁻² (7.587×10 ⁻⁴)	1.972×10 ⁻² (4.578×10 ⁻⁴)	1.944×10 ⁻² (2.660×10 ⁻⁴)
S_{y/x}	0.016	0.008	0.005	0.003
R	0.9957	0.9987	0.9995	0.9998

b) com restrição de não negatividade nas duas dimensões e outras avaliações

Outras avaliações				
	3 componentes (matriz (conc.×esp.)×t _{reação})	4 componentes (matriz (conc.×esp.)×t _{reação})	3 componentes (trilinearidade no componente principal)	4 componentes (trilinearidade no componente principal)
C_{estimada} (ppm)	0.409 (0.123)	0.308 (0.095)	0.373 (0.178)	0.172 (0.111)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.428	0.333	0.618	0.394
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	93.893	95.998	97.096	97.573
SSQ_{resíduos}	3.890	1.671	0.880	0.614
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	16	29
LOF_{MCR vs. PCA}	0.275	1.139	2.145	2.167
Δ_{LOFMCR} (PCA - Exp.)	-5.832	-0.787	-0.760	-0.260
R_{Espectro}	+0.887 - +0.568 +0.589 - +0.571	+0.912 - +0.558 +0.592 - +0.571	+0.512	+0.557
R_{t_{reação}}	+0.463	+0.424	-0.597 - -0.597 -0.597 - -0.597	-0.624 - -0.624 -0.624 - -0.624
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.006 (0.002)	0.004 (0.001)	0.009 (0.004)	0.004 (0.002)
b	1.506×10 ⁻² (1.918×10 ⁻⁴)	1.440×10 ⁻² (1.425×10 ⁻⁴)	2.311×10 ⁻² (4.250×10 ⁻⁴)	2.251×10 ⁻² (2.637×10 ⁻⁴)
S_{y/x}	0.002	0.002	0.005	0.003
R	0.9998	0.9999	0.9997	0.9999

Tabela 4.17 (Continuação)

c) com restrição de não negatividade nas duas dimensões e indicação de ausência de composto principal na primeira matriz

	Número de componentes			
	Dois	Três	Quatro	Cinco
C_{estimada} (ppm)	0.215 (0.337)	0.189 (0.207)	0.152 (0.167)	0.252 (0.288)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{v/x}/b)	1.188	0.730	0.593	1.013
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	93.879	97.729	98.762	99.155
ssq_{resíduos}	3.885	0.538	0.160	0.074
Iterações	2	35	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	2.632	1.153	0.583	0.483
Δ_{LOFMCR (PCA - Exp.)}	-3.471	-1.118	-0.655	-0.362
R_{Espectro}	+0.590	+0.551	+0.561	+0.496
R_{t_{reação}}	np - -0.182	np - -0.658	np - -0.783	np - -0.323
	-0.209 - -0.440	-0.550 - -0.647	-0.494 - -0.653	-0.131 - -0.336
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.006 (0.009)	0.004 (0.005)	0.003 (0.004)	0.005 (0.006)
b	2.814×10 ⁻² (9.944×10 ⁻⁴)	2.358×10 ⁻² (5.122×10 ⁻⁴)	2.222×10 ⁻² (3.918×10 ⁻⁴)	2.150×10 ⁻² (6.477×10 ⁻⁴)
S_{y/x}	0.011	0.006	0.004	0.007
R	0.9988	0.9995	0.9997	0.9991

* máx. – corresponde a indicação de que o número máximo de iterações definido no ajuste do modelo foi atingido. np – não é possível calcular o coeficiente de correlação linear. Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

Padrão

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 4.18 são apresentados os valores de perda de ajuste do modelo MCR-ALS e do número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS de um a cinco componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada do padrão de Nifedipina 10.053 ppm.

É possível verificar na Tabela 4.18 que foram obtidos valores de perda de ajuste de MCR vs. PCA da mesma ordem de grandeza para os modelos até três componentes com um ligeiro acréscimo para os modelos de quatro e cinco componentes. Os valores mais baixos de perda de ajuste de MCR vs Exp. foram encontrados a partir do modelo de três componentes. Tal como na análise da matriz de DMSO, foi obtido um menor número de iterações com o modelo com quatro componentes, o que permite considerar este como o mais adequado para a análise da matriz de padrão.

Tabela 4.18 – Perda de ajuste de MCR-ALS vs. PCA, de MCR-ALS vs. experimental e número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS, de 1 a 5 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz [(concentração × $t_{\text{reacção}}$) × espectro] do padrão de Nifedipina 10.053 ppm.

	Número de componentes				
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco
Número de Iterações	10	34	32	8	17
$\text{LOF}_{\text{MCR vs. PCA}} (\times 10^{-14})$	2.898	3.288	3.136	3.918	4.339
$\text{LOF}_{\text{MCR vs Exp}}$	18.144	3.347	1.406	0.857	0.557

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 4.19 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo MCR-ALS na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada do padrão de Nifedipina 10.053 ppm. Na Tabela 4.19 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a cinco componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições. Na Tabela 4.19 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo MCR-ALS, em que é encontrada que uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como se pode verificar na Tabela 4.19 a), a melhor estimativa de concentração, com uma concentração de 10.029 ppm, é obtida com o modelo de quatro componentes e não negatividade nas duas dimensões. É também encontrada com este modelo uma percentagem de ajuste do modelo elevada assim como boas estimativas do componente principal nas três dimensões. É possível também verificar que uma percentagem de ajuste do modelo elevada é já obtida para o modelo com três componentes, uma ligeira subida é verificada para o modelo de quatro componentes seguida de uma posterior estabilização a um número de componentes superior. Um valor baixo de perda de ajuste de MCR vs PCA e uma diferença pequena entre a perda de ajuste de MCR vs PCA e MCR vs Exp. confirmam que o modelo de quatro componentes é adequado na análise desta matriz.

Como se pode ver, é obtida uma estimativa de concentração próxima à anterior com os modelos apresentados na Tabela 4.19 b). No entanto com todos é encontrada uma estimativa de concentração ligeiramente superior e uma mais baixa percentagem de ajuste do modelo. Tal como na análise da matriz de DMSO, também com a matriz do padrão, parece ser mais adequado a análise da matriz [(concentração × $t_{\text{reacção}}$) × espectro].

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de MCR-ALS de quatro componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais

por estimativas do modelo MCR-ALS de quatro componentes sem restrições na análise da matriz $[(\text{concentração} \times t_{\text{reação}}) \times \text{espectro}]$.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de padrão pelo modelo de MCR-ALS de quatro componentes, o primeiro componente é o composto principal corado, o segundo componente é o composto inicial, o quarto componente é a linha de base com absorvância de fundo com algum ruído e o terceiro componente são os espectros iniciais mais elevados.

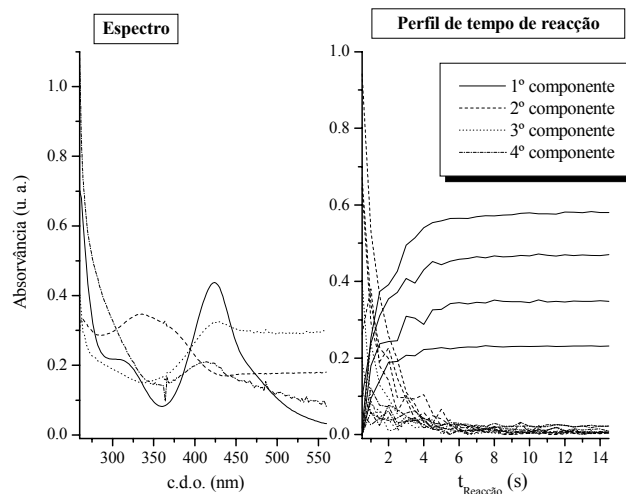


Fig. 4.12 – Espectro e perfis de variação da intensidade de absorvância com o tempo estimados pelo modelo MCR-ALS de 4 componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por MCR-ALS de 4 componentes sem restrições na análise da matriz $[(\text{concentração} \times t_{\text{reação}}) \times \text{espectro}]$ do padrão de Nifedipina 10.053 ppm.

Tabela 4.19 – Estimativas de concentração obtidas por MCR-ALS na análise da matriz [(concentração × $t_{\text{reação}}$) × espectro] de padrão de Nifedipina 10.053 ppm com a) tridimensionalidade, restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por MCR-ALS sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade nas duas dimensões

	Número de componentes			
	Dois	Três	Quatro	Cinco
C_{estimada} (ppm)	11.211 (0.210)	11.451 (0.234)	10.029 (0.237)	9.897 (0.219)
Recuperação (%)	111.516	113.911	99.764	98.454
LD (3S_{y/x}/b)	0.361	0.398	0.434	0.402
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	96.653	98.594	99.139	99.322
SSQ_{resíduos}	2.734	0.482	0.181	0.112
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	7.176×10^{-9}	0.011	0.083	0.386
$\Delta_{\text{LOFMCR}}(\text{PCA} - \text{Exp.})$	-3.347	-1.395	-0.778	-0.292
R_{Espectro}	+0.997	+0.996	+0.994	+0.993
R_{t_{reação}}	+0.134 - -0.010 -0.078 - +0.012	+0.033 - +0.055 -0.111 - +0.042	-0.057 - -0.020 -0.127 - -0.091	-0.028 - -0.019 -0.115 - -0.082
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.230 (0.002)	0.229 (0.002)	0.211 (0.003)	0.208 (0.002)
b	2.054×10^{-2} (2.206×10^{-4})	2.002×10^{-2} (2.368×10^{-4})	2.104×10^{-2} (2.714×10^{-4})	2.101×10^{-2} (2.514×10^{-4})
S_{y/x}	0.002	0.003	0.003	0.003
R	0.9999	0.9999	0.9998	0.9999

b) com restrição de não negatividade nas duas dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	3 componentes (matriz (conc.×esp.)× $t_{\text{reação}}$)	4 componentes (trilinearidade no componente principal)	4 componentes (trilinearidade no componente inicial)	4 componentes (trilinearidade nos componentes principal e inicial)
C_{estimada} (ppm)	10.546 (0.488)	10.441 (0.301)	10.105 (0.238)	10.152 (0.243)
Recuperação (%)	104.903	103.857	100.518	100.984
LD (3S_{y/x}/b)	0.868	0.538	0.433	0.441
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	96.846	97.991	96.803	97.284
SSQ_{resíduos}	2.428	0.985	2.493	1.800
Iterações	50 (máx.)	11	44	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	0.284	1.812	3.080	2.579
$\Delta_{\text{LOFMCR}}(\text{PCA} - \text{Exp.})$	-2.870	-0.192	-0.117	-0.138
R_{Espectro}	+0.999 - +0.998 +0.996 - +0.994	+0.995	+0.990	+0.992
R_{t_{reação}}	+0.282	-0.098 - -0.098 -0.098 - -0.098	-0.053 - -0.014 -0.127 - -0.082	-0.095 - -0.095 -0.095 - -0.095
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.147 (0.003)	0.212 (0.003)	0.211 (0.003)	0.208 (0.003)
b	1.391×10^{-2} (3.593×10^{-4})	2.026×10^{-2} (3.245×10^{-4})	2.093×10^{-2} (2.697×10^{-4})	2.035×10^{-2} (2.878×10^{-4})
S_{y/x}	0.004	0.004	0.003	0.003
R	0.9993	0.9997	0.9998	0.9998

* Ver rodapé da Tabela 4.6.

Formulações Farmacêuticas

Para todas as formulações farmacêuticas foram analisadas matrizes [(concentração \times $t_{\text{reacção}}$) \times espectro] pelo modelo MCR-ALS de quatro componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições. Análises com outras condições de ajuste do modelo se consideradas mais adequadas foram efectuadas.

Na Tabela 4.20 são apresentadas as condições de ajuste do modelo MCR-ALS consideradas mais adequadas na análise das matrizes obtidas com cada amostra analisada.

Como é possível verificar na Tabela 4.20, as condições de ajuste próximas às inicialmente consideradas foram utilizadas na análise de um grande número de amostras. Além da restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de MCR-ALS sem restrições, comuns a todas as análises, a outra condição de ajuste utilizada foi a aplicação de restrição de trilinearidade no componente principal. A aplicação desta restrição permite o ajuste de matrizes com menores desvios à trilinearidade. É de notar que, para as formulações Nigt e Ni20ap, e relativamente as amostras não fortificadas, um número de componentes menor é necessário para a análise das amostras fortificadas. Verificou-se também que, na análise das amostras não fortificadas e fortificadas das formulações Ze20sr e Ad30cr, são encontradas estruturas de graus de desvio à trilinearidade diferentes.

Tabela 4.20 – Condições de ajuste do modelo MCR-ALS utilizadas na análise das matrizes obtidas com as amostras não fortificadas e fortificadas.

Matriz analisada	Condições de ajuste			Amostras analisadas
	Número de componentes	Restrições (duas dimensões)	Estimativas iniciais	
(Concentração \times $t_{\text{reacção}}$) \times espectro	Dois	Não negatividade	MCR-ALS sem restrições	Ad30crFo
	Três			Ze20sr, Ad10ca, NigtFo e Ad10caFo
	Quatro			Nigt e Ni20apFo
	Cinco			Ni20ap
	Dois	Não negatividade e trilinearidade no composto principal corado		Ad20ap, Ad30cr e Ad20apFo
	Três			Ni10ra, Ni10raFo e Ze20srFo
Quatro	Ni10ca e Ni10caFo			

Na Tabela 4.21 são apresentados os resultados da análise pelo modelo MCR-ALS das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas. De uma forma geral, são obtidos pelo modelo MCR-ALS ajustes lineares com coeficientes de correlação linear maiores do que os obtidos anteriormente. Só as amostras Ze20sr e NigtFo apresentam coeficiente de correlação linear de ordem de grandeza menor ou igual a 0.999. Excepto para as amostras Ze20sr e NigtFo, com desvios padrão relativos ligeiramente superiores a 10 %, todas as outras amostras apresentam um desvio padrão relativo inferior a 10 %.

Para a maioria das amostras não fortificadas e fortificadas são obtidas recuperações de concentração total dentro do esperado. As exceções são, com recuperações acima dos 110%, as amostra não fortificada Nigt e Ad10ca e as amostras fortificadas NigtFo e Ni10caFo. Para a maioria das formulações são também obtidas recuperações de fortificação próximas de 100 %. As exceções são, com recuperações de fortificação elevadas acima dos 110 %, as formulações Ze20sr, Ni10ca e Ad10ca e com uma recuperação inferior, abaixo dos 90%, a formulação Nigt.

Para a maioria das amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas das dosagens estimadas por HPLC-UV. De uma forma geral são encontrados erros de previsão abaixo dos 10 %. As exceções encontram-se para as amostras Nigt e Ad30cr respectivamente com erros de previsão de 12 % e 21 %. Os erros de previsão encontrados variam desde 1 a 21 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Ze20sr e o mais alto para a amostra Ad30cr. Na avaliação da quantificação por este modelo, com todas as amostras não fortificadas, é obtido um valor de EPM de 7.160 %, de EPT de 14.411 % e de RMSEP de 2.970. Ao não ser considerada a amostra não fortificada Ad30cr é encontrada um valor de EPM de 5.248 %, de EPT de 6.965 % e de RMSEP de 1.162. Tal como com o modelo PARAFAC2 há uma diminuição significativa da média do erro de previsão e dos valores de EPT e de RMSEP ao não ser considerada a amostra Ad30cr.

Só para a amostra Ze20srFo com outras condições de ajuste nomeadamente, com quatro componentes e aplicação da restrição de trilinearidade no componente principal, é encontrada uma recuperação de fortificação ligeiramente melhor.

Com o modelo MCR-ALS são encontradas estimativas de concentração próximas às obtidas com o modelo PARAFAC2. São também encontradas melhores recuperações de fortificação do que as encontradas com o modelo PARAFAC e ligeiramente piores do que as encontradas com o modelo PARAFAC2.

Tabela 4.21 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas obtidas pelo modelo MCR-ALS.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Ni10ra	Ze20sr	Nigt	Ni10ca
C_{estimada} (ppm)	8.843 (0.621)	9.176 (1.063)	12.515 (0.640)	10.502 (0.606)
C_{esperada} (ppm)	10.080	9.955	10.080	9.929
Recuperação (%)	87.731	92.179	124.158	105.767
LD (3S_{y/x}/b)	1.206	2.023	1.034	0.899
DOS_{estimada} (mg)	8.773	18.436	24.831	10.577
DOS_{estimada} HPLC (mg)	8.626	18.647	22.225	10.044
EP (%)	1.704	1.132	11.726	5.307
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	96.736	98.203	99.046	96.709
SSQ_{resíduos}	1.880	0.743	0.239	3.598
Iterações	18	50 (máx.)	50 (máx.)	22
LOF_{MCR vs. PCA}	2.964	0.581	0.336	3.169
Δ_{LOFMCR} (PCA - Exp.)	-0.300	-1.216	-0.618	-0.125
R_{Espectro}	+0.998	+0.872	+0.996	+0.987
R_t_{reação}	-0.984 - -0.984	-0.567 - -0.828	-0.246 - -0.058	-0.607 - -0.607
	-0.984 - -0.984	-0.910 - -0.088	-0.214 - -0.297	-0.607 - -0.607
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.154 (0.006)	0.111 (0.029)	0.222 (0.005)	0.196 (0.006)
b	1.747×10 ⁻² (6.286×10 ⁻⁴)	1.211×10 ⁻² (7.328×10 ⁻⁴)	1.773×10 ⁻² (5.471×10 ⁻⁴)	2.053×10 ⁻² (3.940×10 ⁻⁴)
S_{y/x}	0.007	0.008	0.006	0.007
R	0.9987	0.9964	0.9990	0.9990

a) amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Ni20ap	Ad10ca	Ad20ap	Ad30cr
C_{estimada} (ppm)	9.398 (0.353)	8.636 (0.173)	10.270 (0.317)	10.183 (0.581)
C_{esperada} (ppm)	9.956	10.080	9.939	10.102
Recuperação (%)	94.400	85.674	103.333	100.798
LD (3S_{y/x}/b)	0.663	0.340	0.573	1.053
DOS_{estimada} (mg)	18.879	8.568	20.667	30.240
DOS_{estimada} HPLC (mg)	20.070	9.461	20.981	38.057
EP (%)	5.934	9.439	1.497	20.540
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	99.297	98.457	95.141	97.194
SSQ_{resíduos}	0.160	0.493	4.618	2.152
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	18	43
LOF_{MCR vs. PCA}	0.453	0.112	3.592	2.591
Δ_{LOFMCR} (PCA - Exp.)	-0.250	-1.432	-1.267	-0.215
R_{Espectro}	+0.943	+0.994	+0.998	+0.951
R_t_{reação}	-0.588 - -0.387	+0.966 - -0.967	-0.662 - -0.662	-0.959 - -0.959
	-0.539 - -0.329	-0.941 - -0.969	-0.662 - -0.662	-0.959 - -0.959
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.214 (0.004)	0.174 (0.002)	0.201 (0.003)	0.210 (0.006)
b	2.276×10 ⁻² (4.512×10 ⁻⁴)	2.013×10 ⁻² (2.037×10 ⁻⁴)	1.956×10 ⁻² (3.333×10 ⁻⁴)	2.058×10 ⁻² (6.448×10 ⁻⁴)
S_{y/x}	0.005	0.002	0.004	0.007
R	0.9996	0.9999	0.9997	0.9990

(Continua)

Tabela 4.21 (Continuação) - b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Ni10raFo	Zc20srFo	NigtFo	Ni10caFo
C_{estimada} (ppm)	11.330 (0.461)	12.213 (0.755)	14.333 (1.796)	13.929 (0.548)
C_{esperada} (ppm)	12.552	12.397	12.540	12.839
Recuperação (%)	90.264	98.518	114.303	112.427
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.789	1.265	2.673	0.830
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	97.490	96.890	98.169	96.475
$SSQ_{\text{resíduos}}$	1.515	2.602	1.186	4.567
Iterações	6	18	50 (máx.)	14
$LOF_{\text{MCR vs. PCA}}$	2.220	2.839	0.034	3.387
$\Delta_{\text{LOFMCR (PCA - Exp.)}}$	-0.290	-0.272	-1.797	-0.138
R_{Espectro}	+0.996	+0.976	+0.994	+0.969
$R_{\text{reação}}$	-0.908 - -0.908	-0.732 - -0.732	-0.835 - -0.810	+0.700 - +0.700
	-0.908 - -0.908	-0.732 - -0.732	-0.881 - -0.864	+0.700 - +0.700
Fortificação ($C_{\text{estimada amostra fortificada}} - C_{\text{estimada amostra não fortificada}}$)				
C_{estimada} (ppm)	2.487	3.037	1.818	3.427
C_{esperada} (ppm)	2.472	2.442	2.460	2.460
Recuperação (%)	100.607	124.365	73.902	139.309
$\Delta = C_{\text{estimada}} - C_{\text{esperada}}$	+0.015	+0.595	-0.642	+0.967
Calibração ($y = bx + a, m = 4$)				
a	0.223 (0.004)	0.234 (0.029)	0.245 (0.055)	0.263 (0.004)
b	1.968×10^{-2} (4.620×10^{-4})	1.808×10^{-2} (6.860×10^{-4})	1.706×10^{-2} (1.361×10^{-3})	1.889×10^{-2} (4.682×10^{-4})
$S_{y/x}$	0.007	0.008	0.015	0.005
R	0.9990	0.9986	0.9937	0.9994

b) amostras fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Ni20apFo	Ad10caFo	Ad20apFo	Ad30crFo
C_{estimada} (ppm)	12.020 (0.340)	12.115 (0.527)	12.704 (0.689)	12.607 (0.082)
C_{esperada} (ppm)	12.398	12.552	12.411	12.574
Rec. (%)	96.952	96.521	102.364	100.264
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.560	0.868	1.104	0.133
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	99.036	98.463	96.326	97.543
$SSQ_{\text{resíduos}}$	0.360	0.628	3.536	2.033
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	12	50 (máx.)
$LOF_{\text{MCR vs. PCA}}$	0.121	0.222	2.779	3.326×10^{-3}
$\Delta_{\text{LOFMCR (PCA - Exp.)}}$	-0.843	-1.315	-0.859	-2.453
R_{Espectro}	+0.975	+0.990	+0.995	+0.998
$R_{\text{reação}}$	-0.795 - -0.919	-0.429 - -0.726	-0.830 - -0.830	-0.541 - -0.900
	-0.885 - -0.855	-0.740 - -0.586	-0.830 - -0.830	-0.817 - -0.895
Fortificação ($C_{\text{estimada amostra fortificada}} - C_{\text{estimada amostra não fortificada}}$)				
C_{estimada} (ppm)	2.622	3.479	2.434	2.424
C_{esperada} (ppm)	2.442	2.472	2.472	2.472
Recuperação (%)	107.371	140.736	98.463	98.058
$\Delta = C_{\text{estimada}} - C_{\text{esperada}}$	+0.180	+1.007	-0.038	-0.048
Calibração ($y = bx + a, m = 4$)				
a	0.263 (0.003)	0.239 (0.005)	0.252 (0.006)	0.281 (0.001)
b	2.186×10^{-2} (3.660×10^{-4})	1.974×10^{-2} (5.097×10^{-4})	1.983×10^{-2} (6.513×10^{-4})	2.225×10^{-2} (8.793×10^{-5})
$S_{y/x}$	0.004	0.006	0.007	0.001
R	0.9997	0.9993	0.9989	1.0000

* máx. – corresponde à indicação de que o número máximo de iterações definido no ajuste do modelo foi atingido. A dosagem é dada em massa de composto por comprimido excepto para Nigt em que a dosagem vem em massa de composto por mL; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

4.4.2.4 - Avaliação global

Na Fig. 4.13 são apresentadas as representações gráficas das percentagens de ajuste do modelo obtidas com os modelos de análise multivariada na análise da matriz de DMSO e do padrão de Nifedipina 10.053 ppm em função do número de componentes.

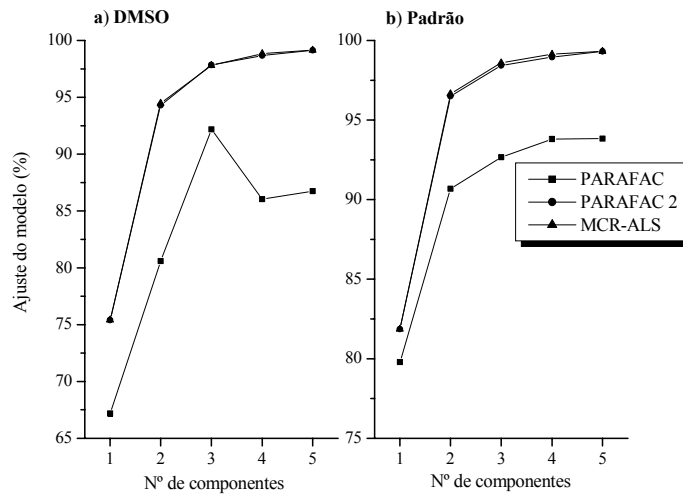


Fig. 4.13 – Gráfico dos valores de percentagem de ajuste dos modelos PARAFAC e PARAFAC2 obtidos na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] e MCR-ALS na análise da matriz [(concentração \times $t_{\text{reação}}$) \times espectro] do a) solvente DMSO e b) padrão de Nifedipina 10.053 ppm com não negatividade em todas as dimensões para os modelos PARAFAC e MCR-ALS e na primeira e terceira dimensões para o modelo PARAFAC2.

A avaliação dos gráficos apresentados na Fig. 4.13 permite verificar uma grande diferença nas percentagens de ajuste do modelo obtidas com todos os componentes pelo modelo PARAFAC e as obtidas com os outros dois modelos. Maiores percentagens de ajuste são obtidas para os modelos PARAFAC2 e MCR-ALS. Também, uma maior proximidade nas percentagens de ajuste do modelo se verifica com estes dois modelos. Assim, com o modelo MCR-ALS na análise da matriz de DMSO, com quatro componentes e na análise do padrão de dois a quatro componentes são obtidas percentagens de ajuste ligeiramente maiores. Claramente, tal como já verificado anteriormente, os modelos mais adequados são aqueles que não assumem a estrutura trilinear dos dados.

Na Fig. 4.14 são apresentadas as representações gráficas dos coeficientes de correlação linear das estimativas do componente principal na dimensão do espectro de absorvância, perfil de tempo de reação e concentração obtidos com os três modelos na análise de cada

uma das amostras não fortificadas e os verificados experimentalmente. Para representação gráfica, se mais que um perfil de tempo de reacção é estimado, com o modelo MCR-ALS é considerado o primeiro perfil estimado e com o modelo PARAFAC2 o primeiro perfil estimado ou o perfil ao c.d.o. de absorvância máxima.

Na dimensão do espectro de absorvância, e como se pode verificar nos gráficos da Fig. 4.14, são obtidos com os três modelos coeficientes de correlação linear próximos para a maioria das amostras. A única excepção verifica-se com o modelo MCR-ALS na análise da amostra Ze20sr. De uma forma geral, são obtidas pelo modelo PARAFAC melhores estimativas nesta dimensão.

Na dimensão do perfil de tempo de reacção e de concentração as melhores estimativas são obtidas com o modelo MCR-ALS. Com este modelo são encontrados, de acordo com o esperado, coeficientes de correlação linear mais negativos para o perfil de tempo de reacção e mais positivos para a concentração. Nestas duas dimensões os coeficientes de correlação linear obtidos com o modelo PARAFAC2 são os que mais se aproximam dos obtidos com o modelo MCR-ALS. As únicas excepções, com coeficientes de correlação mais afastados, verificam-se na dimensão do perfil de tempo de reacção com a amostra Ad10ca e na dimensão da concentração com as amostras Ze20sr e Ni10ca.

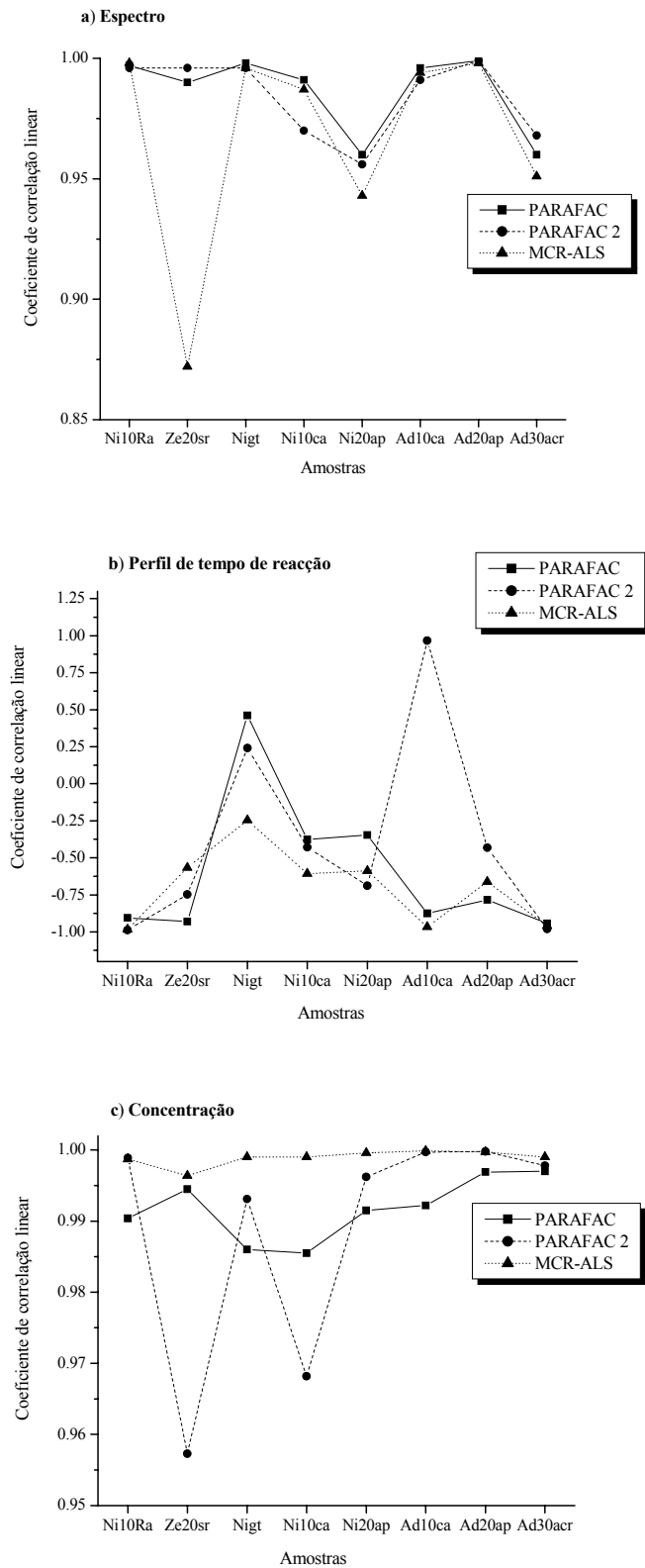


Fig. 4.14 – Comparação dos coeficientes de correlação linear do componente principal entre os espectros a), perfis de tempo de reacção b) e concentração c) estimados na análise das amostras não fortificadas pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS e os obtidos experimentalmente.

Na Fig. 4.15 são apresentadas as representações gráficas das recuperações e dos erros de previsão obtidos na análise das amostras não fortificadas com os três modelos. As recuperações e erros de previsão obtidos por análise directa são também representados.

Como se pode verificar na Fig. 4.15, só para as amostras Ad10ca, Ad20ap e Ad30cr são encontradas recuperações e erros de previsão próximos por análise directa e pelos modelos de análise multivariada. Por análise directa, e com o modelo PARAFAC, são obtidas recuperações acima de 100 % e erros de previsão altos. Com os modelos PARAFAC2 e MCR-ALS são encontrados recuperações e erros de previsão próximos. Com estes dois modelos, e para todas as amostras, são obtidas recuperações próximas de 100 % e erros de previsão mais baixos.

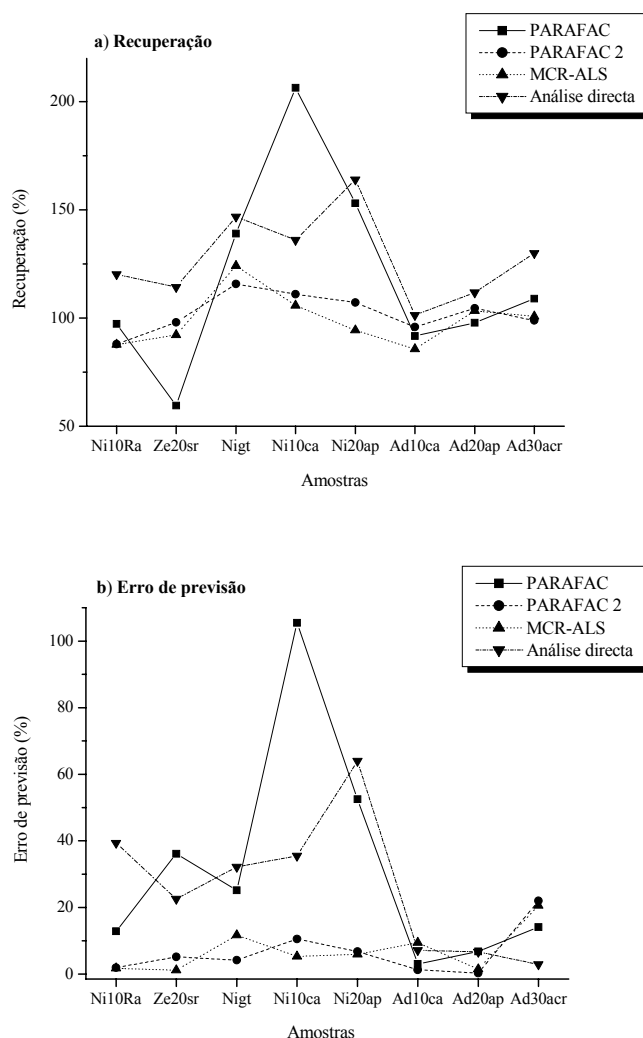


Fig. 4.15 – Comparação da recuperação a) e erros de previsão b) obtidos com cada amostra não fortificada por análise directa e pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS.

Na Tabela 4.22, são apresentados os valores de EPT, RMSEP, EPM e LDM obtidos com o conjunto das amostras não fortificadas analisadas por análise directa e pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS. Para os modelos de análise multivariada, é também apresentado o valor de AjMM.

Tabela 4.22 – Valores de EPM, EPT, RMSEP, LDM e AjMM obtidos com todas as amostras não fortificadas.

Modelo	Parâmetros avaliados				
	EPT (%)	RMSEP	EPM (%)	LDM (ppm)	AjMM (%)
Análise directa	35.563	6.102	29.637	2.529	----
PARAFAC	39.203	6.542	34.569	3.407	88.855
PARAFAC2	4.979	0.831	4.323	2.893	97.898
MCR-ALS	6.965	1.162	5.248	0.963	97.656

Pelas razões já previamente indicadas, na Tabela 4.22 os valores dos parâmetros avaliados para o conjunto das amostras analisadas são os valores calculados não considerando a amostra Ad30cr. São encontrados, pelos modelos PARAFAC2 e MCR-ALS valores de EPT, RMSEP e EPM bastante inferiores aos obtidos por análise directa e com o modelo PARAFAC. Com os modelos MCR-ALS e PARAFAC2, e com excepção do LDM em que um valor inferior é obtido com o modelo MCR-ALS, são encontrados valores dos parâmetros avaliados que podem ser considerados próximos.

Atendendo a todos os critérios avaliados, são obtidas pelo modelo MCR-ALS estimativas de concentração mais adequadas com estimativas nas três dimensões mais consistentes. No entanto, com o modelo PARAFAC2 são também obtidas estimativas de concentração próximas ou mesmo melhores estimativas do que as obtidas com o modelo MCR-ALS.

4.5. Referências

- [1] – Vogel, A., *Química orgânica – Análise orgânica qualitativa*, Editora ao livro técnico S. A. - Indústria e comércio, Rio de Janeiro (1984)
- [2] – Ali, S., Nifedipine, in *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, Vol. 18*. Academic Press, New York, 1989, pp. 221 – 287.
- [3] – Shingbal, D. e Bhangle, S., Simple spectrophotometric analysis of Nifedipine. *Indian Drugs* **24** (1987) 490 – 491.

5. REDUÇÃO DE NIFEDIPINA E REACÇÃO COM OPA

5.1. Fundamento

A Nifedipina é uma dihidropiridina, ver Fig. 1.4 do capítulo 1, que na sua molécula além de dois grupos ésteres tem também um grupo nitro. Este composto não apresenta fluorescência e só um processo de derivatização com obtenção de um derivado fluorescente permite a sua determinação por esta técnica. Uma estratégia para a obtenção de um derivado fluorescente passa pela redução do seu grupo nitro em amina seguida de reacção posterior com um reagente de derivatização de fluorescência para análise de aminas primárias [1,2,3].

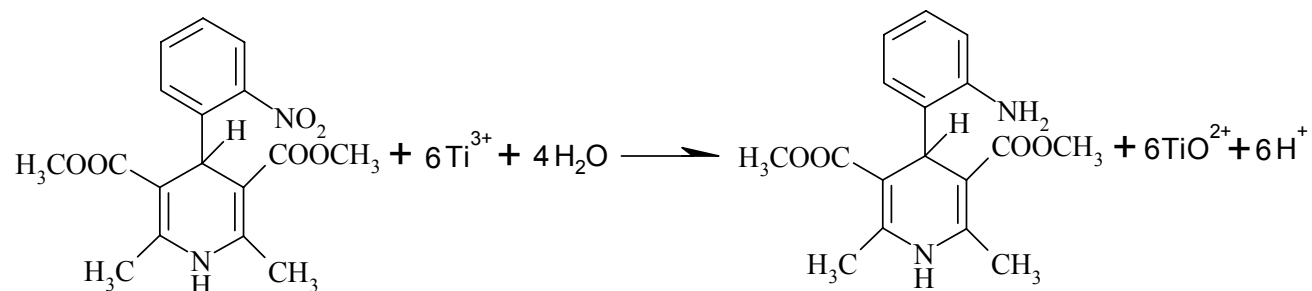
A identificação, detecção sensível e quantificação de numerosas drogas e outras moléculas de interesse que contêm grupos amina primários são importantes. Uma das formas de o fazer é recorrendo a reagentes de derivatização de fluorescência. Diversos reagentes, entre os quais os dialdeídos aromáticos estão disponíveis para esse fim. Os dialdeídos aromáticos [o-ftaldialdeído (OPA) e naftaleno-2,3-dicarboxialdeído (NDA)] são essencialmente não fluorescentes e na presença de um tiol ou cianeto reagem com uma amina primária para darem um derivado isoindol fluorescente. De entre estes dois reagentes o OPA tem sido o mais utilizado. A sua utilização mais comum é na determinação de aminoácidos. A reacção dos aminoácidos com a OPA é efectuada em meio alcalino e na presença de um agente redutor forte como o 2-mercaptoetanol [4].

De forma a aumentar a sensibilidade da determinação, pode ainda ser obtido um aumento da intensidade de fluorescência do amino derivado da Nifedipina através da

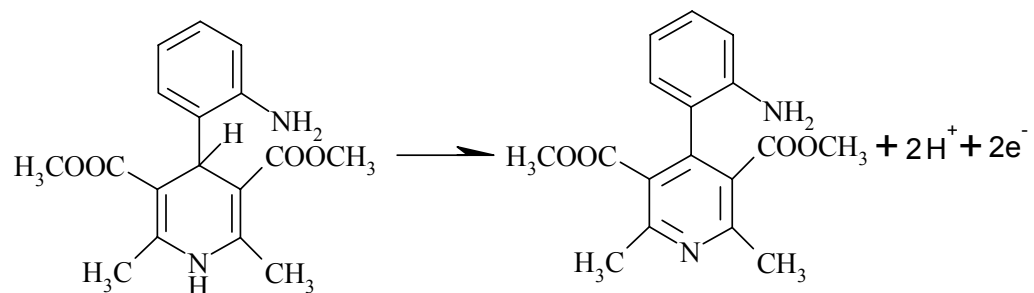
oxidação do anel dihidropiridina a piridina. Esta oxidação pode ser efectuada por exposição à luz visível ou ultravioleta, altas temperaturas e agentes oxidantes. Agentes redutores fortes como grânulos de Zn em HCl e cloreto de titânio são necessários para a redução do grupo nitro da Nifedipina em amina [3,5]. Destes dois agentes redutores o cloreto de titânio, referido como reagente para a titulação quantitativa do grupo nitro em amina, é um agente redutor forte de fácil utilização.

Na Fig. 5.1 é apresentada a reacção de formação do derivado indol fluorescente da Nifedipina por fotooxidação e reacção química com o cloreto de titânio e OPA. A possibilidade de quantificação espectrofluorimétrica da Nifedipina, na presença de possíveis interferentes e da obtenção de estruturas de dados adequadas à utilização de métodos de decomposição tridimensional levou a considerar a possibilidade de quantificação da Nifedipina através desta reacção.

1) Redução do grupo nitro a amina



2) Fotooxidação de dihidropiridina a piridina



3) Reacção com OPA (o-ftaldialdeído)

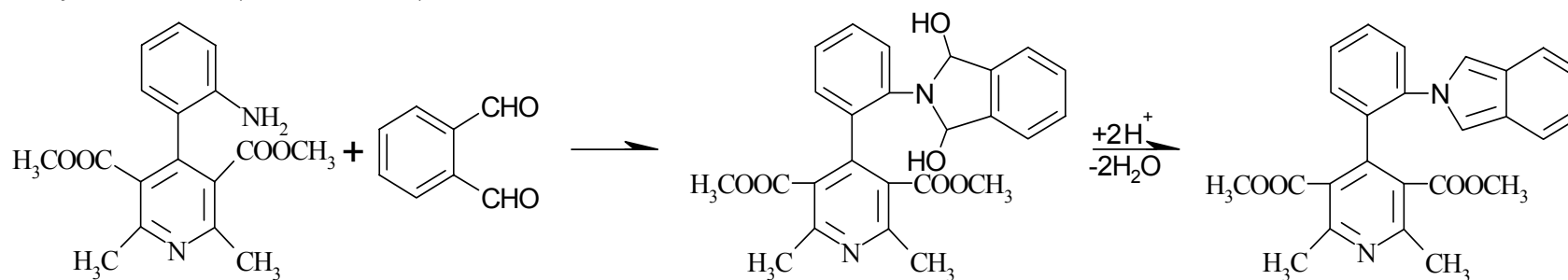


Fig. 5.1 – Formação do derivado indol fluorescente da Nifedipina por fotooxidação e reacção química com o cloreto de titânio e OPA.

5.2. Procedimento experimental

O registo de cada uma das matrizes obtidas foi feito com fendas de excitação e emissão de 0.05 mm e com um tempo de integração 11.5 s. Na fase de optimização, de forma a uma avaliação prévia das condições de reacção, foram também efectuadas medições em modo cromatográfico de avaliação. Neste modo de determinação foram utilizados um tempo de registo de 40 min, tempo de ciclo de 5 min, tempo de integração de 60 s e tempos de varrimento de 66 s.

As soluções padrão de Nifedipina foram preparadas por pesagem rigorosa para a concentração final pretendida. Tanto na fase de optimização, como na fase de quantificação, as soluções padrão de Nifedipina foram preparadas para uma concentração final de 200 ppm em etanol. Soluções padrão de menores concentrações foram preparadas por diluição rigorosa desta solução padrão para o volume total requerido com etanol.

A massa a pesar das diferentes formas farmacêuticas, para uma concentração estimada em Nifedipina de 200 ppm, foi calculada de acordo com a respectiva dosagem da Nifedipina nas diferentes formas farmacêuticas. Atendendo à dosagem, e só nos casos em que não foi possível obter uma solução amostra desta concentração, foram preparadas soluções de concentrações diferentes. A maioria das soluções amostras foram preparadas por pesagem rigorosa do pó, a partir de uma mistura de 20 comprimidos ou cápsulas, correspondente a um comprimido. Para o volume de solução requerido, e de forma a ser obtida a concentração pretendida, com a amostra Nigt foi medido um volume adequado de solução e com as amostras Ni10ra e Ad10ca foi adicionado o conteúdo líquido de 10 cápsulas. Excepto para as amostras Nigt, Ni10ra e Ad10ca as soluções amostra foram posteriormente decantadas e centrifugadas a 13000 rpm durante 10 min.

Tal como com as soluções padrão e de amostras, a solução de OPA 1 % (m/V) em etanol foi também preparada por pesagem rigorosa do sólido para a concentração pretendida. A solução tampão de pH 2.5, utilizada na fase de quantificação, foi preparada por pesagem rigorosa de 1.3 g de acetato de sódio trihidratado e medição de 28.6 mL de ácido acético glacial 100 % para um volume final de solução tampão de 1000 mL. Soluções tampão com outros valores de pH foram também utilizadas na fase de optimização. A solução de HCl 3 M e soluções de outras concentrações inicialmente

utilizadas foram preparadas por diluição da solução de HCl concentrada a 37 %. O cloreto de titânio (III) 10 % preparado em HCl 20 - 30 % foi obtido comercialmente.

Tanto na fase de optimização como na de quantificação a reacção foi efectuada para um volume total de 3 mL em frascos de amostra. Na fase de quantificação a reacção foi efectuada por adição sucessiva dos reagentes utilizados. A ordem de adição dos reagentes foi a seguinte:

- 1) Volume adequado de solução a determinar (branco, padrão amostra ou amostra fortificada).
- 2) 0.125 mL de cloreto de titânio (III) 10 % (em atmosfera de azoto).
- 3) Volume adequado de solução tampão de pH 2.5 para 3 mL.
- 4) 0.225 mL de OPA 1%.

A fotooxidação do anel de dihidropiridina em piridina foi conseguida pela exposição simultânea destes frascos a luz ultravioleta de uma lâmpada de Mercúrio de 400 W a uma distância de 25 cm durante 10 min.

5.3. Optimização

Na fase de optimização pretendeu-se verificar quais as condições mais adequadas de reacção no que respeita a sensibilidade de determinação e velocidade. A avaliação destas condições foi efectuada verificando a gama linear obtida, o limite de detecção, a intensidade de fluorescência ao c.d.o. de excitação e emissão de fluorescência máxima. De uma forma geral procurou-se a obtenção de uma intensidade de fluorescência mais elevada aos maiores c.d.o. de excitação e emissão com um tempo de reacção menor.

A obtenção de um tempo de reacção menor foi efectuada optimizando as condições de reacção e do método analítico de forma a serem conseguidos procedimentos mais simples que levassem a uma maior velocidade de reacção. Após esta avaliação e, atendendo aos diferentes factores que podem influenciar a resposta do sistema, no que diz respeito a intensidade de fluorescência máxima e aos c.d.o. de excitação e de emissão, as condições de reacção foram posteriormente optimizadas recorrendo a optimização univariada e a técnicas de planeamento experimental.

Para todos os modelos de planeamento experimental efectuados foram avaliadas três variáveis de resposta:

- 1) Intensidade de fluorescência máxima.
- 2) c.d.o. de emissão máximo.
- 3) c.d.o. de excitação máximo.

As variáveis do planeamento utilizadas no planeamento experimental factorial total inicial foram:

- Volume de cloreto de titânio (III) 10 %.
- Volume de OPA 1 %.
- Tempo de exposição   lâmpada.

No planeamento experimental de optimização de compósito central final as variáveis do planeamento utilizadas foram o volume de cloreto de titânio (III) e o volume de OPA.

5.3.1. Resultados

Avaliação prévia

As avaliações iniciais foram feitas em cuvete de quartzo para um volume total de 3 mL, com uma concentração de padrão de Nifedipina de 10 ppm em etanol. As condições de reacção iniciais foram:

- 1) Volume adequado de solução padrão a determinar.
- 2) 0.180 mL de cloreto de titânio (III) 10 % (adição em atmosfera de azoto).
- 3) Volume adequado de solução tampão pH 3 para volume total de 3 mL.
- 4) Exposição à lâmpada de mercúrio durante 30 min.
- 5) 0.091 mL de OPA 1 %.
- 6) Espera de 4 min com lâmpada desligada.
- 7) 0.200 mL de HCl 3 M.

Previamente à optimização por planeamento experimental, houve algumas condições de reacção iniciais que foi necessário avaliar. Foram passíveis de avaliação da sua utilização, o tempo de exposição à lâmpada de 30 min, o tempo de espera final assim como a adição última de HCl 3 M para estabilização do complexo. É de referir também que, nestas avaliações prévias, e devido ao facto do reagente de cloreto de titânio ser preparado em HCl 20 - 30 %, o pH da reacção foi também avaliado.

Estas avaliações prévias foram efectuadas fazendo inicialmente o estudo com o tempo expondo as soluções à lâmpada do próprio fluorímetro. Assim, simultaneamente à avaliação do tempo de exposição à lâmpada, foi também possível verificar da necessidade do tempo de espera final, da adição final de HCl 3 M e ainda qual o valor pH mais adequado para a reacção. Sabendo que um meio ácido é necessário para a estabilização do complexo foi avaliada uma gama de pH entre 1 a 3. Os valores de pH pretendidos, foram obtidos sem a adição de solução tampão e por adição de soluções de HCl de diferentes concentrações. Na Fig. 5.2 são apresentados os resultados desta avaliação prévia.

Na avaliação da estabilidade do complexo, com ou sem tempo de espera de 5 min e com ou sem adição de HCl 3 M, foram obtidos perfis idênticos de variação aos apresentados para a avaliação com a variação de pH. Não se verificaram menores tempos de reacção, nem maior estabilidade do complexo por adição de HCl 3 M ou com tempo de espera de 5

min. Só um ligeiro decréscimo da intensidade de fluorescência, não significativo, foi verificado pela não adição de HCl 3 M. Como se pode ver na Fig. 5.2 um tempo mínimo de 10 min de exposição à lâmpada é requerido para todos os valores de pH avaliados. Ainda é possível verificar que, dos valores de pH avaliados, o pH 2.5 é o que permite obter uma maior intensidade de fluorescência associado a uma maior estabilidade da intensidade de fluorescência. Note-se ainda que a pH 2 se atinge uma maior intensidade de fluorescência mais rapidamente.

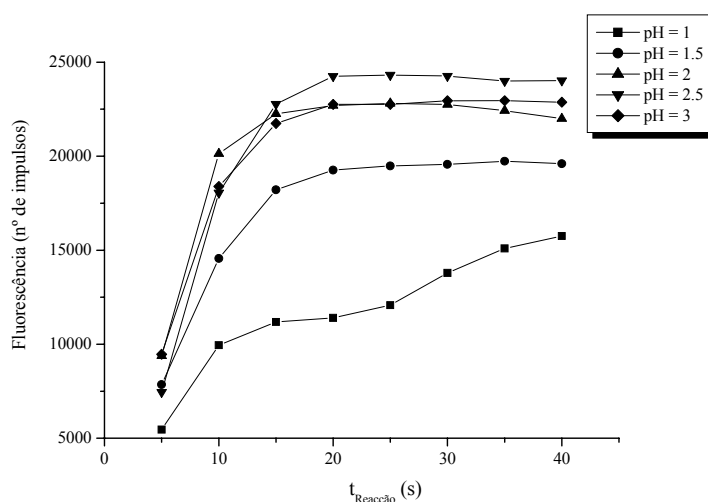


Fig. 5.2 – Avaliação do tempo de exposição à lâmpada e da intensidade de fluorescência por variação do pH da reacção.

Os mesmos resultados foram encontrados, nas mesmas condições, com uma solução tampão de pH 2.5 e por exposição à lâmpada de mercúrio utilizada na quantificação. Uma avaliação univariada dos volumes de cloreto de titânio e de OPA adicionados, com uma solução tampão de pH 2.5 e sem adição de HCl, na gama entre 0.050 e 0.150 mL, mostrou que o volume de adição mais adequado para os dois reagentes é um volume de 0.100 mL. Uma avaliação do tempo de exposição à lâmpada de mercúrio veio também confirmar o tempo de 10 min como tempo mínimo de exposição à lâmpada. Verificou-se, até aos 10 min um aumento significativo na intensidade de fluorescência, ainda um aumento ligeiro até aos 20 min seguido de um decréscimo acentuado até aos 30 min.

Assim, e atendendo a esta avaliação prévia, estudos posteriores através de modelos de planeamento experimental, foram efectuadas com uma concentração de Nifedipina de 10 ppm em etanol e pH 2.5. Os valores de referência iniciais para as variáveis do planeamento

foram um volume de cloreto de titânio e de OPA de 0.100 mL e um tempo de exposição à lâmpada no máximo de 10 min.

Planeamento experimental Factorial Total

A escolha inicial de um planeamento factorial total deveu-se ao facto de o número de factores a avaliar, e conseqüentemente o número de variáveis do planeamento, não ser muito grande e de que com este tipo de planeamento se poder avaliar, além dos efeitos principais de cada variável todas as interacções possíveis entre as diferentes variáveis. No planeamento experimental efectuado foram estudados para cada uma das variáveis dois níveis, sem repetições e três amostras centrais.

Como já referido foram inicialmente avaliadas três variáveis de resposta e três variáveis do planeamento. As variáveis do planeamento contínuas e os níveis estudados foram:

- Volume de cloreto de titânio (III) 10 % (0.050 mL e 0.150 mL, central - 0.100 mL).
- Volume de OPA 1 % (0.050 mL e 0.150 mL, central - 0.100 mL).
- Tempo de exposição à lâmpada (2.50 min e 10.00 min, central - 6.25 min).

A gama de resultados obtidos com cada uma das variáveis de resposta foi:

- 1) Intensidade de fluorescência máxima (18769 impulsos - 32736 impulsos).
- 2) c.d.o. de emissão máximo (501.79 nm - 506.80 nm).
- 3) c.d.o. de excitação máximo (378.75 nm - 383.94 nm).

Da análise dos resultados, verificou-se que, para todas as experiências, foi obtida uma gama alargada dos valores de intensidade de fluorescência máxima e uma gama estreita dos valores de c.d.o. de excitação e de emissão. O valor de intensidade de fluorescência mais elevada foi encontrado com um tempo de exposição à lâmpada de 6.25 min e com volumes de cloreto de titânio e de OPA de 0.100 mL.

Na Tabela 5.1 são apresentados os resultados da avaliação dos efeitos principais e interacções nas variáveis de resposta e na curvatura da resposta de cada uma das variáveis do planeamento, assim como os resultados da avaliação do modelo linear total por ANOVA. O teste de significância de avaliação dos efeitos principais e interacções

efectuado é o teste de significância dos efeitos de ordem superior (HOIE) e o teste de significância de avaliação da curvatura da resposta é o teste de amostras centrais, aqui designado como “Center”. O modelo total é avaliado por ANOVA através da razão F, pelo respectivo valor p e pelo valor de coeficiente de correlação múltipla.

Tabela 5.1 – Resultados obtidos com o planeamento factorial total, por análise dos efeitos principais e interações, através da avaliação da resposta de um padrão de Nifedipina 10 ppm, em etanol e em meio de pH 2.5.*

Variáveis do planeamento	Variáveis de resposta								
	Intensidade de fluorescência			c.d.o. de emissão			c.d.o. de excitação		
	HOIE (p)	Center	Coef. b	HOIE (p)	Center	Coef. b	HOIE (p)	Center	Coef. b
t_{exposição} (min) (A)	ns (0.203)	ns	+2214	ns (0.343)	ns	-0.626	ns (1.000)	ns	0.000
Cloreto de titânio (mL) (B)	ns (0.669)	ns	-419	ns (0.203)	+	+1.131	ns (1.000)	ns	0.000
OPA (mL) (C)	ns (0.144)	ns	+3175	ns (0.500)	ns	-0.374	ns(1.000)	ns	0.000
AB	ns (0.195)	ns	-2312	ns (0.343)	ns	+0.626	---(0.000)	ns	-1.298
AC	ns (0.587)	ns	+556	ns (0.500)	ns	-0.374	+++ (0.000)	ns	+1.298
BC	ns (0.213)	ns	+2111	ns (0.500)	ns	+0.374	--- (0.000)	ns	-1.298
Modelo total (ANOVA)									
Razão F (p)	7.860 (0.267)			2.963 (0.418)			np (0.000)		
R_{múltipla}	0.979			0.947			1.000		

* Coef. b. – coeficiente de regressão b de cada efeito ou interação do modelo; entre parêntesis é apresentado um valor de probabilidade (p), para um nível de significância de 5 %, que indica na avaliação de um efeito principal ou interação a probabilidade de que seja significativo ou na avaliação do modelo a probabilidade do modelo ser válido; código de avaliação de efeitos ou interações negativas ou positivas de acordo com o nível de significância - ns – não significativo (≥ 0.05); - ou + - [0.01;0.05], -- ou ++ - [0.005;0.01], --- ou +++ - <0.005.

Na avaliação dos efeitos principais e interações, como se pode ver na Tabela 5.1, verificou-se, para a intensidade de fluorescência e para o c.d.o. de emissão, que o modelo não é globalmente válido, apesar dos coeficientes de correlação múltipla altos. Para o c.d.o. de excitação, e atendendo à pouca variabilidade da resposta, não foi possível tirar conclusões acerca da validade do modelo pois não foi possível definir o modelo. Nas condições avaliadas, pela análise dos efeitos principais, das interações e dos coeficiente de regressão b verificou-se que:

- 1) O aumento do tempo de exposição à lâmpada provoca um aumento da intensidade de fluorescência máxima e uma diminuição do c.d.o. de emissão não significativos.
- 2) O aumento do volume de cloreto de titânio provoca um decréscimo não significativo e o aumento de volume de OPA provoca um acréscimo não

significativo da intensidade de fluorescência com efeitos contrários não significativos sobre o c.d.o. de emissão.

- 3) Não foram encontradas interações significativas para a intensidade de fluorescência e para o c.d.o. de emissão.
- 4) A única curvatura de resposta positiva foi obtida para o c.d.o. de emissão com o aumento do volume de cloreto de titânio.

Atendendo aos resultados obtidos com este planeamento experimental deve já estar-se a trabalhar numa zona das variáveis próximas do óptimo. O aumento da intensidade de fluorescência, associado a uma diminuição do c.d.o. de emissão, é favorecido por um aumento do tempo de exposição à lâmpada e por um aumento do volume de OPA. Apesar de o aumento da intensidade de fluorescência não ser significativo com o aumento tempo de exposição à lâmpada, verifica-se que foi obtida uma maior intensidade de fluorescência a um tempo de exposição à lâmpada de 6.25 min. Assim as respostas máximas das três variáveis de resposta devem ser avaliadas a um tempo mínimo de exposição à lâmpada, com um aumento do volume adicionado de OPA e com volumes idênticos de cloreto de titânio.

Planeamento experimental de Optimização Compósito Central

A possibilidade de utilização de um tempo menor de exposição à lâmpada foi ainda avaliada. Assim, a um tempo de exposição de 5 min, com um aumento do volume adicionado de OPA e com volumes de cloreto de titânio adicionados, idênticos aos anteriormente adicionados, avaliou-se a intensidade de fluorescência obtida. Uma vez que unicamente duas variáveis do planeamento foram avaliadas, foi utilizado um modelo de planeamento experimental de optimização de compósito central. O planeamento experimental de optimização foi efectuado de forma a avaliar exactamente a zona de resposta máxima para a intensidade de fluorescência e eventualmente para as outras duas variáveis de resposta (c.d.o. de excitação e de emissão). Este planeamento permite avaliar níveis das variáveis abaixo e acima dos níveis do planeamento. Nestas condições irá permitir verificar se um aumento de reagente do volume de OPA ainda será possível e se é significativo.

Assim o planeamento experimental de optimização de compósito central foi efectuado com o padrão de Nifedipina em etanol, pH 2.5, tempo de exposição à lâmpada de 5 min, com aumento do volume de OPA, com dois níveis das variáveis do planeamento e três amostras centrais. As duas variáveis do planeamento e os respectivos níveis foram:

- Volume de cloreto de titânio (níveis do planeamento - 0.050 mL e 0.150 mL, níveis fora do planeamento – 0.029 mL e 0.171 mL e nível central – 0.100 mL).
- Volume de OPA (níveis do planeamento - 0.150 mL e 0.250 mL, níveis fora do planeamento – 0.129 mL e 0.271 mL e nível central – 0.200 mL).

A gama de resultados obtidos com cada uma das variáveis de resposta foi:

- 1) Intensidade de fluorescência máxima (25828 impulsos - 30704 impulsos).
- 2) c.d.o. de emissão máximo (508.82 nm - 510.84 nm).
- 3) c.d.o. de excitação máximo (378.75 nm - 383.94 nm).

Como já seria de esperar nas condições avaliadas foram obtidas uma gama mais estreita de valores intensidade de fluorescência máxima e de c.d.o. de emissão máxima. Também atendendo há já pouca variabilidade encontrada no c.d.o. de excitação com o planeamento experimental factorial total foi obtido um intervalo idêntico de variação. A intensidade de fluorescência máxima mais elevada foi encontrada com um volume de cloreto de titânio de 0.100 mL e de OPA de 0.200 mL.

Não se verificou um aumento da intensidade de fluorescência máxima encontrada e, verificou-se mesmo um decréscimo ligeiro do limite superior previamente encontrado da intensidade de fluorescência máxima. Este ligeiro decréscimo, e tendo em atenção os resultados prévios da avaliação do tempo de exposição à lâmpada, levaram a considerar a utilização do tempo de exposição à lâmpada de 10 min.

Na Tabela 5.2 são apresentados os resultados da avaliação dos efeitos de cada uma das variáveis do planeamento nas variáveis da resposta pelos testes de significância HOIE e “Center”, da avaliação do modelo linear total e do modelo quadrático por ANOVA, bem de como os efeitos quadráticos podem ou não melhorar o modelo linear previamente avaliado. O modelo total quadrático, a importância dos efeitos quadráticos e a forma da superfície de resposta são avaliados por ANOVA através da razão F e pelo respectivo valor p para cada uma das variáveis da resposta. Além desta avaliação é também apresentado

para cada uma das variáveis da resposta o respectivo valor máximo, mínimo ou de inflexão previsto.

Tabela 5.2 – Resultados obtidos com o planeamento experimental de optimização de composto central, por análise dos a) efeitos principais e das b) superfícies de resposta, através da avaliação da resposta de um padrão de Nifedipina 10 ppm, em etanol, em meio de pH 2.5 e com um tempo de exposição à lâmpada de 5 min.*

a) Efeitos principais

Variáveis do planeamento	Variáveis de resposta								
	Intensidade de fluorescência			c.d.o. de emissão			c.d.o. de excitação		
	HOIE (p)	Center	Coef. b	HOIE (p)	Center	Coef. b	HOIE(p)	Center	Coef. b.
Cloreto de titânio (mL)	ns (0.710)	ns	+477	--- (0.000)	ns	+1.010	+++ (0.000)	ns	-2.595
OPA (mL)	ns (0.911)	ns	+141	ns (1.000)	ns	0.000	ns(1.000)	ns	0.000
Modelo total (ANOVA)									
Razão F (p)	0.123 (0.896)			np (0.000)			np (0.000)		
R _{múltipla}	0.445			1.000			1.000		

b) Superfícies de resposta

Superfícies de resposta			
Variáveis do planeamento	Intensidade de fluorescência	c.d.o. de emissão	c.d.o. de excitação
Ponto previsto	Máximo– 30340 impulsos	Inflexão – 510.797 nm	Inflexão – 383.831 nm
Cloreto de titânio (mL)	0.120	0.173	0.027
OPA (mL)	0.178	0.200	0.200
Avaliação do modelo			
Razão F (p)	2.750 (0.129)	7.671 (0.015)	3.075 (0.106)
R _{múltipla}	0.804	0.915	0.820
Efeitos quadráticos [razão F (p)]	2.173 (0.145)	2.276 (0.184)	0.912 (0.451)
Perda de ajuste [razão F (p)]	3.650 (0.226)	0.504 (0.748)	0.126 (0.960)

* Ver rodapé da Tabela 5.1.

Como se pode ver na Tabela 5.2, e como seria de esperar, atendendo à zona de avaliação das variáveis de resposta ser próximas do óptimo pretendido, para a intensidade de fluorescência o modelo de avaliação dos efeitos principais não é globalmente válido. Mesmo na avaliação do c.d.o. de excitação e de emissão não é possível a definição de um modelo. Verifica-se, no entanto, que as duas variáveis de resposta estudadas não afectam significativamente a intensidade de fluorescência. Relativamente ao anteriormente encontrado, o coeficiente b associado ao aumento do volume de OPA, é de valor bastante menor, e o associado ao aumento do volume de cloreto de titânio, é da mesma ordem de grandeza mas de sinal contrário.

Na avaliação das superfícies de resposta, e excepto para o c.d.o. de emissão, os modelos não são também globalmente válidos pelas mesmas razões já apontadas na análise dos

efeitos principais. Apesar dos efeitos quadráticos não afectarem significativamente os modelos, a avaliação da razão F e do respectivo valor p da perda de ajuste para as três variáveis de resposta, indica que o modelo descreve de maneira adequada a forma real das superfícies de resposta.

Assim, o resultado mais significativo é na avaliação da superfície de resposta da intensidade de fluorescência em que é detectado um máximo, e em que é possível definir claramente uma zona de resposta máxima. Os volumes de cloreto de titânio e de OPA que definem o ponto máximo previsto pelo modelo são próximos da média dos valores que definem a zona de resposta máxima. Atendendo a este ponto máximo, e à zona de resposta máxima, um volume de 0.125 mL de cloreto de titânio próximo do ponto máximo e um volume de OPA de 0.225 mL ligeiramente acima ao encontrado, mas dentro da zona de resposta máxima, são os volumes considerados para a quantificação da Nifedipina com esta reacção.

Avaliações posteriores nas condições entretanto avaliadas, com e sem adição de HCl 3 M, revelaram a obtenção de intensidades de fluorescência e de estabilidade do complexo próximas, confirmando assim a não necessidade da adição de HCl 3 M. Verificou-se ainda nestas condições a função linear e o limite de detecção obtidos. Assim as condições de reacção definidas para a quantificação foram:

- pH 2.5.
- Tempo de exposição à lâmpada de 10 min.
- Volume de cloreto de titânio (III) 10 % de 0.125 mL.
- Volume de OPA 1 % de 0.225 mL.

5.4. Quantificação

Na quantificação, o método de calibração de adição de padrão com a obtenção do derivado fluorescente foi efectuado em 4 frascos de amostra diferentes. O método de calibração de adição de padrão foi efectuado por adição de volumes diferentes ($\approx 15, 38$ e $75 \mu\text{L}$) da solução padrão de Nifedipina 200 ppm em etanol para um volume final de 3 mL em solução tampão de pH 2.5. A determinação de solução padrão e das soluções amostra, foi feita para uma concentração estimada de 2.5 ppm. A fortificação avaliada foi de 1 ppm. As soluções padrão preparadas encontravam-se numa gama de concentrações entre 1 ppm e 5 ppm.

A comparação das funções lineares, obtidas com a solução padrão e com as soluções amostra, foi efectuada na gama de 0.5 a 10 ppm.

Análise de registos

Da análise da matriz de fluorescência obtida, verificou-se que o produto fluorescente apresentava c.d.o. de excitação máximo a 385.39 nm e c.d.o. de emissão máximo a 509.51 nm, com dispersão de primeira ordem próxima a esta banda de fluorescência máxima mas com pouca interferência na banda de fluorescência do composto principal.

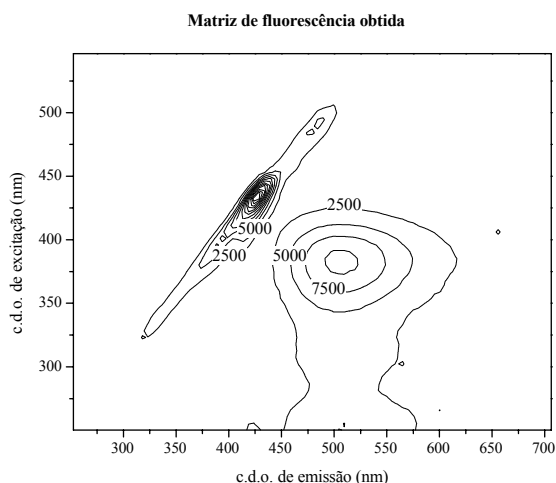


Fig. 5.3 – Matriz de fluorescência obtida do produto da reacção de um padrão de Nifedipina 2.508 ppm com o cloreto de titânio e OPA.

A escolha de intensidade de fluorescência máxima utilizada na determinação por análise directa foi feita para cada um dos registos obtidos tendo em atenção a intensidade máxima de fluorescência ao c.d.o. de excitação e emissão desse máximo de cada um dos registos.

Curvas de calibração padrão

Na Tabela 5.3 são apresentados os valores dos parâmetros de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados das curvas de calibração padrão obtidas com o padrão e com as diferentes amostras analisadas em dias diferentes. Para o padrão são apresentados os parâmetros de regressão linear obtidos com uma regressão linear.

Tabela 5.3 – Comparação da curva de calibração padrão de um padrão e das amostras farmacêuticas obtidas no máximo de intensidade de fluorescência.*

Parâmetros avaliados	Calibração ($y = bx + a$, $m = 5$ e Gama - 0.5 a 10 ppm)				
	Padrão	Ni10ra	Ze20sr	Nigt	Ni10ca
a	2110.326 (546.214)	1725.857 (474.482)	1945.210 (418.059)	2567.749 (1129.928)	2379.842 (790.602)
b	5179.724 (113.682)	2631.671 (92.101)	3378.056 (81.235)	4604.033 (219.329)	3932.314 (153.704)
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.478	0.813	0.559	1.107	0.908
$S_{y/x}$	825.849	713.384	629.093	1698.847	1189.696
R	0.9994	0.9982	0.9991	0.9966	0.9977

(continuação)

Parâmetros avaliados	Calibração ($y = bx + a$, $m = 5$ e Gama - 0.5 a 10 ppm)			
	Ni20ap	Ad10ca	Ad20ap	Ad30cr
a	3393.220 (1721.457)	1414.148 (166.229)	1084.014 (119.497)	1588.990 (489.410)
b	3254.528 (332.036)	2970.391 (32.267)	3800.249 (23.178)	3374.624 (94.850)
LD ($3S_{y/x}/b$)	2.386	0.252	0.142	0.656
$S_{y/x}$	2588.203	249.926	179.818	738.259
R	0.9847	0.9998	0.9999	0.9988

* Ver rodapé da Tabela 3.1.

Excepto para a amostra Ni20ap, são obtidos para as outras amostras ajustes lineares com coeficientes de correlação linear, de ordem de grandeza igual ou superior a 0.997, próxima a obtida com o padrão.

Associados a valores de ordenada na origem ligeiramente acima de zero são encontrados em todas as funções lineares desvios padrão relativamente altos. Para a maioria das amostras são encontrados valores de ordenada na origem da ordem dos 2000 impulsos, próximos aos obtidos com o padrão. As excepções com valores inferiores, são as amostras Ad10ca e Ad20ap, e com valores superiores as amostras Nigt e Ni20ap.

Atendendo aos valores de ordenada na origem ligeiramente acima de zero encontrados para todas as funções lineares é possível que um desvio sistemático positivo inerente à determinação possa estar presente. Da comparação dos valores de ordenada na origem obtidos para as amostras com o padrão, um possível desvio sistemático positivo pode estar presente nas amostras Ad10ca e Ad20ap e um possível desvio sistemático negativo pode estar presente nas amostras Nigt e Ni20ap.

Da comparação do valor do declive obtido com padrão e o declive obtido com as amostras, verifica-se que valores de declive inferiores ao valor obtido com o padrão são encontrados para todas as amostras. São encontradas diferenças no valor do declive, de 1000 impulsos para as amostras Ni10ca e Ad20ap e de 2000 impulsos para o resto das amostras. Atendendo à comparação dos valores de declive para todas as amostras é possível considerar a existência de uma possível interferência negativa.

5.4.1. Análise directa

Da avaliação de todas as adições de padrão efectuadas verificou-se de uma forma geral pouca variabilidade, dentro da resolução da determinação de 5 nm, tanto no c.d.o. de excitação (380 a 385 nm) como no c.d.o. de emissão (505 a 510 nm) encontrados ao máximo de intensidade de fluorescência.

As estimativas de concentração do solvente, padrão, amostras não fortificadas e amostras fortificadas obtidas por análise directa ao máximo de intensidade de fluorescência são apresentadas na Tabela 5.4 a) e b). Excepto para a amostra fortificada NigtFo, são encontrados para todas as amostras ajustes com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.997. Salvo algumas excepções, são encontrados para a maioria das amostras desvios padrão associados às estimativas de concentração da mesma ordem de grandeza. Para a maioria das amostras os desvios padrão relativos são inferiores a 10 %. Desvios padrão ligeiramente superiores a 10 % são encontrados para a amostra Ni10ca e para a amostra fortificada NigtFo.

Na Tabela 5.4 a) pode verificar-se que para o solvente foi obtida uma estimativa próxima de zero e que para o padrão foi obtida uma estimativa ligeiramente acima da concentração esperada.

De uma forma geral, com as amostras não fortificadas e fortificadas, são obtidas recuperações próximas de 100 %. As exceções, com uma recuperação superior a 110 %, verificam-se para as amostras não fortificadas Nigt e Ni20ap e fortificadas NigtFo, Ni10caFo, Ni20apFo e Ad20apFo e, com um recuperação inferior a 90 %, verificam-se para as amostras não fortificadas Ni10ra e Ad10ca. São encontradas recuperações de fortificação superiores ao esperado para a maioria das formulações farmacêuticas. Com as formulações Nigt, Ni10ca, Ni20ap e Ad20ap são encontradas recuperações de fortificação superiores a 130 % e com as formulações Ni10ra e Ad10ca ligeiramente superiores a 110%.

Para a maioria das amostras não fortificadas são encontrados erros de previsão inferiores ou iguais a 10 %. As exceções são as amostras não fortificadas Nigt e Ad30Cr com erros de previsão respectivamente de 29 % e 15 %. Os erros de previsão encontrados variam entre 5 e 29 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Ad20ap e o mais alto para a amostra Nigt. Ao considerar-se todas as amostras, é obtido um valor de EPM de 12.563 %, de EPT de 16.464 % e de RMSEP de 3.393. Ao não ser considerada a amostra Ad30cr é obtido um valor de EPM de 12.090 %, de EPT de 17.351 % e de RMSEP de 7.661. Sem a inclusão da amostra Ad30cr, e pela avaliação destes parâmetros, não se verifica uma melhoria na quantificação.

De uma forma geral são encontradas estimativas dentro do esperado por análise directa. Tendo em atenção a comparação das funções lineares previamente efectuadas só seria possível confirmar interferências negativas para as amostras com concentração estimada inferior ao esperado. A estimativa de concentração superior obtida com a amostra não fortificada Nigt, poderia ser explicada por um possível desvio sistemático positivo inerente ao método analítico. No entanto, esse desvio sistemático possível não é confirmado pela avaliação das estimativas de concentração obtidas com as outras amostras. Também a avaliação da concentração total e da fortificação estimadas com as amostras fortificadas não permite a confirmação de qualquer tipo de interferência ou desvio sistemático.

Tabela 5.4 – Estimativas de concentração do a) solvente, padrão, amostras não fortificadas e b) amostras fortificadas obtidas por análise directa ao c.d.o. de excitação e emissão de intensidade de fluorescência máxima.*

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Solvente	Padrão	Ni10ra	Ze20sr	Nigt
C_{estimada} (ppm)	0.217 (0.069)	2.794 (0.045)	2.056 (0.021)	2.672 (0.201)	3.636 (0.085)
C_{esperada} (ppm)	0.000	2.508	2.533	2.480	2.533
Recuperação (%)	----	111.418	81.163	107.758	143.528
LD (3S_{y/x}/b)	0.261	0.097	0.051	0.442	0.159
DOS_{estimada} (mg)	----	----	8.116	21.760	28.705
DOS_{estimada} HPLC (mg)	----	----	8.626	18.647	22.225
EP (%)	----	11.404	5.912	16.694	29.156
c.d.o. excitação (nm)	385 (4)	380 e 385 (3)	380 (3) e 385	380 (2) e 385(2)	380, 385 (2) e 391
c.d.o. emissão (nm)	505 e 510 (3)	499, 505 (2) e 510	505 (4)	510 (3) e 514	505 (4)
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	1249.792 (376.055)	10607.714 (91.874)	12518.387 (78.064)	13222.896 (548.072)	18280.769 (200.338)
b	5753.920 (132.130)	3796.111 (32.281)	6088.299 (27.429)	4948.631 (192.570)	5027.641 (70.390)
S_{y/x}	500.400	122.253	103.877	729.297	266.581
R	0.9995	0.9999	1.0000	0.9985	0.9998

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Ni10ca	Ni20ap	Ad10ca	Ad20ap	Ad30cr
C_{estimada} (ppm)	2.286 (0.261)	2.817 (0.028)	2.142 (0.194)	2.727 (0.122)	2.696 (0.193)
C_{esperada} (ppm)	2.478	2.550	2.533	2.484	2.506
Recuperação (%)	92.225	110.507	84.557	109.791	107.588
LD (3S_{y/x}/b)	0.618	0.059	0.472	0.266	0.423
DOS_{estimada} (mg)	9.224	22.099	8.455	21.956	32.277
DOS_{estimada} HPLC (mg)	10.044	20.070	9.461	20.981	38.057
EP (%)	8.164	10.110	10.633	4.647	15.188
c.d.o. excitação (nm)	380 e 385 (3)	380 (3) e 385	380 (3) e 385	380 (2)e 385 (2)	380(3) e 385
c.d.o. emissão (nm)	505 (2) e 510 (2)	505 (3) 510	505 (2) e 510 (2)	505 (2) e 510 (2)	505 e 510(3)
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	11571.992 (783.463)	14626.998 (76.827)	11088.434 (611.935)	11434.628 (278.889)	15076.166 (592.014)
b	5062.835 (275.277)	5191.788 (26.994)	5176,405 (215.009)	4192.550 (97.990)	5592.109 (208.009)
S_{y/x}	1042.521	102.231	814.277	371.106	787.768
R	0.9971	1.0000	0.9983	0.9995	0.9986

(Continua)

Tabela 5.4 (Continuação)

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Ni10raFo	Ze20srFo	NigtFo	Ni10caFo
$C_{estimada}$ (ppm)	3.149 (0.078)	3.609 (0.143)	5.404 (0.701)	4.135 (0.184)
$C_{esperada}$ (ppm)	3.509	3.455	3.509	3.454
Recuperação (%)	89.755	104.453	154.007	119.731
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.157	0.268	1.026	0.319
c.d.o. excitação (nm)	380 (2) e 385 (2)	380 (3) e 385	385 (4)	380 (3) e 385
c.d.o. emissão (nm)	505 (2) e 510 (2)	505 (3) e 510	505 (2) e 510 (2)	505 (2) e 510 (2)
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)				
$C_{estimada}$ (ppm)	1.093	0.937	1.768	1.849
$C_{esperada}$ (ppm)	0.975	0.975	0.975	0.975
Recuperação (%)	112.103	96.103	181.271	189.641
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	+0.118	-0.038	+0.793	+0.874
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	17982.378 (224.931)	15704.325 (292.297)	25993.563 (1236.022)	16536.398 (320.007)
b	5710.141 (79.032)	4351.653 (102.701)	4810.419 (434.287)	3998.989 (112.437)
$S_{y/x}$	299.307	388.948	1644.722	425.820
R	0.9998	0.9994	0.9919	0.9992

b) amostras fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Ni20apFo	Ad10caFo	Ad20apFo	Ad30crFo
$C_{estimada}$ (ppm)	4.168 (0.106)	3.240 (0.237)	4.232 (0.255)	3.755 (0.166)
$C_{esperada}$ (ppm)	3.525	3.509	3.460	3.481
Recuperação (%)	118.250	92.335	122.339	107.866
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.184	0.472	0.437	0.305
c.d.o. excitação (nm)	380 (3) e 385	380 (4)	380 e 385 (3)	380 (4)
c.d.o. emissão (nm)	505 (4)	505 (3) e 510	505 (2) e 510 (2)	505 (2) e 510 (2)
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)				
$C_{estimada}$ (ppm)	1.351	1.098	1.505	1.059
$C_{esperada}$ (ppm)	0.975	0.975	0.975	0.975
Recuperação (%)	138.517	112.615	154.359	108.615
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	+0.376	+0.123	+0.530	+0.084
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	14940.368 (164.942)	15958.037 (582.856)	15066.746 (389.600)	18395.175 (374.435)
b	3584.484 (57.954)	4925.738 (204.792)	3559.950 (136.890)	4898.847 (131.561)
$S_{y/x}$	219.482	775.582	518.425	498.245
R	0.9997	0.9983	0.9985	0.9993

* A dosagem é dada em massa de composto por comprimido excepto para Nigt em que a dosagem vem em massa de composto por mL; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados, excepto na avaliação do c.d.o. de excitação e de emissão em que o valor entre parêntesis corresponde ao número de vezes que é encontrado um determinado c.d.o. de excitação e de emissão de fluorescência máxima. Os c.d.o. de excitação e de emissão apresentados correspondem aos obtidos nas quatro determinações de cada uma das adições de padrão.

5.4.2. Análise multivariada

Para a análise multivariada todas as matrizes de dados obtidas foram previamente reduzidas à banda de fluorescência máxima e atendendo a zonas do espectro que possam não ser consideradas relevantes para esta análise.

As matrizes, com uma gama de c.d.o. de excitação de 250.24 a 546.51 nm (58 c.d.o.) e de c.d.o. de emissão de 252.36 a 706.14 nm (91 c.d.o.), foram reduzidas para matrizes analisadas numa gama de c.d.o. de excitação de 250.24 a 447.75 nm (39 c.d.o.) e de c.d.o. de emissão de 449.00 a 701.10 nm (51 c.d.o.). Um total de 1989 pontos espectrais foi analisado.

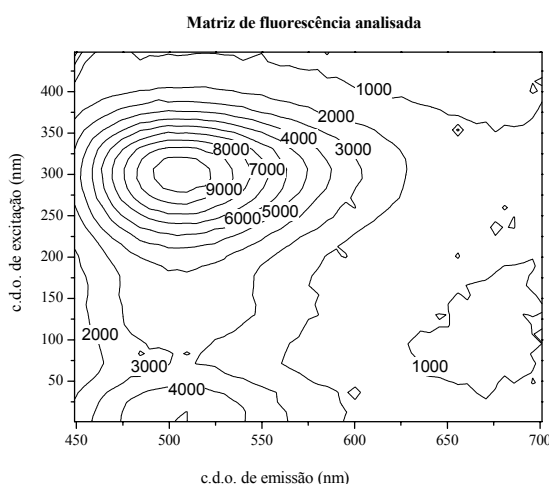


Fig. 5.4 – Matriz de fluorescência analisada do produto da reação de um padrão de Nifedipina 2.508 ppm com o cloreto de titânio e OPA.

Na Fig. 5.5 são apresentados os espectros de excitação e emissão experimentais obtidos a intensidade de fluorescência máxima.

Uma menor variação está presente nos espectros de excitação e emissão experimentais obtidos. Assim, o critério de avaliação na comparação das diferentes estimativas obtidas pelos diferentes métodos de decomposição tridimensional é um critério de maior semelhança possível ou seja um coeficiente correlação linear positivo alto.

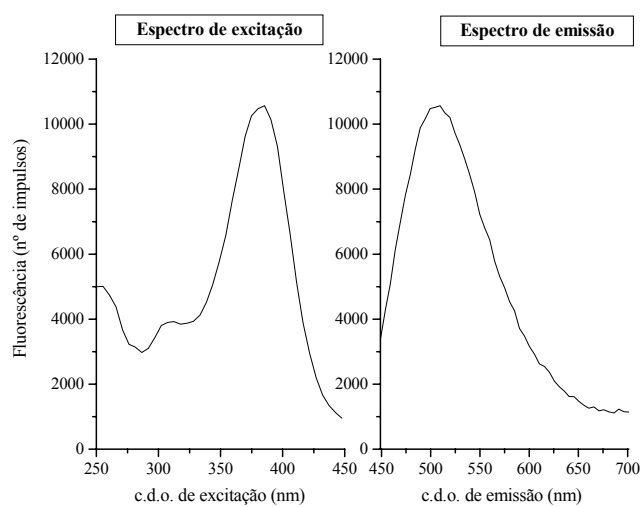


Fig. 5.5 – Espectros de excitação e emissão experimentais reduzidos do padrão de Nifedipina 2.508 ppm ao máximo de intensidade de fluorescência (c.d.o. de excitação de 385.37 nm e c.d.o. de emissão de 509.50 nm).

Análise inicial

A representação gráfica (Fig. 5.6) dos valores singulares normalizados, obtidos por decomposição de valor singular, para os três tipos de amostras estudadas mostra que no mínimo dois e no máximo cinco componentes são necessários para a análise do tipo de matrizes avaliadas. Para as matrizes de etanol, padrão e amostra Nigt um número mínimo de quatro componentes parece ser o mais adequado. Para o etanol, com a matriz de linha aumentada na dimensão dos espectros de emissão, para o padrão, com a matriz singular sem adição de padrão e a de linha aumentada na dimensão dos espectros de excitação e, para a amostra Nigt, com a matriz de linha aumentada na dimensão dos espectros de excitação, é mais notório que possa ser um número de no mínimo cinco ou mesmo seis componentes o número de componentes mais adequado.

Quer para as matrizes singulares, quer para as matrizes de linha aumentada em cada uma das dimensões o mesmo número de componentes parecem ser necessários para a análise destas matrizes. Desta avaliação não é notório, por diferença de ordem das matrizes, desvios a trilinearidade. Mesmo para a matriz de etanol tal não é evidente.

Tabela 5.5 – Variância explicada pelos primeiros seis componentes obtidos por análise de componentes principais*

Variância explicada por PCA (%)						
Componente principal	Etanol	Etanol [exc.×(conc.×emi.)]	Padrão	Padrão [exc.×(conc.×emi.)]	Nigt	Nigt [exc.×(conc.×emi.)]
1	97.63	98.67	99.34	99.05	99.66	99.36
2	1.70	0.97	0.53	0.77	0.27	0.50
3	0.19	0.28	0.08	0.12	0.04	0.10
4	0.11	0.04	0.02	0.02	0.01	0.02
5	0.08	0.02	0.01	0.01	0.00	0.01
6	0.06	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00

* [exc.×(conc.×emi.)] – Matriz linha aumentada em que as linhas são o número de tempos de reacção e as colunas os espectros obtidos nas quatro matrizes.

Também, na Tabela 5.5 é possível verificar que, na avaliação das matrizes singulares e de linha aumentada na dimensão do tempo de reacção, dois componentes parecem ser os necessários para explicar quase 100 % de variância. Só para a matriz singular de etanol, são necessários três componentes para explicar 100 % de variância. Por esta análise, um número de três componentes no máximo parecem ser os necessários para a análise destas matrizes. Tal como por avaliação dos gráficos da Fig. 5.6 também não é notório um aumento da ordem das matrizes singulares e de linha aumentada.

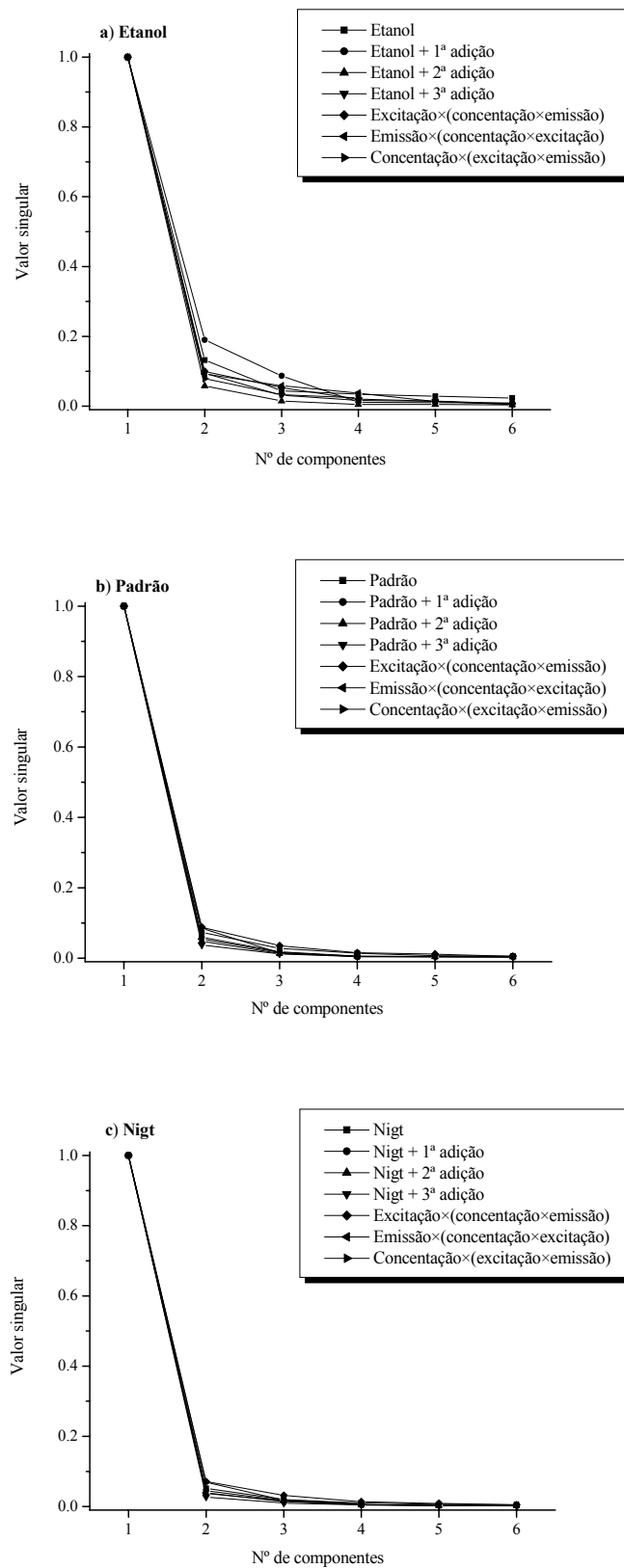


Fig. 5.6 – Gráficos de valor singular de cada uma das matrizes singulares e das respectivas matrizes aumentadas de a) etanol, b) padrão de Nifedipina e c) amostra Nigt.

5.4.2.1 - PARAFAC

No ajuste pelo modelo PARAFAC foi de uma forma geral utilizada a matriz tridimensional [excitação × emissão × concentração] ($39 \times 51 \times 4$). As condições geralmente utilizadas para o ajuste foram a aplicação de restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições.

Solvente

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 5.6 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC, de um a seis componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por TLD na análise da matriz tridimensional do solvente etanol.

Como se pode verificar na Tabela 5.6, por validação cruzada, foram encontradas pequenas diferenças de valores de ajuste para os modelos de dois a quatro componentes. Também, para os modelos de um a quatro componentes, foram encontrados um número de iterações baixo e valores do teste de consistência do núcleo válidos. Atendendo, a uma menor diferença de valores de ajuste, um número de iterações baixo e um teste de consistência mais alto o modelo de três componentes parece ser o mais adequado. No entanto, atendendo aos testes de consistência válidos, bem como para o modelo de quatro componentes, um número de iterações baixo, é possível que um modelo de quatro ou mesmo de cinco componentes possam ser os mais adequados.

Tabela 5.6 – Validação cruzada do modelo PARAFAC, de 1 a 6 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por TLD na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] do solvente etanol. São apresentados a diferença dos ajustes obtidos por validação cruzada entre os modelos na análise da matriz segmentada e total, o número de iterações e o valor do teste de consistência do núcleo (corcondia).

	Número de componentes					
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis
Número de Iterações	3	2	26	26	148	1728
Corcondia	100	100	99.052	98.314	99.054	91.108
$\Delta_{AjMS-AjMT}$	-0.003	-0.129	-0.134	-0.305	-1.538	-2.670

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 5.7 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC na análise da matriz tridimensional do solvente etanol. Na Tabela 5.7 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a seis componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições. Na Tabela 5.7 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como se pode ver na Tabela 5.7 b), as estimativas de concentração do solvente mais adequadas, são obtidas com os modelos de quatro e cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e a matriz centrada na segunda dimensão, respectivamente com estimativas de 0.071 e 0.061 ppm. É de referir no entanto que, são encontradas com estas condições de ajuste percentagens de ajuste do modelo e testes de consistência do núcleo de valor baixo. A estimativa de concentração mais próxima de zero, com uma percentagem de ajuste mais alta, e um teste de consistência do núcleo válido, é obtida para o modelo de quatro componentes, não negatividade nas três dimensões e unimodalidade na segunda dimensão com uma estimativa de 0.089 ppm. Também são obtidos para este modelo, com o componente principal, coeficientes de correlação linear dos espectros de excitação e de emissão dentro do esperado e um coeficiente de correlação do ajuste linear alto.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de PARAFAC de quatro componentes, não negatividade nas três dimensões, unimodalidade na segunda dimensão e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC de quatro componentes sem restrições na análise da matriz [excitação × emissão × concentração].

Tabela 5.7 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] de etanol com a) restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) não negatividade nas três dimensões

	Número de componentes				
	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis
C_{estimada} (ppm)	0.172 (0.076)	0.126 (0.060)	0.097 (0.067)	0.098 (0.065)	0.097 (0.065)
Recuperação (%)	---	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.289	0.233	0.259	0.255	0.253
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	91.814	95.198	97.304	97.841	98.311
ssq_{resíduos}	1.324×10 ⁹	4.557×10 ⁸	1.437×10 ⁸	9.209×10 ⁷	5.640×10 ⁷
Iterações	20	16	20	32	34
Corcondia (%)	96.430	97.912	90.106	67.894	3.873
R_{Excitação}	+0.682	+0.684	+0.684	+0.682	+0.682
R_{Emissão}	+0.283	+0.274	+0.278	+0.278	+0.278
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.029 (0.012)	0.021 (0.010)	0.017 (0.011)	0.017 (0.011)	0.017 (0.011)
b	0.168 (0.004)	0.170 (0.003)	0.171 (0.004)	0.171 (0.004)	0.171 (0.011)
S_{y/x}	0.016	0.013	0.015	0.015	0.014
R	0.9994	0.9996	0.9995	0.9995	0.9995

b) não negatividade nas três dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	4 componentes (unimodilidade na segunda dimensão)	5 componentes (unimodilidade na segunda dimensão)	4 componentes (matriz centrada na segunda dimensão)	5 componentes (matriz centrada na segunda dimensão)
C_{estimada} (ppm)	0.089 (0.066)	0.092 (0.065)	0.071 (0.059)	0.062 (0.061)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.258	0.255	0.232	0.239
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	97.227	97.811	62.528	62.801
ssq_{resíduos}	1.520×10 ⁸	9.470×10 ⁷	45.142×10 ¹⁰	2.735×10 ¹⁰
Iterações	16	42	8	10
Corcondia (%)	90.039	79.825	45.142	28.498
R_{Excitação}	+0.684	+0.682	+0.680	+0.680
R_{Emissão}	+0.283	+0.279	+0.318	+0.268
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.015 (0.011)	0.016 (0.011)	0.012 (0.010)	0.011 (0.010)
b	0.172 (0.004)	0.171 (0.004)	0.172 (0.004)	0.173 (0.004)
S_{y/x}	0.015	0.015	0.013	0.014
R	0.9995	0.9995	0.9996	0.9996

* Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de etanol pelo modelo de PARAFAC de quatro componentes, o primeiro componente é o composto principal, o segundo componente é a linha de base, o terceiro componente é a linha de base com pico de dispersão e o quarto componente é a linha de base com fluorescência de início elevada.

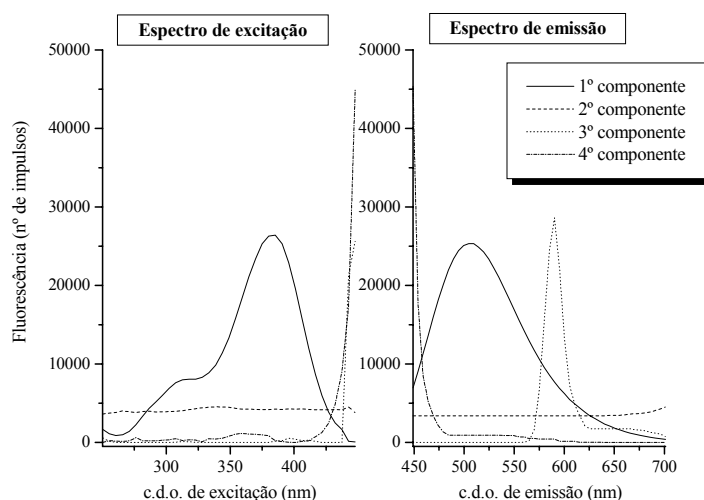


Fig. 5.7 – Espectro de excitação e de emissão estimados pelo modelo PARAFAC de 4 componentes, não negatividade nas três dimensões, unimodalidade na primeira dimensão e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC de 4 componentes sem restrições na análise da matriz excitação \times emissão \times concentração do solvente etanol.

Padrão

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 5.8 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC, de um a seis componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por TLD na análise da matriz do padrão de Nifedipina 2.508 ppm.

Como se pode ver na Tabela 5.8, foram encontradas, por validação cruzada, pequenas diferenças nos valores de ajuste para os números de componentes avaliados. Foi encontrado um número menor de iterações com os modelos de um a três componentes. São obtidos, testes de consistência válidos para os modelos de um, dois, cinco e seis componentes. Considerando o número baixo de iterações e o teste de consistência válido, o modelo com dois componentes parece ser o mais adequado. No entanto, apesar da maior dificuldade do ajuste, o modelo de cinco componentes poderá também ser considerado.

Tabela 5.8 – Validação cruzada do modelo PARAFAC, de 1 a 6 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por TLD na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] do padrão de Nifedipina 2.508 ppm. São apresentados a diferença dos ajustes obtidos por validação cruzada entre os modelos na análise da matriz segmentada e total, o número de iterações e o valor do teste de consistência do núcleo (corcondia).

	Número de componentes					
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis
Número de Iterações	3	2	58	600	836	992
Corcondia	100	100	-9.287	-0.024	85.019	86.600
$\Delta_{A_{IMS}-A_{MT}}$	-0.002	-0.003	-0.003	-0.003	-0.002	-0.003

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 5.9 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC na análise da matriz tridimensional do padrão de Nifedipina 2.508 ppm. Na Tabela 5.9 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a seis componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições. Na Tabela 5.9 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Excepto para o modelo de dois componentes, não negatividade nas três dimensões e matriz centrada na segunda dimensão, com uma concentração de 2.501 ppm, o resto dos modelos avaliados apresentam baixas recuperações. São obtidas, com os modelos avaliados na Tabela 5.9 a) recuperações abaixo de 80 % e com os modelos avaliados na Tabela 5.9 b) recuperações próximas de 90 %. É encontrado, com o modelo de dois componentes, não negatividade nas três dimensões e matriz centrada na segunda dimensão o valor mais baixo de percentagem de ajuste do modelo, um baixo número de iterações, um teste de consistência válido, um valor inferior de coeficiente de correlação linear de emissão, valor superior de coeficiente de correlação linear de excitação e um valor próximo de coeficiente de correlação de ajuste linear. Assim, considerando a estimativa de concentração obtida, e apesar do baixo valor de percentagem do ajuste do modelo e pior estimativa do espectro de emissão, este modelo é considerado o mais adequado.

Assim, atendendo aos critérios considerados o modelo mais adequado é o modelo de PARAFAC de dois componentes, não negatividade nas três dimensões, matriz centrada na segunda dimensão e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC dois componentes sem restrições na análise da matriz [excitação × emissão × concentração].

Tabela 5.9 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] de padrão de Nifedipina 2.508 ppm com a) restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) Não negatividade nas três dimensões

	Número de componentes				
	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis
C_{estimada} (ppm)	1.932 (0.064)	1.471 (0.083)	-0.203 (0.172)	1.538 (0.098)	1.617 (0.196)
Recuperação (%)	77.045	58.658	-8.075	61.311	64.483
LD (3S_{y/x}/b)	0.163	0.233	0.726	0.270	0.532
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	95.689	97.608	98.143	98.645	98.743
ssq_{resíduos}	5.062×10 ⁸	1.559×10 ⁸	9.390×10 ⁷	5.003×10 ⁷	4.305×10 ⁷
Iterações	36	348	284	644	612
Corcondia (%)	91.185	8.337	0.135	73.015	26.516
R_{Excitação}	+0.917	+0.919	+0.926	+0.919	+0.937
R_{Emissão}	+1.000	+1.000	+1.000	+1.000	+0.998
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.216 (0.005)	0.181 (0.007)	-0.037 (0.034)	0.186 (0.008)	0.193 (0.016)
b	0.112 (0.002)	0.123 (0.003)	0.185 (0.012)	0.121 (0.003)	0.119 (0.006)
S_{y/x}	0.006	0.010	0.045	0.011	0.021
R	1.0000	0.9998	0.9996	0.9994	0.9978

b) não negatividade nas três dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	2 componentes (unimodalidade na primeira dimensão)	2 componentes (unimodalidade na primeira e segunda dimensões)	2 componentes (ortogonalidade na primeira dimensão)	2 componentes (matriz centrada na segunda dimensão)
C_{estimada} (ppm)	2.231 (0.054)	2.231 (0.054)	2.164 (0.063)	2.501 (0.023)
Recuperação (%)	88.968	88.968	86.273	99.735
LD (3S_{y/x}/b)	0.130	0.130	0.153	0.052
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	95.492	95.486	95.199	62.803
ssq_{resíduos}	5.535×10 ⁸	5.551×10 ⁸	6.279×10 ⁸	3.769×10 ¹⁰
Iterações	24	24	5	8
Corcondia (%)	89.571	89.580	24.542	90.347
R_{Excitação}	+0.914	+0.914	+0.737	+0.937
R_{Emissão}	+1.000	+1.000	+1.000	+0.934
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
A	0.235 (0.003)	0.235 (0.003)	0.231 (0.004)	0.250 (0.001)
b	0.105 (0.001)	0.105 (0.001)	0.107 (0.001)	0.100 (4.543×10 ⁻⁴)
S_{y/x}	0.005	0.005	0.005	0.002
R	0.9999	0.9999	0.9998	1.0000

* Ver rodapé da Tabela 5.7.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz do padrão pelo modelo PARAFAC de dois componentes, o primeiro componente corresponde ao composto principal e o segundo componente corresponde a linha de base com pico de fluorescência inicial considerado como composto secundário.

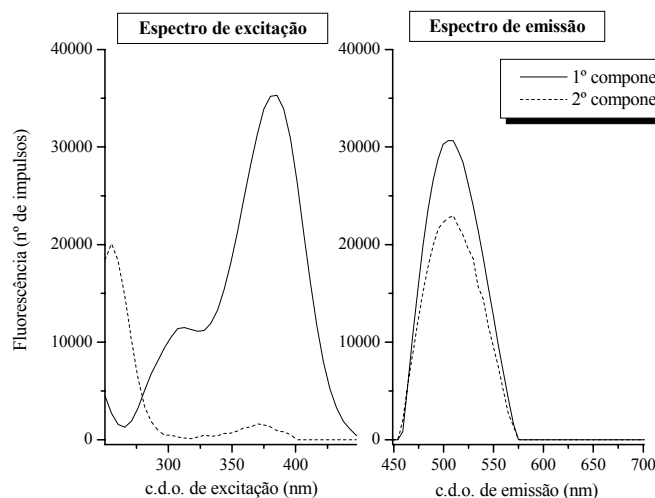


Fig. 5.8 – Espectro de excitação e de emissão estimados pelo modelo PARAFAC de 2 componentes, não negatividade nas três dimensões e matriz centrada na segunda dimensão na análise da matriz [excitação \times emissão \times concentração] do padrão de Nifedipina 2.508 ppm.

Formulações Farmacêuticas

Para todas as formulações farmacêuticas foram analisadas matrizes [excitação \times emissão \times concentração] pelo modelo PARAFAC de dois componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC de dois componentes sem restrições. Análises com outras condições de ajuste do modelo se consideradas mais adequadas foram efectuadas.

Na Tabela 5.10 são apresentadas as condições de ajuste do modelo PARAFAC consideradas mais adequadas na análise das matrizes obtidas com cada amostra analisada.

Como é possível verificar pela Tabela 5.10, para algumas das amostras, as estimativas mais adequadas são encontradas com condições de ajuste diferentes das inicialmente consideradas. Para a maioria das formulações farmacêuticas, as estimativas mais

adequadas são encontradas com condições de ajuste do modelo idênticas na análise das amostras não fortificadas e fortificadas.

Na análise das formulações farmacêuticas Ni10ca, Ni20ap e Ad20ap, as estimativas de concentração mais adequadas são obtidas com um número maior de componentes. É com estas formulações, que são encontradas condições de ajuste diferentes na análise das amostras não fortificadas e fortificadas. Na análise dos dois tipos de amostra das formulações Ni10ca e Ni20ap, é utilizado um mesmo número de componentes com aplicação de restrições diferentes. Além da restrição de não negatividade nas três dimensões, na análise da amostra não fortificada é aplicada na segunda dimensão com a formulação Ni10ca a restrição de ortogonalidade e com a formulação Ni20ap a restrição de unimodilidade. Com a formulação Ad20ap, um número menor de componentes é utilizado na análise da amostra fortificada.

Tabela 5.10 – Condições de ajuste do modelo PARAFAC utilizadas na análise das matrizes obtidas com as amostras não fortificadas e fortificadas.

Matriz analisada	Condições de ajuste			Amostras analisadas	
	Número de componentes	Restrições	Estimativas iniciais		
Excitação × emissão × concentração	Dois	Não negatividade nas três dimensões	PARAFAC sem restrições	Nigt e NigtFo	
	Cinco			Ni10caFo e Ni20apFo	
	Cinco	Não negatividade nas três dimensões e unimodilidade na primeira dimensão		Ad20ap	
	Seis			Ad20apFo	
	Cinco	Não negatividade nas três dimensões e unimodilidade na segunda dimensão		Ni20ap	
	Cinco	Não negatividade nas três dimensões e ortogonalidade na segunda dimensão		Ni10ca	
	Matriz centrada na segunda dimensão				
	Dois	Não negatividade nas três dimensões		PARAFAC sem restrições	Ni10ra, Ni10raFo
Três	Ze20sr, Ze20srFo, Ad10ca e Ad10caFo				
			Ad30cr e Ad30crFo		

Na Tabela 5.11 são apresentados os resultados da análise pelo modelo PARAFAC das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas.

Para a maioria das amostras são encontrados ajustes lineares com coeficientes de correlação linear do ajuste de ordem de grandeza igual ou superior a 0.999. As exceções, com um coeficiente de correlação linear do ajuste linear ligeiramente inferior a 0.999,

encontram-se para as amostras não fortificadas Ze20sr, Ad10ca e Ni10ca e as fortificadas Ni10caFo e Ad20apFo e, com um coeficiente de correlação do ajuste linear próximo de 0.990, para os dois tipos de amostras da formulação farmacêutica Nigt. Para a maioria das amostras, são obtidos desvios padrão relativos inferiores a 10 %. As exceções são encontradas para as amostras não fortificadas Ze20sr, Nigt, Ni10ca e Ad10ca e para as amostras fortificadas NigtFo e Ni10caFo.

É possível verificar pelas Tabelas 5.11 a) e b) que, para a maioria das amostras não fortificadas e fortificadas, são encontradas recuperações próximas de 100 %. As exceções verificam-se para as amostras não fortificadas e fortificadas das formulações farmacêuticas Ni10ra, Nigt e Ad10ca. São encontradas, para os dois tipos de amostra, da formulação farmacêutica Nigt, recuperações acima de 110 % e, das formulações farmacêuticas Ni10ra e Ni10ca, recuperações inferiores a 90 %. Para a maioria das formulações são também encontradas recuperações de fortificação próximas de 100 %. As únicas exceções verificam-se para a formulação Nigt com uma recuperação de fortificação inferior a 90 % e para a formulação Ad10ca com uma recuperação de fortificação superior a 110 %.

Para todas as análises efectuadas são obtidos testes de consistência do núcleo válidos. Os valores de testes de consistência do núcleo mais baixos são obtidos para as amostras não fortificadas e fortificadas das formulações farmacêuticas Ad30cr e Ad20ap. Para a primeira amostra, o ajuste do modelo com pré processamento da matriz e, para a segunda amostra, o ajuste do modelo com cinco componentes indicam alguma dificuldade no ajuste.

Para a maioria das amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas das dosagens estimadas por HPLC-UV. Para a maioria das amostras são encontrados erros de previsão inferiores a 10 %. Erros de previsão superiores a 10 %, são no entanto encontrados com as amostras Nigt, Ad10ca e Ad30cr. Os erros de previsão encontrados variam desde 0.5 a 21 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Ni20ap e o mais alto para a amostra Ad30cr.

Na avaliação da quantificação por este modelo, com todas as amostras não fortificadas, é obtida um valor de EPM de 8.728 %, de EPT de 15.102 % e de RMSEP de 3.112. Ao não ser considerada a amostra Ad30cr é obtido um valor de EPM de 7.032 %, de EPT de 9.072 % e de RMSEP de 1.514. Ao não ser considerada a amostra Ad30cr, ao contrário do que

acontece por análise directa, é encontrado um valor de EPM ligeiramente menor e valores de EPT e de RMSEP cerca de duas vezes menores.

É de referir que, para os dois tipos de amostras, das formulação farmacêuticas Ni10ra, Ze20sr, Ad10ca e Ad30cr, analisadas com pré processamento da matriz, são obtidas as mais baixas percentagens de ajuste do modelo com percentagens de ajuste da ordem dos 60%. Também, associados às percentagens de ajuste do modelo baixas, são encontrados os mais baixos coeficientes de correlação linear da estimativa de emissão do componente principal. Assim mesmo, foram encontradas para estas amostras estimativas de concentração e recuperações de fortificação mais adequadas.

Como seria de esperar, atendendo ao já avaliado por análise preliminar, são encontradas estimativas de concentração adequadas. Relativamente as estimativas obtidas por análise directa, são também encontradas com a maioria das amostras melhores estimativas de concentração.

Tabela 5.11 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas obtidas pelo modelo PARAFAC.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Ni10ra	Ze20sr	Nigt	Ni10ca
C_{estimada} (ppm)	2.008 (0.083)	2.266 (0.273)	3.239 (0.607)	2.478 (0.261)
C_{esperada} (ppm)	2.533	2.480	2.533	2.478
Recuperação (%)	79.255	91.383	127.843	99.984
LD (3S_{y/x}/b)	0.207	0.649	1.213	0.597
DOS_{estimada} (mg)	7.926	18.454	25.571	9.999
DOS_{estimada} HPLC(mg)	8.626	18.647	22.225	10.044
EP (%)	8.115	1.035	15.055	0.448
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	61.598	61.901	97.978	97.598
ssq_{resíduos}	7.283×10 ¹⁰	6.880×10 ¹⁰	9.726×10 ⁸	2.196×10 ⁸
Iterações	4	4	66	116
Corcondia (%)	96.314	96.344	66.812	91.222
R_{Excitação}	+0.970	+0.908	+0.956	+0.998
R_{Emissão}	+0.932	+0.933	+1.000	+0.965
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.221 (0.006)	0.237 (0.017)	0.284 (0.027)	0.248 (0.015)
b	0.110 (0.002)	0.105 (0.006)	0.088 (0.009)	0.101 (0.005)
S_{y/x}	0.008	0.023	0.035	0.020
R	0.9997	0.9967	0.9888	0.9973

a) amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Ni20ap	Ad10ca	Ad20ap	Ad30cr
C_{estimada} (ppm)	2.572 (0.140)	1.928 (0.221)	2.489 (0.100)	2.524 (0.198)
C_{esperada} (ppm)	2.550	2.533	2.484	2.506
Recuperação (%)	100.872	76.104	100.190	100.713
LD (3S_{y/x}/b)	0.314	0.560	0.229	0.447
DOS_{estimada} (mg)	20.177	7.611	20.040	30.218
DOS_{estimada} HPLC(mg)	20.070	9.461	20.981	38.057
EP (%)	0.533	19.554	4.485	20.598
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	99.019	62.154	98.466	61.502
ssq_{resíduos}	4.649×10 ⁷	5.721×10 ¹⁰	7.655×10 ⁷	7.925×10 ¹⁰
Iterações	464	8	298	5
Corcondia (%)	89.494	99.251	39.777	33.332
R_{Excitação}	+0.995	+0.903	+0.934	+0.987
R_{Emissão}	+1.000	+0.932	+0.999	+0.935
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.254 (0.008)	0.215 (0.016)	0.250 (0.006)	0.251 (0.011)
b	0.099 (0.003)	0.112 (0.006)	0.100 (0.002)	0.100 (0.004)
S_{y/x}	0.010	0.021	0.008	0.015
R	0.9992	0.9976	0.9996	0.9985

(Continua)

Tabela 5.11 (Continuação)

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Ni10raFo	Ze20srFo	NigtFo	Ni10caFo
$C_{estimada}$ (ppm)	2.992 (0.069)	3.272 (0.203)	4.036 (0.806)	3.446 (0.420)
$C_{esperada}$ (ppm)	3.509	3.455	3.509	3.454
Recuperação (%)	85.268	94.710	115.036	99.763
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.143	0.403	1.420	0.811
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	61.503	62.174	92.043	97.966
$ssq_{resíduos}$	9.758×10^{10}	6.616×10^{10}	5.783×10^9	1.945×10^8
Iterações	4	3	94	134
Corcondia (%)	96.339	95.747	70.838	53.811
$R_{Excitação}$	+0.920	+0.994	+0.920	+0.925
$R_{Emissão}$	+0.934	+0.935	+1.000	+1.000
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)				
$C_{estimada}$ (ppm)	0.984	1.006	0.797	0.968
$C_{esperada}$ (ppm)	0.975	0.975	0.975	0.975
Recuperação (%)	100.923	103.180	81.744	99.282
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	+0.009	+0.031	-0.178	-0.007
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	0.274 (0.003)	0.286 (0.009)	0.313 (0.028)	0.293 (0.017)
b	0.092 (0.001)	0.087 (0.003)	0.077 (0.010)	0.085 (0.006)
$S_{y/x}$	0.004	0.012	0.037	0.023
R	0.9998	0.9987	0.9847	0.9949

b) amostras fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Ni20apFo	Ad10caFo	Ad20apFo	Ad30crFo
$C_{estimada}$ (ppm)	3.537 (0.088)	3.052 (0.215)	3.455 (0.301)	3.511 (0.204)
$C_{esperada}$ (ppm)	3.525	3.509	3.460	3.481
Recuperação (%)	100.340	86.983	99.874	100.862
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.168	0.442	0.581	0.390
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.976	62.080	98.120	61.778
$ssq_{resíduos}$	3.826×10^7	7.286×10^{10}	1.301×10^8	8.600×10^{10}
Iterações	528	4	748	8
Corcondia (%)	93.303	94.487	23.933	23.435
$R_{Excitação}$	+0.994	+0.983	+0.958	+0.997
$R_{Emissão}$	+0.998	+0.932	+0.998	+0.934
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)				
$C_{estimada}$ (ppm)	0.965	1.124	0.966	0.987
$C_{esperada}$ (ppm)	0.975	0.975	0.975	0.975
Recuperação (%)	98.974	115.282	99.077	101.231
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	-0.010	+0.149	-0.009	+0.012
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	0.296 (0.004)	0.277 (0.010)	0.293 (0.012)	0.295 (0.008)
b	0.084 (0.001)	0.091 (0.004)	0.085 (0.004)	0.084 (0.003)
$S_{y/x}$	0.005	0.013	0.016	0.011
R	0.9998	0.9985	0.9974	0.9988

* Ver rodapé da Tabela 4.9.

5.4.2.2 – PARAFAC2

No ajuste pelo modelo PARAFAC2 foi de uma forma geral utilizada a matriz tridimensional [emissão × excitação × concentração] ($51 \times 39 \times 4$). As condições geralmente utilizadas para o ajuste foram a aplicação de restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD.

Solvente

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 5.12 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC2, de um a seis componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SVD na análise da matriz tridimensional do solvente etanol.

Como se pode verificar na Tabela 5.12, por validação cruzada a menor diferença de valores de ajuste entre o modelo segmentado e total foi obtida com o modelo de dois componentes. O número de iterações mais baixo, exceptuando o modelo de um componente, foi obtido com o modelo de quatro componentes. Com o modelo de quatro componentes foi ainda encontrada uma diferença de valores de ajuste relativamente baixa. Atendendo ao mais elevado ajuste do modelo de quatro componentes, relativamente ao modelo de dois componentes, este parece ser o mais adequado.

Tabela 5.12 – Validação cruzada do Modelo PARAFAC2, de 1 a 5 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] de DMSO. São apresentados os ajustes obtidos na análise da matriz segmentada e na matriz total, diferença de ajustes e o número de iterações necessários.

	Número de componentes					
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis
Número de Iterações	2	2000	2000	914	1657	2000
AjMS (%)	88.362	91.827	93.722	96.243	85.121	76.632
AjMT (%)	88.391	92.679	95.814	98.103	98.661	98.785
$\Delta_{AjMS-AjMT}$	-0.029	-0.852	-2.092	-1.860	-13.540	-22.153

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 5.13 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC2 na análise da matriz tridimensional do solvente etanol. Na Tabela 5.13 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a seis componentes, não negatividade na primeira e terceira

dimensões e estimativas iniciais por estimativas obtidas por SVD. Na Tabela 5.13 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC2, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como se pode ver na Tabela 5.13 b), a estimativa de concentração de valor positivo mais próxima de zero, com uma concentração de 0.065 ppm, é obtida com o modelo com três componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais obtidas por SVD na análise da matriz [concentração \times excitação \times emissão]. É ainda encontrado, com as estimativas do componente principal, um coeficiente de correlação do ajuste linear elevado e, de acordo o esperado, mais baixos coeficientes de correlação linear do espectro de excitação e do espectro de emissão.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é modelo de PARAFAC2 de três componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais obtidas por SVD na análise da matriz [concentração \times excitação \times emissão].

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de etanol pelo modelo de PARAFAC2 de três componentes, o primeiro componente é a linha de base, o segundo componente é a linha de base com pico de dispersão e o terceiro componente é o composto principal.

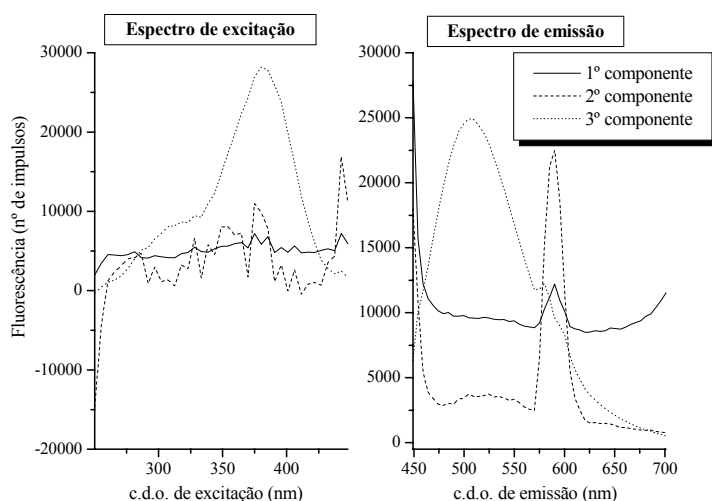


Fig. 5.9 – Espectro de excitação e de emissão estimados pelo modelo PARAFAC2 de 3 componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC2 de 3 componentes sem restrições na análise da matriz [concentração \times excitação \times emissão] do solvente etanol.

Tabela 5.13 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC2 na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] do solvente etanol com a) restrição de não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões

Número de componentes					
	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis
C_{estimada} (ppm)	0.087 (0.081)	0.077 (0.074)	-0.034(0.133)	0.118 (0.067)	0.114 (0.060)
Recuperação (%)	---	---	---	---	---
LD (3S_{v/x}/b)	0.317	0.290	0.537	0.260	0.231
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	92.618	95.671	98.103	98.661	98.777
ssq_{resíduos}	1.076×10 ⁹	3.704×10 ⁸	7.112×10 ⁷	3.546×10 ⁷	2.955×10 ⁷
Iterações	90	432	1038	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.207- +0.693	+0.145 -+0.598	+0.295- +0.694	+0.565- +0.698	+0.629 -+0.694
R_{Emissão}	+0.679- +0.675	+0.678 -+0.401	+0.683- +0.418	+0.682- +0.693	+0.681 -+0.682
R_{Emissão}	+0.305	+0.273	+0.278	+0.277	+0.275
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.018 (0.014)	0.013 (0.012)	-0.006(0.024)	0.020 (0.011)	0.019 (0.010)
b	0.172 (0.005)	0.172 (0.004)	0.177 (0.008)	0.170 (0.004)	0.171 (0.003)
S_{v/x}	0.018	0.017	0.032	0.015	0.013
R	0.9992	0.9993	0.9978	0.9995	0.9996

b) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e outras avaliações

Outras avaliações				
	3 componentes (matriz conc.×exc.×emi.)	4 componentes (matriz conc.×exc.×emi.)	4 componentes (matriz exc.×emi.×conc. e unimodalidade na 1 ^a dimensão)	3 componentes (matriz conc.×emi.×exc.)
C_{estimada} (ppm)	0.065 (0.045)	0.090 (0.064)	0.072 (0.080)	0.097 (0.063)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{v/x}/b)	0.176	0.249	0.315	0.244
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	97.386	99.535	97.444	97.479
ssq_{resíduos}	1.350×10 ⁸	4.269×10 ⁸	1.291×10 ⁸	1.256×10 ⁸
Iterações	1054	698	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.669 (máx.)	+0.675 (máx.)	+0.684	+0.685
R_{Emissão}	+0.252	+0.276	+0.268 - +0.490 -0.194 - -0.490	+0.269 (máx.)
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.011 (0.008)	0.016 (0.011)	0.012 (0.014)	0.017 (0.010)
b	0.173 (0.003)	0.172 (0.004)	0.172 (0.005)	0.171 (0.004)
S_{v/x}	0.010	0.014	0.018	0.014
R	0.9998	0.9995	0.9992	0.9995

* máx. – corresponde à indicação de que o número máximo de iterações definido no ajuste do modelo foi atingido ou de que o coeficiente de correlação linear apresentado corresponde ao calculado com a estimativa do espectro de excitação ou de emissão respectivamente ao c.d.o. de emissão ou de excitação de fluorescência máxima. Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

Padrão

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 5.14 são apresentados os resultados obtidos ppm por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC2, de um a seis componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SVD na análise da matriz tridimensional do padrão de Nifedipina 2.508 ppm.

Como é possível verificar na Tabela 5.14, por validação cruzada, não foram obtidas diferença dos valores de ajuste com os modelos entre dois e seis componentes que permitam tirar conclusões acerca do número de componentes mais adequado. No entanto, o modelo de dois componentes, com um número baixo de iterações, maior ajuste do modelo segmentado e menor diferença de valor de ajuste parece ser o mais adequado.

Tabela 5.14 – Validação cruzada do Modelo PARAFAC2, de 1 a 6 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] de padrão de Nifedipina 2.508 ppm. São apresentados os ajustes obtidos na análise da matriz segmentada e na matriz total, diferença de ajustes e o número de iterações necessários.

	Número de componentes					
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis
Número de Iterações	2	57	2000	2000	2000	2000
AjMS (%)	94.126	35.188	-12.429	-13.589	1.046	-34.312
AjMT (%)	94.150	97.420	98.704	98.799	98.887	98.974
$\Delta_{AjMS-AjMT}$	-0.024	-62.232	-111.133	-112.388	-97.841	-133.286

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 5.15 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC2 na análise da matriz tridimensional do padrão de Nifedipina 2.508 ppm. Na Tabela 5.15 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a seis componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas obtidas por SVD. Na Tabela 5.15 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC2, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como é possível verificar na Tabela 5.15 a) e b), as melhores estimativas de concentração são obtidas com o modelo de dois componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas obtidas por SVD e com o modelo de três componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e

estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC2 sem restrições, com uma estimativa de concentração respectivamente de 2.480 ppm e 2.472 ppm. Também, por avaliação dos coeficientes de correlação linear, são encontradas com estes dois modelos boas estimativas do componente principal nas três dimensões. Relativamente ao modelo de dois componentes, o modelo de três componentes permite um ajuste com uma maior percentagem de ajuste do modelo e um número de iterações mais baixo. No entanto, atendendo à avaliação prévia por validação cruzada e à estimativa de concentração com recuperação mais próxima do esperado, o modelo de dois componentes e estimativas iniciais por SVD é considerado o mais adequado.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de PARAFAC2 de dois componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [emissão × excitação × concentração]. A análise por este modelo, com estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC2 sem restrições, foi também posteriormente considerada.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz do padrão de Nifedipina pelo modelo PARAFAC2 de dois componentes, o primeiro componente é a linha de base com pico de fluorescência inicial considerado como composto secundário e o segundo componente é o composto principal.

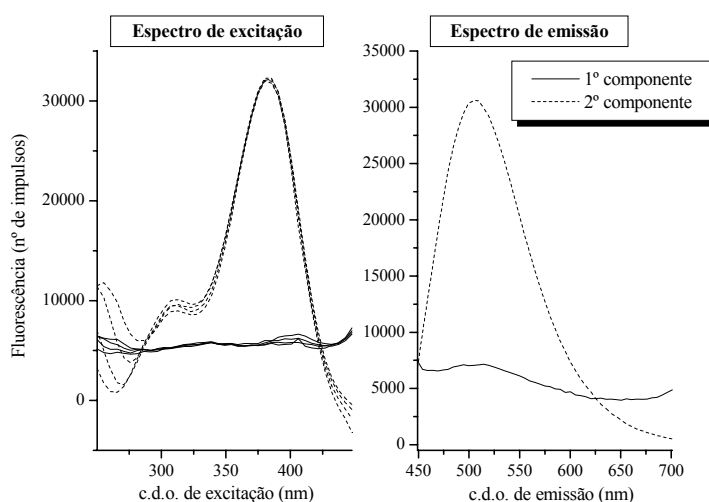


Fig. 5.10 – Espectro de excitação e de emissão estimados pelo modelo PARAFAC2 de 2 componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] do padrão de Nifedipina 2.508 ppm.

Tabela 5.15 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC2 na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] de padrão de Nifedipina 2.508 ppm com a) restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões

Número de componentes					
	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis
C_{estimada} (ppm)	2.480 (0.009)	2.394 (0.036)	2.462 (0.038)	3.490 (0.158)	2.715 (0.048)
Recuperação (%)	98.893	95.440	98.171	139.140	108.240
LD (3S_{y/x}/b)	0.022	0.083	0.087	0.303	0.106
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	97.912	98.687	98.794	98.853	98.973
ssq_{resíduos}	1.188×10 ⁸	4.699×10 ⁷	3.963×10 ⁷	3.582×10 ⁷	2.874×10 ⁷
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.999- +0.991	+0.933- +0.946	+0.987- +0.966	+0.817- +0.882	+0.980- +0.960
R_{Emissão}	+0.961- +0.937	+0.946- +0.924	+0.926- +0.904	+0.945- +0.933	+0.918- +0.897
	+1.000	+1.000	+0.995	+0.999	+0.997
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.249 (0.001)	0.244 (0.002)	0.248 (0.002)	0.294 (0.006)	0.261 (0.003)
b	0.100 (1.915×10 ⁻⁴)	0.102 (0.001)	0.101 (0.001)	0.084 (0.009)	0.096 (0.001)
S_{y/x}	0.001	0.003	0.003	0.009	0.003
R	1.0000	0.9999	0.9999	0.9993	0.9999

b) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e outras avaliações

Outras avaliações				
	3 componentes (estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições)	4 componentes (estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições)	3 componentes (unimodalidade na 1 ^a dimensão)	4 componentes (unimodalidade na 1 ^a dimensão)
C_{estimada} (ppm)	2.472 (0.010)	2.587 (0.006)	1.891 (0.015)	2.391 (0.264)
Recuperação (%)	98.579	103.142	75.411	95.350
LD (3S_{y/x}/b)	0.024	0.013	0.038	0.613
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.703	98.799	98.675	98.781
ssq_{resíduos}	4.58×10 ⁷	3.931×10 ⁷	4.784×10 ⁷	4.048×10 ⁷
Iterações	1826	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+1.000	+1.000	+1.000	+0.999
R_{Emissão}	+0.970 - +0.973	+0.995 - +0.983	+0.995 - +0.985	+0.913 - +0.855
	+0.945 - +0.919	+0.953 - +0.927	+0.955 - +0.932	+0.826 - +0.838
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.249 (0.001)	0.255 (3.182×10 ⁻⁴)	0.213 (0.011)	0.244 (0.016)
b	0.101 (2.120×10 ⁻⁴)	0.098 (1.118×10 ⁻⁴)	0.113 (3.742×10 ⁻⁴)	0.102 (0.006)
S_{y/x}	8.030×10 ⁻⁴	4.235×10 ⁻⁴	0.001	0.021
R	1.0000	1.000	1.0000	0.9971

* Ver rodapé da Tabela 4.6.

Formulações Farmacêuticas

Para todas as formulações farmacêuticas foram analisadas matrizes [emissão × excitação × concentração] pelo modelo PARAFAC2 de dois componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD. Análises com outras condições de ajuste do modelo se consideradas mais adequadas foram efectuadas.

Na Tabela 5.16 são apresentadas as condições de ajuste do modelo PARAFAC2 consideradas mais adequadas na análise das matrizes obtidas com cada amostra analisada.

Tabela 5.16 – Condições de ajuste do modelo PARAFAC2 utilizadas na análise das matrizes obtidas com as amostras não fortificadas e fortificadas.

Matriz analisada	Condições de ajuste			Amostras analisadas
	Número de componentes	Restrições (1ª e 3ª dimensões)	Estimativas iniciais	
Emissão × excitação × concentração	Dois	Não negatividade	SVD	Nigt
	Três			Ad10caFo
	Quatro			Ni10caFo, Ze20srFo e Ad20apFo
	Cinco			Ze20sr
	Três			NigtFo e Ad10ca
	Quatro			Ni10ra e Ni10raFo
Quatro	Ni10ca			
Concentração × excitação × emissão	Três		PARAFAC2 sem restrições	Ni20apFo
Excitação × emissão × concentração	Quatro		PARAFAC2 sem restrições	Ad20ap
	Cinco		PARAFAC2 sem restrições	Ad30cr
Concentração × emissão × excitação	Três		SVD	Ni20ap
	Quatro		PARAFAC2 sem restrições	Ad30crFo

Como se pode verificar na Tabela 5.16, para um número razoável de amostras, as estimativas mais adequadas são encontradas com as condições de ajuste inicialmente consideradas. A maioria das estimativas é encontrada na análise da matriz inicialmente considerada [emissão × excitação × concentração]. No entanto, para algumas amostras, as estimativas mais adequadas são encontradas com a análise de matrizes de tipo diferente. Também, independentemente da matriz analisada, das restrições e do número de

componentes utilizados para um número maior de amostras são encontradas estimativas adequadas com estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC2 sem restrições.

Atendendo aos menores desvio de trilinearidade esperados, só para três amostras, não fortificada Ni20ap e fortificadas Ad30crFo e Ni20apFo, as melhores estimativas de concentração são encontradas na análise de matrizes em que a primeira dimensão é a dimensão da concentração. Também, atendendo a menor variabilidade provável na dimensão do espectro de emissão, só para as amostras não fortificadas Ad20ap e Ad30cr as melhores estimativas de concentração são encontradas análise da matriz [excitação × emissão × concentração].

Só para a formulação Ni10ra, o mesmo tipo de condições de ajuste é considerado adequado na análise da amostra não fortificada e fortificada. Para as restantes formulações, e apesar de algumas condições de ajuste idênticas, diferentes condições de ajuste são consideradas mais adequadas na análise dos dois tipos de amostra. Para a formulação Ad10ca estimativas iniciais diferentes, para a formulação Ze20sr um número de componentes diferente, para as formulações Nigt e Ni10ca um número de componentes e estimativas iniciais diferentes, para a formulação Ad30cr tipos de matriz e um número de componentes diferentes e para as formulações Ad20ap e Ni20ap tipos de matriz e estimativas iniciais diferentes. É de referir ainda que, na análise dos dois tipos de amostra, em que um número de componentes diferente é considerado adequado, o número menor de componentes é utilizado na análise da amostra fortificada. A única exceção é encontrada com a formulação Nigt em que um maior número de componentes é utilizado na análise da amostra fortificada.

Na Tabela 5.17 são apresentados os resultados da análise pelo modelo PARAFAC2 das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas.

Para a maioria das amostras são obtidos ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.999. Valores de coeficientes de correlação linear de ajuste linear inferiores, são encontrados para as amostras não fortificadas Ze20sr, Ni10ca e Ad30cr e fortificadas Ni10caFo, Ad30crFo e NigtFo. Para a maioria das amostras são encontrados desvios padrão relativos de uma forma geral inferiores a 10 %. As exceções, encontram-se para as amostras não fortificadas Ze20sr e Ni10ca com desvios padrão ligeiramente superiores a 10 % e, para as amostras Ad30cr e

NigtFo com desvios padrão superiores a 20 %. De uma forma geral, são obtidos com a maioria das amostras, desvios padrão relativos inferiores aos encontrados com o modelo PARAFAC.

Recuperações dentro do esperado são obtidas para todas as amostras não fortificadas e fortificadas. As únicas excepções são encontradas para as formulações Ni10ra e Nigt. São obtidas, para os dois tipos de amostra, com a formulação Ni10ra recuperações ligeiramente inferiores a 90 % e, com a formulação Nigt recuperações ligeiramente superiores a 110 %. São ainda obtidas, para todas as formulações farmacêuticas recuperações de fortificação por volta de 100 %.

Para a maioria das amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas da dosagem estimada por HPLC-UV. A única excepção, pelas razões já apontadas é a amostra Ad30cr. Excepto para a amostra não fortificada Ad30cr, são obtidos com todas as outras amostras não fortificadas erros de previsão inferiores 10 %. Os erros de previsão encontrados variam desde 1 a 23 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Ni20ap e o mais alto para a amostra Ad30cr.

Na avaliação da quantificação por este modelo, com todas as amostras não fortificadas, é obtido um valor de EPM de 6.466 %, de EPT de 15.772 % e de RMSEP de 3.251. Ao não se considerar a amostra Ad30cr é obtido um valor de EPM de 4.042 %, de EPT de 5.071 % e de RMSEP de 0.846. Ao não ser considerada a amostra Ad30cr, é encontrado um valor de EPM cerca de duas vezes menor e valores de EPT e de RMSEP cerca de três vezes menores.

É de referir ainda que, uma estimativa de dosagem mais próxima, da dosagem estimada por HPLC-UV, é obtida para a amostra Ni10ra na análise do mesmo tipo de matriz, com um número de componentes superior e com estimativas iniciais por SVD. Também para a formulação Ze20sr, uma recuperação de fortificação próxima à indicada é também encontrada por um modelo de cinco e seis componentes, na análise do mesmo tipo de matriz da amostra não fortificada e fortificada e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC2 sem restrições.

São encontradas pelo modelo PARAFAC2 melhores estimativas de concentração relativamente às obtidas por análise directa e estimativas próximas relativamente às obtidas pelo modelo PARAFAC. São também encontradas pelo modelo PARAFAC2 estimativas de recuperação de fortificação mais adequadas.

Tabela 5.17 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas obtidas pelo modelo PARAFAC2.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Ni10ra	Ze20sr	Nigt	Ni10ca
C_{estimada} (ppm)	2.061 (0.056)	2.497 (0.274)	2.872 (0.050)	2.550 (0.329)
C_{esperada} (ppm)	2.533	2.480	2.533	2.478
Recuperação (%)	81.354	100.709	113.366	102.899
LD (3S_{y/x}/b)	0.140	0.622	0.107	0.742
DOS_{estimada} (mg)	8.136	20.335	22.674	10.289
DOS_{estimada} HPLC (mg)	8.626	18.647	22.225	10.044
EP (%)	5.681	9.052	2.020	2.439
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.879	98.563	98.194	98.887
SSQ_{resíduos}	6.208×10 ⁷	9.787×10 ⁷	1.960×10 ⁸	4.710×10 ⁷
Iterações	559	1635	714	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.983 - +0.949	+0.964 - +0.934	+0.997 - +0.972	+0.987 - +0.997
	+0.952 - +0.977	+0.882 - +0.886	+0.998 - +0.977	+0.996 - +0.997
R_{Emissão}	+1.000	+1.000	+1.000	+1.000
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.224 (0.004)	0.250 (0.016)	0.269 (0.002)	0.253 (0.018)
b	0.109 (0.001)	0.100 (0.005)	0.094 (0.001)	0.099 (0.006)
S_{y/x}	0.005	0.021	0.003	0.025
R	0.9998	0.9970	0.9999	0.9958

a) amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Ni20ap	Ad10ca	Ad20ap	Ad30cr
C_{estimada} (ppm)	2.587 (0.169)	2.349 (0.145)	2.450 (0.078)	2.434 (0.467)
C_{esperada} (ppm)	2.550	2.533	2.484	2.506
Recuperação (%)	101.470	91.553	98.621	97.141
LD (3S_{y/x}/b)	0.379	0.340	0.178	1.075
DOS_{estimada} (mg)	20.295	9.272	19.726	29.140
DOS_{estimada} HPLC (mg)	20.070	9.461	20.981	38.057
EP (%)	1.121	1.998	5.982	23.431
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	99.329	98.227	98.518	99.188
SSQ_{resíduos}	2.176×10 ⁷	1.256×10 ⁸	7.142×10 ⁷	3.529×10 ⁷
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.993	+0.852 - +0.906	+0.949	+0.924
		+0.909 - +0.862		
R_{Emissão}	+1.000 (máx.)	+0.999	+0.989 - +0.992	+0.995 - +0.994
			+1.000 - +1.000	+0.997 - +0.999
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.255 (0.009)	0.240 (0.009)	0.247 (0.005)	0.246 (0.027)
b	0.098 (0.003)	0.103 (0.003)	0.101 (0.002)	0.101 (0.010)
S_{y/x}	0.012	0.012	0.006	0.036
R	0.9989	0.9991	0.9998	0.9912

(Continua)

Tabela 5.17 (Continuação)

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Ni10raFo	Ze20srFo	NigtFo	Ni10caFo
$C_{estimada}$ (ppm)	3.050 (0.163)	3.478 (0.087)	3.892 (0.879)	3.502 (0.309)
$C_{esperada}$ (ppm)	3.509	3.455	3.509	3.454
Recuperação (%)	86.934	100.669	110.935	101.410
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.335	0.167	1.582	0.591
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.828	98.856	98.670	98.810
$ssq_{resíduos}$	9.049×10^7	6.056×10^7	1.615×10^8	6.654×10^7
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
$R_{Excitação}$	+0.998 - +0.942	+0.975 - +0.985	+0.983 - +0.947	+0.992 - +0.917
	+0.933 - +0.931	+0.987 - +0.944	+0.938 - +0.907	+0.934 - +0.929
$R_{Emissão}$	+1.000	+1.000	+1.000	+1.000
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)				
$C_{estimada}$ (ppm)	0.989	0.981	1.020	0.952
$C_{esperada}$ (ppm)	0.975	0.975	0.975	0.975
Recuperação (%)	101.436	100.615	104.615	97.641
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	+0.014	+0.006	+0.045	-0.023
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	0.277 (0.008)	0.294 (0.004)	0.308 (0.031)	0.295 (0.012)
b	0.091 (0.003)	0.085 (0.001)	0.079 (0.011)	0.084 (0.004)
$S_{y/x}$	0.010	0.005	0.042	0.017
R	0.9991	0.9998	0.9811	0.9973

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Ni20apFo	Ad10caFo	Ad20apFo	Ad30crFo
$C_{estimada}$ (ppm)	3.525 (0.104)	3.304 (0.009)	3.473 (0.173)	3.434 (0.237)
$C_{esperada}$ (ppm)	3.525	3.509	3.460	3.481
Recuperação (%)	100.009	94.169	100.379	98.633
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.198	0.411	0.333	0.459
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	99.524	98.659	98.824	99.255
$ssq_{resíduos}$	8.278×10^6	9.107×10^7	5.092×10^7	3.268×10^7
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
$R_{Excitação}$	+0.994 (máx.)	+0.992 - +0.986	+0.993 - +0.981	+0.994
		+0.983 - +0.978	+0.974 - +0.990	
$R_{Emissão}$	+1.000	+0.999	+0.998	+1.000 (máx.)
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)				
$C_{estimada}$ (ppm)	0.938	0.955	1.023	1.000
$C_{esperada}$ (ppm)	0.975	0.975	0.975	0.975
Recuperação (%)	96.205	97.949	104.923	102.564
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	-0.037	-0.020	+0.048	+0.025
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	0.296 (0.004)	0.287 (0.009)	0.294 (0.007)	0.292 (0.010)
b	0.084 (0.001)	0.087 (0.003)	0.085 (0.002)	0.085 (0.003)
$S_{y/x}$	0.006	0.012	0.009	0.013
R	0.9997	0.9987	0.9991	0.9984

* máx. – corresponde à indicação de que o número máximo de iterações definido no ajuste do modelo foi atingido ou de que o coeficiente de correlação linear apresentado corresponde ao calculado com a estimativa do espectro de excitação ou de emissão respectivamente ao c.d.o. de emissão ou de excitação de fluorescência máxima; A dosagem é dada em massa de composto por comprimido excepto para Nigt em que a dosagem vem em massa de composto por mL; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

5.4.2.3 – MCR-ALS

No ajuste pelo modelo MCR-ALS foi de uma forma geral utilizada a matriz bidimensional [(concentração × excitação) × emissão] (156 × 51). As condições geralmente utilizadas para o ajuste foram a aplicação de restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições.

Solvente

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 5.18 são apresentados os valores de perda de ajuste do modelo MCR-ALS e do número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS de um a seis componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada do solvente etanol.

É possível verificar na Tabela 5.18 que, os valores mais baixos de perda de ajuste de MCR vs. PCA foram obtidos com os modelos de três e quatro componentes e, os de perda de ajuste de MCR vs Exp. foram encontrados a partir do modelo de quatro componentes. Os menores números de iterações foram encontrados para os modelos de um e dois componentes. Os valores de perda de ajuste baixos, associados a um número de iterações não muito alto, levam a considerar o modelo de quatro componentes como o mais adequado.

Tabela 5.18 – Perda de ajuste de MCR-ALS vs. PCA, de MCR-ALS vs. experimental e número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS, de 1 a 6 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão] do solvente etanol.

	Número de componentes					
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis
Número de Iterações	2	4	25	19	17	17
LOF _{MCR vs. PCA} (×10 ⁻¹⁴)	2.980	3.731	2.694	2.980	3.361	3.432
LOF _{MCR vs Exp}	11.609	7.141	4.167	1.892	1.334	1.209

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 5.19 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo MCR-ALS na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada do solvente etanol. Na Tabela 5.19 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a seis componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições. Na Tabela 5.19 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo MCR-ALS, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como é possível verificar pela Tabela 5.19 b), a estimativa de concentração mais próxima de zero, com uma concentração de 0.009 ppm, é obtida com o modelo de quatro componentes, não negatividade nas duas dimensões, unimodalidade no composto principal na primeira dimensão e estimativas iniciais por estimativas de MCR-ALS de quatro componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação]. Uma estimativa de concentração próxima a esta, com uma concentração de 0.015 ppm, é encontrada com o modelo de cinco componentes com as mesmas condições de ajuste. No entanto, associado às boas estimativas de concentração encontradas com estas condições de ajuste, mesmo melhor do que as encontradas com a indicação de ausência do composto principal na primeira matriz, encontram-se valores de percentagem de ajuste do modelo baixos da ordem dos 94 %.

Não considerando as estimativas obtidas por estes modelos, a estimativa mais próxima de zero com uma estimativa de 0.067 ppm, com uma maior percentagem de ajuste do modelo, é obtida com o modelo de cinco componentes, não negatividade nas duas dimensões, com a indicação de ausência do composto principal na primeira matriz e estimativas iniciais por estimativas de MCR-ALS de cinco componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação].

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de MCR-ALS de cinco componentes, não negatividade nas duas dimensões, componente principal da primeira matriz não relacionado com o componente principal das outras matrizes e estimativas iniciais por estimativas de MCR-ALS de cinco componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação].

Tabela 5.19 – Estimativas de concentração obtidas por MCR-ALS na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão] do solvente etanol com a) tridimensionalidade, restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por MCR-ALS sem restrições, b) o mesmo que em a) e outras avaliações e c) o mesmo que em a) mas com indicação de ausência de componente principal na primeira matriz.*

a) com restrição de não negatividade nas duas dimensões

Número de componentes					
	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis
C_{estimada} (ppm)	0.222 (0.066)	0.193 (0.066)	0.203 (0.065)	0.129 (0.063)	0.130 (0.063)
Recuperação (%)	---	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.249	0.250	0.246	0.243	0.243
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	92.857	95.777	98.107	98.664	98.788
SSQ_{resíduos}	3.524×10 ⁹	3.524×10 ⁸	7.079×10 ⁷	3.529×10 ⁷	2.902×10 ⁷
Iterações	50 (máx.)	16	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	0.154	0.754	0.023	0.073	0.078
Δ_{LOFMCR (PCA - Exp.)}	-6.999	-3.468	-1.869	-1.263	-1.134
R_{Excitação}	+0.661- +0.691	+0.75 - +0.693	+0.748- +0.693	+0.924- +0.694	+0.595- +0.694
R_{Emissão}	+0.682- +0.684	+0.681- +0.684	+0.681- +0.683	+0.681 - +0.683	+0.681- +0.683
	+0.312	+0.282	+0.282	+0.283	+0.281
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	1706.754 (480.085)	4428.874 (1440.300)	4624.124 (1405.030)	2992.575 (1416.459)	3015.771 (1411.829)
b	7695.904 (168.682)	23000.401 (506.062)	22833.898 (493.670)	23262.278 (497.686)	23237.724 (496.059)
S_{y/x}	638.830	1916.547	1869.615	1884.823	1878.663
R	0.9995	0.9995	0.9995	0.9995	0.9995

b) com restrição de não negatividade nas duas dimensões e outras avaliações

Outras avaliações				
	5 componentes (unimodilidade no componente principal na 1ª dimensão)	5 componentes (unimodilidade no componente principal na 1ª dimensão e trilinearidade no componente principal)	4 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc. e unimodilidade no componente principal na 1ª dimensão)	5 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc. e unimodilidade no componente principal na 1ª dimensão)
C_{estimada} (ppm)	0.102 (0.062)	0.099 (0.061)	0.009 (0.031)	0.015 (0.026)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.241	0.237	0.122	0.102
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.313	98.176	94.005	93.812
SSQ_{resíduos}	5.624×10 ⁷	6.573×10 ⁷	7.103×10 ⁸	7.568×10 ⁸
Iterações	8	6	14	8
LOF_{MCR vs. PCA}	1.032	1.244	5.666	6.016
Δ_{LOFMCR (PCA - Exp.)}	1.687	1.824	-0.329	-0.172
R_{Excitação}	+0.684 - +0.694	+0.684 - +0.684	+0.684	+0.684
R_{Emissão}	+0.681 - +0.684	+0.684 - +0.684	np - +0.260	np - +0.236
	+0.283	+0.283	+0.267 - +0.378	+0.256 - +0.385
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	2391.035 (1422.682)	2322.900 (1394.529)	170.746 (596.931)	287.624 (493.269)
b	23531.812 (499.812)	23530.688 (489.980)	19491.001 (209.737)	19243.282 (173.315)
S_{y/x}	1893.103	1855.642	794.311	656.373
R	0.9995	0.9996	0.9999	0.9999

(Continua)

Tabela 5.19 (Continuação)

c) com restrição de não negatividade nas duas dimensões e indicação de ausência de composto principal na primeira matriz

	Número de componentes			
	Quatro	Cinco	Quatro (matriz (conc.×emi.)×exc.)	Cinco (matriz (conc.×emi.)×exc.)
C_{estimada} (ppm)	0.086 (0.072)	0.083 (0.069)	0.074 (0.061)	0.067 (0.055)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.281	0.270	0.240	0.238
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.056	98.617	97.833	98.512
SSQ_{resíduos}	7.466×10 ⁷	3.778×10 ⁷	9.278×10 ⁷	4.379×10 ⁷
Iterações	34	20	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	0.366	0.362	0.849	0.306
Δ_{LOFMCR (PCA - Exp.)}	-1.561	-1.020	-1.318	-1.183
R_{Excitação}	np - +0.694 +0.681 - +0.683	np - +0.694 +0.681 - +0.684	+0.684	+0.683
R_{Emissão}	+0.278	+0.282	np - +0.262 +0.269 - +0.299	np - +0.245 +0.265 - +0.312
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	2117.864 (1727.498)	1977.516 (1607.969)	1420.064 (1145.557)	1250.273 (1007.081)
b	24552.835 (606.972)	23739.962 (564.974)	19084.921 (402.502)	18540.994 (353.847)
S_{y/x}	2298.709	2139.657	1524.345	1340.081
R	0.9994	0.9994	0.9996	0.9996

* Ver rodapé da Tabela 4.17.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de etanol pelo modelo de MCR-ALS de cinco componentes, o primeiro, terceiro e quarto componentes são a linha de base com picos de dispersão, o segundo componente é o composto principal e o quinto componente é a linha de base.

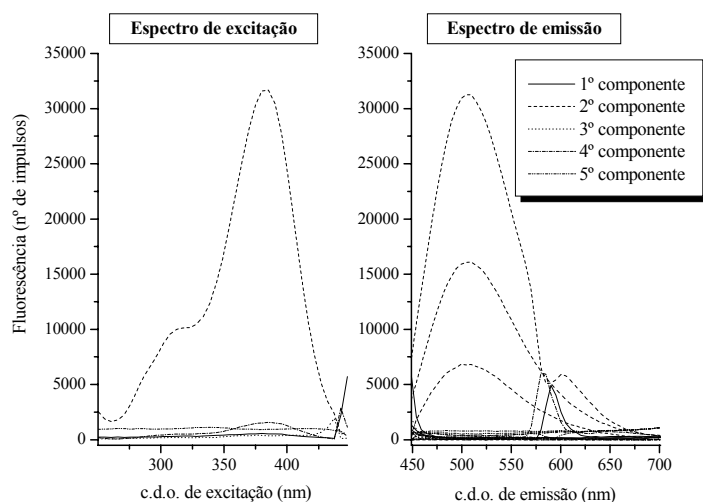


Fig. 5.11 – Espectro de excitação e de emissão estimados pelo modelo MCR-ALS de 5 componentes, não negatividade nas duas dimensões, componente principal da primeira matriz não relacionado com o componente principal das outras matrizes e estimativas iniciais por MCR-ALS de 5 componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação] do solvente etanol.

Padrão

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 5.20 são apresentados os valores de perda de ajuste do modelo MCR-ALS e do número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS de um a seis componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada [(concentração × excitação) × emissão] do padrão de Nifedipina 2.508 ppm.

Como é possível verificar na Tabela 5.20, foram obtidos valores de perda de ajuste de MCR vs. PCA de ordem de grandeza próxima para um número de componentes entre dois e seis. Os menores valores de perda de ajuste MCR vs Exp. foram encontrados a partir do modelo de três componentes. O menor número de iterações foi encontrado para os modelos de três e quatro componentes. Entre os modelos de três e quatro componentes, o número de

iterações ligeiramente menor encontrado com o modelo de quatro componentes, poderá permitir considerar este como o mais adequado para a análise da matriz de padrão.

Tabela 5.20 – Perda de ajuste de MCR-ALS vs. PCA, de MCR-ALS vs. experimental e número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS, de 1 a 6 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão] do padrão de Nifedipina 2.508 ppm.

	Número de componentes					
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis
Número de Iterações	21	21	13	11	39	21
$LOF_{MCR \text{ vs. } PCA} (\times 10^{-14})$	2.182	3.366	3.144	3.323	3.097	3.037
$LOF_{MCR \text{ vs } Exp}$	5.850	2.088	1.294	1.198	1.109	1.021

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 5.21 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo MCR-ALS na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada [(concentração × excitação) × emissão] do padrão de Nifedipina 2.508 ppm. Na Tabela 5.21 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a seis componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições. Na Tabela 5.21 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo MCR-ALS, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como é possível verificar na Tabela 5.21 b), a melhor estimativa de concentração, com uma concentração de 2.508 ppm, é encontrada com o modelo de três componentes, não negatividade nas duas dimensões, unimodalidade no componente secundário na primeira dimensão, trilinearidade no componente secundário e estimativas iniciais por estimativas por MCR-ALS de três componentes sem restrições. Com este modelo, são também encontrados, coeficientes de correlação linear altos das estimativas do componente principal nas três dimensões.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de MCR-ALS de três componentes, não negatividade nas duas dimensões, unimodalidade no componente secundário na primeira dimensão, trilinearidade no componente secundário e estimativas iniciais por estimativas do modelo MCR-ALS de três componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão].

Tabela 5.21 – Estimativas de concentração obtidas por MCR-ALS na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão] de padrão de Nifedipina 2.508 ppm com a) tridimensionalidade, restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por MCR-ALS sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade nas duas dimensões

	Número de componentes				
	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis
C_{estimada} (ppm)	2.726 (0.025)	2.359 (0.023)	2.257 (0.025)	2.149 (0.012)	2.344 (0.026)
Recuperação (%)	108.690	94.050	89.976	85.697	93.456
LD (3S_{y/x}/b)	0.054	0.055	0.060	0.029	0.061
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	97.912	98.706	98.800	98.856	98.976
ssq_{resíduos}	1.187×10 ⁸	4.561×10 ⁷	3.920×10 ⁷	3.565×10 ⁷	2.856×10 ⁷
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	21	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	3.828×10 ⁻⁴	0.030	0.063	0.299	0.080
Δ_{LOFMCR (PCA - Exp.)}	-2.088	-1.264	-1.136	-0.845	-0.944
R_{Excitação}	+1.000- +0.991	+1.000- +0.987	+0.994- +0.983	+0.989- +0.981	+0.992- +0.987
	+0.960- +0.935	+0.956- +0.932	+0.952- +0.928	+0.951- +0.933	+0.958- +0.932
R_{Emissão}	+1.000	+1.000	+1.000	+1.000	+1.000
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	41314.058 (205.953)	37481.024 (217.864)	15970.439 (84.467)	35136.050 (118.993)	37170.561 (241.145)
b	15155.873 (72.363)	15890.094 (76.549)	36039.061 (240.400)	16347.900 (41.809)	15858.660 (84.729)
S_{y/x}	274.053	289.903	319.890	158.339	320.882
R	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

b) com restrição de não negatividade nas duas dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	2 componentes (trilinearidade no componente principal e no secundário)	3 componentes (trilinearidade no componente secundário)	3 componentes (unimodalidade no componente secundário na 1 ^a e 2 ^a dimensões)	3 componentes (unimodalidade no componente secundário na 1 ^a dimensão e trilinearidade no componente secundário)
C_{estimada} (ppm)	2.392 (0.021)	2.393 (0.022)	2.369 (0.054)	2.508 (0.021)
Recuperação (%)	95.394	95.408	94.451	99.993
LD (3S_{y/x}/b)	0.048	0.051	0.127	0.047
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	93.448	98.584	97.295	98.449
ssq_{resíduos}	1.170×10 ⁹	5.463×10 ⁷	2.131×10 ⁸	7.004×10 ⁷
Iterações	10	50 (máx.)	4	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	6.213	0.576	2.479	0.948
Δ_{LOFMCR (PCA - Exp.)}	-0.339	-0.840	-0.318	-0.656
R_{Excitação}	+0.957 - +0.957	+0.998 - +0.988	+0.996 - +0.986	+0.999 - +0.990
	+0.957 - +0.957	+0.957 - +0.933	+0.956 - +0.931	+0.959 - +0.934
R_{Emissão}	+1.000	+1.000	+1.000	+1.000
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	40029.296 (202.331)	37740.276 (199.611)	37054.455 (497.549)	38109.021 (179.411)
b	16731.359 (71.091)	15772.196 (70.135)	15642.450 (174.818)	15196.013 (63.038)
S_{y/x}	269.234	265.614	662.067	238.735
R	1.0000	1.0000	0.9999	1.0000

* Ver rodapé da Tabela 4.6.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de padrão pelo modelo de MCR-ALS de três componentes, o primeiro componente é o composto principal, o segundo componente é a linha de base e o terceiro é a linha de base com pico de fluorescência inicial considerado como composto secundário.

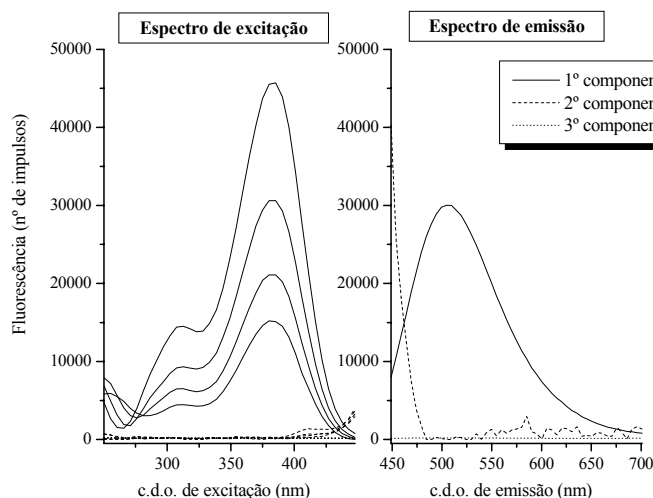


Fig. 5.12 – Espectro de excitação e de emissão estimados pelo modelo MCR-ALS de 3 componentes, não negatividade nas duas dimensões, unimodalidade no componente secundário na primeira dimensão, trilinearidade no componente secundário e estimativas iniciais por MCR-ALS de 3 componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração \times excitação) \times emissão] do padrão de Nifedipina 2.508 ppm.

Formulações Farmacêuticas

Para todas as formulações farmacêuticas foram analisadas matrizes [(concentração \times excitação) \times emissão] pelo modelo MCR-ALS de três componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de MCR-ALS sem restrições. Análises com outras condições de ajuste do modelo se consideradas mais adequadas foram efectuadas.

Na Tabela 5.22 são apresentadas as condições de ajuste do modelo MCR-ALS consideradas mais adequadas na análise das matrizes obtidas com cada amostra analisada.

Como é possível verificar na Tabela 5.22, para um grande número de amostras as estimativas mais adequadas foram encontradas com condições de ajuste próximas às

inicialmente consideradas. Além da restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de MCR-ALS sem restrições, comuns a todas as análises, as outras condições de ajuste utilizadas foram a aplicação de restrição de trilinearidade no componente principal ou no composto secundário, unimodilidade no composto secundário e a análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação].

As mesmas condições de ajuste são utilizadas na análise das amostras não fortificadas e fortificadas das formulações Ni10ca, Ni20ap, Ad10ca e Ad30cr. Para as outras formulações farmacêuticas um número de componentes diferentes é utilizado na análise das amostras não fortificadas e fortificadas da mesma formulação. Na análise com este modelo, e ao contrário do normalmente encontrado com o modelo PARAFAC2, um número maior de componentes é utilizado na análise das amostras fortificadas.

Tabela 5.22 – Condições de ajuste do modelo MCR-ALS utilizadas na análise das matrizes obtidas com as amostras não fortificadas e fortificadas.

Matriz analisada	Condições de ajuste			Amostras analisadas
	Número de componentes	Restrições (duas dimensões)	Estimativas iniciais	
(Concentração × excitação) × emissão	Dois	Não negatividade	MCR-ALS sem restrições	Ad20ap, Ad10ca e Ad10caFo
	Três			Ni10ra e Ad20apFo
	Quatro			Ni10raFo
	Cinco			Ze20sr
	Seis			Ze20srFo
	Dois	Não negatividade e trilinearidade no composto principal		Nigt
	Três			NigtFo, Ni10ca e Ni10caFo
Quatro	Não negatividade, trilinearidade no composto secundário e unimodilidade no composto secundário na primeira dimensão	Ad30cr e Ad30crFo		
(Concentração × emissão) × excitação	Três	Não negatividade e trilinearidade no composto secundário	Ni20ap e Ni20apFo	

Na Tabela 5.23 são apresentados os resultados da análise pelo modelo MCR-ALS das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas.

Para a maioria das amostras são obtidos ajustes lineares com coeficientes de correlação de ordem de grandeza igual ou superior a 0.999. Valores de coeficientes de correlação linear de ajuste linear inferiores, são encontrados para as amostras não fortificadas Ze20sr,

Ni10ra e Ad10ca e fortificadas Ni10caFo, Ad20apFo e NigtFo. Excepto para a amostra NigtFo, com um desvio padrão relativo da ordem de 20 %, para as outras amostras são encontrados desvios padrão relativos inferiores a 10 %.

Para a maioria das amostras não fortificadas e fortificadas são obtidas recuperações próximas de 100 %. As exceções são encontradas, com recuperações ligeiramente inferiores a 90 %, para as amostras não fortificadas Ni10Ra, Ni10ca, Ad10ca e fortificada Ni10raFo e, com recuperações superiores a 110 %, para os dois tipos de amostra da formulação Nigt. Para a maioria das formulações são também obtidas recuperações de fortificação próximas de 100 %. Só para a formulação Ad10ca é encontrada uma recuperação de fortificação da ordem de 110 %.

Para a maioria das amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas das dosagens estimadas por HPLC-UV. Para a maioria das amostras não fortificadas são encontrados erros de previsão inferiores a 10 %. Só para as formulações Ni10ca e Ad30cr são obtidos erros de previsão superiores. Os erros de previsão encontrados variam desde 0.2 a 22 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Ad20ap e o mais alto para a amostra Ad30cr.

Na avaliação da quantificação por este modelo com todas as amostras não fortificadas é obtida é obtido um valor de EPM de 8.162 %, de EPT de 14.955 % e de RMSEP de 3.082. Ao não ser considerada a amostra Ad30cr é obtido um valor de EPM de 6.210 %, de EPT de 5.993 % e de RMSEP de 1.000 %. Ao não ser considerada a amostra Ad30cr, é encontrada uma média de erro de previsão ligeiramente menor e valores de EPT e de RMSEP cerca de três vezes menores.

É de referir ainda que estimativas de dosagem mais próximas da dosagem estimada por HPLC-UV são obtidas para algumas amostras com condições de ajuste diferentes. Para as amostras Ni10ra e Ni10ca, com um número de componentes inferior, restrição de trilinearidade no componente secundário e unimodalidade no componente secundário na primeira dimensão mas com piores percentagens de ajuste do modelo. Para a amostra Ni20ap, com um número de componentes superior, sem aplicação da restrição de trilinearidade no componente principal mas mais baixa recuperação da fortificação. Ainda para a amostra Nigt, na análise de outro tipo de matriz e com ou sem aplicação da restrição de trilinearidade no componente principal, com melhor ajuste do modelo mas mais baixa recuperação da fortificação.

São encontradas, pelo modelo MCR-ALS, melhores estimativas de concentração do que as obtidas por análise directa e pelo modelo PARAFAC. Relativamente às estimativas de concentração obtidas pelo modelo PARAFAC2 são encontradas, de uma forma geral, estimativas de concentração próximas pelo modelo MCR-ALS. No que respeita à recuperação de fortificação, e excepto para uma amostra, são também encontradas por este modelo recuperações de fortificação próximas às encontradas com o modelo PARAFAC2.

Tabela 5.23 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas obtidas pelo modelo MCR-ALS.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Ni10ra	Ze20sr	Nigt	Ni10ca
C_{estimada} (ppm)	2.072 (0.012)	2.452 (0.204)	3.015 (0.066)	2.187 (0.251)
C_{esperada} (ppm)	2.533	2.480	2.533	2.478
Recuperação (%)	81.780	98.901	119.030	88.260
LD (3S_{y/x}/b)	0.029	0.469	0.137	0.607
DOS_{estimada} (mg)	8.179	19.968	23.803	8.824
DOS_{estimada} HPLC(mg)	8.626	18.647	22.225	10.044
EP (%)	5.182	7.084	7.100	12.147
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.722	98.257	94.813	98.062
ssq_{resíduos}	8.073×10 ⁷	1.440×10 ⁸	1.617×10 ⁹	1.432×10 ⁸
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	14
LOF_{MCR vs. PCA}	0.021	1.047	0.491	1.196
Δ_{LOFMCR} (PCA – Exp.)	-1.275	-0.696	-1.378	-0.744
R_{Excitação}	+0.999 - +0.948	+0.928 - +0.929	+0.986 - +0.986	+0.999 - +0.999
R_{Emissão}	+0.950 - +0.976	+0.882 - +0.866	+0.986 - +0.986	+0.999 - +0.999
	+1.000	+1.000	+0.997	+1.000
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	49040.224 (171.050)	49557.322 (2372.373)	68511.730 (777.466)	44436.821 (3087.485)
b	23670.915 (60.100)	20207.755 (833.555)	22720.329 (273.170)	20314.592 (1084.816)
S_{y/x}	227.609	3156.817	1034.542	4108.387
R	1.0000	0.9983	0.9999	0.9972

a) amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Ni20ap	Ad10ca	Ad20ap	Ad30cr
C_{estimada} (ppm)	2.642 (0.055)	2.193 (0.211)	2.601 (0.105)	2.485 (0.184)
C_{esperada} (ppm)	2.550	2.533	2.484	2.506
Recuperação (%)	103.616	86.572	104.690	99.028
LD (3S_{y/x}/b)	0.122	0.508	0.233	0.421
DOS_{estimada} (mg)	20.726	8.657	20.941	29.751
DOS_{estimada} HPLC(mg)	20.070	9.461	20.981	38.057
EP (%)	3.269	8.498	0.191	21.825
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.548	95.935	97.843	98.912
ssq_{resíduos}	1.020×10 ⁸	6.600×10 ⁸	1.513×10 ⁸	6.336×10 ⁷
Iterações	27	50 (máximo)	50 (máximo)	50 (máximo)
LOF_{MCR vs. PCA}	0.732	2.780×10 ⁻³	7.100×10 ⁻⁴	+0.771
Δ_{LOFMCR} (PCA – Exp.)	-0.721	-4.062	-2.156	-0.318
R_{Excitação}	+0.999	+0.998 - +0.959	+1.000 - +0.999	+1.000 - +0.989
R_{Emissão}	+0.998 - +0.994	+0.957 - +0.900	+0.982 - +0.967	+0.990 - +0.989
	+0.998 - +0.998	+1.000	+1.000	+1.000
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	43786.721 (507.532)	44457.181 (2581.635)	44198.223 (993.686)	55991.570 (2377.667)
b	16575.493 (178.326)	20270.888 (907.081)	16995.071 (349.141)	22563.798 (835.415)
S_{y/x}	675.352	3435.274	1322.256	3163.863
R	0.9999	0.9980	0.9996	0.9986

(Continua)

Tabela 5.23 (Continuação) - b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Ni10raFo	Ze20srFo	NigtFo	Ni10caFo
$C_{estimada}$ (ppm)	3.047 (0.052)	3.442 (0.130)	3.978 (0.784)	3.175 (0.289)
$C_{esperada}$ (ppm)	3.509	3.455	3.509	3.454
Recuperação (%)	86.849	99.609	113.366	91.943
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.108	0.252	1.394	0.584
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.831	98.983	94.924	92.395
$ssq_{resíduos}$	9.004×10^7	4.782×10^7	2.353×10^9	2.718×10^9
Iterações	50 (máx.)	14	50 (máx.)	14
LOF_{MCR} vs. PCA	0.036	0.525	4.906	7.470
Δ_{LOFMCR} (PCA - Exp.)	-1.134	-0.491	-0.170	-0.136
$R_{Excitação}$	+1.000 - +0.941	+1.000 - +0.998	+0.960 - +0.960	+0.932 - +0.932
$R_{Emissão}$	+0.931 - +0.931	+0.999 - +0.979	+0.960 - +0.960	+0.932 - +0.932
	+1.000	+1.000	+0.992	+1.000
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada - $C_{estimada}$ amostra não fortificada)				
$C_{estimada}$ (ppm)	0.975	0.990	0.963	0.988
$C_{esperada}$ (ppm)	0.975	0.975	0.975	0.975
Recuperação (%)	100.000	101.539	98.769	101.333
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	0.000	+0.015	-0.012	+0.013
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	68936.448 (610.249)	59914.731 (1099.656)	108810.836 (9550.007)	63583.382 (2930.207)
b	22622.451 (214.416)	17409.469 (386.374)	27355.766 (3355.482)	20023.588 (1029.555)
$S_{y/x}$	812.033	1463.266	12707.796	3899.104
R	0.9999	0.9995	0.9853	0.9974

b) amostras fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Ni20apFo	Ad10caFo	Ad20apFo	Ad30crFo
$C_{estimada}$ (ppm)	3.605 (0.121)	3.284 (0.204)	3.635 (0.242)	3.510 (0.145)
$C_{esperada}$ (ppm)	3.525	3.509	3.460	3.481
Rec. (%)	102.271	93.586	105.076	100.833
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.228	0.405	0.453	0.277
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.059	96.573	98.610	98.603
$ssq_{resíduos}$	1.374×10^8	5.952×10^8	7.108×10^7	1.149×10^8
Iterações	26	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR} vs. PCA	1.098	9.063×10^{-4}	0.183	1.088
Δ_{LOFMCR} (PCA - Exp.)	-0.844	-3.427	-1.207	-0.309
$R_{Excitação}$	+0.998	+1.000 - +0.985	+0.991 - +0.994	+1.000 - +0.979
	+0.998 - +0.999	+0.982 - +0.977	+0.989 - +0.987	+0.999 - +0.998
$R_{Emissão}$	+0.999 - +0.999	+0.999	+1.000	+1.000
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada - $C_{estimada}$ amostra não fortificada)				
$C_{estimada}$ (ppm)	0.963	1.091	1.034	1.025
$C_{esperada}$ (ppm)	0.975	0.975	0.975	0.975
Recuperação (%)	98.769	111.863	106.051	105.128
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	-0.012	+0.116	+0.059	+0.050
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	41907.781 (663.892)	63386.605 (1958.400)	54195.852 (1690.828)	70009.877 (1385.007)
b	11625.471 (233.264)	19303.869 (688.101)	2249.915 (594.088)	19944.993 (486.635)
$S_{y/x}$	883.413	2605.961	2249.915	1842.972
R	0.9996	0.9987	0.9984	0.9994

* Ver rodapé da Tabela 4.21.

5.4.2.4 – Avaliação global

Na Fig. 5.13 são apresentadas as representações gráficas das percentagens de ajuste do modelo obtidas com os modelos de análise multivariada na análise da matriz de etanol e do padrão de Nifedipina 2.508 ppm em função do número de componentes.

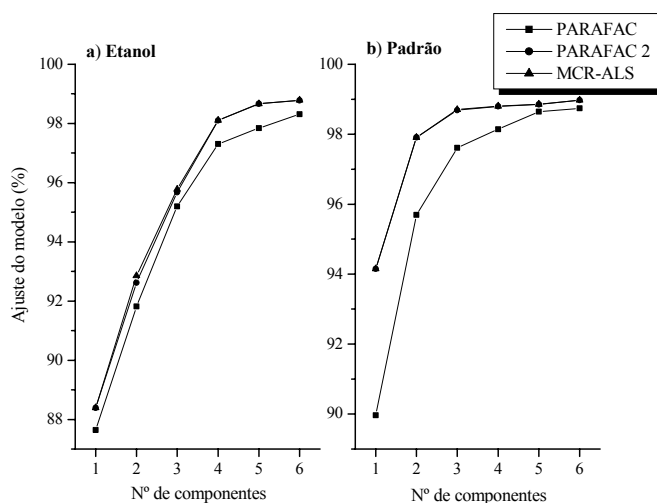


Fig. 5.13 – Gráfico dos valores de percentagem de ajuste do modelo PARAFAC obtido na análise da matriz [excitação × emissão × concentração], PARAFAC2 na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] e MCR-ALS na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão] do a) solvente etanol e b) padrão de Nifedipina 2.508 ppm com não negatividade em todas as dimensões para os modelos PARAFAC e MCR-ALS e na primeira e terceira dimensões para o modelo PARAFAC2.

Da avaliação dos gráficos apresentados na Fig. 5.13, pode verificar-se que na análise da matriz de etanol e do padrão são obtidos resultados idênticos na comparação das percentagens de ajuste do modelo obtidas com os três modelos. Para os dois tipos de matrizes, de dois a seis componentes, verifica-se que os modelos PARAFAC2 e MCR-ALS apresentam percentagens de ajuste do modelo próximas entre si e superiores às obtidas com o modelo PARAFAC. É possível ainda verificar que na análise da matriz de padrão, com o modelo PARAFAC de cinco e seis componentes, são obtidas percentagens de ajuste do modelo próximas às obtidas com os modelos PARAFAC2 e MCR-ALS com o mesmo número de componentes. Atendendo à avaliação com os dois tipos de matrizes, os modelos mais adequados parecem ser os dois modelos que não assumem a estrutura trilinear dos dados. Tal facto, parece indicar que apesar da estrutura trilinear dos dados, algum desvio a essa trilinearidade é observada.

Na Fig. 5.14 são apresentadas as representações gráficas dos coeficientes de correlação linear das estimativas do componente principal na dimensão do espectro de excitação, de emissão e concentração obtidos com os três modelos na análise de cada uma das amostras não fortificadas e os verificados experimentalmente. Para representação gráfica, se mais que um espectro de excitação ou emissão é estimado, com o modelo MCR-ALS é considerado o primeiro espectro estimado e com o modelo PARAFAC2 o primeiro espectro ou o espectro estimado ao c.d.o. respectivamente de emissão ou excitação de fluorescência máxima.

Como se pode verificar nos gráficos da Fig. 5.14, de uma forma geral, são obtidas melhores estimativas do componente principal nas três dimensões pelo modelo MCR-ALS.

No que diz respeito às estimativas do espectro de excitação, excepto para as amostras Ze20sr e Nigt com o modelo PARAFAC2, as estimativas com um coeficiente correlação superior são obtidas com o modelo MCR-ALS. Uma maior proximidade nos coeficientes de correlação linear obtidos é encontrada com os modelos PARAFAC e PARAFAC2. Assim mesmo, são encontradas de uma forma geral, melhores estimativas pelo modelo PARAFAC2 quando se compara com as obtidas pelo modelo PARAFAC.

Também, no que diz respeito às estimativas do espectro de emissão, as estimativas com um coeficiente correlação superior são obtidas de uma forma geral com o modelo MCR-ALS. No entanto, uma maior proximidade é encontrada nos coeficientes de correlação linear obtidos com este modelo e o modelo PARAFAC2. Com o modelo PARAFAC, só para as amostras Nigt, Ni20ap e Ad20ap são encontrados coeficientes de correlação linear próximos aos obtidos com os outros dois modelos. Para as restantes amostras, são obtidos com o modelo PARAFAC coeficientes de correlação linear mais baixos.

De uma forma geral, são obtidos coeficientes de correlação linear de ajuste linear na dimensão de concentração próximos com os três modelos. As maiores diferenças, são encontradas para a amostra Nigt com o modelo PARAFAC e Ad30cr com o modelo PARAFAC2 com coeficientes de correlação inferiores aos obtidos com os outros dois modelos.

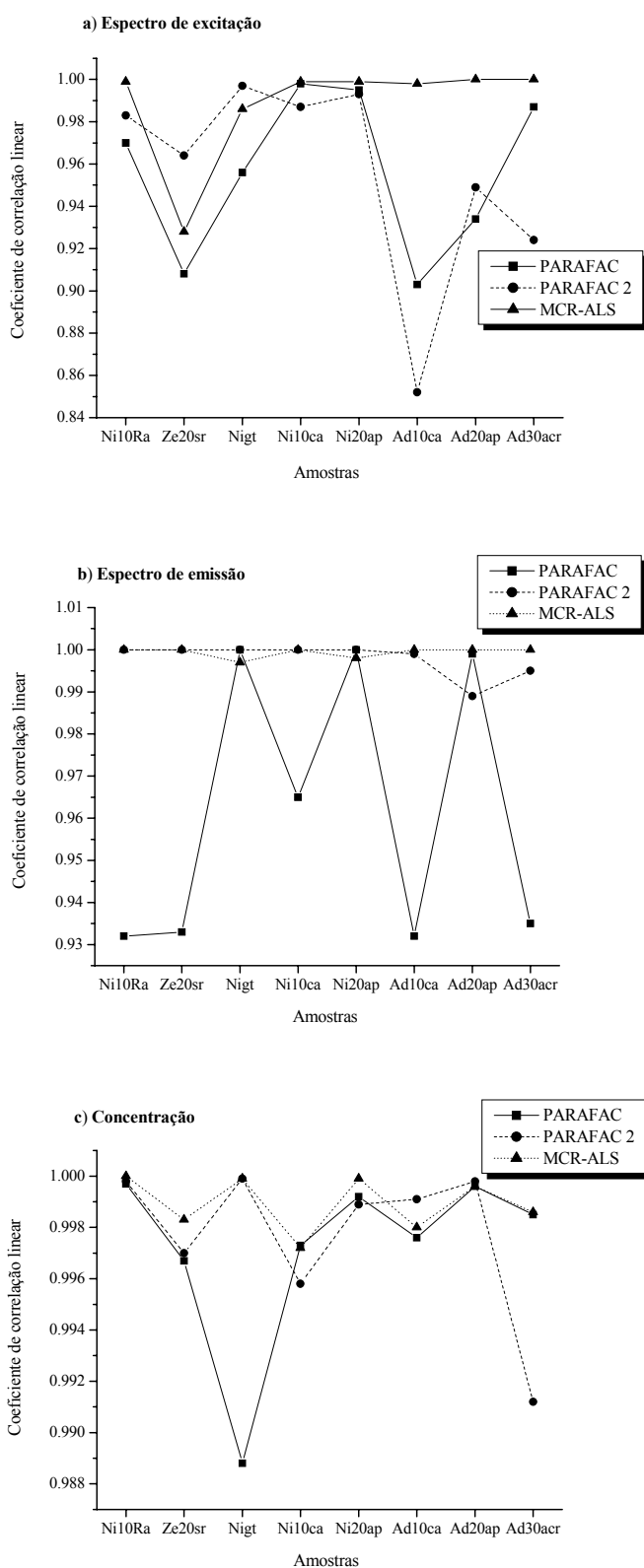


Fig. 5.14 – Comparação dos coeficientes de correlação linear do componente principal entre os espectros de excitação a), espectros de emissão b) e concentração c) estimados na análise das amostras não fortificadas pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS e os obtidos experimentalmente.

Na Fig. 5.15 são apresentadas as representações gráficas das recuperações e dos erros de previsão obtidos na análise das amostras não fortificadas com os três modelos. As recuperações e erros de previsão obtidos por análise directa são também representados.

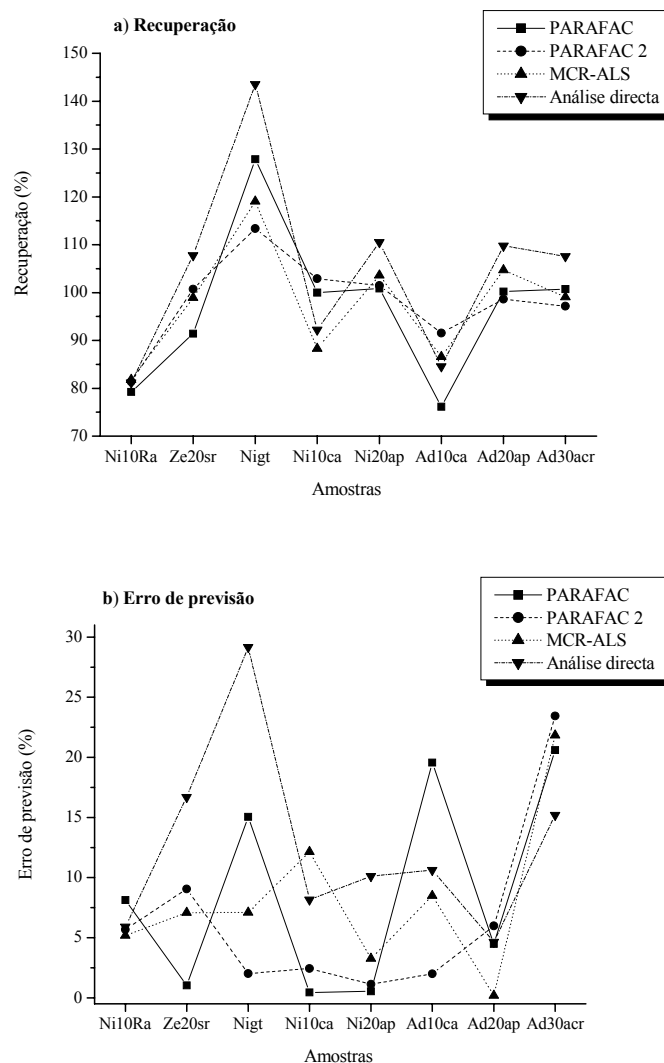


Fig. 5.15 – Comparação da recuperação a) e erros de previsão b) obtidos com cada amostra não fortificada por análise directa e pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS.

Como se pode ver na Fig. 5.15 são encontrados por análise directa recuperações e erros de previsão mais altos. De uma forma geral com os três modelos são encontradas para todas as amostras recuperações próximas. Erros de previsão de uma forma geral menores são encontrados para a maioria das amostras para o modelo PARAFAC2. Erros de previsão baixos são encontrados para as amostras Ze20sr, Ni10ca e Ni20ap com o modelo PARAFAC e para as amostras Ni10ra e Ad20ap com o modelo MCR-ALS.

Na Tabela 5.24, são apresentados os valores de EPT, RMSEP, EPM e LDM obtidos com o conjunto das amostras não fortificadas analisadas por análise directa e pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS. Para os modelos de análise multivariada, é também apresentado o valor de AjMM.

Tabela 5.24 – Valores de EPM, EPT, RMSEP, LDM e AjMM obtidos com todas as amostras não fortificadas.

Modelo	Parâmetros avaliados				
	EPT (%)	RMSEP	EPM (%)	LDM (ppm)	AjMM (%)
Análise directa	17.351	7.661	12.188	0.295	----
PARAFAC	9.072	1.514	7.032	0.538	82.672
PARAFAC2	5.071	0.846	4.042	0.358	98.658
MCR-ALS	5.993	1.000	6.210	0.300	97.454

Pelas razões previamente indicadas os valores dos parâmetros avaliados na Tabela 5.24, para o conjunto das amostras analisadas são os valores calculados não considerando a amostra Ad30cr. São encontrados pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS valores de EPT, RMSEP e EPM bastante inferiores aos obtidos por análise directa. Relativamente ao encontrado com os outros dois modelos, é encontrado pelo modelo PARAFAC valores mais elevados de EPT, RMSEP, EPM e LDM e um valor mais baixo de AjMM. Os modelos PARAFAC2 e MCR-ALS apresentam valores próximos de EPT e RMSEP. Relativamente ao modelo MCR-ALS, é obtido com o modelo PARAFAC2 um menor valor de EPT e maiores valores de LDM e AjMM. O menor valor de LDM de entre os três modelos, próximo do obtido por análise directa, é encontrado com o modelo MCR-ALS.

Atendendo a todos os critérios avaliados as estimativas concentração mais adequadas são obtidas com o modelo PARAFAC2. Com o modelo MCR-ALS, associadas às melhores estimativas nas três dimensões, são também obtidas estimativas adequadas de concentração. Com o modelo PARAFAC, apesar das piores estimativas obtidas nas três dimensões, para algumas amostras são também obtidas estimativas de concentração adequadas.

5.5. Referências

- [1] – Ali, S. L., Nifedipine, in *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, Vol. 18*. Academic Press, New York, 1989, pp. 221 – 287.
- [2] – Pedersen, O. L., Christensen, C. K., Mikkelsen, E. e Rämisch, K. D., Relationship between the antihypertensive effect and steady-state plasma concentration of Nifedipine given alone or in combination with a beta-adrenoceptor blocking agent. *European Journal of Clinical Pharmacology* **18** (1980) 287 – 293.
- [3] – Schlobmann, V. K., Fluorometrische bestimmung des 4-(2'-nitrophenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarbonsäuredimethylester und seines hautmetaboliten. *Drug Research/Arzneimittel-Forschung* **22** (1972) 60 – 62.
- [4] – Roth, M. Fluorescence reaction for amino acids. *Analytical Chemistry* **43** (1971) 880 – 882.
- [5] – Karadi, A. B., Ravi, U. M., Shobha, M. e Raju, S. A. Spectrophotometric determination of Nifedipine. *The Eastern Pharmacist* **43** (2000) 117 – 118.

consideradas como ésteres cíclicos também reagem de forma idêntica. Na Fig. 6.1 são apresentadas as reacções envolvidas na reacção de um éster de ácido acético com hidroxilamina e um sal férrico.

Atendendo à possibilidade de determinação espectrofotométrica de vários compostos com base nesta reacção, foram estudados por diversos autores a influência de diferentes variáveis da reacção, a estabilidade do complexo corado e o mecanismo da reacção [2,3,4].

As variáveis de reacção estudadas foram o solvente utilizado, a concentração de ião férrico, a concentração de hidroxilamina, a quantidade em excesso de ácido, a temperatura e o tempo da reacção. No que concerne às variáveis da reacção, é referido que para muitos dos ésteres estudados a reacção após 30 min não ocorre à temperatura ambiente. Só a temperaturas superiores, da ordem de 72 °C, o desenvolvimento de cor e a estabilidade do complexo são consideradas satisfatórias.

A formação e a estabilidade do complexo são ainda afectadas pela concentração do ião férrico e pelo excesso de ácido necessário para a neutralização do hidróxido de sódio inicialmente utilizado. A concentração de ião férrico é considerada importante para o desenvolvimento de cor e estabilidade do complexo. Em [2] um valor de 4.8 mM e em [4] de 30 mM são indicados como valores de concentração de ião férrico mínimos ideais. Baixas concentrações de ácido foram encontradas mais favoráveis para a formação do complexo, apesar de ainda ser referido que a concentrações mais baixas de ácido é encontrada uma menor estabilidade do complexo.

O Diltiazem apresenta um grupo éster na sua molécula, ver Fig. 1.6 do capítulo 1, e como tal, esta reacção pode também ser utilizada tanto para a sua identificação como para a sua quantificação espectrofotométrica. Na literatura são encontradas duas referências em que a determinação espectrofotométrica do Diltiazem é feita recorrendo a esta reacção [5,6]. Nestas, são indicadas condições de reacção diferentes para a determinação do Diltiazem. Tal como noutras referências, o reagente de hidroxilamina utilizado, é preparado por adição de volumes iguais de soluções de hidroxilamina e hidróxido de sódio 12.5 % (m/V), o sal férrico utilizado é diluído em ácido perclórico diluído e a temperatura de reacção é aproximadamente 70 °C. Em [5], é utilizado, como solvente da solução padrão o etanol, como solvente do reagente de hidroxilamina o metanol, como sal férrico o perclorato férrico e o tempo de reacção é de 5 min. São descritas interferências e previamente à dosagem espectrofotométrica recorre-se a uma separação por cromatografia

líquida de camada fina. Em [6], é utilizado, como solvente da solução padrão o metanol, como solvente do reagente de hidroxilamina a água, como sal férrico o sulfato de amónia férrico e o tempo de reacção é de 20 min. Não são descritas interferências, mas previamente à dosagem espectrofotométrica em comprimidos procede-se a uma extracção por clorofórmio. Em ambas as referências é descrita a obtenção de um derivado corado com absorvância máxima por volta de 500 nm. Gamas lineares de trabalho entre 40 a 400 ppm e entre 50 a 800 ppm são indicadas.

A possibilidade de quantificação espectrofotométrica do Diltiazem a c.d.o. mais altos, na presença de possíveis interferências, e a obtenção de estruturas de dados seguindo a cinética da reacção, adequadas a utilização de métodos de decomposição tridimensional, levou a considerar a possibilidade de quantificação da Diltiazem através desta reacção.

6.2. Procedimento experimental

O registo de cada uma das matrizes obtidas, seguindo a cinética da reacção, foi efectuado na gama de c.d.o. de 240 a 800 nm, com um tempo de registo de 60 s, tempo de ciclo de 1 s, tempo de integração de 0.5 s e com o obliterador aberto.

As soluções padrão de Diltiazem foram preparadas por pesagem rigorosa para a concentração final pretendida após secagem em forno a 105 °C durante 2 horas. Foram utilizadas soluções padrão de concentrações da ordem dos 4000 ppm em água, metanol, etanol e isopropanol na fase de optimização e em metanol na fase de quantificação. Soluções padrão de menores concentrações foram preparadas por diluição rigorosa desta solução padrão com cada um dos solventes utilizados.

A massa a pesar das diferentes formas farmacêuticas, para uma concentração estimada em Diltiazem de 4000 ppm, foi calculada de acordo com a respectiva dosagem da Diltiazem nas diferentes formas farmacêuticas. As soluções amostras foram preparadas por pesagem rigorosa do pó, a partir de uma mistura de 20 comprimidos ou cápsulas, correspondente a um comprimido. Atendendo à dosagem, e só nos casos em que não foi possível obter uma solução amostra nesta gama de concentrações, foram preparadas soluções de concentrações diferentes. As soluções amostra foram posteriormente decantadas e centrifugadas a 13000 rpm durante 10 min.

Tal como na preparação das soluções anteriores, as soluções de hidroxilamina, hidróxido de sódio e sulfato de amónia e férrico foram também preparadas por pesagem rigorosa do sólido para a concentração pretendida. Foram preparadas soluções aquosas de hidroxilamina e hidróxido de sódio e soluções do sulfato de amónia e férrico em ácido perclórico diluído 7 % (m/m). O reagente de hidroxilamina adicionado foi preparado por adição de volumes iguais de soluções de hidroxilamina e hidróxido de sódio de forma à obtenção da concentração pretendida de cada um dos compostos. Na fase de optimização foram utilizadas soluções de hidroxilamina, hidróxido de sódio e sulfato de amónia e férrico de concentrações diversas. Na fase de quantificação foram utilizadas soluções de hidroxilamina 9.350 % (m/V), de hidróxido de sódio 18.750 % (m/V) e de sulfato de amónia e férrico 2.000 % (m/V). O ácido inicialmente utilizado para neutralização da base foi o ácido perclórico 14 % (m/V) preparado por diluição do ácido perclórico concentrado 70 % (m/m). Na fase de quantificação foi utilizado o volume mínimo de ácido perclórico

necessário para a neutralização do hidróxido de sódio e na fase de optimização foram utilizados volumes superiores.

Na fase de optimização a avaliação do método foi feita inicialmente em balões de diluição para um volume total de 25 mL e posteriormente em cuvete de quartzo para um volume total de 2.5 mL. Na fase de quantificação todas as determinações foram efectuadas numa cuvete de quartzo de 1 cm para um volume total de solução de 2.5 mL por adição sucessiva dos reagentes utilizados. A ordem de adição dos reagentes foi a seguinte:

- 1) Volume adequado de solução a determinar (branco, padrão, amostra ou amostra fortificada).
- 2) Volume de metanol suficiente para obter 0.5 mL (atendendo ao volume anteriormente adicionado).
- 3) 0.300 mL de reagente de hidroxilamina (hidroxilamina - 9.375 % / hidróxido de sódio - 18.750 %).
- 4) Volume de metanol suficiente para perfazer os 2.5 mL.
- 4) Volume de ácido perclórico diluído mínimo para neutralizar o hidróxido de sódio (\cong 0.410 mL - 0.430 mL).
- 6) 0.100 mL de sulfato de amónia e férrico 2.000 % (m/V).

A adição do reagente férrico (sulfato de amónia e férrico 2.000 %) foi feita após o início do registo. É de notar que também na fase de optimização, e exceptuando o volume de ácido perclórico que varia, foi adicionado um volume idêntico dos outros reagentes.

6.3. Optimização

Na fase de optimização, pretendeu-se verificar quais as condições mais adequadas de reacção no que respeita a sua sensibilidade e velocidade. Esta avaliação foi efectuada verificando a gama linear obtida, o limite de detecção, a absorvância ao c.d.o. de absorvância máxima bem como os tempos de reacção para atingir essa absorvância máxima. De uma forma geral procurou-se uma absorvância mais elevada, ao c.d.o. maior atingida com um tempo de reacção menor.

Após uma avaliação inicial, a optimização das condições de reacção foi efectuada recorrendo a modelos de planeamento experimental. Atendendo às características próprias desta reacção em dois passos, a primeira reacção em meio básico e a segunda reacção em meio ácido, foi necessário proceder-se a uma avaliação separada. Juntamente com as outras variáveis do planeamento, num dos planeamentos iniciais, com uma concentração fixa de hidróxido de sódio, avaliaram-se adições de volumes diferentes de ácido e num segundo planeamento, com um volume fixo de ácido, mínimo para neutralizar o hidróxido de sódio, avaliaram-se concentrações diferentes de hidróxido de sódio. De forma a facilitar a sua identificação neste capítulo, os dois tipos de planeamento experimental foram designados por planeamento experimental tipo 1 e 2 com a seguinte legenda:

- Planeamento experimental tipo 1 - Concentração fixa de hidróxido de sódio 12.5%, com variação do volume de ácido adicionado para neutralizar o hidróxido de sódio.
- Planeamento experimental tipo 2 - Volume fixo de ácido, mínimo para neutralizar o hidróxido de sódio, com variação da concentração de hidróxido de sódio.

Para todos os planeamentos experimentais efectuados foram avaliadas três variáveis de resposta:

- 1) Absorvância máxima.
- 2) c.d.o. de absorvância máxima.
- 3) Tempo de reacção.

As variáveis do planeamento utilizadas nos planeamentos de varrimento factoriais fraccionados iniciais foram:

- Concentração de hidroxilamina.
- Concentração de hidróxido de sódio.

- Concentração de reagente férrico.
- Volume de ácido perclórico diluído.
- Temperatura de reacção.
- Solvente utilizado na preparação da solução padrão.

No planeamento experimental de optimização de compósito central final, as variáveis do planeamento utilizadas foram a concentração de hidroxilamina, de hidróxido de sódio e de reagente férrico.

6.3.1. Resultados

Avaliação prévia

Tendo em atenção as informações disponíveis, as avaliações feitas de início, em balões de 25 mL com uma concentração de Diltiazem em metanol de 480 ppm, confirmaram o c.d.o. de absorvância máximo esperado e a necessidade de adição de um volume de ácido suficiente que neutralizasse o hidróxido de sódio evitando assim a precipitação de hidróxido férrico. Além disso, verificou-se o aparecimento de cor à temperatura ambiente mesmo sem aquecimento e sem tempo de espera. Avaliações prévias de fluorescência foram também efectuadas, no entanto não foram obtidas intensidades de fluorescência que levassem a considerar a possibilidade de utilização desta técnica.

Verificou-se que a reacção se desenvolvia de forma rápida à temperatura ambiente. No início, de maneira a avaliar as possíveis alterações da velocidade de reacção e o seu efeito na intensidade de absorvância máxima obtida, os diferentes factores que podiam afectar a reacção foram modificados de uma forma univariada. Avaliou-se a concentração de hidróxido de sódio (pH da reacção inicial), concentração de hidroxilamina, concentração de reagente férrico, temperatura de reacção e solvente utilizado. Foi utilizado o dobro e metade das concentrações de cada um dos reagentes, os solventes metanol, etanol, água e isopropanol e uma temperatura de reacção desde a temperatura ambiente até 70 °C.

Nas condições utilizadas verificou-se que:

- A concentração mínima de hidróxido de sódio necessária para que a reacção ocorra é de 8 %.

-
- O aumento da concentração de hidróxido de sódio provoca um aumento da intensidade de absorvância.
 - O aumento da concentração de reagente férrico provoca um aumento da intensidade de absorvância.
 - Um aumento da concentração de hidroxilamina requer um aumento da concentração de hidróxido de sódio para que haja desenvolvimento de cor.
 - Com uma concentração de hidroxilamina de 6.250 %, é obtida uma intensidade de absorvância idêntica à obtida com uma concentração de hidroxilamina 12.500 %.
 - A intensidades de absorvância maiores nos solventes metanol e etanol, em comparação com as obtidas em água e isopropanol, está associada uma velocidade de reacção maior para o metanol e menor para o etanol.
 - O aumento de temperatura não parece afectar grandemente a velocidade de reacção e a intensidade de absorvância obtidas.

Atendendo a esta avaliação prévia, e para avaliações posteriores através de modelos de planeamento experimental, a reacção com a hidroxilamina e sal férrico foi efectuada com uma concentração de Diltiazem de 250 ppm. As referências iniciais consideradas, para as variáveis de planeamento foram, concentração de hidroxilamina e hidróxido de sódio de 12.5 %, concentração de reagente férrico de 1.250 %, solvente o metanol e temperatura de reacção a temperatura ambiente.

Planeamento experimental de Varrimento Factorial Fraccionado

Atendendo ao facto de se pretender fazer os dois planeamentos experimentais, tipo 1 e 2, com um maior número de variáveis do planeamento, numa gama de níveis de variação alargada e, com um menor número de experiências, foram inicialmente efectuados planeamentos de varrimento factorial fraccionado. Ainda de forma a diminuir mais o número de experiências, foram efectuados estes planeamentos de varrimento factoriais fraccionado com um nível de resolução baixo e sem amostras centrais. No nível de resolução efectuado, os efeitos principais confundem-se entre si e com as interacções de dois factores.

Planeamentos experimentais de varrimento exploratórios

Como já referido, foram inicialmente avaliadas nestes dois planeamentos, e para cada um deles, cinco variáveis do planeamento, dois níveis e três variáveis de resposta.

Para o planeamento tipo 1 as variáveis do planeamento, quatro variáveis contínuas e uma de categorias, e os dois níveis estudados foram:

- Concentração de hidroxilamina (0.625 % e 18.750 %).
- Volume de ácido perclórico diluído (0.250 mL e 1.000 mL).
- Temperatura de reacção (25 °C e 70 °C).
- Concentração de reagente férrico (0.625 % e 2.500 %).
- Solvente utilizado na preparação da solução padrão (metanol e água).

A gama de resultados obtidos com cada uma das variáveis de resposta foi:

- 1) Absorvância máxima (0.039 u.a. – 0.291 u.a.).
- 2) c.d.o. de absorvância máxima (486 nm – 510 nm).
- 3) Tempo de reacção (2.5 s – 32 s).

Para o planeamento tipo 2 as variáveis do planeamento, quatro variáveis contínuas e uma de categorias, e os níveis estudados foram:

- Concentração de hidroxilamina (0.625 % e 12.500 %).
- Concentração de hidróxido de sódio (8.000 % e 25.000 %).
- Temperatura de reacção (25 °C e 70 °C).
- Concentração de reagente férrico (0.625 % e 2.500 %).
- Solvente utilizado na preparação da solução padrão (metanol e água).

A gama de resultados obtidos com cada uma das variáveis de resposta foi:

- 1) Absorvância máxima (0.064 u.a. – 0.497 u.a.).
- 2) c.d.o. de absorvância máxima (484 nm – 532 nm).
- 3) Tempo de reacção (3 s – 15.5 s).

Da análise global dos resultados obtidos em todas as experiências, com os dois planeamentos, é de realçar os resultados mais adequados para as três variáveis de resposta encontrados com o planeamento tipo 2. Tal facto, vem reafirmar o efeito do aumento da concentração de hidróxido de sódio, uma vez que neste planeamento foram utilizadas

concentrações de hidróxido de sódio superiores a 12.5 %. É também de notar, os tempos de reacção baixos encontrados em ambos os planeamentos.

O teste de significância de avaliação dos efeitos principais efectuado é o teste da significância dos efeitos de ordem superior (HOIE). Como foi dito, a avaliação dos efeitos principais e de possíveis interacções confundem-se a este nível de resolução. No entanto, dos resultados obtidos nesta análise com os dois tipos de planeamentos de varrimento fraccionado efectuados, é de realçar que:

- 1) Só para a absorvância, no planeamento tipo 1, o modelo avaliado é globalmente válido.
- 2) Os únicos efeitos significativos avaliados são, a diminuição da absorvância pelo aumento do volume de ácido perclórico diluído (planeamento tipo 1) e a diminuição de c.d.o. pelo aumento da concentração de reagente férrico (planeamento tipo 2).
- 3) O aumento da concentração de hidroxilamina provoca um aumento do c.d.o. nos dois tipos de planeamento com diminuição (planeamento tipo 1) ou aumento de absorvância (planeamento tipo 2) associado a um efeito contrário no tempo de reacção.
- 4) O aumento da concentração de hidróxido de sódio provoca um aumento em todas as variáveis de resposta.
- 5) O aumento de temperatura de reacção provoca uma diminuição do tempo de reacção nos dois tipos de planeamento associado, no planeamento tipo 1, a um aumento de absorvância e diminuição de c.d.o. e, no planeamento tipo 2, a uma diminuição de absorvância e aumento de c.d.o..
- 6) O aumento da concentração de reagente férrico provoca um aumento de absorvância com diminuição do c.d.o. nos dois tipos de planeamento.
- 7) A água provoca uma diminuição em todas as variáveis de resposta.

Atendendo a que a velocidade de reacção obtida já é baixa à temperatura ambiente o peso desta variável de resposta é pouco significativo na escolha dos níveis de variáveis de resposta mais adequadas. Pelos resultados obtidos, as condições mais adequadas parecem ser metanol como solvente, volume mínimo de ácido para neutralizar o hidróxido de sódio, aumento da concentração de hidróxido de sódio, aumento da concentração de reagente férrico e a reacção à temperatura ambiente.

Planeamentos experimentais de varrimento de confirmação

De forma a confirmar estas conclusões, foram efectuados dois novos planeamentos experimentais de varrimento fraccionados com um nível de resolução superior. No nível de resolução efectuado, os efeitos principais não se confundem entre si nem com as interacções de dois factores, mas as interacções de dois factores podem confundir-se entre si. Os planeamentos experimentais fraccionados foram efectuados tendo como solvente o metanol, com quatro variáveis do planeamento, com dois níveis, duas repetições e três amostras centrais.

Para o planeamento tipo 1, as variáveis do planeamento contínuas e os níveis estudados foram:

- Concentração de hidroxilamina (6.250 % e 18.750 %, central – 12.500 %)
- Volume de ácido perclórico diluído (0.250 mL e 1.000 mL, central – 0.625 mL).
- Temperatura de reacção (25 °C e 70 °C, central - 47.5 °C).
- Concentração de reagente férrico (0.625 % e 1.875 %, central - 1.250 %).

A gama de resultados obtidos com cada uma das variáveis de resposta foi:

- 1) Absorvância máxima (0.105 u.a. – 0.533 u.a.).
- 2) c.d.o. de absorvância máxima (486 nm – 512 nm).
- 3) Tempo de reacção (2 s – 22.5 s).

Para o planeamento tipo 2, as variáveis do planeamento contínuas e os níveis estudados foram:

- Concentração de hidroxilamina (0.625 % e 12.500 %, central - 6.563 %).
- Concentração de hidróxido de sódio (8.000 % e 18.750 %, central - 13.375 %).
- Temperatura de reacção (25 °C e 70 °C, central - 47.5 °C).
- Concentração de reagente férrico (0.625 % e 1.875 %, central - 1.250 %).

A gama de resultados obtidos com cada uma das variáveis de resposta foi:

- 1) Absorvância máxima (0.074 u.a. – 0.455 u.a.).
- 2) c.d.o. de absorvância máxima (484 nm – 510 nm).
- 3) Tempo de reacção (2.5 s – 7 s).

Da análise global dos resultados obtidos em todas as experiências, com os dois tipos de planeamentos, é de realçar o seguinte:

- (i) No planeamento tipo 1, um aumento significativo tanto do limite inferior como superior do intervalo do intervalo de variação da intensidade de absorvância.
- (ii) No planeamento tipo 2, uma redução significativa do intervalo de variação do tempo de reacção.
- (iii) Nos dois planeamentos, intervalos de variação de c.d.o. idênticos aos anteriormente encontrados.

Na Tabela 6.1, para o planeamento tipo 1, e na Tabela 6.2, para o planeamento tipo 2, são apresentados os resultados da avaliação dos efeitos principais e interacções nas variáveis de resposta de cada uma das variáveis do planeamento assim como os resultados da avaliação do modelo linear total por ANOVA. São efectuados os testes de significância HOIE e “Center”. O modelo total é avaliado por ANOVA através da razão F, pelo respectivo valor p, e pelo valor de coeficiente de correlação múltipla.

Tabela 6.1 – Resultados obtidos com o segundo planeamento fraccionado tipo 1, por análise dos efeitos principais e interacções, através da avaliação da resposta de um padrão de Diltiazem 250 ppm, em metanol e com concentração de hidróxido de sódio de 12.5%.*

Variáveis do planeamento	Variáveis de resposta								
	Absorvância			c.d.o.			t _{reacção}		
	HOIE(p)	Center	Coef. b	HOIE (p)	Center	Coef. b	HOIE (p)	Center	Coef. b
Hidroxilamina (A)	---(0.000)	--	-0.058	ns (0.172)	+	+1.625	ns (0.515)	ns	+0.750
Ác. perclórico (B)	---(0.000)	---	-0.122	ns (0.085)	+	+2.125	ns (0.481)	ns	+0.813
T _{reacção} (C)	---(0.000)	--	-0.026	ns (0.122)	-	-1.875	-(0.034)	ns	-2.813
Regente férrico (D)	+++ (0.000)	++	+0.055	-(0.029)	--	-2.875	ns (0.337)	ns	-1.125
AB = CD	++(0.008)	+	+0.016	ns (0.240)	-	-1.375	ns (0.289)	ns	+1.250
AC = BD	++(0.002)	++	+0.021	+(0.042)	+	+2.625	ns (0.390)	ns	-1.000
AD = BC	+(0.022)	+	+0.013	ns (0.172)	+	+1.625	ns (0.550)	ns	-0.688
Modelo total (ANOVA)									
Razão F (p)	167.523 (0.000)			3.701 (0.043)			1.585 (0.266)		
R_{múltipla}	0.997			0.874			0.762		

* Ver rodapé da Tabela 5.1.

Como se pode ver na Tabela 6.1, excepto para o modelo na avaliação do tempo de reacção, os modelos, utilizados na avaliação dos efeitos principais e interacções, são globalmente válidos. É de realçar que, na avaliação da intensidade de absorvância, os

efeitos principais e as interacções avaliadas entre as variáveis do planeamento são estatisticamente significativas.

Nas condições avaliadas, pela análise dos efeitos principais, das interacções significativas possíveis e dos coeficientes de regressão (b), verificou-se que:

- 1) O aumento da concentração de hidroxilamina, do volume de ácido perclórico e da temperatura de reacção provocam uma diminuição significativa na intensidade de absorvância.
- 2) O aumento de concentração do reagente férrico provoca um aumento significativo de absorvância e uma diminuição significativa do c.d.o..
- 3) O aumento de temperatura de reacção provoca uma diminuição do tempo de reacção associada a uma diminuição da intensidade de absorvância e do c.d.o..
- 4) Possíveis interacções nas variáveis de resposta são mais prováveis pela avaliação da intensidade de absorvância.

Da análise da curvatura de resposta neste planeamento, o mais relevante é avaliado para o reagente férrico, em que um máximo de intensidade de absorvância e um mínimo de c.d.o. se podem encontrar dentro da gama de concentrações avaliada. Ainda, se verifica que é possível encontrar para a hidroxilamina e para o ácido perclórico, mínimos para a intensidade de absorvância e máximos para o c.d.o., e para a temperatura de reacção mínimos de intensidade de absorvância e c.d.o..

Tabela 6.2 – Resultados obtidos com o segundo planeamento fraccionado tipo 2, por análise dos efeitos principais e interacções, através da avaliação da resposta de um padrão de Diltiazem 250 ppm, em metanol e com volume de ácido perclórico fixo.*

Variáveis do planeamento	Variáveis de resposta								
	Absorvância			c.d.o.			t _{reacção}		
	HOIE(p)	Center	Coef. b	HOIE (p)	Center	Coef. b	HOIE (p)	Center	Coef. b
Hidroxilamina (A)	+++ (0.000)	+	+0.102	+++ (0.000)	+	+8.500	ns (0.922)	ns	+0.031
NaOH (B)	+++ (0.000)	+	+0.053	-- (0.003)	ns	-2.250	ns (0.625)	ns	+0.156
T_{reacção} (C)	-- (0.007)	ns	-0.021	- (0.022)	ns	-1.500	ns (0.497)	ns	-0.219
Reagente férrico (D)	++ (0.002)	ns	+0.027	--- (0.000)	-	-4.750	ns (0.768)	ns	-0.094
AB = CD	+++ (0.000)	+	+0.048	+++ (0.000)	ns	+3.500	ns (0.625)	ns	+0.156
AC = BD	ns (0.978)	ns	-0.0002	+++ (0.000)	+	+4.750	ns (0.297)	-	-0.344
AD = BC	ns (0.701)	ns	-0.002	+ (0.022)	ns	+1.500	ns (0.166)	-	-0.469
Modelo total (ANOVA)									
Razão F (p)	73.375 (0.000)			70.698 (0.000)			0.670 (0.695)		
R_{múltipla}	0.992			0.992			0.608		

* Ver rodapé da Tabela 5.1.

Como se pode ver na Tabela 6.2, tal como no planeamento tipo 1, excepto para o modelo na avaliação do tempo de reacção, os modelos utilizados na avaliação dos efeitos principais e interacções são globalmente válidos. Neste planeamento verifica-se que, para a intensidade de absorvância, todos os efeitos principais, e para o c.d.o., além destes todas as interacções possíveis entre as variáveis do planeamento, são estatisticamente significativos.

Nas condições avaliadas, pela análise dos efeitos principais, das interacções significativas possíveis e dos coeficiente de regressão (b), verificou-se que:

- 1) O aumento da concentração de hidroxilamina provoca um aumento significativo na intensidade de absorvância e no c.d.o..
- 1) O aumento da concentração de hidróxido de sódio provoca um aumento significativo na intensidade de absorvância e uma diminuição do c.d.o..
- 3) O aumento de temperatura de reacção provoca uma diminuição significativa da intensidade de absorvância e do c.d.o., com diminuição não significativa no tempo de reacção.
- 2) O aumento de concentração do reagente férrico provoca um aumento significativo de absorvância e uma diminuição significativa do c.d.o..
- 4) Possíveis interacções nas variáveis de resposta são mais prováveis pela avaliação do c.d.o..

Da análise da curvatura da resposta neste planeamento, o mais relevante é avaliado para a hidroxilamina e para o hidróxido de sódio, em que um máximo de intensidade de absorvância se pode encontrar na gama de valores de concentração avaliadas para as duas variáveis de resposta. É de realçar também que, nestas condições, quer para a temperatura de reacção quer para o reagente férrico a análise de efeitos principais e a análise de curvatura confirmam o anteriormente obtido no planeamento experimental tipo 1.

Da análise destes segundos planeamentos experimentais tipo 1 e 2 é possível confirmar que, um volume menor de ácido perclórico para neutralizar o hidróxido de sódio, temperatura ambiente, uma concentração maior de hidróxido de sódio e de reagente férrico na gama de concentrações previamente avaliadas, parecem ser as condições adequadas para se obter uma maior sensibilidade na resposta a um tempo de reacção mínimo. Modelos quadráticos, como os do planeamento experimental de optimização, são também necessários para se poder avaliar melhor estas zonas de máximos e mínimos, e eventualmente definir exactamente pontos máximos ou mínimos das variáveis de resposta.

Planeamento Experimental de Optimização Box Behnken

Atendendo aos resultados anteriores, de forma a confirmar os resultados já obtidos, de forma a se poderem definir zonas de resposta de maior intensidade de absorvância ao maior c.d.o. assim como definir máximos de resposta, foram ainda efectuados dois planeamentos de optimização Box Behnken tipo 1 e tipo 2. Estes foram feitos, tendo como solvente o metanol, à temperatura ambiente, com três variáveis do planeamento, com dois níveis, sem repetições, três amostras centrais e três variáveis de resposta. Para as variáveis do planeamento foram utilizados um intervalo pequeno de volume de ácido perclórico adicionado, níveis de concentração para o hidróxido de sódio e reagente férrico maiores e níveis de concentração de hidroxilamina com o limite inferior maior.

Para o planeamento tipo 1, com uma concentração de hidróxido de sódio de 12.5 %, as três variáveis do planeamento e os níveis estudados foram:

- Concentração de hidroxilamina (6.250 % e 18.750 %, central – 12.5 %).
- Volume de ácido perclórico diluído (0.250 mL e 0.500 mL, central – 0.375 mL).
- Concentração de reagente férrico (1.000 % e 2.000 %, central - 1.500 %).

Os resultados obtidos para as variáveis de resposta foram:

- 1) Absorvância máxima (0.271 u.a. – 0.531 u.a.).
- 2) c.d.o. de absorvância máxima (508 nm – 510 nm).
- 3) Tempo de reacção (3 s – 31 s).

Para o planeamento tipo 2 as três variáveis do planeamento e os níveis estudados foram:

- Concentração de hidroxilamina (6.250 % e 12.500 %, central - 9.375 %).
- Concentração de hidróxido de sódio (8.000 % e 25.000 %, central - 18.750 %).
- Concentração de reagente férrico (1.000 % e 2.000 %, central - 1.500 %).

A gama de resultados obtidos com cada uma das variáveis de resposta foi:

- 1) Absorvância máxima (0.451 u.a. – 0.555 u.a.).
- 2) c.d.o. de absorvância máxima (506 nm – 514 nm).
- 3) Tempo de reacção (3 s – 29.5 s).

Relativamente aos resultados das variáveis de resposta anteriormente obtidos, foram encontrados com os dois tipos de planeamento, para a intensidade e c.d.o. absorvância máxima, intervalos de variação menores. Para o tempo de reacção, foi encontrado um intervalo de variação idêntico no planeamento tipo 1 e um intervalo um pouco maior para o planeamento tipo 2.

Na Tabela 6.3, para o planeamento tipo 1, e na Tabela 6.4, para o planeamento tipo 2, são apresentados os resultados da avaliação dos efeitos das variáveis do planeamento nas variáveis da resposta, da avaliação do modelo linear total, do modelo quadrático e de como os efeitos quadráticos podem ou não melhorar o modelo linear. São efectuados os testes de significância HOIE e “Center”. O modelo linear total, o modelo total quadrático, a importância dos efeitos quadráticos e a forma da superfície de resposta são avaliados por ANOVA através da razão F, pelo respectivo valor p e pelo valor de coeficiente de correlação múltipla para cada uma das variáveis da resposta. Além desta avaliação é também apresentado para cada uma das variáveis da resposta o respectivo valor máximo, mínimo ou de inflexão previsto.

Tabela 6.3 – Resultados obtidos no planeamento de optimização Box Behnken tipo 1, por análise dos a) efeitos principais e das b) superfícies de resposta, através da avaliação da resposta de um padrão de Diltiazem 250 ppm, em metanol, com concentração de hidróxido de sódio de 12.5 % e à temperatura ambiente.*

a) Efeitos principais

Variáveis do planeamento	Variáveis de resposta								
	Absorvância			c.d.o.			t _{reacção}		
	HOIE(p)	Center	Coef. b.	HOIE(p)	Center	Coef. b.	HOIE(p)	Center	Coef. b.
Hidroxilamina	---(0.001)	--	-0.071	ns(1.000)	ns	0.000	ns(0.558)	ns	-1.938
Ác. perclórico	--(0.005)	-	-0.051	ns(0.256)	+++	+0.250	ns(0.249)	+	+3.938
Reag. férrico	++(0.010)	+	+0.045	ns(0.256)	---	-0.250	ns(0.878)	ns	-0.500
Modelo total (ANOVA)									
Razão F (p)	18.017 (0.0006)			1.000 (0.441)			0.649 (0.606)		
R _{múltipla}	0.933			0.522			0.442		

b) Superfícies de resposta

Superfícies de resposta			
Ponto previsto	Absorvância		t _{reacção}
	Máximo	Inflexão	
Hidroxilamina (%)	9.433	510.125 nm	5.812 s
Ácido perclórico (mL)	0.061		
Reagente férrico (%)	2.067		
Avaliação do modelo			
Razão F (p)	42.374 (0.000)	1.156 (0.413)	1.085 (0.445)
R _{múltipla}	0.985	0.681	0.670
Efeitos quadráticos [razão F (p)]	17.550 (0.0007)	0.978 (0.450)	1.252 (0.354)
Perda de ajuste [razão F (p)]	1.293 (0.497)	np (0.000)	24.878 (0.039)

* Ver rodapé da Tabela 5.1.

Como se pode ver na Tabela 6.3, só para a absorvância os modelos utilizados na avaliação dos efeitos principais e das interacções são globalmente válidos. Nas condições avaliadas, pela análise dos efeitos principais, das interacções significativas possíveis e dos coeficiente de regressão (b), verificou-se que:

- 1) As interacções avaliadas não são estatisticamente significativas.
- 2) O aumento de concentração de hidroxilamina, reagente férrico e de volume de ácido perclórico confirmam os efeitos nas variáveis de resposta anteriormente verificados.

Na análise das superfícies de resposta para as três variáveis de resposta, o modelo só é globalmente válido para a intensidade de absorvância. É de notar ainda que, a curvatura desta superfície resposta confirma a tendência anterior. Quer para o c.d.o. quer para o tempo de reacção os efeitos quadráticos não afectam os modelos. Há uma perda de ajuste significativa na análise da superfície de resposta do c.d.o. e do tempo de reacção, indicando que um modelo linear descreve melhor a resposta destas duas variáveis.

Como é indicado na Tabela 6.3, a partir das superfícies de resposta obtidas, são previstos, um ponto máximo para a absorvância e pontos de inflexão para as outras duas variáveis de resposta. Da análise das superfícies de resposta obtidas para as três variáveis de resposta, o mais relevante são os resultados obtidos na avaliação da intensidade de absorvância.

Para a intensidade de absorvância, da análise das três superfícies de resposta obtidas, confirma-se em todas o máximo para uma concentração de hidroxilamina 9.375 %, um volume de ácido perclórico de 0.250 mL e uma concentração de reagente férrico 2.000 %. Tal facto, além de vir confirmar a utilização de um volume mínimo de ácido perclórico, e eventualmente um valor superior de concentração de reagente férrico, indica-nos como valor óptimo de concentração de hidroxilamina 9.375 % para uma concentração de hidróxido de sódio 12.5 %.

Para o c.d.o. e tempo de reacção, são encontradas nas superfícies de resposta obtidas, zonas de resposta máxima e mínima e daí o ponto de inflexão encontrados pelo modelo. Apesar da não validade dos modelos quadráticos, para estas duas variáveis de resposta, são encontrados pela análise das superfícies de resposta um ponto máximo, para o c.d.o., e um ponto mínimo, para o tempo de reacção.

Tabela 6.4 – Resultados obtidos do planeamento de optimização Box Behnken tipo 2, por análise dos a) efeitos principais e das b) superfícies de resposta, através da avaliação da resposta de um padrão de Diltiazem 250 ppm, em metanol, com volume de ácido perclórico fixo e à temperatura ambiente.*

a) Efeitos principais

Variáveis do planeamento	Variáveis de resposta								
	Absorvância			c.d.o.			t _{reacção}		
	HOIE(p)	Center	Coef. b	HOIE(p)	Center	Coef. b	HOIE(p)	Center	Coef. b
Hidroxilamina	ns(0.945)	ns	-0.0008	ns (0.256)	ns	-0.500	ns(0.389)	ns	-2.937
NaOH	ns(0.988)	ns	-0.0002	ns (0.256)	ns	+0.500	ns(0.836)	ns	+0.688
Reagente férrico	ns(0.066)	+	+0.024	ns (1.000)	ns	0.000	ns(0.970)	ns	-0.125
Modelo total (ANOVA)									
Razão F (p)	1.518 (0.282)			1.000 (0.441)			0.293 (0.830)		
R _{múltipla}	0.602			0.522			0.315		

b) Superfícies de resposta

Superfícies de resposta			
	Absorvância		t _{reacção}
	c.d.o.		
Ponto previsto	Inflexão - 0.493 u.a.		Máximo - 511.440nm
Hidroxilamina (%)	9.244		Inflexão - 17.448 s
NaOH (%)	18.714		8.705
Reagente férrico (%)	-0.026		20.089
			1.500
			1.385
Avaliação do modelo			
Razão F (p)	1.009 (0.481)		0.637 (0.700)
R _{múltipla}	0.656		0.569
Efeitos Quadráticos [razão F (p)]	0.432 (0.736)		0.982 (0.448)
Perda de ajuste [razão F (p)]	5.601 (0.159)		0.637 (0.717)

* Ver rodapé da Tabela 5.1.

Como se pode ver na Tabela 6.4, e atendendo a já se estar a trabalhar na zona de concentrações óptimas, com intervalos de variação pequenos, verifica-se que para nenhuma das variáveis os modelos utilizados na análise dos efeitos principais e das interacções são globalmente válidos. Nas condições avaliadas, pela análise dos efeitos principais, das interacções significativas possíveis e dos coeficiente de regressão (b), verificou-se que:

- 1) As interacções avaliadas não são estatisticamente significativas.
- 2) O aumento de concentração de reagente férrico, associado a uma curvatura significativa positiva, é o único que provoca um aumento na intensidade de absorvância.

Da análise das superfícies de resposta, observa-se também que os modelos avaliados para as três variáveis de resposta não são globalmente válidos e que nem os efeitos quadráticos melhoram significativamente o modelo linear. No entanto, para as três variáveis de resposta a perda de ajuste por se utilizar este modelo quadrático não é

estatisticamente significativa, o que indica que a forma da superfície de resposta descreve adequadamente os resultados das três variáveis de resposta. Tal facto, vem confirmar já se pode estar a trabalhar na zona do óptimo de resposta para as três variáveis de resposta.

Como é indicado na Tabela 6.4, a partir das superfícies de resposta obtidas, são previstos um ponto máximo para o c.d.o. e pontos de inflexão para as outras duas variáveis de resposta.

Para a intensidade de absorvância, e da análise das três superfícies de resposta, verifica-se um ponto máximo claramente definido a absorvância 0.529, com concentração de hidroxilamina 9.115 % e de hidróxido de sódio 18.750 %. A concentração de hidroxilamina encontrada confirma o valor encontrado no planeamento tipo 1 e o dobro da concentração de hidroxilamina parece ser a concentração adequada de hidróxido de sódio. Nas superfícies de resposta da concentração de hidroxilamina e de hidróxido de sódio com a concentração de reagente férrico, os máximos verificam-se aos mesmos valores de concentração de hidroxilamina e de hidróxido de sódio e a valores de concentração de reagente férrico no nível superior.

Para o c.d.o., e nas três superfícies de resposta, verifica-se a existência de máximos a valores próximos dos indicados para o ponto máximo previsto. Para o tempo de reacção um máximo é também obtido na superfície de resposta entre o reagente férrico e a hidroxilamina.

Com os resultados obtidos, é possível definir como concentrações óptimas de hidroxilamina a concentração de 9.375 % e de hidróxido de sódio a concentração de 18.750 %. Além disso, as outras condições que permitem uma maior sensibilidade na determinação por este método do Diltiazem são, um volume mínimo necessário para a neutralização do hidróxido de sódio e uma concentração de reagente férrico não inferior a 1.5 %.

Planeamento Experimental de Optimização Compósito Central

Atendendo aos resultados até agora encontrados, um último planeamento experimental de optimização foi efectuado de forma avaliar o volume de reagente férrico a adicionar nas condições de variáveis do planeamento entretanto avaliadas. O planeamento de optimização escolhido foi o planeamento experimental de optimização de compósito central. Este planeamento experimental não é mais do que uma extensão do planeamento

factorial total de dois níveis e irá permitir verificar se nestas condições um aumento de reagente do volume de reagente férrico ainda será possível e significativo.

Assim, o planeamento experimental de optimização de composto central foi efectuado com o padrão de Diltiazem em metanol, concentração hidróxido de sódio 18.750 %, volume mínimo de ácido perclórico para neutralizar o hidróxido de sódio, a temperatura ambiente, com concentração de hidroxilamina tendo como valor central a concentração de 9.375 % e com uma concentração de reagente férrico acima de 1.5 % e cinco amostras centrais. As duas variáveis do planeamento e os níveis estudados foram:

- Concentração de hidroxilamina (níveis do planeamento - 6.250 % e 12.500 %, níveis fora do planeamento – 4.956 % e 13.794 % e nível central – 9.375 %).
- Concentração de reagente férrico (níveis do planeamento - 1.500 % e 2.500 %, níveis fora do planeamento – 1.293 % e 2.707 % e nível central – 2.000 %).

A gama de resultados obtidos com cada uma das variáveis de resposta foi:

- 1) Absorvância máxima (0.522 u.a. – 0.613 u.a.).
- 2) c.d.o. de absorvância máxima (508 nm – 512 nm).
- 3) Tempo de reacção (5 s – 25 s).

Da análise dos resultados obtidos para as três variáveis de resposta e, como seria de esperar nas condições avaliadas das variáveis do planeamento, foram observadas uma gama mais estreita de c.d.o. e um aumento da intensidade de absorvância máxima.

Na Tabela 6.5 são apresentados os resultados obtidos da avaliação do modelo quadrático e os pontos máximos, mínimos ou de inflexão possíveis.

Tabela 6.5 – Resultados obtidos no planeamento de optimização de composto central, por análise das superfícies de resposta, através da avaliação da resposta com um padrão de Diltiazem 250 ppm em metanol, com concentração de hidróxido de sódio de 18.750%, volume fixo de ácido perclórico e à temperatura ambiente.*

Superfícies de resposta			
	Absorvância	c.d.o.	t_{reacção}
Ponto previsto	Máximo – 0.586 u.a.	Máximo – 512.715 nm	Inflexão – 12.686 s
Hidroxilamina (%)	9.060	11.398	8.252
Reagente férrico (%)	2.550	2.111	2.854
Avaliação do modelo			
Razão F (p)	0.959 (0.500)	0.888 (0.536)	1.552 (0.288)
R_{múltipla}	0.638	0.623	0.725
Efeitos quadráticos [razão F (p)]	0.948 (0.432)	1.112 (0.381)	0.396 (0.687)
Perda de ajuste [razão F (p)]	1.500 (0.343)	9.649 (0.027)	1.732 (0.298)

* Ver rodapé da Tabela 5.1.

Como se pode ver na Tabela 6.5, o máximo obtido para a intensidade de absorvância confirma a concentração para a hidroxilamina de 8.750 %. Da análise das três superfícies de resposta, é possível definir uma concentração de reagente férrico a utilizar, uma concentração entre 2 e 2.5 %, para uma intensidade de absorvância máxima a um c.d.o. maior e, entre 1.5 e 2 %, para um tempo de reacção mínimo. Assim, uma concentração de 2% parece ser a mais adequada para a quantificação com maior sensibilidade com um tempo de reacção mínimo.

Uma optimização univariada foi ainda efectuada com o aumento da concentração de reagente férrico desde 0.5 até 5 %. Verificou-se um aumento da intensidade de absorvância mais significativo até aos 2 %, ligeiro aumento até aos 3 % e diminuição posterior até aos 5%. Nas condições de reacção optimizadas, verificou-se ainda a função linear e o limite de detecção. Assim as condições de reacção definidas para a quantificação foram:

- Metanol como solvente.
- Concentração de hidroxilamina 9.375 %.
- Concentração de hidróxido de sódio 18.750 %.
- Concentração de reagente férrico 2.000 %.
- Volume mínimo de ácido perclórico para neutralizar o hidróxido de sódio.
- Temperatura ambiente.

6.4. Quantificação

Na quantificação, o método de calibração de adição de padrão foi efectuado por adição de volumes diferentes ($\approx 30, 90$ e $150 \mu\text{L}$) da solução padrão de Diltiazem 4000 ppm para um volume final de 2.50 mL em metanol. A determinação da solução padrão e das soluções amostra foi feita para uma concentração estimada de 150 ppm . A fortificação avaliada foi de 50 ppm . As soluções padrão obtidas encontravam-se numa gama de $50 \text{ ppm} - 250 \text{ ppm}$.

A comparação das funções lineares obtidas com a solução padrão e com as soluções amostra foi efectuada na gama de 100 a 500 ppm .

Análise de registos

Da análise dos registos obtidos, verificou-se que, antes do início da reacção, ou seja antes da adição do reagente férrico, todos os registos apresentavam um pico invertido por volta dos 350 nm e um ligeiro ruído acima dos 600 nm .

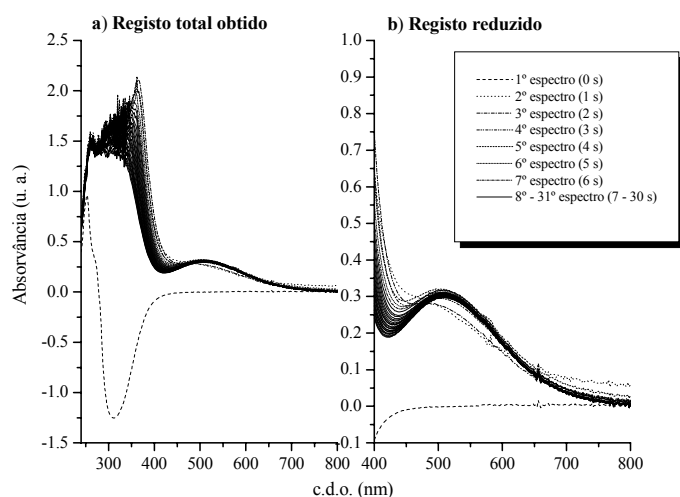


Fig. 6.2 – Gráficos da evolução da reacção de uma solução padrão de Diltiazem de 150.028 ppm com a hidroxilamina e sal férrico em que a) é o registo total obtido e b) o registo reduzido.

Após a adição do reagente férrico (Fig. 6.2) além do aparecimento da banda de absorvância do composto principal por volta dos 500 nm , aparecia também uma banda larga com absorvância intensa abaixo dos 350 nm . Verificou-se que, de uma forma não

muito acentuada, esta banda diminuía em intensidade e largura de banda a medida que a reacção decorria. A banda de absorvância do composto principal é uma banda bem definida que vai desde os 400 nm até aos 800 nm. No tempo de reacção registado, verificou-se um aumento progressivo da absorvância, até atingir a intensidade máxima de absorvância ao c.d.o. de absorvância máximo e posterior decréscimo não muito significativo. Os primeiros espectros obtidos apresentavam registos com linhas de base ligeiramente mais altas que o normal mas, que na maioria dos registos, não afectavam a intensidade de absorvância máxima.

A escolha da absorvância utilizada na determinação por análise directa foi feita, para cada um dos registos obtidos, escolhendo a intensidade máxima de absorvância para cada um dos registos.

Curvas de calibração padrão

Na Tabela 6.6 são apresentados os valores dos parâmetros de regressão linear encontrados pelo método dos mínimos quadrados das curvas de calibração padrão obtidas com o padrão e com as amostras analisadas. Para o padrão, são apresentados o valor mínimo e máximo dos parâmetros obtidos de duas regressões lineares obtidas nas mesmas condições em dias diferentes.

Tabela 6.6 – Comparação da curva de calibração padrão de um padrão e das amostras farmacêuticas obtidas no máximo de absorvância.*

Parâmetros avaliados	Calibração Padrão ($y = bx + a$, $m = 5$ e Gama - 100 a 500 ppm)				
	Padrão	Al60co	Df60co	Ba90re	Dt60co
a	0.005 – 0.038	-0.004 (0.015)	0.006 (0.012)	0.007 (0.008)	0.028 (0.023)
b	1.817×10^{-3} (2.079×10^{-3})	1.887×10^{-3} (4.629×10^{-5})	2.156×10^{-3} (3.547×10^{-5})	1.810×10^{-3} (2.491×10^{-5})	1.990×10^{-3} (6.900×10^{-5})
ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	818 - 938	849	970	816	896
$s_{y/x}$	0.006 – 0.027	0.015	0.011	0.008	0.022
R	0.9975 - 0.9998	0.9991	0.9996	0.9997	0.9982
(continuação)					
Parâmetros avaliados	Calibração Padrão ($y = bx + a$, $m = 5$ e Gama - 100 a 500 ppm)				
	Dtap	Di60me	Di120me	He60co	He120sr
a	0.017 (0.016)	0.027 (0.020)	0.016 (0.013)	0.028 (0.029)	0.001 (0.020)
b	1.781×10^{-3} (4.871×10^{-5})	2.042×10^{-3} (5.885×10^{-5})	2.086×10^{-3} (3.890×10^{-5})	2.219×10^{-3} (8.845×10^{-5})	1.964×10^{-3} (6.176×10^{-5})
ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	803	919	940	1000	885
$s_{y/x}$	0.015	0.019	0.012	0.028	0.020
R	0.9989	0.9988	0.9995	0.9976	0.9985

* Ver rodapé da Tabela 3.1

Para todas as amostras são obtidos ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.998, dentro do intervalo de valores obtidos com o padrão.

Tanto para o padrão, como para as amostras, são obtidos valores de ordenada na origem próximos de zero. Todos os valores de ordenada na origem obtidos para as amostras estão dentro do intervalo de valores encontrados para o padrão. Excepto para a amostra Al60co, todos os valores são superiores a zero, mas próximos de zero, o que não permite considerar a existência de qualquer desvio sistemático. Os maiores valores, são encontrados com as amostras Dt60co, Di60me e He60co, com um valor de ordenada na origem de 0.028.

Da análise do declive obtido, verifica-se que, para a maioria das amostras, o valor de absorvidade molar se situa dentro do intervalo encontrado para o padrão. As excepções são, com uma absorvidade molar ligeiramente inferior, a amostra Dtap e, com absorvidades molares ligeiramente superiores, as amostras Df60co e He60co. Atendendo às funções lineares obtidas, também não é claro considerar a possibilidade de existência de algum tipo de interferência.

6.4.1. Análise directa

Da avaliação de todas as adições de padrão efectuadas verifica-se alguma variabilidade, tanto no tempo de reacção (5 s a 24 s), como no c.d.o. (498 nm a 512 nm) encontrados ao máximo de absorvância.

As estimativas de concentração do solvente, padrão, amostras não fortificadas e amostras fortificadas obtidas por análise directa ao máximo de absorvância são apresentadas na Tabela 6.7 a) e b).

Tabela 6.7 – Estimativas de concentração do a) solvente, padrão, amostras não fortificadas e b) amostras fortificadas obtidas por análise directa ao c.d.o. de absorvância máxima.*

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas					
	Solvente	Padrão	Al60co	Df60co	Ba90re	Dt60co
C_{estimada} (ppm)	6.699 (2.454)	156.713 (4.933)	155.233 (10.809)	151.420 (12.006)	152.501 (16.271)	156.865 (12.494)
C_{esperada} (ppm)	0.000	150.028	149.648	150.089	150.460	150.168
Recup. (%)	---	104.456	103.731	100.886	101.356	104.460
LD (3S_{y/x}/b)	9.251	9.943	21.895	24.588	33.316	25.130
DOS_{estimada} (mg)	----	----	62.951	60.604	91.221	62.816
DOS_{estimada}HPLC (mg)	----	----	54.645	57.019	81.617	57.184
EP (%)	----	4.456	15.200	6.287	12.992	9.849
t_{reacção} (s)	20-6-7-5	4-14-14-6	5-6-4-7	8-15-14-16	7-13-5-23	13-24-8-6
c.d.o. (nm)	502, 508 e 510(2)	502, 508 e 510 (2)	498, 502, 506 e 508	508 (3) e 510	504, 508 (2) e 512	500 e 508(3)
Calibração (y = bx + a, m = 4)						
a	0.012 (0.004)	0.316 (0.005)	0.314 (0.011)	0.328 (0.014)	0.273 (0.015)	0.334 (0.014)
b	1.760×10 ⁻³ (2.821×10 ⁻⁵)	1.494×10 ⁻⁴ (3.475×10 ⁻⁵)	2.025×10 ⁻³ (7.694×10 ⁻⁵)	2.165×10 ⁻³ (9.254×10 ⁻⁵)	1.791×10 ⁻³ (1.034×10 ⁻⁴)	2.128×10 ⁻³ (9.296×10 ⁻⁵)
S_{y/x}	0.005	0.007	0.015	0.018	0.020	0.018
R	0.9997	0.9997	0.9986	0.9982	0.9967	0.9981

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Dtap	Di60me	Di120me	He60co	He120sr
C_{estimada} (ppm)	155.477 (23.403)	174.130 (4.751)	159.912 (8.704)	159.821 (14.208)	154.904 (14.355)
C_{esperada} (ppm)	150.729	150.111	150.602	150.213	150.007
Recuperação (%)	103.150	116.001	106.182	106.396	103.265
LD (3S_{y/x}/b)	47.447	9.040	17.391	28.301	29.059
DOS_{estimada} (mg)	206.300	69.600	127.418	64.019	123.917
DOS_{estimada}HPLC (mg)	198.360	57.689	115.152	54.870	110.619
EP (%)	4.003	20.647	10.652	16.674	12.021
t_{reacção} (s)	7-6-9-4	5-5-4-4	5-5-15-13	7-4-10-8	7-6-6-13
c.d.o. (nm)	506, 508 (2) 512	502, 500, 504 e 508	500, 504, 506 (2)	504 e 508 (3)	502, 504, 506 e 512
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.267 (0.021)	0.360 (0.005)	0.336 (0.009)	0.344 (0.016)	0.320 (0.015)
b	1.716×10 ⁻³ (1.411×10 ⁻⁴)	2.067×10 ⁻³ (3.249×10 ⁻⁵)	2.101×10 ⁻³ (6.331×10 ⁻⁵)	2,151×10 ⁻³ (1.058×10 ⁻⁴)	2.064×10 ⁻³ (1.043×10 ⁻⁴)
S_{y/x}	0.027	0.006	0.012	0.020	0.020
R	0.9933	0.9998	0.9991	0.9976	0.9975

(Continua)

Tabela 6.7 (Continuação)

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Al60coFo	Df60coFo	Ba90reFo	Dt60coFo	DtapFo
$C_{\text{estimada total}}$ (ppm)	204.259 (8.283)	205.580 (8.142)	206.515 (6.440)	210.283 (2.015)	214.509 (15.471)
$C_{\text{esperada total}}$ (ppm)	199.658	200.322	200.246	200.401	200.515
Recuperação (%)	102.304	102.625	103.131	104.931	106.979
LD ($3S_{y/x}/b$)	14.418	14.094	11.156	3.441	26.198
$t_{\text{reacção}}$ (s)	5-6-12-10	15-14-10-12	8-9-9-7	9-4-5-12	7-7-6-7
c.d.o. (nm)	504, 508(2) e 510	508(4)	508 e 510 (3)	508 (3) e 514	506, 508(2) e 512
Fortificação ($C_{\text{estimada amostra fortificada}} - C_{\text{estimada amostra não fortificada}}$)					
C_{estimada} (ppm)	49.026	54.340	54.014	53.418	59.032
C_{esperada} (ppm)	50.009	50.232	49.786	50.232	49.786
Recuperação (%)	98.034	108.177	108.492	106.342	118.572
$\Delta = C_{\text{estimada}} - C_{\text{esperada}}$	-0.983	+4.108	+4.228	+3.186	+9.246
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	0.413 (0.007)	0.449 (0.008)	0.361 (0.005)	0.433 (0.002)	0.346 (0.011)
b	2.023×10^{-3} (5.062×10^{-5})	2.185×10^{-3} (5.354×10^{-5})	1.747×10^{-3} (3.377×10^{-5})	2.060×10^{-3} (1.232×10^{-5})	1.612×10^{-3} (7.317×10^{-5})
$S_{y/x}$	0.010	0.010	0.006	0.002	0.014
R	0.9994	0.9994	0.9996	1.0000	0.9979

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Di60meFo	Di120meFo	He60coFo	He120srFo
$C_{\text{estimada total}}$ (ppm)	205.586 (9.592)	196.161 (2.274)	206.587 (20.359)	202.980 (9.502)
$C_{\text{esperada total}}$ (ppm)	200.344	200.388	200.446	200.240
Recuperação (%)	102.617	97.891	103.064	101.368
LD ($3S_{y/x}/b$)	16.603	4.060	35.142	16.572
$t_{\text{reacção}}$ (s)	4-10-8-5	6-9-15-14	7-4-13-5	6-5-11-17
c.d.o. (nm)	500, 504 e 508(2)	504 e 508(3)	502, 504, 506 e 508	504, 508(2) e 510
Fortificação ($C_{\text{estimada amostra fortificada}} - C_{\text{estimada amostra não fortificada}}$)				
C_{estimada} (ppm)	31.456	36.345	46.766	48.076
C_{esperada} (ppm)	50.232	49.786	50.232	50.232
Recuperação (%)	62.621	73.003	93.099	95.707
$\Delta = C_{\text{estimada}} - C_{\text{esperada}}$	-18.776	-13.441	-3.466	-2.156
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	0.436 (0.009)	0.435 (0.002)	0.449 (0.020)	0.405 (0.009)
b	2.121×10^{-3} (6.123×10^{-5})	2.218×10^{-3} (1.560×10^{-5})	2.172×10^{-3} (1.327×10^{-4})	1.997×10^{-3} (5.752×10^{-5})
$S_{y/x}$	0.012	0.003	0.025	0.011
R	0.9992	1.0000	0.9963	0.9992

* A dosagem é dada em massa de composto por comprimido; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados, excepto na avaliação do c.d.o. em que o valor entre parêntesis corresponde ao número de vezes que é encontrado um determinado c.d.o. de absorvância máxima. Os tempos de reacção e os c.d.o. apresentados correspondem aos obtidos nas quatro determinações de cada uma das adições de padrão.

Para todas as amostras são encontrados ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza superior a 0.990. São também encontrados, para todas as amostras desvios padrão relativos da mesma ordem de grandeza. Excepto para as amostras não fortificadas Ba90re e Dtap, são encontrados para as restantes amostras desvios padrão relativos inferiores a 10 %.

Como se pode verificar na Tabela 6.7 a), para o solvente e para o padrão foram obtidas estimativas de concentração adequadas. É encontrada, para o solvente, atendendo aos níveis de concentração da adição de padrão e ao limite de detecção, uma estimativa próxima de zero e para o padrão uma estimativa próxima de 150 ppm.

Também, para a maioria das amostras, não fortificadas e fortificadas, foram obtidas estimativas dentro da concentração esperada. A única excepção, verifica-se para a amostra não fortificada Di60me com uma recuperação superior a 110 %. Como se pode verificar, pela análise das recuperações obtidas, as estimativas de concentração encontram-se ligeiramente acima da concentração esperada para a maioria das amostras. A única excepção, verifica-se para a amostra fortificada Di120meFo com uma recuperação inferior a 100 %. Quanto à recuperação de fortificação, são encontradas recuperações próximas de 100 %. As excepções são, com uma recuperação superior a 110 %, a formulação farmacêutica Dtap e, inferior a 90 %, as formulações Di60me e Di120me.

São encontrados para a maioria das amostras não fortificadas erros de previsão, relativos a dosagem estimada por HPLC-UV, iguais ou superiores a 10 %. As únicas excepções verificam-se para as amostras Df60co e Dtap com erros respectivamente de 6 e 4 %. Os erros de previsão encontrados variam entre 4 e 21 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Dtap e o mais alto para a amostra Di60me. Ao serem consideradas todas as amostras na avaliação da quantificação obtida por análise directa é obtido um valor de EPM de 12.040 %, de EPT de 9.699 % e de RMSEP de 9.555.

Os resultados obtidos com as adições de padrão não permitem confirmar qualquer tipo de interferência e, apesar de se encontrarem estimativas ligeiramente superiores à concentração esperada, também não é possível confirmar qualquer tipo de desvio sistemático.

6.4.2. Análise multivariada

Para a análise multivariada todas as matrizes de dados obtidas foram previamente reduzidas, atendendo ao tempo de reacção máximo e a zonas do espectro que possam não ser consideradas relevantes para esta análise.

As matrizes, com um tempo de registo de 60 s (61 tempos de reacção) numa gama de c.d.o. de 240 a 800 nm (281 c.d.o.), foram reduzidas para matrizes com um tempo de reacção de 29 s (30 tempos de reacção) e uma gama de c.d.o. de 400 a 800 nm (201 c.d.o.). Um total de 6030 pontos espectrais foi analisado.

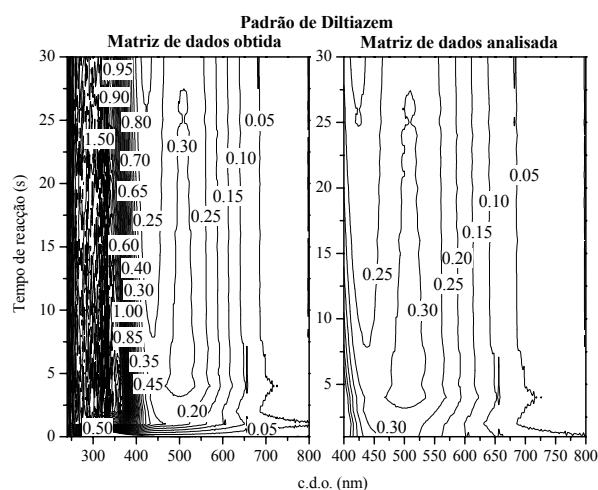


Fig. 6.3 – Gráficos de contorno de níveis da matriz obtida (tempo de reacção 30 s) e matriz reduzida (tempo de reacção 29 s) da solução padrão de Diltiazem de 150.028 ppm.

Na Fig. 6.4 são apresentados o espectro e o perfil de tempo de reacção experimentais obtidos a intensidade de absorvância máxima.

Atendendo ao espectro obtido, o critério de avaliação na comparação das diferentes estimativas obtidas pelos diferentes métodos de decomposição tridimensional é um critério de maior semelhança possível ou seja um coeficiente correlação linear positivo alto.

Uma menor intensidade de absorvância, com um aumento até ao máximo de reacção e eventual estabilização ou ligeiro decréscimo é o perfil esperado para o tempo de reacção. Atendendo ao perfil de tempo de reacção esperado para o tempo de reacção, o critério de avaliação foi de uma forma geral o de menor semelhança e com uma variação oposta ao obtido experimentalmente, ou seja, um menor coeficiente correlação linear negativo. Ao contrário dos espectros experimentais obtidos em que uma menor variação esta presente,

no que respeita ao tempo de reacção o critério pode ser o de maior semelhança ou seja um maior coeficiente de correlação negativo devido a maior variação deste perfil.

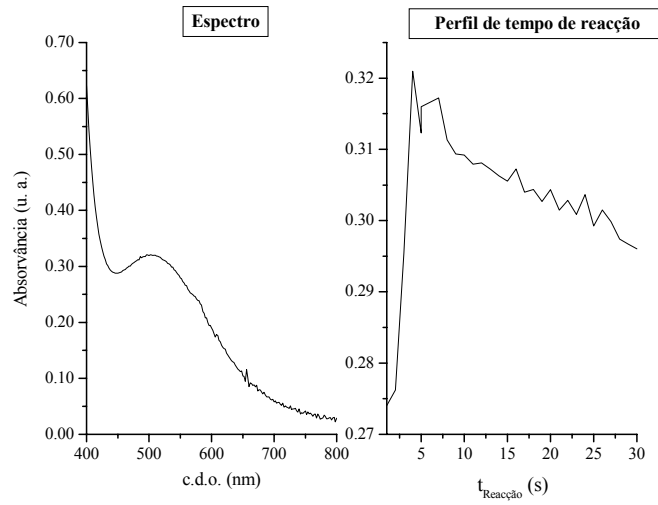


Fig. 6.4 – Espectro e perfil de variação da intensidade de absorvância com o tempo experimentais do padrão de Diltiazem de 150.028 ppm ao máximo de absorvância (tempo de reacção de 4 s e c.d.o. de 502 nm).

Análise inicial

A representação gráfica (Fig. 6.5) dos valores singulares normalizados obtidos por decomposição de valor singular para os três tipos de amostras estudadas mostra que no mínimo dois e no máximo cinco componentes são necessários para a análise do tipo de matrizes avaliadas.

Para o metanol um número de componentes entre três e cinco, para o padrão entre três e quatro e para a amostra Ba90re entre quatro e cinco parece ser o número adequado para a análise do tipo de matrizes de cada uma das amostras. Para algumas das matrizes analisadas, com cada uma das amostras, é mais notório que um número mínimo de quatro componentes é o mais adequado.

O mesmo número de componentes parece ser necessário para análise das matrizes singulares e das matrizes de linha aumentada em cada uma das dimensões. Desta análise inicial, não é notório por diferença de ordem das matrizes, desvios a trilinearidade. Mesmo para a matriz de metanol tal não é notório.

Tabela 6.8 – Variância explicada pelos primeiros cinco componentes obtidos por análise de componentes principais.*

Componente principal	Variância explicada por PCA (%)					
	Metanol	Metanol [$t_{rx} \times (\text{conc.} \times \text{esp.})$]	Padrão	Padrão [$t_{rx} \times (\text{conc.} \times \text{esp.})$]	Ba90re	Ba90re [$t_{rx} \times (\text{conc.} \times \text{esp.})$]
1	96.25	98.87	98.59	99.41	99.42	99.66
2	3.52	0.94	1.35	0.48	0.54	0.28
3	0.17	0.10	0.05	0.09	0.04	0.04
4	0.03	0.06	0.01	0.01	0.01	0.01
5	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01

* [$t_{rx} \times (\text{conc.} \times \text{esp.})$] – Matriz linha aumentada em que as linhas são o número de tempos de reacção e as colunas os espectros obtidos nas quatro matrizes.

Também, é possível verificar na Tabela 6.8 que, na análise das matrizes singulares e de linha aumentada na dimensão do tempo de reacção dois componentes parecem ser os necessários para explicar quase 100 % de variância. Três componentes no máximo parecem ser os necessários para a análise deste tipo de matrizes. Para a matriz de metanol três componentes são claramente necessários. Tal como por avaliação dos gráficos da Fig. 6.5 também não é notório um aumento da ordem das matrizes singulares e de linha aumentada.

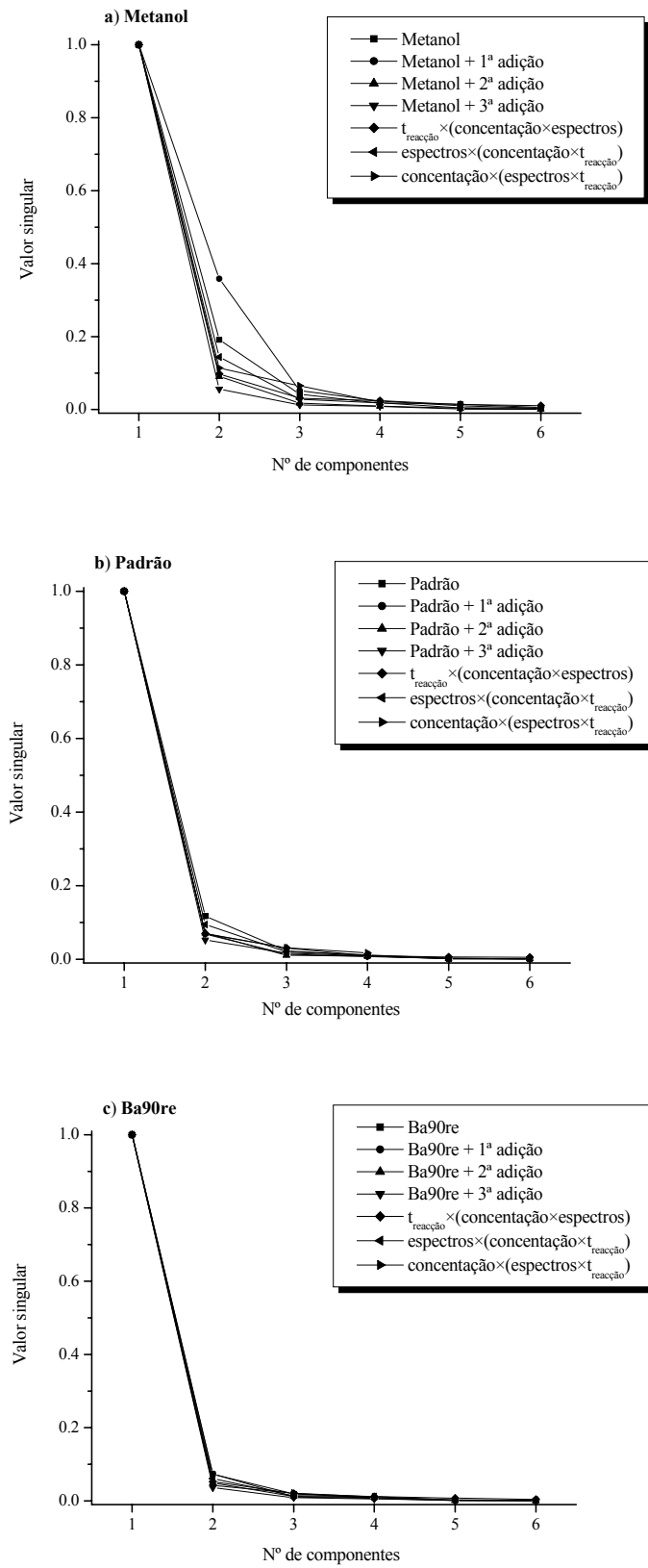


Fig. 6.5 – Gráficos de valor singular de cada uma das matrizes singulares e das respectivas matrizes aumentadas de a) metanol, b) padrão de Diltiazem e c) amostra Ba90re.

6.4.2.1 - PARAFAC

No ajuste pelo modelo PARAFAC foi de uma forma geral utilizada a matriz tridimensional [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] ($201 \times 30 \times 4$). As condições geralmente utilizadas para o ajuste foram a aplicação de restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições.

Solvente

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 6.9 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC, de um a cinco componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por TLD na análise da matriz tridimensional do solvente metanol.

Como se pode verificar na Tabela 6.9, por validação cruzada, foram encontradas diferenças de valores de ajuste próximas para os números de componentes analisados. O menor número de iterações verificou-se para os modelos de um e dois componentes. Também, para os modelos de três e quatro componentes, foram encontrados um número de iterações não muito elevado. No entanto os valores do teste de consistência do núcleo indicam claramente que o modelo mais adequado é o modelo de dois componentes.

Tabela 6.9 – Validação cruzada do modelo PARAFAC, de 1 a 5 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por TLD na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] do solvente metanol. São apresentados a diferença dos ajustes obtidos por validação cruzada entre os modelos na análise da matriz segmentada e total, o número de iterações e o valor do teste de consistência do núcleo (corcondia).

	Número de componentes				
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco
Número de Iterações	3	2	300	524	2500
Corcondia	100	100	14.995	0.231	0.350
$\Delta_{\text{AjMS-AjMT}}$	-0.006	-0.012	-0.011	-0.011	-0.010

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 6.10 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC na análise da matriz tridimensional do solvente metanol. Na Tabela 6.10 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições. Na Tabela

6.10 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

É possível verificar pela Tabela 6.10 b) que, a melhor estimativa de concentração, com uma concentração de 0.016 ppm, é obtida com o modelo de dois componentes, não negatividade nas três dimensões e a matriz centrada na primeira e normalizada na segunda dimensão. No entanto, uma percentagem de ajuste do modelo não válida é encontrada com este modelo.

As estimativas de concentração encontradas com os outros modelos encontram-se no intervalo de concentrações entre 1 e 2 ppm. De entre estes modelos, só os modelos de dois componentes, com não negatividade nas três dimensões ou além desta restrição com unimodilidade na primeira dimensão, apresentam uma percentagem de ajuste do modelo adequada e um teste de consistência do núcleo superior. Sendo obtidas com estes dois modelos, estimativas de concentração da ordem de 1.6 ppm, é considerado o modelo mais adequado o modelo de dois componentes e não negatividade nas três dimensões.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de PARAFAC de dois componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC de dois componentes sem restrições na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reacção}}$ \times concentração].

Tabela 6.10 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC na análise da matriz [espectro $\times t_{\text{reação}} \times \text{concentração}$] de metanol com a) restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por PARAFAC sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) não negatividade nas três dimensões

	Número de componentes			
	Dois	Três	Quatro	Cinco
C_{estimada} (ppm)	1.626 (5.579)	1.409 (5.448)	10.730 (10.764)	23.938 (35.515)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	21.581	21.098	39.754	122.824
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	90.353	92.884	91.511	93.793
ssq_{resíduos}	4.480	2.438	3.470	1.855
Iterações	12	40	174	60
Corcondia (%)	84.452	10.167	11.362	13.771
R_{Espectro}	-0.187	-0.174	-0.225	-0.225
R_{treação}	-0.512	-0.749	-0.763	-0.763
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.005 (0.019)	0.005 (0.018)	0.034 (0.033)	0.071 (0.093)
b	3.350 $\times 10^{-3}$ (1.253 $\times 10^{-4}$)	3.353 $\times 10^{-3}$ (1.226 $\times 10^{-4}$)	3.194 $\times 10^{-3}$ (2.200 $\times 10^{-4}$)	2.952 $\times 10^{-3}$ (6.284 $\times 10^{-3}$)
S_{y/x}	0.024	0.024	0.042	0.121
R	0.9986	0.9987	0.9953	0.9576

b) não negatividade nas três dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	2 componentes (matriz centrada na primeira dimensão)	2 componentes (matriz normalizada na segunda dimensão)	2 componentes (matriz centrada na primeira e normalizada na segunda dimensão)	2 componentes (unimodalidade na primeira dimensão)
C_{estimada} (ppm)	1.455 (6.824)	1.306 (5.677)	0.016 (4.725)	1.617 (5.596)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	26.421	21.994	18.426	21.647
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	58.168	6.333	-279.519	90.346
ssq_{resíduos}	84.250	422.361	6.934 $\times 10^3$	4.487
Iterações	9	12	11	13
Corcondia (%)	58.111	87.578	56.937	84.478
R_{Espectro}	-0.160	-0.188	-0.159	-0.187
R_{treação}	-0.731	+0.493	-0.771	-0.516
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.005 (0.023)	0.004 (0.019)	0.000 (0.016)	0.005 (0.019)
b	3.351 $\times 10^{-3}$ (1.534 $\times 10^{-4}$)	3.355 $\times 10^{-3}$ (1.279 $\times 10^{-4}$)	3.462 $\times 10^{-3}$ (1.105 $\times 10^{-4}$)	3.350 $\times 10^{-3}$ (1.257 $\times 10^{-4}$)
S_{y/x}	0.030	0.025	0.021	0.024
R	0.9979	0.9986	0.9990	0.9986

* Ver rodapé da Tabela 5.7.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de metanol pelo modelo de PARAFAC de dois componentes, o primeiro componente é o composto principal corado e o segundo componente é o composto inicial e linha de base com absorvância de fundo.

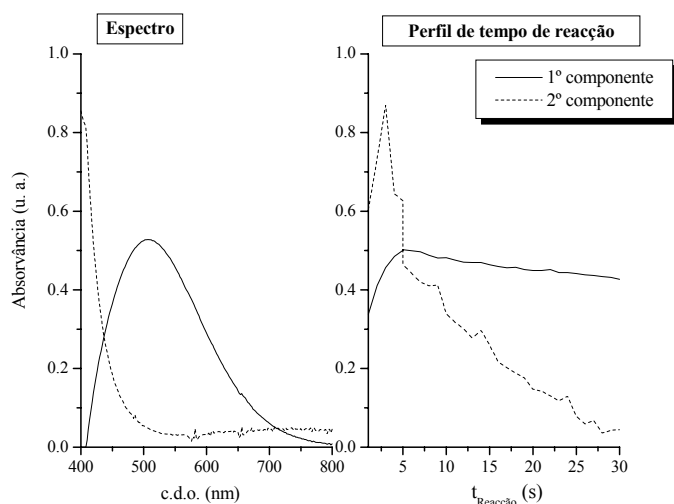


Fig. 6.6 – Espectro e perfil de variação da intensidade de absorvância com o tempo estimados pelo modelo PARAFAC de 2 componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC de 2 componentes sem restrições na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reacção}}$ \times concentração] do solvente metanol.

Padrão

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 6.11 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC, de um a cinco componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por TLD na análise da matriz do padrão de Diltiazem 150.028 ppm.

Pode verificar-se na Tabela 6.11 que, por validação cruzada, foi para os modelos de dois, quatro e cinco que foi encontrada uma menor diferença dos valores de ajuste. O menor número de iterações foi obtido para o modelo de dois componentes. Um número baixo de iterações foi ainda encontrado para o modelo de três componentes. O teste de consistência do núcleo confirma que o modelo de dois componentes parece ser o mais adequado.

Tabela 6.11 – Validação cruzada do modelo PARAFAC, de 1 a 5 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por TLD na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] de padrão de Diltiazem 150.028 ppm. São apresentados a diferença dos ajustes obtidos por validação cruzada entre os modelos na análise da matriz segmentada e total, o número de iterações e o valor do teste de consistência do núcleo (corcondia).

	Número de componentes				
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco
Número de Iterações	3	2	150	2100	1006
Corcondia	100	100	-15.058	-0.049	17.683
$\Delta_{\text{AIMS-AJMT}}$	-0.003	-0.007	-0.028	-0.007	-0.005

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 6.12 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC na análise da matriz tridimensional do padrão de Diltiazem 150.028 ppm. Na Tabela 6.12 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições. Na Tabela 6.12 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como é possível verificar na Tabela 6.12 a), a estimativa de concentração mais adequada, com uma concentração de 148.371 ppm, é obtida com o modelo de três componentes e não negatividade nas três dimensões. Associada a esta estimativa de concentração, é encontrada uma percentagem de ajuste do modelo superior, um baixo número de iterações e um teste de consistência válido. O valor de teste de consistência encontrado, ligeiramente mais baixo do que o do modelo de dois componentes, indica alguma dificuldade no ajuste.

Estimativas também adequadas são encontradas com outros modelos avaliados. Na Tabela 6.12 a) com estimativas adequadas, o modelo de dois componentes, não negatividade nas três dimensões, apresenta um teste de consistência superior mas uma percentagem de ajuste do modelo menor e, o modelo de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões, apresenta uma percentagem de ajuste do modelo superior mas um valor de teste de consistência do núcleo mais baixo. Na Tabela 6.12 b) com estimativas adequadas, os modelos de dois e três componentes e a matriz normalizada na segunda dimensão, apresentam testes de consistência válidos mas com percentagens de ajuste do modelo muito baixas. Ainda na Tabela 6.12 b), com não negatividade nas três dimensões e aplicação de restrição de unimodalidade na primeira dimensão, são obtidas

estimativas de concentração ligeiramente inferiores com valores de percentagens de ajuste do modelo e testes de consistência válidos.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de PARAFAC de três componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC de três componentes sem restrições na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração].

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de padrão pelo modelo PARAFAC de três componentes, o primeiro componente corresponde ao composto corado formado, o segundo componente corresponde ao composto inicial e o terceiro componente a linha de base com absorvância de fundo.

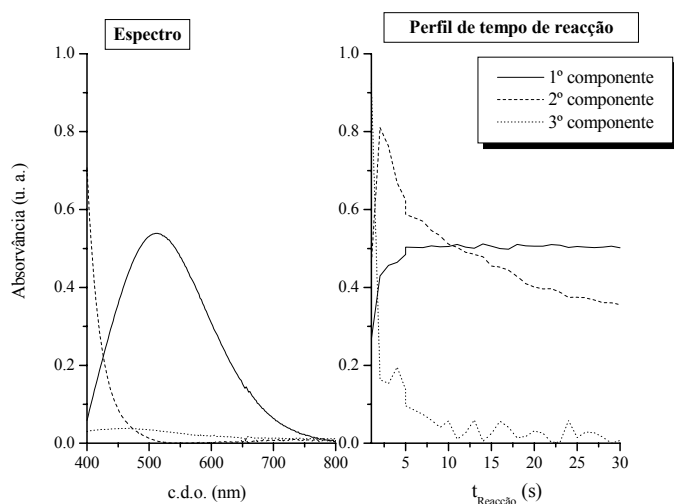


Fig. 6.7 – Espectro e perfil de variação da intensidade de absorvância com o tempo estimados pelo modelo PARAFAC de 3 componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por PARAFAC de 3 componentes sem restrições na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] do padrão de Diltiazem 150.028 ppm.

Tabela 6.12 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC na análise da matriz [espectro $\times t_{\text{reação}} \times \text{concentração}$] de padrão de Diltiazem 150.028 ppm com a) restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por PARAFAC sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) Não negatividade nas três dimensões

	Número de componentes			
	Dois	Três	Quatro	Cinco
C_{estimada} (ppm)	148.234 (4.281)	148.371 (3.299)	131.362(101.066)	148.567 (8.177)
Recuperação (%)	98.805	98.896	87.559	99.026
LD (3S_{v/x}/b)	8.876	6.838	222.174	16.936
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	95.741	97.477	98.096	98.710
SSQ_{resíduos}	5.341	1.875	1.068	0.490
Iterações	12	30	76	168
Corcondia (%)	97.449	76.512	0.594	46.766
R_{Espectro}	+0.657	+0.698	+0.664	+0.689
R_{t_{reação}}	+0.775	+0.649	+0.732	+0.666
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.267 (0.004)	0.267 (0.003)	0.246 (0.107)	0.267 (0.008)
b	1.799 $\times 10^{-3}$ (2.772 $\times 10^{-5}$)	1.798 $\times 10^{-3}$ (2.134 $\times 10^{-5}$)	1.871 $\times 10^{-3}$ (7.213 $\times 10^{-4}$)	1.797 $\times 10^{-3}$ (5.283 $\times 10^{-5}$)
S_{y/x}	0.005	0.004	0.139	0.010
R	0.9998	0.9999	0.8780	0.9991

b) não negatividade nas três dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	2 componentes (matriz normalizada na segunda dimensão)	3 componentes (matriz normalizada na segunda dimensão)	2 componentes (unimodalidade na primeira dimensão)	3 componentes (unimodalidade na primeira dimensão)
C_{estimada} (ppm)	147.961 (4.875)	148.409 (3.144)	144.023 (5.556)	146.258 (3.200)
Recuperação (%)	98.622	98.921	95.998	97.487
LD (3S_{v/x}/b)	10.117	6.514	11.687	6.680
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	78.597	88.274	95.711	97.447
SSQ_{resíduos}	134.875	40.483	5.417	1.919
Iterações	14	32	48	156
Corcondia (%)	96.471	79.524	95.879	76.686
R_{Espectro}	+0.657	+0.705	+0.654	+0.694
R_{t_{reação}}	+0.331	+0.534	+0.732	+0.641
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.266 (0.005)	0.267 (0.003)	0.263 (0.005)	0.265 (0.003)
b	1.801 $\times 10^{-3}$ (3.162 $\times 10^{-5}$)	1.798 $\times 10^{-3}$ (2.033 $\times 10^{-5}$)	1.825 $\times 10^{-3}$ (3.702 $\times 10^{-5}$)	1.811 $\times 10^{-3}$ (2.100 $\times 10^{-5}$)
S_{y/x}	0.006	0.004	0.007	0.004
R	0.9997	0.9999	0.9996	0.9999

* Ver rodapé da Tabela 5.7.

Formulações Farmacêuticas

Para todas as formulações farmacêuticas foram analisadas matrizes [espectro \times $t_{\text{reacção}}$ \times concentração] pelo modelo PARAFAC de três componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC de três componentes sem restrições. Análises com outras condições de ajuste do modelo se consideradas mais adequadas foram efectuadas.

Na Tabela 6.13 são apresentadas as condições de ajuste do modelo PARAFAC consideradas mais adequadas na análise das matrizes obtidas com cada amostra analisada.

Como se pode verificar na Tabela 6.13, para a maioria das amostras, as estimativas mais adequadas foram encontradas com condições de ajuste diferentes das inicialmente consideradas. Além da restrição de não negatividade nas três dimensões, a outra condição de ajuste utilizada foi a restrição de unimodalidade na primeira dimensão. Para a maioria das formulações farmacêuticas, as estimativas mais adequadas são encontradas com condições de ajuste do modelo idênticas na análise das amostras não fortificadas e fortificadas. Só com as formulações Al60co e Di120me um número menor de componentes é utilizado em na análise das amostras fortificadas.

Tabela 6.13 – Condições de ajuste do modelo PARAFAC utilizadas na análise das matrizes obtidas com as amostras não fortificadas e fortificadas.

Matriz analisada	Condições de ajuste			Amostras analisadas
	Número de componentes	Restrições	Estimativas iniciais	
Espectro \times $t_{\text{reacção}}$ \times Concentração	Dois	Não negatividade nas três dimensões	PARAFAC sem restrições	Dtap, DtapFo, Di120meFo, He60co e He60coFo
	Três			Di120me, He120sr e He120srFo
	Dois	Não negatividade nas três dimensões e unimodalidade na primeira dimensão		Ba90re, Ba90reFo, Di60me, Di60meFo, Df60co, Df60coFo e Al60coFo
	Três			Dt60co, Dt60coFo e Al60co

Na Tabela 6.14 são apresentados os resultados da análise pelo modelo PARAFAC das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas.

Excepto para a amostra não fortificada Dtap, com um coeficiente de correlação linear menor, para todas as outras amostras são obtidos ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.990. Devido aos níveis de concentração mais altos, são obtidos, para as amostras fortificadas, ajustes lineares com coeficientes de correlação linear mais elevados. Para a maioria das amostras, são obtidos desvios padrão relativos inferiores a 10 %. As únicas exceções são as amostras não fortificadas Dtap e He60co e a amostra fortificada He60coFo.

É possível verificar pelas Tabelas 6.14 a) e b) que, para as amostras não fortificadas e fortificadas das formulações farmacêuticas Al60co, Di120me e He60co são encontradas recuperações ligeiramente mais baixas do que é esperado. De entre estas amostras, a recuperação mais baixa, com uma recuperação de 79 %, é encontrada para a amostra não fortificada Di120me. Para as restantes amostras, são encontradas recuperações entre 90 e 100%. Para a maioria das formulações são também encontradas recuperações de fortificação próximas de 100 %. As exceções são, a formulação He120sr, com uma recuperação ligeiramente superior a 110 % e, as formulações Df60co, Dtap e Di60me, com uma recuperação ligeiramente inferior a 90 %.

Os valores de testes de consistência do núcleo para as amostra não fortificadas Dt60co e He120sr e a amostra fortificada DtapFo dão a indicação da dificuldade no ajuste com os modelos que apresentam as estimativas mais adequadas.

Para a maioria das amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas das dosagens estimadas por HPLC-UV. São encontrados para todas as amostras não fortificadas erros de previsão inferiores a 10 %. A única exceção com um erro de previsão de 17 % verifica-se para a amostra Di120me. Os erros de previsão encontrados variam desde 0.4 a 17 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Dt60co e o mais alto para a amostra Di120Me.

Na avaliação da quantificação por este modelo com todas as amostras não fortificadas é obtido um valor de EPM de 5.839 %, de EPT de 9.040 % e de RMSEP de 8.906.

É de referir ainda que, estimativas de dosagem mais próximas da dosagem estimada por HPLC-UV, do que as apresentadas na Tabela 6.14 a), são obtidas para algumas amostras com condições de ajuste diferentes das apresentadas. Estimativas de dosagem mais

próximas são obtidas para a amostra Dtap, com ortogonalidade na segunda dimensão, com teste de consistência e ajuste do modelo válidos; para a amostra Ba90re, com a matriz centrada na primeira e normalizada na segunda dimensão, com teste de consistência válido mas com ajuste do modelo negativo; para a amostra He120sr, com um número menor de componentes, com um teste de consistência válido mas com uma recuperação de fortificação não adequada; para a amostra Di120me, com um número maior de componentes e com teste de consistência não válido. Também recuperações de fortificação mais adequadas, mas com estimativas de concentração diferente do esperado, são encontradas com as formulações Di60me, He60co e Df60co, com outras condições de ajuste para a amostra não fortificada ou fortificada ou mesmo para os dois tipos de amostra.

Com a maioria das amostras são encontradas pelo modelo PARAFAC melhores estimativas de concentração relativamente às obtidas por análise directa. As estimativas adequadas obtidas parecem confirmar o já verificado por análise preliminar em que um menor desvio a trilinearidade é esperado.

Tabela 6.14 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas obtidas pelo modelo PARAFAC.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Al60co	Df60co	Ba90re	Dt60co	Dtap
$C_{estimada}$ (ppm)	126.421 (8.005)	143.607 (14.395)	146.577 (10.252)	142.589 (9.817)	138.060 (41.319)
$C_{esperada}$ (ppm)	149.648	150.089	150.460	150.168	150.729
Recuperação (%)	84.479	95.681	97.419	94.953	91.595
LD ($3S_{y/x}/b$)	17.912	30.270	21.415	20.715	88.867
$DOS_{estimada}$ (mg)	50.687	57.409	87.677	56.972	183.190
$DOS_{estimada}$ HPLC(mg)	54.645	57.019	81.617	57.184	198.360
EP (%)	7.243	0.684	7.425	0.371	7.648
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	96.685	96.566	96.605	97.595	95.839
$ssq_{resíduos}$	3.060	3.770	2.268	1.836	2.869
Iterações	22	50	38	91	30
Corcondia (%)	57.019	99.618	99.759	29.528	94.311
$R_{Espectro}$	+0.742	+0.963	+0.928	+0.938	+0.994
$R_{t_{reacção}}$	-0.391	+0.552	+0.926	-0.295	+0.822
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	0.245 (0.009) 1.941×10^{-3}	0.262 (0.014) 1.827×10^{-3}	0.265 (0.010) 1.809×10^{-2}	0.261 (0.010) 1.834×10^{-3}	0.256 (0.042) 1.858×10^{-3}
b	(6.035×10^{-5})	(9.613×10^{-5})	(6.715×10^{-5})	(6.603×10^{-5})	(2.861×10^{-4})
$S_{y/x}$	0.012	0.018	0.013	0.013	0.055
R	0.9990	0.9972	0.9986	0.9987	0.9771

a) amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Di60me	Di120me	He60co	He120sr
$C_{estimada}$ (ppm)	148.173 (11.737)	119.638 (10.383)	131.364 (13.734)	145.134 (11.691)
$C_{esperada}$ (ppm)	150.111	150.602	150.213	150.007
Recuperação (%)	98.709	79.440	87.452	96.751
LD ($3S_{y/x}/b$)	24.300	23.852	30.141	24.540
$DOS_{estimada}$ (mg)	59.225	95.328	52.471	116.102
$DOS_{estimada}$ HPLC(mg)	57.689	115.152	54.870	110.619
EP (%)	2.663	17.216	4.372	4.957
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	96.754	97.729	96.432	97.563
$ssq_{resíduos}$	3.269	1.580	4.303	1.667
Iterações	40	2	42	36
Corcondia (%)	99.328	75.697	90.176	7.294
$R_{Espectro}$	+0.826	+0.803	+0.722	+0.857
$R_{t_{reacção}}$	-0.409	+0.727	-0.079	+0.962
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	0.267 (0.011) 1.799×10^{-3}	0.238 (0.012) 1.990×10^{-3}	0.250 (0.015) 1.907×10^{-3}	0.263 (0.011) 1.810×10^{-3}
b	(7.599×10^{-5})	(8.225×10^{-5})	(9.990×10^{-5})	(7.699×10^{-5})
$S_{y/x}$	0.015	0.016	0.019	0.015
R	0.9982	0.9983	0.9973	0.9982

(Continua)

Tabela 6.14 (Continuação)

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Al60coFo	Df60coFo	Ba90reFo	Dt60coFo	DtapFo
C_{estimada} total (ppm)	178.564 (9.198)	186.847 (9.099)	199.202 (10.787)	190.744 (13.733)	180.567 (17.097)
C_{esperada} total (ppm)	199.658	200.322	200.246	200.401	200.515
Recuperação (%)	89.435	93.274	99.335	95.292	90.052
LD (3S_{v/x}/b)	17.290	16.646	12.039	24.831	31.994
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	96.588	97.752	97.676	98.294	93.652
SS_{resíduos}	4.467	2.249	1.480	1.154	8.636
Iterações	54	84	106	170	16
Corcondia (%)	99.672	99.252	72.534	52.239	-14.963
R_{Espectro}	+0.892	+0.926	+0.934	+0.918	+0.980
R_{t_{reacção}}	+0.258	+0.897	+0.992	+0.993	+0.981
Fortificação (C_{estimada} amostra fortificada – C_{estimada} amostra não fortificada)					
C_{estimada} (ppm)	52.143	43.240	52.625	48.155	42.507
C_{esperada} (ppm)	50.009	50.232	49.786	50.232	49.786
Recuperação (%)	104.267	86.081	105.702	95.865	85.379
Δ = C_{estimada} – C_{esperada}	+2.134	-6.992	+2.839	-2.077	-7.279
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.291 (0.007)	0.297 (0.007)	0.296 (0.008)	0.300 (0.010)	0.293 (0.013)
b	1.61×10 ⁻³ (4.894×10 ⁻⁵)	1.590×10 ⁻³ (4.601×10 ⁻⁵)	1.597×10 ⁻³ (5.503×10 ⁻⁵)	1.571×10 ⁻³ (6.782×10 ⁻⁵)	1.621×10 ⁻³ (8.987×10 ⁻⁵)
S_{y/x}	0.009	0.009	0.011	0.013	0.017
R	0.9991	0.9992	0.9988	0.9981	0.9969

b) amostras fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Di60meFo	Di120meFo	He60coFo	He120srFo
C_{estimada} total (ppm)	190.823 (3.786)	172.740 (4.323)	177.505 (22.900)	202.056 (15.754)
C_{esperada} total (ppm)	200.344	200.388	200.446	200.240
Recuperação (%)	95.248	86.203	88.555	100.907
LD (3S_{v/x}/b)	6.845	8.290	43.114	27.646
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	96.203	97.048	96.132	95.632
SS_{resíduos}	5.909	3.781	6.512	6.271
Iterações	52	2	42	42
Corcondia (%)	98.460	100	95.447	46.058
R_{Espectro}	+0.756	+0.819	+0.856	+0.967
R_{t_{reacção}}	+0.216	+0.897	+0.548	+0.972
Fortificação (C_{estimada} amostra fortificada – C_{estimada} amostra não fortificada)				
C_{estimada} (ppm)	42.650	53.102	46.141	56.922
C_{esperada} (ppm)	50.232	49.786	50.232	50.232
Recuperação (%)	84.906	106.661	91.856	113.318
Δ = C_{estimada} – C_{esperada}	-7.582	+3.316	-4.091	+6.690
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.300 (0.003)	0.287 (0.004)	0.290 (0.018)	0.307 (15.754)
b	1.571×10 ⁻³ (1.869×10 ⁻⁵)	1.661×10 ⁻³ (2.387×10 ⁻⁵)	1.636×10 ⁻³ (1.226×10 ⁻⁴)	1.520×10 ⁻³ (7.282×10 ⁻⁵)
S_{y/x}	0.004	0.005	0.024	0.014
R	0.9999	0.9998	0.9944	0.9977

* A dosagem é dada em massa de composto por comprimido; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

6.4.2.2 – PARAFAC2

No ajuste pelo modelo PARAFAC2 foi de uma forma geral utilizada a matriz tridimensional [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] ($201 \times 30 \times 4$). As condições geralmente utilizadas para o ajuste foram a aplicação de restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD.

Solvente

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 6.15 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC2, de um a cinco componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SVD na análise da matriz tridimensional do solvente metanol.

Como se pode ver na Tabela 6.15, apesar do número de iterações necessários para atingir o critério de convergência no modelo de quatro componentes atingir o limite definido, é possível verificar, pela menor valor de diferença de ajuste e pelos maiores valores de ajuste, que este modelo parece ser o mais adequado.

Tabela 6.15 – Validação cruzada do Modelo PARAFAC2, de 1 a 5 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] de metanol. São apresentados os ajustes obtidos na análise da matriz segmentada e na matriz total, diferença de ajustes e o número de iterações necessários.

	Número de componentes				
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco
Número de Iterações	2	56	2000	2000	2000
AjMS (%)	85.382	96.451	97.781	99.101	99.484
AjMT (%)	85.347	96.323	97.884	99.089	82.475
$\Delta_{\text{AjMS-AjMT}}$	-0.035	-0.128	-0.103	-0.013	-17.009

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 6.16 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC2 na análise da matriz tridimensional solvente metanol. Na Tabela 6.16 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a cinco componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas obtidas por SVD. Na Tabela 6.16 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC2, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como se pode ver na Tabela 6.16 a), a estimativa de concentração mais próxima de zero, com uma concentração de -0.566 ppm, é encontrada com o modelo de cinco componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD. Também se pode verificar na Tabela 6.16 b) que, a estimativa de concentração do solvente de valor positivo mais próxima de zero, com uma concentração de 1.206 ppm, é encontrada com o modelo de quatro componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC2 sem restrições. Com estes dois modelos, são obtidas percentagens de ajuste do modelo próximas de valor elevado.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de PARAFAC2 de quatro componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC2 de quatro componentes sem restrições na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração].

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de metanol pelo modelo de PARAFAC2 de quatro componentes, o primeiro e segundo componentes são a linha de base com absorvância de fundo, o terceiro componente é o composto inicial e o quarto componente é o composto principal corado.

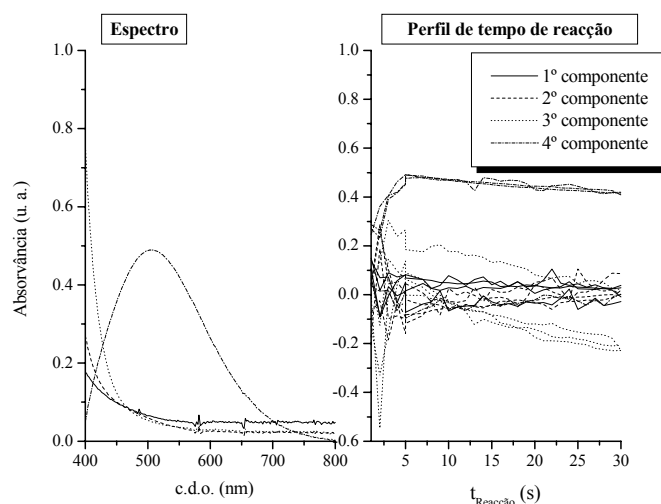


Fig. 6.8 – Espectro e perfil de variação da intensidade de absorvância com o tempo estimados pelo modelo PARAFAC2 de 4 componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC2 de 4 componentes sem restrições na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] do solvente metanol.

Tabela 6.16 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC2 na análise da matriz [espectro $\times t_{\text{reação}} \times$ concentração] do solvente metanol com a) restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões

Número de componentes				
	Dois	Três	Quatro	Cinco
C_{estimada} (ppm)	7.447 (5.091)	35.743 (8.448)	3.665 (6.529)	-0.566 (7.631)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	19.117	27.599	24.991	29.851
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	96.451	97.687	98.685	99.356
SSQ_{resíduos}	0.606	0.258	0.083	0.019
Iterações	53	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Espectro}	-0.102	+0.246	-0.127	-0.315
R_{t_{reação}}	+0.861 - -0.220 -0.714 - -0.570	+0.974 - +0.623 +0.523 - +0.447	+0.919 - -0.442 -0.714 - -0.650	+0.675 - -0.827 -0.768 - -0.686
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.024 (0.016)	0.101 (0.020)	0.012 (0.021)	-0.002 (0.026)
b	3.252 $\times 10^{-3}$ (1.077 $\times 10^{-4}$)	2.828 $\times 10^{-3}$ (1.353 $\times 10^{-4}$)	3.314 $\times 10^{-3}$ (1.435 $\times 10^{-4}$)	3.585 $\times 10^{-3}$ (1.751 $\times 10^{-4}$)
S_{y/x}	0.021	0.026	0.028	0.034
R	0.9989	0.9977	0.9981	0.9973

b) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e outras avaliações

Outras avaliações				
	3 componentes (estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições)	4 componentes (estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições)	2 componentes (matriz conc. $\times t_{\text{reação}} \times$ esp.)	3 componentes (matriz conc. $\times t_{\text{reação}} \times$ esp. e unimodalidade na 3ª dimensão)
C_{estimada} (ppm)	3.212 (6.623)	1.206 (7.218)	2.153 (5.356)	3.645 (6.131)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	25.410	27.791	20.661	23.470
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.045	99.228	92.118	96.773
SSQ_{resíduos}	0.184	0.029	2.991	0.502
Iterações	212	2000 (máx.)	18	67
R_{Espectro}	-0.078	-0.063	-0.093	-0.116
R_{t_{reação}}	+0.605 - -0.773 -0.738 - -0.623	+0.748 - -0.776 -0.783 - -0.665	-0.517 (máx.)	-0.634 (máx.)
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.028 (6.623)	0.004 (0.024)	0.007 (0.018)	0.012 (0.020)
b	3.322 $\times 10^{-3}$ (1.463 $\times 10^{-4}$)	3.355 $\times 10^{-3}$ (1.627 $\times 10^{-4}$)	3.341 $\times 10^{-3}$ (1.196 $\times 10^{-4}$)	3.515 $\times 10^{-3}$ (1.348 $\times 10^{-4}$)
S_{y/x}	0.028	0.031	0.023	0.026
R	0.9981	0.9977	0.9987	0.9983

* Ver rodapé da Tabela 4.11.

Padrão

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 6.17 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC2, de um a cinco componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SVD na análise da matriz tridimensional do padrão de Diltiazem 150.028 ppm.

É possível verificar pela Tabela 6.17 que, por validação cruzada, foram obtidas pequenas diferenças de ajustes para os modelos de dois e quatro componentes. Com o modelo de dois componentes, foi encontrado um número menor de iterações, e com o modelo de quatro componentes, foi obtida uma percentagem de ajuste do modelo mais elevada. Apesar de se obter um menor número de iterações com o modelo de dois componentes, o maior valor de percentagem de ajuste do modelo, encontrado com o modelo de quatro componentes, permite considerar este como o mais adequado.

Tabela 6.17 – Validação cruzada do Modelo PARAFAC2, de 1 a 5 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] de padrão de Diltiazem 150.028 ppm. São apresentados os ajustes obtidos na análise da matriz segmentada e na matriz total, diferença de ajustes e o número de iterações necessários.

	Número de componentes				
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco
Número de Iterações	2	1400	2000	2000	2000
AjMS (%)	90.255	97.307	98.137	99.298	85.270
AjMT (%)	90.310	97.415	98.724	99.497	99.689
$\Delta_{\text{AjMS-AjMT}}$	-0.055	-0.108	-0.587	-0.199	-14.419

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 6.18 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC2 na análise da matriz tridimensional do padrão de Diltiazem 150.028 ppm. Na Tabela 6.18 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a cinco componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas obtidas por SVD. Na Tabela 6.18 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC2, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como se pode verificar na Tabela 6.18 b), a estimativa de concentração mais próxima do valor de concentração esperado, com uma concentração de 143.683 ppm, é obtida como o modelo de quatro componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e

estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC2 sem restrições. São encontrados por este modelo, uma percentagem de ajuste do modelo elevada e estimativas adequadas do componente principal na dimensão da concentração. As mesmas condições de ajuste do modelo são encontradas tanto na análise da matriz do solvente metanol como na análise da matriz de padrão.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de PARAFAC2 de quatro componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC2 de quatro componentes sem restrições na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração].

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz do padrão de Diltiazem pelo modelo de PARAFAC2 de quatro componentes, o primeiro e terceiro componentes são a linha de base com absorvância de fundo, o segundo componente é o composto inicial e o quarto componente é o composto principal corado.

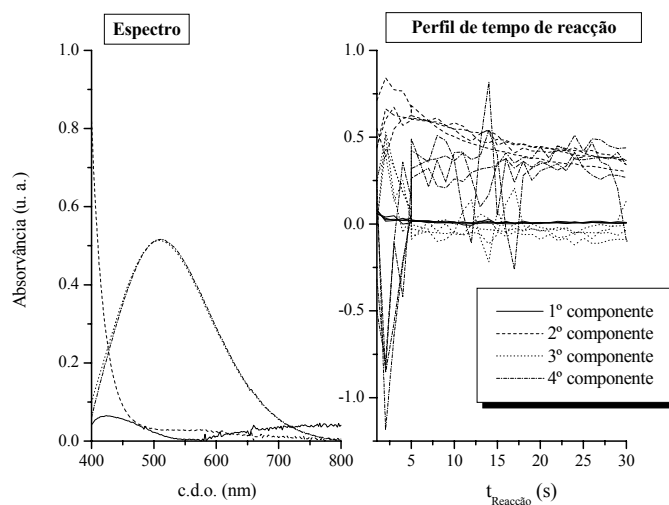


Fig. 6.9 – Espectro e perfil de variação da intensidade de absorvância com o tempo estimados pelo modelo PARAFAC2 de 4 componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC2 de 4 componentes sem restrições na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] do padrão de Diltiazem 150.028 ppm.

Tabela 6.18 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC2 na análise da matriz [espectro $\times t_{\text{reacção}} \times \text{concentração}$] de padrão de Diltiazem 150.028 ppm com a) restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões

Número de componentes				
	Dois	Três	Quatro	Cinco
C_{estimada} (ppm)	56.026 (28.150)	154.630 (3.717)	71.385 (33.955)	176.449 (53.866)
Recuperação (%)	37.344	103.068	47.581	117.611
LD (3S_{y/x}/b)	83.614	7.544	94.301	101.925
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	97.415	98.573	99.434	99.703
SSQ_{resíduos}	1.968	0.594	0.094	0.026
Iterações	1232	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Espectro}	+0.836	+0.675	+0.984	+0.766
R_{t_{reacção}}	+0.381 - +0.159 +0.359 - +0.282	+0.512 - +0.423 +0.631 - +0.640	+0.045 - -0.257 -0.181 - -0.652	+0.078 - -0.607 -0.186 - +0.095
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.144 (0.055)	0.272 (0.003)	0.171 (0.058)	0.289 (0.043)
b	2.564 $\times 10^{-3}$ (3.721 $\times 10^{-4}$)	1.761 $\times 10^{-3}$ (2.306 $\times 10^{-5}$)	2.396 $\times 10^{-3}$ (3.922 $\times 10^{-4}$)	1.637 $\times 10^{-3}$ (2.895 $\times 10^{-4}$)
S_{y/x}	0.071	0.004	0.075	0.056
R	0.9796	0.9998	0.9742	0.9701

b) restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e outras avaliações

Outras avaliações				
	3 componentes (estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições)	4 componentes (estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições)	3 componentes (matriz conc. $\times t_{\text{reacção}} \times \text{esp.}$)	3 componentes (matriz conc. $\times t_{\text{reacção}} \times \text{esp.}$ e estimativas iniciais por números aleatórios)
C_{estimada} (ppm)	166.590 (91.156)	143.683 (3.000)	137.900 (3.893)	134.880 (15.562)
Recuperação (%)	111.039	95.711	91.916	89.903
LD (3S_{y/x}/b)	177.943	6.318	8.364	37.787
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.423	99.487	98.199	98.154
SSQ_{resíduos}	0.732	0.084	0.955	1.033
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Espectro}	+0.740	+0.711	+0.777	+0.887
R_{t_{reacção}}	+0.534 - +0.564 +0.686 - +0.200	+0.592 - +0.526 +0.358 - +0.415	+0.621 (máx.)	+0.556 (máx.)
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.279 (0.077)	0.263 (0.003)	0.257 (0.004)	0.254 (0.016)
b	1.677 $\times 10^{-3}$ (5.179 $\times 10^{-4}$)	1.827 $\times 10^{-3}$ (2.003 $\times 10^{-5}$)	1.864 $\times 10^{-3}$ (2.706 $\times 10^{-5}$)	1.883 $\times 10^{-3}$ (1.104 $\times 10^{-4}$)
S_{y/x}	0.099	0.004	0.005	0.021
R	0.9164	0.9999	0.9998	0.9966

* Ver rodapé da Tabela 4.11.

Formulações Farmacêuticas

Para todas as formulações farmacêuticas foram analisadas matrizes [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] pelo modelo PARAFAC2 de quatro componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC2 sem restrições. Análises com outras condições de ajuste do modelo se consideradas mais adequadas foram efectuadas.

Na Tabela 6.19 são apresentadas as condições de ajuste do modelo PARAFAC2 consideradas mais adequadas na análise das matrizes obtidas com cada amostra analisada.

Tabela 6.19 – Condições de ajuste do modelo PARAFAC2 utilizadas na análise das matrizes obtidas com as amostras não fortificadas e fortificadas.

Matriz analisada	Condições de ajuste			Amostras analisadas
	Número de componentes	Restrições (1ª e 3ª dimensões)	Estimativas iniciais	
Espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração	Dois	Não negatividade	SVD	Di120meFo
	Quatro			Di120me e Al60co
	Cinco		PARAFAC2 sem restrições	Dtap, DtapFo, He120sr e He120srFo
Concentração \times $t_{\text{reação}}$ \times espectro	Quatro		SVD	Ba90reFo
	Três		PARAFAC2 sem restrições	Di60me
	Quatro			Ba90re
	Três		Números aleatórios	Di60meFo, Dt60coFo e He60coFo
	Quatro			Dt60co, He60co e Al60coFo
	Cinco			Df60co e Df60coFo

Como se pode verificar na Tabela 6.19, para a maioria das amostras, as estimativas de concentração foram encontradas com condições de ajuste diferentes das inicialmente consideradas. Para um grande número das amostras, as estimativas mais adequadas, foram obtidas na análise da matriz [concentração \times $t_{\text{reação}}$ \times espectro] e ainda com estimativas iniciais obtidas de forma diferente.

A matriz [concentração \times $t_{\text{reação}}$ \times espectro] permite lidar com desvios maiores da trilinearidade e, como se pode ver na Tabela 6.19, os maiores desvios são encontrados com as formulações farmacêuticas de menor dosagem. Também, tal como já verificado

anteriormente, o maior número de estimativas adequadas com estimativas iniciais por números aleatórios são obtidos na análise da matriz [concentração \times $t_{\text{reacção}}$ \times espectro].

Para as formulações Dtap, He120sr e Df60co são utilizadas as mesmas condições de ajuste na análise das amostras não fortificadas e fortificadas. Para as formulações Di60me e Ba90re são utilizadas diferentes estimativas iniciais e para a formulação Al60co além de diferentes estimativas iniciais é utilizado um tipo diferente de matriz, na análise das amostras fortificadas e não fortificadas. Para as formulações Di120me, Dt60co e He60co, é utilizado um número de componentes inferior na análise das amostras fortificadas.

Na Tabela 6.20 são apresentados os resultados da análise pelo modelo PARAFAC2 das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas.

Para todas as amostras são obtidos ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.990. De uma forma geral, são obtidos para as amostras fortificadas, ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza ligeiramente superior. São encontrados para a maioria das amostras, de uma forma geral, desvios padrão relativos inferiores a 10 %. Só para as amostras não fortificadas Ba90re, Dtap, He60co e He120sr são encontrados desvios padrão ligeiramente superiores a 10 %. Para a maioria das amostras, os desvios padrão relativos encontrados, são de uma forma geral próximos aos encontrados com o modelo PARAFAC.

Recuperações dentro do esperado são obtidas para todas as amostras não fortificadas e fortificadas. As únicas excepções, com recuperações ligeiramente inferiores a 90 %, verificam-se para a amostra não fortificada e fortificada da formulação Ba90re. São também obtidas, para a maioria das formulações farmacêuticas, recuperações de fortificação próximas de 100 %. As excepções, com recuperações ligeiramente inferiores a 90 %, são as formulações Ba90Re, Di60me e Di120me e, com uma recuperação ligeiramente superior a 110 %, a formulação He120sr.

Para a maioria das amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas das dosagens estimadas por HPLC-UV. Os erros de previsão encontrados variam desde 0.3 a 3 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Df60co e o mais alto para a amostra Ba90re. Na avaliação da quantificação por este modelo com todas as amostras não fortificadas é obtido um valor de EPM de 1.403 %, de EPT de 1.542 % e de RMSEP de 1.519.

É de referir ainda que, uma estimativa de dosagem mais próxima da dosagem estimada por HPLC-UV, é obtida para a amostra Ba90re com condições de ajuste idênticas mas com estimativas iniciais por SVD. Também para a formulação Di60me, é encontrada uma recuperação de fortificação de 95 %, com condições de ajuste idênticas mas com quatro componentes na análise da amostra fortificada.

Melhores estimativas de concentração, relativamente às obtidas por análise directa e por PARAFAC, são encontradas pelo modelo PARAFAC2. Também, de uma forma geral, são encontradas melhores recuperações de fortificação.

Tabela 6.20 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas obtidas pelo modelo PARAFAC2.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Al60co	Df60co	Ba90re	Dt60co	Dtap
C_{estimada} (ppm)	138.884 (7.370)	143.101 (11.428)	132.466 (16.668)	140.075 (12.850)	147.308 (25.106)
C_{esperada} (ppm)	149.648	150.089	150.460	150.168	150.729
Recuperação (%)	92.807	95.344	88.041	93.278	97.730
LD (3S_{y/x}/b)	15.780	24.073	36.559	27.352	52.123
DOS_{estimada} (mg)	55.684	57.206	79.237	55.967	195.461
DOS_{estimada} HPLC (mg)	54.645	57.019	81.617	57.184	198.360
EP (%)	1.901	0.328	2.916	2.128	1.462
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	99.320	99.224	99.623	98.890	99.655
SSq_{resíduos}	0.129	0.192	0.028	0.391	0.020
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Espectro}	+0.695	+0.994	+0.979	+0.942	+0.910
R_{t_{reacção}}	-0.548 - -0.038 -0.142 - -0.373	-0.217	+0.819(máx.)	+0.663(máx.)	+0.119-+0.181 +0.750-+0.083
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.258 (0.008)	0.262 (0.011)	0.252 (0.018)	0.259 (0.013)	0.266 (0.024)
b	1.858×10 ⁻³ (5.088×10 ⁻⁵)	1.830×10 ⁻³ (7.659×10 ⁻⁵)	1.899×10 ⁻³ (1.203×10 ⁻⁴)	1.849×10 ⁻³ (8.793×10 ⁻⁵)	1.804×10 ⁻³ (1.629×10 ⁻⁴)
S_{y/x}	0.010	0.015	0.023	0.017	0.031
R	0.9993	0.9983	0.9960	0.9977	0.9919

a) amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Di60me	Di120me	He60co	He120sr
C_{estimada} (ppm)	143.686 (9.372)	142.303 (11.463)	139.337 (15.729)	137.580 (26.741)
C_{esperada} (ppm)	150.111	150.602	150.213	150.007
Recuperação (%)	95.720	94.489	92.759	91.715
LD (3S_{y/x}/b)	19.703	24.296	33.565	57.414
DOS_{estimada} (mg)	57.432	113.387	55.656	110.059
DOS_{estimada} HPLC (mg)	57.689	115.152	54.870	110.619
EP (%)	0.446	1.533	1.433	0.506
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.867	99.528	98.909	99.696
SSq_{resíduos}	0.398	0.069	0.402	0.026
Iterações	2	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Espectro}	+0.871	+0.530	+0.905	+0.913
R_{t_{reacção}}	+0.119 (máx.)	+0.870 - +0.903 +0.824 - +0.817	-0.341 (máx.)	+0.294 - -0.024 +0.918 - +0.909
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.263 (0.009)	0.261 (0.011)	0.258 (0.016)	0.256 (0.028)
b	1.827×10 ⁻³ (6.257×10 ⁻⁵)	1.836×10 ⁻³ (7.729×10 ⁻⁵)	1.854×10 ⁻³ (1.082×10 ⁻⁴)	1.864×10 ⁻³ (1.860×10 ⁻⁴)
S_{y/x}	0.012	0.015	0.021	0.036
R	0.9988	0.9982	0.9966	0.9902

(Continua)

Tabela 6.20 (Continuação)

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Al60coFo	Df60coFo	Ba90reFo	Dt60coFo	DtapFo
C_{estimada} total (ppm)	187.490 (16.416)	188.318 (6.409)	176.828 (14.317)	192.423 (1.877)	195.840 (19.179)
C_{esperada} total (ppm)	199.658	200.322	200.246	200.401	200.515
Recuperação (%)	93.906	94.008	88.305	96.019	97.668
LD (3S_{y/x}/b)	30.028	11.674	27.104	3.376	34.275
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	99.070	99.254	99.512	99.066	99.678
SSQ_{resíduos}	0.332	0.248	0.065	0.346	0.022
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Espectro}	+0.959	+0.947	+0.999	+0.901	+0.971
R_treacção	-0.698 (máx.)	+0.072(máx.)	+0.956(máx.)	+0.965(máx.)	+0.978-+0.907 +0.925-+0.905
Fortificação (C_{estimada amostra fortificada} - C_{estimada amostra não fortificada})					
C_{estimada} (ppm)	48.606	45.217	44.362	52.348	48.532
C_{esperada} (ppm)	50.009	50.232	49.786	50.232	49.786
Recuperação (%)	97.195	90.016	89.105	104.213	97.481
Δ = C_{estimada} - C_{esperada}	-1.403	-5.015	-5.424	+2.116	-1.254
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.298 (0.012) 1.587×10 ⁻³	0.298 (0.005) 1.583×10 ⁻³	0.290 (0.011) 1.640×10 ⁻³	0.301 (0.001) 1.564×10 ⁻³	0.303 (0.014) 1.548×10 ⁻³
b	(8.270×10 ⁻⁵)	(3.212×10 ⁻⁵)	(7.702×10 ⁻⁵)	(9.177×10 ⁻⁶)	(9.194×10 ⁻⁵)
S_{y/x}	0.016	0.006	0.015	0.002	0.018
R	0.9973	0.9996	0.9978	1.0000	0.9965

b) amostras fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Di60meFo	Di120meFo	He60coFo	He120srFo
C_{estimada} total (ppm)	187.627 (3.263)	186.692 (2.860)	186.900 (15.574)	194.423 (10.482)
C_{esperada} total (ppm)	200.344	200.388	200.446	200.240
Recuperação (%)	93.653	93.165	93.242	97.095
LD (3S_{y/x}/b)	5.956	5.252	28.489	18.748
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.785	97.847	98.582	99.683
SSQ_{resíduos}	0.606	2.012	0.875	0.033
Iterações	2000 (máx.)	1494	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Espectro}	+0.923	+0.798	+0.913	+0.999
R_treacção	+0.288 (máx.)	+0.986 - +0.953 +0.828 - +0.952	+0.466 (máx.)	+0.351 - +0.144 +0.954 - +0.644
Fortificação (C_{estimada amostra fortificada} - C_{estimada amostra não fortificada})				
C_{estimada} (ppm)	43.941	44.389	47.563	56.843
C_{esperada} (ppm)	50.232	49.786	50.232	50.232
Recuperação (%)	87.476	89.160	94.687	113.161
Δ = C_{estimada} - C_{esperada}	-6.291	-5.397	-2.669	+6.611
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.298 (0.002) 1.586×10 ⁻³	0.297 (0.002) 1.591×10 ⁻³	0.297 (0.012) 1.590×10 ⁻³	0.302 (0.007) 1.554×10 ⁻³
b	(1.642×10 ⁻⁵)	(1.448×10 ⁻⁵)	(7.872×10 ⁻⁵)	(5.065×10 ⁻⁵)
S_{y/x}	0.003	0.003	0.015	0.010
R	0.9999	0.9999	0.9976	0.9989

* máx. - corresponde à indicação de que o número máximo de iterações definido no ajuste do modelo foi atingido ou de que o coeficiente de correlação linear apresentado corresponde ao calculado com a estimativa do espectro ou tempo de reacção respectivamente ao tempo de reacção ou ao c.d.o. de absorvância máximo. A dosagem é dada em massa de composto por comprimido; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

6.4.2.3 – MCR-ALS

No ajuste pelo modelo MCR-ALS foi de uma forma geral utilizada a matriz bidimensional [(concentração \times $t_{\text{reação}}$) \times espectro] (120 \times 201). As condições geralmente utilizadas para o ajuste foram a aplicação de restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições.

Solvente

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 6.21 são apresentados os valores de perda de ajuste do modelo MCR-ALS e do número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS de um a cinco componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada do solvente metanol.

É possível verificar na Tabela 6.21, que foram obtidas perdas de ajuste de MCR vs. PCA próximas com os modelos de dois a cinco componentes. Os mais baixos valores de perda de ajuste de MCR vs Exp. foram encontrados a partir do modelo de três componentes. Foi verificado um maior decréscimo de perda de ajuste de MCR vs Exp. do modelo de três para quatro componentes. O menor número de iterações foi obtido com o modelo de dois componentes. Apesar de um número de iterações maior, o modelo mais adequado parece ser um modelo de quatro componentes.

Tabela 6.21 – Perda de ajuste de MCR-ALS vs. PCA, de MCR-ALS vs. experimental e número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS, de 1 a 5 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz [(concentração \times $t_{\text{reação}}$) \times espectro] do solvente metanol.

	Número de componentes				
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco
Número de Iterações	15	11	33	42	39
LOF _{MCR vs. PCA}	2.986×10^{-14}	3.427×10^{-14}	5.797×10^{-14}	3.737×10^{-14}	3.941×10^{-14}
LOF _{MCR vs Exp}	14.618	3.420	1.942	0.677	0.470

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 6.22 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo MCR-ALS na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada do solvente metanol. Na Tabela 6.22 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a cinco componentes, não negatividade

nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições. Na Tabela 6.22 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo MCR-ALS, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

As estimativas de concentração mais próximas do esperado são encontradas com a análise dos modelos apresentados na Tabela 6.22 b). A melhor estimativa de concentração, com uma concentração de 0.191 ppm, é encontrada com o modelo de quatro componentes, não negatividade nas duas dimensões e restrição de trilinearidade no componente principal na análise da matriz [(concentração \times $t_{\text{reação}}$) \times espectro]. Com percentagens de ajuste do modelo mais altas, são encontradas estimativas mais elevadas que a anterior, com os modelos de dois e três componentes e não negatividade nas duas dimensões na análise da matriz [(concentração \times espectro) \times $t_{\text{reação}}$].

É ainda de referir que, na avaliação da matriz de metanol, com indicação de ausência de componente principal na primeira matriz, não se encontrou melhores resultados do que os apresentados na Tabela 6.22 b).

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de MCR-ALS de quatro componentes, não negatividade nas duas dimensões, trilinearidade no componente principal e estimativas iniciais por estimativas do modelo MCR-ALS de quatro componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração \times $t_{\text{reação}}$) \times espectro].

Tabela 6.22 – Estimativas de concentração obtidas por MCR-ALS na análise da matriz [(concentração × $t_{\text{reacção}}$) × espectro] do solvente metanol com a) tridimensionalidade, restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por MCR-ALS sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade nas duas dimensões

Número de componentes				
	Dois	Três	Quatro	Cinco
C_{estimada} (ppm)	5.333 (6.233)	5.417 (6.293)	7.557 (6.182)	5.435 (6.071)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	23.659	23.875	23.199	23.031
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	92.865	93.609	91.394	93.889
SSQ_{resíduos}	2.451	1.966	3.566	1.798
Iterações	31	45	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	6.324	6.082	8.587	6.092
ΔLOF_{MCR} (PCA - Exp.)	-0.811	-0.309	-0.020	-0.019
R_{Espectro}	-0.178	-0.186	-0.276	-0.259
R_{t_{reacção}}	+0.566 - +0.717 +0.864 - +0.823	+0.986 - +0.076 -0.626 - -0.518	+0.969 - +0.090 -0.639 - -0.494	+0.992 - -0.195 -0.682 - -0.578
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.008 (0.009)	0.007 (0.008)	0.010 (0.008)	0.007 (0.007)
b	1.459×10 ⁻³ (5.981×10 ⁻⁵)	1.330×10 ⁻³ (5.503×10 ⁻⁵)	1.316×10 ⁻³ (5.290×10 ⁻⁵)	1.248×10 ⁻³ (4.981×10 ⁻⁵)
S_{y/x}	0.012	0.011	0.010	0.010
R	0.9983	0.9983	0.9984	0.9984

b) com restrição de não negatividade nas duas dimensões e outras avaliações

Outras avaliações				
	2 componentes (matriz (conc.×esp.)×t _{reacção})	3 componentes (matriz (conc.×esp.)×t _{reacção})	3 componentes (trilinearidade no componente principal)	4 componentes (trilinearidade no componente principal)
C_{estimada} (ppm)	1.761 (6.180)	1.425 (6.761)	3.450 (6.289)	0.191 (6.264)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	23.889	26.179	24.100	24.410
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	92.943	93.451	89.699	91.599
SSQ_{resíduos}	2.393	2.065	5.108	3.398
Iterações	11	39	5	46
LOF_{MCR vs. PCA}	5.579	5.771	10.143	8.372
ΔLOF_{MCR} (PCA - Exp.)	-1.472	-0.779	-0.158	-0.029
R_{Espectro}	+0.999 - -0.273 -0.198 - -0.161	+0.987 - -0.282 -0.198 - -0.157	-0.211	-0.126
R_{t_{reacção}}	-0.657	-0.861	-0.588 - -0.588 -0.588 - -0.588	-0.499 - -0.499 -0.499 - -0.499
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.001 (0.005)	0.004 (0.017)	0.005 (0.009)	0.000 (0.009)
b	7.641×10 ⁻⁴ (3.163×10 ⁻⁵)	2.476×10 ⁻³ (1.123×10 ⁻⁴)	1.382×10 ⁻³ (5.773×10 ⁻⁵)	1.423×10 ⁻³ (6.019×10 ⁻⁵)
S_{y/x}	0.006	0.022	0.011	0.012
R	0.9983	0.9979	0.9983	0.9982

* Ver rodapé da Tabela 4.6.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de metanol pelo modelo de MCR-ALS de quatro componentes, o primeiro componente é o composto inicial, o segundo componente é o composto principal corado e o terceiro e quarto componentes são a linha de base com absorvância de fundo.

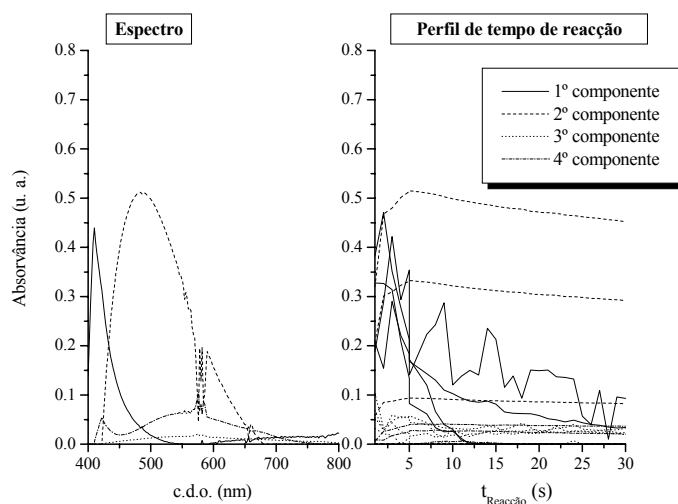


Fig. 6.10 – Espectro e perfil de variação da intensidade de absorvância com o tempo estimados pelo modelo MCR-ALS de 4 componentes, não negatividade nas duas dimensões, trilinearidade no componente principal e estimativas iniciais por MCR-ALS de 4 componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração \times $t_{\text{reação}}$) \times espectro] do solvente metanol.

Padrão

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 6.23 são apresentados os valores de perda de ajuste do modelo MCR-ALS e do número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS de um a cinco componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada do padrão de Diltiazem 150.028 ppm.

Na Tabela 6.23 é possível verificar que, foram encontrados para os modelos de dois a quatro componentes perdas de ajuste de MCR vs. PCA próximas. Os valores mais baixos perdas de ajuste de MCR vs Exp. foram encontrados a partir do modelo de três componentes. O menor número de iterações, associado a baixas perdas de ajuste de MCR vs. PCA e de MCR vs Exp., foi encontrado com o modelo de quatro componentes. O modelo mais adequado parece ser o modelo de quatro componentes.

Tabela 6.23 – Perda de ajuste de MCR-ALS vs. PCA, de MCR-ALS vs. experimental e número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS, de 1 a 5 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz [(concentração × $t_{\text{reacção}}$) × espectro] do padrão de Diltiazem 150.028 ppm.

	Número de componentes				
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco
Número de Iterações	12	12	25	12	22
$\text{LOF}_{\text{MCR vs. PCA}}$	3.802×10^{-14}	3.308×10^{-14}	3.087×10^{-14}	3.388×10^{-14}	3.635×10^{-14}
$\text{LOF}_{\text{MCR vs Exp}}$	9.690	2.368	1.233	0.310	0.225

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 6.24 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo MCR-ALS na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada do padrão de Diltiazem 150.028 ppm. Na Tabela 6.24 a) são apresentados os resultados obtidos com dois a cinco componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições. Na Tabela 6.24 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo MCR-ALS, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como se pode verificar na Tabela 6.24 a) e b), só com a aplicação de restrição de trilinearidade, no componente principal ou no componente principal e componente inicial, são obtidas estimativas de concentração próximas do esperado.

Para todas as análises com os modelos apresentados na Tabela 6.24 b) verifica-se uma grande proximidade da estimativa de concentração relativamente à esperada. No entanto, as melhores estimativas do componente principal nas três dimensões e um limite de detecção baixo, levam a considerar o modelo de três componentes e restrição de trilinearidade no componente principal como o modelo mais adequado. É de referir que, ao contrário do que é habitual, o critério para o perfil de tempo de reacção estimado é o de um perfil mais próximo ao experimental, e assim o critério considerado é o de um coeficiente de correlação linear mais positivo.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de MCR-ALS de três componentes, não negatividade nas duas dimensões, trilinearidade no componente principal e estimativas iniciais por estimativas do modelo MCR-ALS de três componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração × $t_{\text{reacção}}$) × espectro].

Tabela 6.24 – Estimativas de concentração obtidas por MCR-ALS na análise da matriz [(concentração × $t_{\text{reação}}$) × espectro] de padrão de Diltiazem 150.028 ppm com a) tridimensionalidade, restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por MCR-ALS sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade nas duas dimensões

	Número de componentes			
	Dois	Três	Quatro	Cinco
C_{estimada} (ppm)	102.014 (24.488)	104.493 (23.620)	103.226 (19.923)	101.948 (28.626)
Recuperação (%)	67.997	69.649	68.805	67.953
LD (3S_{y/x}/b)	60.030	57.348	48.611	70.191
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	97.632	98.763	99.594	99.709
SSQ_{resíduos}	1.651	0.451	0.049	0.025
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	4.409×10 ⁻⁴	0.102	0.262	0.186
Δ_{LOFMCR} (PCA – Exp.)	-2.368	-1.136	-0.144	-0.006
R_{Espectro}	+0.843	+0.840	+0.834	+0.840
R_{t_{reação}}	+0.400 - +0.199	+0.423 - +0.236	+0.441 - +0.288	+0.367 - +0.284
	+0.437 - +0.328	+0.460 - +0.369	+0.478 - +0.387	+0.421 - +0.613
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.191 (0.029)	0.193 (0.027)	0.186 (0.022)	0.187 (0.033)
b	1.877×10 ⁻³ (1.955×10 ⁻⁴)	1.849×10 ⁻³ (1.840×10 ⁻⁴)	1.802×10 ⁻³ (1.520×10 ⁻⁴)	1.837×10 ⁻³ (2.237×10 ⁻⁴)
S_{y/x}	0.038	0.035	0.029	0.043
R	0.9893	0.9902	0.9930	0.9855

b) com restrição de não negatividade nas duas dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	3 componentes (trilinearidade no componente principal)	4 componentes (trilinearidade no componente principal)	3 componentes (trilinearidade no componente principal e no inicial)	4 componentes (trilinearidade no componente principal e no inicial)
C_{estimada} (ppm)	150.543 (1.104)	148.381 (1.563)	149.644 (1.360)	150.767 (1.040)
Recuperação (%)	100.343	98.902	99.744	100.493
LD (3S_{y/x}/b)	2.271	3.240	2.807	2.138
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	97.338	97.702	97.033	97.391
SSQ_{resíduos}	2.087	1.554	2.591	2.004
Iterações	28	31	37	40
LOF_{MCR vs. PCA}	2.360	2.277	2.698	2.591
Δ_{LOFMCR} (PCA – Exp.)	-0.302	-0.021	-0.268	-0.018
R_{Espectro}	+0.842	+0.842	+0.741	+0.742
R_{t_{reação}}	+0.701 - +0.701	+0.677 - +0.677	+0.696 - +0.696	+0.690 - +0.690
	+0.701 - +0.701	+0.677 - +0.677	+0.696 - +0.696	+0.690 - +0.690
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.220 (0.001)	0.210 (0.001)	0.219 (0.001)	0.208 (0.001)
b	1.465×10 ⁻³ (5.772×10 ⁻⁶)	1.418×10 ⁻³ (7.973×10 ⁻⁶)	1.462×10 ⁻³ (7.125×10 ⁻⁶)	1.3812×10 ⁻³ (5.125×10 ⁻⁶)
S_{y/x}	0.001	0.002	0.001	0.001
R	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

* Ver rodapé da Tabela 4.6.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz do padrão de Diltiazem pelo modelo de MCR-ALS de três componentes, o primeiro componente é o composto inicial, o segundo componente é o composto principal corado e o terceiro componente é a linha de base com absorvância de fundo.

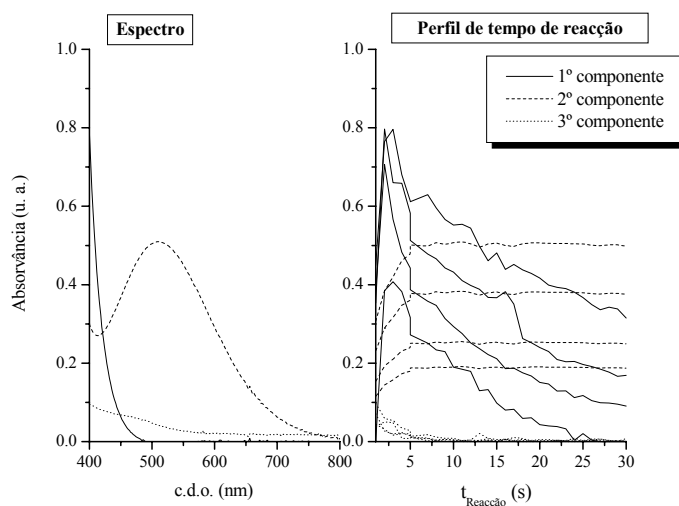


Fig. 6.11 – Espectro e perfil de variação da intensidade de absorvância com o tempo estimados pelo modelo MCR-ALS de 3 componentes, não negatividade nas duas dimensões, trilinearidade no componente principal e estimativas iniciais por estimativas de MCR-ALS de 3 componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração \times $t_{\text{reacção}}$) \times espectro] do padrão de Diltiazem 150.028 ppm.

Formulações Farmacêuticas

Para todas as formulações farmacêuticas foram analisadas matrizes [(concentração \times $t_{\text{reacção}}$) \times espectro] pelo modelo MCR-ALS de três componentes, não negatividade nas duas dimensões, trilinearidade no composto principal e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições. Análises com outras condições de ajuste do modelo se consideradas mais adequadas foram efectuadas.

Na Tabela 6.25 são apresentadas as condições de ajuste do modelo MCR-ALS consideradas mais adequadas na análise das matrizes obtidas com cada amostra analisada.

Tabela 6.25 – Condições de ajuste do modelo MCR-ALS utilizadas na análise das matrizes obtidas com as amostras não fortificadas e fortificadas.

Matriz analisada	Condições de ajuste			Amostras analisadas
	Número de componentes	Restrições (duas dimensões)	Estimativas iniciais	
(Concentração × t _{reação}) × espectro	Dois	Não negatividade e trilinearidade no composto principal	MCR-ALS sem restrições	Di60meFo
	Três			Ba90re, Ba90reFo e Df60coFo
	Quatro			He60co e He60coFo
	Dois	Não negatividade e trilinearidade no composto principal e inicial		Di60me
Três	Dtap, DtapFo, Dt60co, Dt60coFo e Df60co			
(Concentração × espectro) × t _{reação}	Três	Não negatividade		Al60coFo, Di120me e Di120meFo
	Três	Não negatividade e trilinearidade no composto principal		Al60co
	Quatro	Não negatividade e trilinearidade no composto principal		He120srFo
	Quatro	Não negatividade e trilinearidade no composto principal e inicial	He120sr	

Como é possível verificar na Tabela 6.25, para a maioria das amostras as estimativas mais adequadas foram encontradas com condições de ajuste diferentes das inicialmente consideradas. As condições de ajuste, que permitem a obtenção de estimativas adequadas, diferentes das iniciais foram, a análise da matriz [(concentração × espectro) × t_{reação}], a não aplicação de restrição de trilinearidade no composto principal ou a sua aplicação tanto ao composto principal como ao composto inicial.

Consoante os maiores ou menores desvios a trilinearidade assim são utilizadas condições de ajuste diferentes. Na análise de matrizes com menores desvios a trilinearidade a análise da matriz [(concentração × espectro) × t_{reação}] é a mais adequada. Com a maioria das amostras, na análise matriz [(concentração × espectro) × t_{reação}], as melhores estimativas são encontradas com a aplicação da restrição de trilinearidade só no composto principal ou no composto principal e inicial. As exceções, em que não é aplicada a restrição de trilinearidade na análise deste tipo de matriz, são encontradas para a amostra não fortificada Di120me e fortificadas Al60coFo e Di120meFo.

Para as formulações Ba90re, Dt60co, Dtap, Di120me e He60co as mesmas condições de ajuste são utilizadas na análise das amostras não fortificadas e fortificadas. Para as restantes formulações, só a aplicação da restrição de trilinearidade difere na análise das amostras não fortificadas e fortificadas. Para a formulação Al60co é utilizada a restrição de trilinearidade no composto principal na análise da amostra não fortificada e não é utilizada na análise da amostra fortificada. Para as formulações Df60co, Di60me e He120sr, a restrição de trilinearidade é aplicada no composto principal e inicial na análise das amostras não fortificadas, e só é aplicada no composto inicial na análise das matrizes das amostras fortificadas. Estas diferenças, nas condições de ajuste utilizadas na análise dos dois tipos de amostras, indicam que as amostras fortificadas apresentam um menor desvio a trilinearidade.

Na Tabela 6.26 são apresentados os resultados da análise pelo modelo MCR-ALS das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas.

De uma forma geral, são obtidos pelo modelo MCR-ALS ajustes lineares com coeficientes de correlação linear maiores do que os obtidos anteriormente. Excepto para a amostra não fortificada Dtap, com um coeficiente de correlação linear de 0.908, são obtidos ajustes lineares com coeficiente de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.990. Excepto para a amostra Dtap, com um desvio padrão de 30 %, todas as outras amostras apresentam um desvio padrão relativo inferior a 10 %.

Para todas as amostras não fortificadas e fortificadas são obtidas recuperações de concentração total dentro do esperado. De uma forma geral, são também obtidas recuperações de fortificação por volta de 100 %. As excepções, são as formulações Df60co, Di60me e He60co com recuperações de fortificação ligeiramente abaixo dos 90%.

Para a maioria das amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas das dosagens estimadas por HPLC-UV. São encontrados para todas as amostras não fortificadas erros de previsão inferiores a 10 %. Os erros de previsão encontrados variam desde 0.2 a 6 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Di120me e o mais alto para as amostra He60co e He120sr. Na avaliação da quantificação por este modelo, com todas as amostras não fortificadas, é obtido um valor de EPM de 2.863 %, de EPT de 3.094 % e de RMSEP de 3.048.

É de referir que, estimativas de dosagem mais próximas da dosagem estimada por HPLC-UV, são obtidas para algumas amostras com condições de ajuste diferentes. Estimativas de dosagem mais próximas são obtidas, para a amostra He120sr, com quatro componentes e, para a amostra He60co, com três componentes e restrição de trilinearidade também no componente inicial.

Ainda, com condições de ajuste diferentes, são obtidas para algumas formulações recuperações de fortificação superiores. É obtida uma recuperação superior, para a formulação He60co com uma pior estimativa de dosagem e um pior ajuste do modelo e, para a amostra Di120me com uma pior estimativa de dosagem e pior ajuste linear.

São encontradas, pelo modelo MCR-ALS, estimativas próximas às obtidas com o modelo PARAFAC2. Recuperações de fortificação mais adequadas são encontradas com o modelo MCR-ALS. No entanto, de uma forma geral, são encontradas estimativas de concentração mais próximo do esperado com o modelo PARAFAC2.

Tabela 6.26 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas obtidas pelo modelo MCR-ALS.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Al60co	Df60co	Ba90re	Dt60co	Dtap
C_{estimada} (ppm)	137.429 (3.329)	144.229 (11.541)	142.585 (12.176)	144.647 (8.857)	146.752 (42.308)
C_{esperada} (ppm)	149.648	150.089	150.460	150.168	150.729
Recuperação (%)	91.834	96.095	94.766	96.323	97.162
LD (3S_{y/x}/b)	7.165	24.217	25.782	18.559	88.407
DOS_{estimada} (mg)	55.101	57.673	85.290	57.794	194.723
DOS_{estimada} HPLC (mg)	54.645	57.019	81.617	57.184	198.360
EP (%)	0.835	1.147	4.500	1.067	1.834
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	96.485	97.279	97.235	98.082	95.902
SSq_{resíduos}	3.442	2.368	1.504	1.168	2.783
Iterações	47	50 (máx.)	26	31	14
LOF_{MCR vs. PCA}	2.548	2.635	2.469	1.579	3.918
Δ_{LOFMCR} (PCA - Exp.)	-0.968	-0.087	-0.296	-0.339	-0.180
R_{Espectro}	+0.840-+0.840	+0.982	+0.972	+0.954	+0.982
R_{t_{reacção}}	-0.423	+0.583-+0.583	+0.960-+0.960	-0.163 - -0.163	+0.934-+0.934
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.117 (3.329)	0.221 (0.010)	0.190 (0.009)	0.227 (0.008)	0.179 (0.028)
b	8.548×10 ⁻⁴ (1.063×10 ⁻⁵)	1.530×10 ⁻³ (6.441×10 ⁻⁵)	1.336×10 ⁻³ (5.967×10 ⁻⁵)	1.572×10 ⁻³ (5.071×10 ⁻⁵)	1.221×10 ⁻³ (1.870×10 ⁻⁴)
S_{y/x}	0.002	0.012	0.011	0.010	0.036
R	0.9998	0.9982	0.9980	0.9990	0.9773

a) amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Di60me	Di120me	He60co	He120sr
C_{estimada} (ppm)	151.343 (11.217)	144.848 (2.204)	145.276 (13.510)	145.986 (11.032)
C_{esperada} (ppm)	150.111	150.602	150.213	150.007
Recuperação (%)	100.841	96.179	96.713	97.320
LD (3S_{y/x}/b)	22.975	4.631	28.247	23.012
DOS_{estimada} (mg)	60.492	115.415	58.028	116.783
DOS_{estimada} HPLC (mg)	57.689	115.152	54.870	110.619
EP (%)	4.859	0.228	5.755	5.572
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	96.761	98.079	98.560	97.510
SSq_{resíduos}	3.2542	1.143	0.700	1.740
Iterações	43	14	50 (máx.)	11
LOF_{MCR vs. PCA}	1.705	0.533	1.419	2.204
Δ_{LOFMCR} (PCA - Exp.)	-1.534	-1.388	-0.020	-0.286
R_{Espectro}	+0.837	+0.941 - +0.964	+0.882	+0.855 - +0.855
R_{t_{reacção}}	-0.263 - -0.263	+0.901 - +0.873	-0.056 - -0.056	+0.855 - +0.855
	-0.263 - -0.263	+0.980	-0.056 - -0.056	+0.976
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.242 (0.009)	0.145 (0.001)	0.218 (0.011)	0.151 (0.008)
b	1.599×10 ⁻³ (6.386×10 ⁻⁵)	1.004×10 ⁻³ (8.054×10 ⁻⁶)	1.502×10 ⁻³ (7.373×10 ⁻⁵)	1.037×10 ⁻³ (4.148×10 ⁻⁵)
S_{y/x}	0.012	0.002	0.014	0.008
R	0.9984	0.9999	0.9976	0.9984

(Continua)

Tabela 6.26 (Continuação) - b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Al60coFo	Df60coFo	Ba90reFo	Dt60coFo	DtapFo
C_{estimada} total (ppm)	187.239 (5.645)	187.033 (8.449)	190.777 (8.130)	194.975 (2.582)	195.574 (4.255)
C_{esperada} total (ppm)	199.658	200.322	200.246	200.401	200.515
Recuperação (%)	93.780	93.366	95.133	97.293	97.536
LD (3S_{v/x}/b)	10.333	15.448	14.750	4.611	7.612
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	98.476	98.249	98.414	97.434	95.278
SSQ_{resíduos}	0.891	1.365	0.689	2.610	4.779
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	40	47	12
LOF_{MCR vs. PCA}	0.236	1.424	1.316	2.320	4.662
Δ_{LOFMCR (PCA - Exp.)}	-1.288	-0.327	-0.851	-0.246	-0.061
R_{Espectro}	+0.961+0.986 +0.974+0.953	+0.977	+0.984	+0.919	+0.958
R_{t_{reação}}	+0.300	+0.881+0.881	+0.984+0.984	+0.983+0.983	+0.969+0.969
Fortificação (C_{estimada} amostra fortificada - C_{estimada} amostra não fortificada)					
C_{estimada} (ppm)	49.810	42.804	48.192	50.328	48.822
C_{esperada} (ppm)	50.009	50.232	49.786	50.232	49.786
Recuperação (%)	99.602	85.213	96.798	100.191	98.064
Δ = C_{estimada} - C_{esperada}	-0.199	-7.428	-1.594	+0.096	-0.964
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.157 (0.002)	0.305 (0.006)	0.245 (0.005)	0.297 (0.002)	0.250 (0.002)
b	8.385×10 ⁻⁴ (1.504×10 ⁻⁵)	1.632×10 ⁻³ (4.381×10 ⁻⁵)	1.286×10 ⁻³ (3.287×10 ⁻⁵)	1.522×10 ⁻³ (1.220×10 ⁻⁵)	1.280×10 ⁻³ (1.688×10 ⁻⁵)
S_{y/x}	0.003	0.008	0.006	0.002	0.003
R	0.9997	0.9993	0.9993	0.9999	0.9998

b) amostras fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas			
	Di60meFo	Di120meFo	He60coFo	He120srFo
C_{estimada} total (ppm)	196.211 (5.727)	190.242 (3.102)	185.510 (24.923)	198.476 (17.692)
C_{esperada} total (ppm)	200.344	200.388	200.446	200.240
Recuperação (%)	97.937	94.937	92.549	99.120
LD (3S_{v/x}/b)	10.189	5.637	45.783	31.265
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	96.489	98.469	97.929	95.013
SSQ_{resíduos}	5.053	1.017	1.868	8.172
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	24	3
LOF_{MCR vs. PCA}	1.678	0.150	2.058	4.910
Δ_{LOFMCR (PCA - Exp.)}	-1.833	-1.381	-0.013	-0.077
R_{Espectro}	+0.893	+0.960 - +0.956 +0.930 - +0.904	+0.943	+0.970 - +0.970 +0.970 - +0.970
R_{t_{reação}}	+0.273 - +0.273	+0.924	+0.549 - +0.549	+0.983
Fortificação (C_{estimada} amostra fortificada - C_{estimada} amostra não fortificada)				
C_{estimada} (ppm)	44.868	45.394	40.234	52.490
C_{esperada} (ppm)	50.232	49.786	50.232	50.232
Recuperação (%)	89.326	91.178	80.096	104.495
Δ = C_{estimada} - C_{esperada}	-5.364	-4.392	-9.998	+2.258
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.301 (0.004)	0.191 (0.001)	0.301 (0.019)	0.054 (0.002)
b	1.533×10 ⁻³ (2.715×10 ⁻⁵)	1.003×10 ⁻³ (9.797×10 ⁻⁶)	1.624×10 ⁻³ (1.292×10 ⁻⁴)	2.741×10 ⁻⁴ ± (1.490×10 ⁻⁵)
S_{y/x}	0.005	0.002	0.025	0.003
R	0.9997	0.9999	0.9937	0.9971

* máx. - corresponde à indicação de que o número máximo de iterações definido no ajuste do modelo foi atingido. Dosagem esperada e obtida vem em massa de composto por comprimido; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

6.4.2.4 – Avaliação global

Na Fig. 6.12 são apresentadas as representações gráficas das percentagens de ajuste do modelo obtidas com os modelos de análise multivariada na análise da matriz de metanol e do padrão de Diltiazem 150.028 ppm em função do número de componentes.

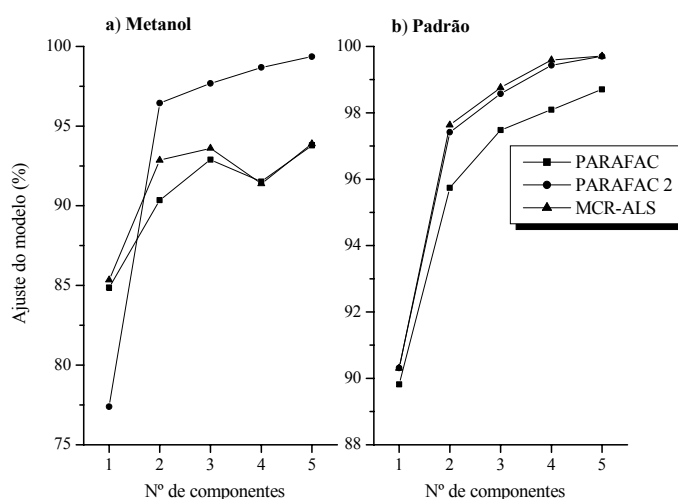


Fig. 6.12 – Gráfico dos valores de percentagem de ajuste dos modelos PARAFAC e PARAFAC2 obtidos na análise da matriz [espectro \times $t_{\text{reação}}$ \times concentração] e MCR-ALS na análise da matriz [(concentração \times $t_{\text{reação}}$) \times espectro] do a) solvente metanol e b) padrão de Diltiazem 150.028 ppm com não negatividade em todas as dimensões para os modelos PARAFAC e MCR-ALS e na primeira e terceira dimensões para o modelo PARAFAC2.

Da avaliação dos gráficos apresentados na Fig. 6.12 pode verificar-se que são obtidos resultados distintos na comparação das percentagens de ajuste do modelo obtidas com os três modelos na análise da matriz de metanol e de padrão.

Na análise da matriz de metanol, com o modelo de PARAFAC2 de dois a cinco componentes, obtêm-se maiores percentagens de ajuste do modelo assim como maiores diferenças relativamente às percentagens obtidas com os outros dois modelos. Com o modelo de MCR-ALS, e relativamente ao modelo PARAFAC, são obtidas maiores percentagens de ajuste do modelo com dois e três e menores com quatro e cinco componentes.

Na análise da matriz de padrão, com os modelos PARAFAC2 e MCR-ALS, obtêm-se maiores percentagens de ajuste modelo e percentagens próximas entre si. Assim mesmo, são obtidas percentagens de ajuste ligeiramente maiores com o modelo MCR-ALS para dois, três e quatro componentes. Atendendo à avaliação com os dois tipos de matrizes, os

modelos mais adequados são aqueles que não assumem a estrutura trilinear dos dados, nomeadamente o modelo PARAFAC2, que assumindo a estrutura trilinear dos dados permite desvios a essa trilinearidade.

Na Fig. 6.13 são apresentadas as representações gráficas dos coeficientes de correlação linear das estimativas do componente principal na dimensão do espectro de absorvância, perfil de tempo de reacção e concentração obtidos com os três modelos na análise de cada uma das amostras não fortificadas e os verificados experimentalmente. Para representação gráfica, com o modelo MCR-ALS, se mais que um espectro de absorvância ou perfil de tempo de reacção é estimado, é considerado o primeiro espectro ou perfil estimado e, com o modelo PARAFAC2, se mais que um perfil de tempo de reacção é estimado, é considerado o primeiro perfil estimado ou o perfil ao c.d.o. de absorvância máxima.

Na dimensão do espectro de absorvância, e como se pode verificar nos gráficos da Fig. 6.13, são obtidos com os três modelos coeficientes de correlação linear relativamente próximos. As únicas excepções são, a amostra Di120me, com coeficientes de correlação linear diferentes para os três modelos, e a amostra He60co, com um coeficiente de correlação linear diferente para o modelo PARAFAC. De uma forma geral, são obtidas pelo modelo MCR-ALS melhores estimativas nesta dimensão.

Na dimensão do perfil de tempo de reacção, é de notar que para algumas amostras, e dependendo do obtido experimentalmente, o critério foi o de uma maior semelhança. De uma forma geral, as melhores estimativas são obtidas com os modelos PARAFAC e MCR-ALS. Excepto para as amostras Dt60co, Dtap e Di60me, com maiores diferenças no coeficiente de correlação linear, são também encontradas para o modelo PARAFAC2 estimativas próximas às obtidas com os modelos PARAFAC e MCR-ALS.

Na dimensão de concentração, de uma forma geral são obtidos coeficientes de correlação linear do ajuste linear próximos com os três modelos. As maiores diferenças nos coeficientes de correlação linear, verificam-se com o modelo PARAFAC2, relativamente aos obtidos com os outros dois modelos, para a amostra Dtap, com um coeficiente de correlação superior, e para a amostra He120sr, com um coeficiente de correlação inferior.

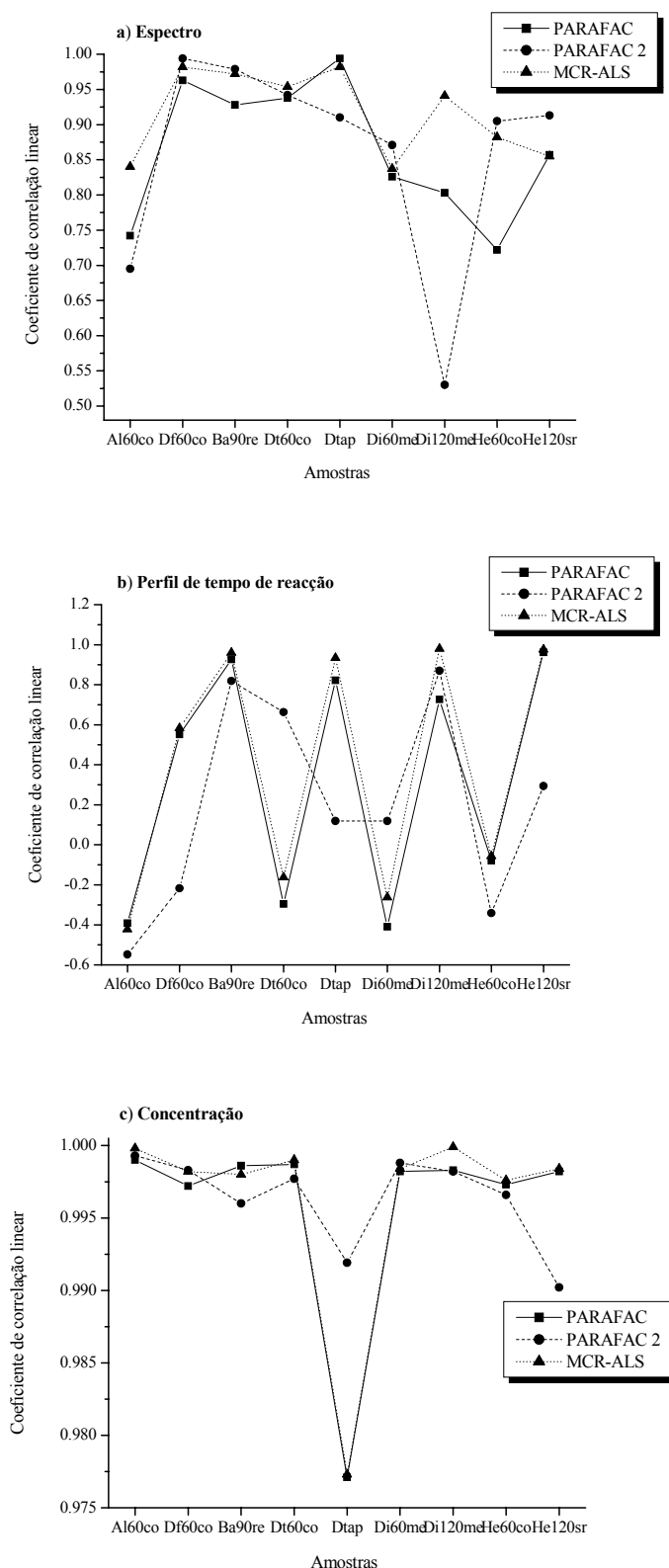


Fig. 6.13 – Comparação dos coeficientes de correlação linear do componente principal obtidos entre os espectros a), perfis de tempo de reacção b) e concentração c) estimados na análise das amostras não fortificadas pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS e os obtidos experimentalmente.

Na Fig. 6.14 são apresentadas as representações gráficas das recuperações e dos erros de previsão obtidos na análise das amostras não fortificadas com os três modelos. As recuperações e erros de previsão obtidos por análise directa são também representados.

Como se pode ver na Fig. 6.14, são encontrados por análise directa recuperações superiores a 100 % e erros de previsão altos. Para o modelo PARAFAC, são obtidas recuperações próximas de 100 % e erros de previsão de uma forma geral superiores aos verificados com os modelos PARAFAC2 e MCR-ALS. Melhores recuperações e erros de previsão, são de uma forma geral, obtidos com os modelos PARAFAC2 e MCR-ALS. Para o modelo PARAFAC2, são obtidos recuperações ligeiramente abaixo das recuperações obtidas com o modelo MCR-ALS e erros de previsão de uma forma geral mais baixos.

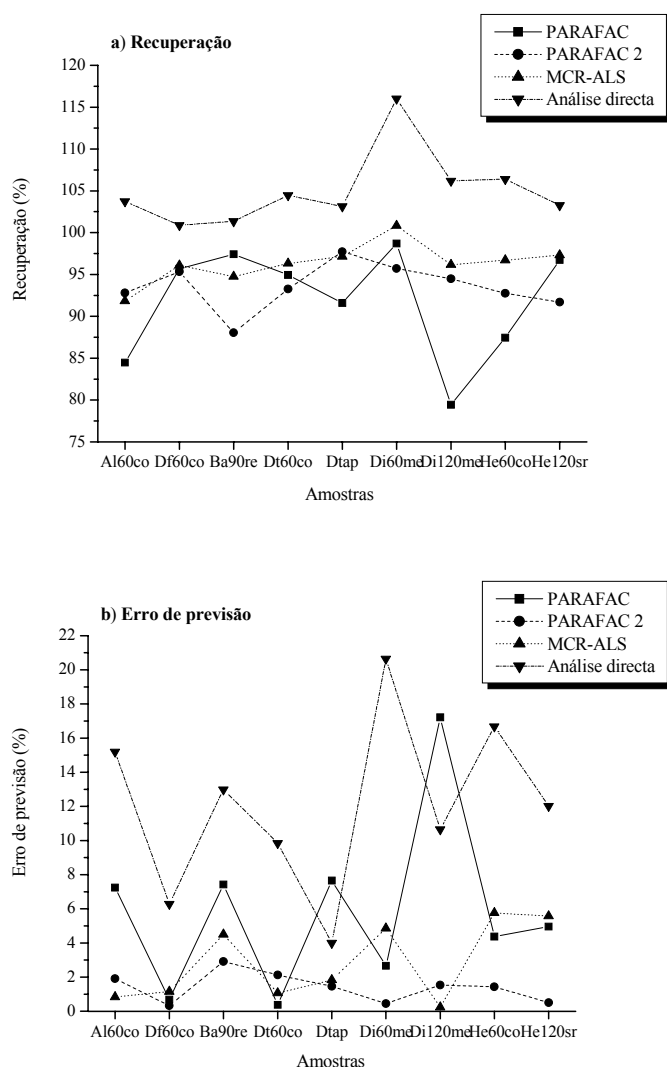


Fig. 6.14 – Comparação da recuperação a) e erros de previsão b) obtidos com cada amostra não fortificada por análise directa e pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS.

Na Tabela 6.27, são apresentados os valores de EPT, RMSEP, EPM e LDM obtidos com o conjunto das amostras não fortificadas analisadas por análise directa e pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS. Para os modelos de análise multivariada, é também apresentado o valor de AjMM.

Tabela 6.27 – Valores de EPM, EPT, RMSEP, LDM e AjMM obtidos com todas as amostras não fortificadas.

Modelo	Parâmetros avaliados				
	EPT (%)	RMSEP	EPM (%)	LDM (ppm)	AjMM (%)
Análise directa	9.699	9.555	12.040	26.421	----
PARAFAC	9.040	8.906	5.839	31.335	96.863
PARAFAC2	1.542	1.519	1.403	32.318	99.301
MCR-ALS	3.094	3.048	2.863	26.974	96.766

São encontrados pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS valores de EPT, RMSEP e EPM menores do que os obtidos por análise directa. De entre os três modelos, os menores valores destes parâmetros são encontrados pelo modelo PARAFAC2. É também encontrado com este modelo o maior valor de AjMM. O menor valor de LDM, próximo do obtido por análise directa, é encontrado com o modelo MCR-ALS.

Atendendo a todos os critérios avaliados as estimativas de concentração mais adequadas são obtidas com o modelo PARAFAC2. No entanto, com o modelo MCR-ALS são obtidas estimativas nas três dimensões mais consistentes com as estimativas de concentração mais próximas às obtidas pelo modelo PARAFAC2.

6.5. Referências

- [1] – Vogel, Arthur I., *Química orgânica – Análise orgânica qualitativa*, Editora ao livro técnico S. A. - Indústria e comércio, Rio de Janeiro (1984)
- [2] – Goddu, R. F., LeBlanc, N. F. e Wright, C. M., Spectrophotometric determination of esters and anhydrides by hydroxamic acid reaction. *Analytical Chemistry* **27** (1955) 1251 – 1255.
- [3] – Jencks, W. P., The reaction of hydroxylamine with activated acyl groups. II Mechanism of the reaction. *Journal of American Chemical Society* **80** (1958) 4585 – 4588.
- [4] – Notari, R. E. e Munson, J. W., Hydroxyamic acids I: factors affecting the stability of the hydroxamic acid-iron complex. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **58** (1969) 1060 – 1064.
- [5] – Zivanov-Stakic, D., Agbaba, D. e Ciric, L. J., Spectrophotometric determination of Diltiazem in dosage forms. *Il Farmaco* **47** (1993) 393 – 396.
- [6] – Kamath, B.V., Shivram, K. e Shah, A. C., Selective spectrophotometric determination of Diltiazem hydrochloride in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **11** (1993) 407 – 409.

7. ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA DO VERAPAMIL

7.1. Fundamento

Quimicamente o Verapamil é uma difenilalquilamina. Em solução metanólica apresenta absorvância no ultravioleta com máximos a 230 e 278 nm e quando excitado por luz ultravioleta apresenta fluorescência com c.d.o. máximo de excitação de 276 nm e emissão de 316 nm [1]. A análise espectrofluorimétrica directa do Verapamil em fluidos biológicos e tecidos foi efectuada na gama entre 0.1 e 10 ppm após extracção por heptano e extracção reversa por ácido [2].

A possibilidade de quantificação espectrofluorimétrica directa do Verapamil sem extracção prévia, na presença de possíveis interferentes, através da obtenção de matrizes de excitação-emissão adequadas a utilização de métodos de decomposição tridimensional levou a considerar a possibilidade de quantificação do Verapamil através de fluorescência directa.

7.2. Procedimento experimental

O registo de cada uma das matrizes obtidas foi feito com fendas de excitação e emissão de 0.05 mm e com um tempo de integração 18 s. Na fase de optimização, foram também efectuadas medições com fendas de 0.1 e 0.25 mm assim como com tempos de integração diferentes.

As soluções padrão de Verapamil foram preparadas por pesagem rigorosa, após secagem em forno a 105 °C durante 2 horas, nos solventes utilizados para a concentração final pretendida. Foram preparadas, na fase de optimização soluções padrão de Verapamil em água, metanol e etanol com concentrações entre 750 e 1000 ppm e na fase de quantificação em metanol com concentração de 750 ppm. Soluções padrão de menores concentrações foram preparadas por diluição rigorosa da solução padrão no solvente utilizado. As diluições foram efectuadas, na fase de optimização em balão de diluição para um volume final de 5 mL e na fase de quantificação em cuvete de quartzo para um volume final de 3 mL. Previamente à determinação, são ainda preparadas na fase de quantificação soluções de concentração intermédia de 100 e 5 ppm em balões de diluição para um volume final de 10 mL.

A massa a pesar das diferentes formas farmacêuticas, para uma concentração estimada em Verapamil de 100, 400, 1200 e 2400 ppm, foi calculada de acordo com a respectiva dosagem de Verapamil nas diferentes formas farmacêuticas. As soluções amostras foram preparadas por pesagem rigorosa do pó, a partir de uma mistura de 20 comprimidos ou cápsulas, correspondente a um comprimido. No caso da forma farmacêutica injectável Isinj, de forma a ser obtida a concentração pretendida, o volume de solução de uma ampola foi adicionado para um volume total de solução. Excepto para a amostra Isinj as soluções amostra foram posteriormente decantadas e centrifugadas a 13000 rpm durante 10 min.

7.3. Optimização

Na fase de optimização, pretendeu-se avaliar a sensibilidade da determinação no que diz respeito aos solventes utilizados e, com o mesmo solvente, no que diz respeito às condições instrumentais de determinação. Os solventes utilizados foram o metanol, etanol e água e as condições instrumentais utilizadas foram as larguras das fendas de excitação e de emissão (0.05, 0.1 e 0.25 mm).

A sensibilidade da determinação foi avaliada através da verificação do valor de declive do gráfico de calibração e da gama linear de trabalho obtida.

7.3.1. Resultados

Avaliação do solvente

A avaliação de sensibilidade da determinação com metanol, etanol e água foi efectuada com fendas de excitação e emissão de 0.05 mm e com um tempo de integração de 8 s. Na Fig. 7.1, são apresentados os gráficos obtidos com o padrão de Verapamil nos três solventes e na gama de concentração entre 0.05 e 30 ppm para avaliação da gama linear de trabalho.

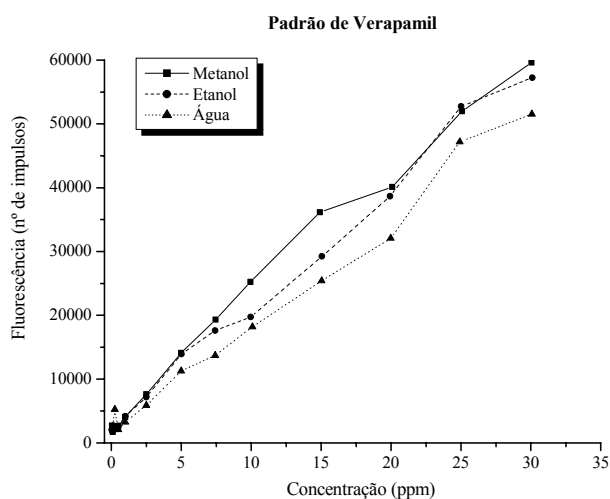


Fig. 7.1 – Gráfico da intensidade de fluorescência do padrão de Verapamil em função da concentração do padrão na gama de 0.05 até 30 ppm nos solventes metanol, etanol e água.

Como se pode verificar pelo gráfico da Fig. 7.1, na determinação com o metanol, foram encontrados uma maior sensibilidade na resposta, um maior limite superior de resposta linear e conseqüentemente uma maior gama linear de trabalho. Relativamente ao metanol, foi obtida uma sensibilidade na resposta idêntica para o etanol e menor para a água. Quer para o etanol quer para a água o limite superior de resposta linear encontrado foi de 5 ppm.

Na Tabela 7.1 são apresentadas os valores dos parâmetros de regressão linear encontrados pelo método dos mínimos quadrados das curvas de calibração padrão obtidas com os três solventes nas gamas lineares avaliadas para cada um deles.

Tabela 7.1 – Regressões lineares obtidas para o padrão de Verapamil em metanol, etanol e água.*

Função linear obtida ($y = bx + a$)			
Solvente	Metanol	Etanol	Água
Gama linear (ppm)	0.1 - 15	0.1 - 5	0.5 - 5
m	9	6	4
a	1722.901 (164.154)	1528.253 (153.447)	1073.523 (181.669)
b	2339.604 (24.330)	2435.852 (65.722)	2020.268 (63.767)
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.459	0.344	0.331
$S_{y/x}$	358.137	279.317	222.876
R	0.9996	0.9985	0.9990

* Ver rodapé da Tabela 3.1.

Como se pode verificar na Tabela 7.1, da avaliação das funções lineares obtidas com os três solventes, pode confirmar-se que uma gama linear maior, com um melhor ajuste, é obtida para o metanol. É também encontrado para o metanol, um declive alto, próximo ao encontrado para o etanol. Em comparação com os encontrados para o etanol e a água um maior limite de detecção é encontrado para o metanol. Apesar disso, e atendendo à gama linear avaliada associada a um declive do gráfico de calibração alto, leva a considerar o metanol como solvente para a quantificação do Verapamil por fluorescência directa.

Avaliação das condições instrumentais

Na avaliação das fendas de excitação e emissão mais adequadas, não foi possível a utilização do mesmo tempo de integração com as diferentes larguras fendas, uma vez que, para se fazer a avaliação em toda a gama linear, se teria de utilizar o tempo de integração escolhido para a fenda mais larga. Isso implicaria que, com as fendas mais estreitas, poderia não haver detecção ou seriam obtidas intensidades de fluorescência baixas. Assim,

a avaliação da sensibilidade de determinação utilizando diferentes larguras de fendas, foi efectuada com o tempo de integração adequado para cada uma das larguras de fendas utilizadas, de forma a que uma intensidade de fluorescência máxima da ordem dos 60 000 impulsos fosse obtida para o padrão de 15 ppm.

Na Tabela 7.2 são apresentados os valores dos parâmetros de regressão linear obtidos pelo método dos mínimos quadrados das curvas de calibração padrão obtidas com o padrão de Verapamil em metanol com fendas de excitação e emissão de 0.05, 0.1 e 0.25 mm.

Tabela 7.2 – Funções lineares obtidas para o padrão de Verapamil em metanol com fendas de excitação e emissão de 0.05, 0.1 e 0.25 ppm.*

Função linear ($y = bx + a$, $m = 8$, gama linear - 0.1 - 15 ppm)				
Largura das fendas de excitação e emissão (mm)	0.05	0.05	0.1	0.25
$t_{\text{integração}}$ (s)	20	14	4	0.7
Int. de Fluorescência (Verapamil - 15 ppm)	64582	48295	55855	59003
a	1832.108 (503.231)	1324.324 (377.691)	867.439 (557.218)	893.772 (675.033)
b	4225.022 (75.276)	3092.812 (56.497)	3590.413 (83.352)	3826.883 (100.975)
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.775	0.794	1.009	1.147
$S_{y/x}$	1090.804	818.684	1207.826	1463.202
R	0.9990	0.9990	0.9984	0.9979

* Ver rodapé da Tabela 3.1.

Como se pode ver na Tabela 7.2, pelas funções lineares obtidas com as fendas de 0.05 mm e com tempos de integração diferentes com cada uma das fendas, o declive da curva de calibração obtida está dependente do tempo de integração utilizado. Assim, e atendendo a intensidade de fluorescência máxima obtida com o padrão de 15 ppm, para as diferentes fendas e nos tempos de integração utilizados não parece haver grande diferença no declive da função linear obtida com as diferentes fendas utilizadas. Nas condições avaliadas, verifica-se que, com as fendas de 0.1 mm e 0.25 mm são obtidos valores de ordenada na origem inferiores, e que, com as fendas de 0.05 mm são obtidos melhores ajustes com limite detecção inferior.

Apesar de um valor de ordenada na origem maior ser obtido com as fendas de 0.05 mm, o que pode estar relacionado com o maior tempo de integração utilizado, e parecendo não haver diferença na sensibilidade da resposta obtida, optou-se na quantificação pela utilização destas fendas uma vez que são obtidos melhores ajustes associados a um menor limite de detecção.

7.4. Quantificação

Na quantificação, o método de calibração de adição de padrão foi efectuado, numa cuvete de quartzo de 1 cm, por três adições sucessivas de 10 μL da solução padrão de Nifedipina 750 ppm a 3 mL da solução a determinar. A determinação de solução padrão e das soluções amostra foi feita para uma concentração estimada de 5 ppm. A fortificação avaliada foi de 2 ppm. As soluções padrão obtidas encontravam-se numa gama de 2.5 ppm – 7.5 ppm.

A comparação das funções lineares obtidas com a solução padrão e com as soluções amostra foi efectuada na gama de 1 a 15 ppm.

Análise de registos

Da análise da matriz de fluorescência obtida, verificou-se que o Verapamil apresenta duas bandas de fluorescência a c.d.o. de excitação baixos. A banda de fluorescência principal tem intensidade de fluorescência máxima a um c.d.o. de excitação de 262.84 nm e c.d.o. de emissão de 288.67 nm. A dispersão de primeira ordem é próxima a esta banda de fluorescência máxima e interfere na banda de fluorescência do composto principal. A segunda banda de fluorescência tem intensidade de fluorescência máxima mais baixa a um c.d.o. de excitação de 285.12 nm e c.d.o. de emissão de 616.24 nm.

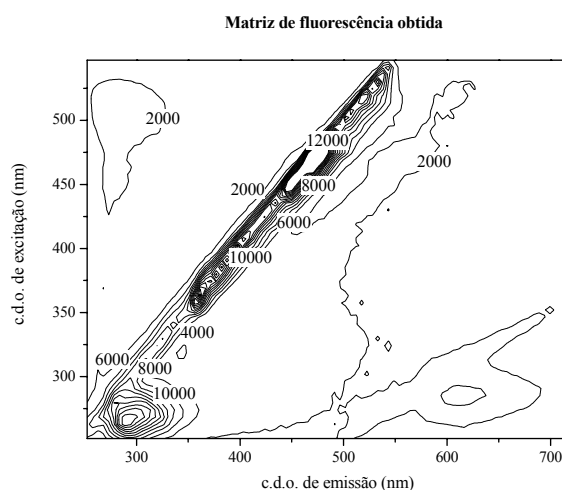


Fig. 7.2 – Matriz de fluorescência obtida com um padrão de Verapamil 4.980 ppm.

A escolha de intensidade de fluorescência máxima utilizada na determinação por análise directa foi feita para cada um dos registos obtidos tendo em atenção a intensidade máxima de fluorescência ao c.d.o. de excitação e emissão desse máximo de cada um dos registos.

Curvas de calibração padrão

Na Tabela 7.3 são apresentados os valores dos parâmetros de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados das curvas de calibração padrão obtidas com o padrão e com as amostras analisadas. Para o padrão são apresentados os parâmetros de regressão linear obtidos com uma regressão linear.

Tabela 7.3 – Comparação da curva de calibração padrão de um padrão e das amostras farmacêuticas obtidas no máximo de intensidade de fluorescência.*

Parâmetros avaliados	Calibração ($y = bx + a$, $m = 5$ e Gama - 1 a 15 ppm)					
	Padrão	Ve40ra	Isinj	Is40co	Isret	Ishta
a	2059.279 (1278.813)	260.765 (718.440)	827.329 (354.507)	1190.199 (968.768)	717.495 (536.520)	1641.480 (686.110)
b	4007.242 (151.228)	3866.217 (85.008)	4262.437 (41.940)	4280.256 (114.587)	4325.444 (64.102)	3582.653 (81.157)
LD (3S_{y/x}/b)	1.305	0.760	0.340	0.926	0.507	0.783
S_{y/x}	1743.432	979.462	483.307	1320.739	731.321	935.223
R	0.9979	0.9993	0.9999	0.9989	0.9997	0.9992

* Ver rodapé da Tabela 3.1.

De uma forma geral, são encontradas para todas as amostras ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.998, maiores que os obtidos com o padrão. O ajuste, com um coeficiente de correlação linear mais elevado é obtido para a amostra Isinj.

Valores de ordenada na origem inferiores ao encontrado para o padrão são obtidos para todas as amostras. Apesar dos valores de ordenada na origem obtidos não serem altos todos os valores são superiores a zero. Assim é possível que algum tipo de desvio sistemático positivo inerente ao próprio método possa existir. Na avaliação do desvio padrão associado a ordenada na origem, verifica-se que são encontrados desvios padrão altos para todas as amostras assim como para o padrão. Um maior erro na sua avaliação, é encontrado para a amostra Is40co e um menor erro é encontrado para a amostra Isinj.

Da avaliação do declive obtido, verifica-se que são encontrados para todas as amostras valores de declive próximos ao obtido com o padrão. Três amostras apresentam declives

ligeiramente superiores e duas amostras declives ligeiramente inferiores. Com um declive ligeiramente menor, é para a amostra Ishta que é obtida a maior diferença no valor do declive com uma diferença de 400 impulsos. Atendendo à comparação dos valores de declive para todas as amostras não é possível considerar a existência de qualquer possível interferência positiva ou negativa.

7.4.1. Análise directa

Da avaliação de todas as adições de padrão efectuadas verificou-se uma grande estabilidade no que diz respeito tanto ao c.d.o. de excitação (263 a 268 nm) como ao c.d.o. de emissão (289 a 294 nm) encontrados ao máximo de intensidade de fluorescência. A variabilidade encontrada para as amostras encontra-se dentro da resolução da determinação de 5 nm.

As estimativas de concentração do solvente, padrão, amostras não fortificadas e amostras fortificadas obtidas por análise directa ao máximo de intensidade de fluorescência são apresentadas na Tabela 7.4 a) e b). São obtidos para todas as amostras coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.998. Coeficientes de correlação linear ligeiramente menores a 0.999, são encontrados para a amostra não fortificada Is40co, fortificadas Ve40raFo e IshtaFo e para a amostra não fortificada e fortificada da formulação farmacêutica Isret. Para todas as amostras são encontrados desvios padrão relativos inferiores a 10 %.

Na Tabela 7.4 a) é possível verificar que, foram obtidas na determinação com o solvente e com o padrão estimativas ligeiramente mais altas do que as esperadas.

De uma forma geral, com as amostras não fortificadas e fortificadas, são obtidas recuperações próximas de 100 %. As únicas excepções são, com uma recuperação inferior a 90 %, a amostra não fortificada Ve40ra e, com uma recuperação superior a 110 %, a amostra fortificada IsretFo. Apesar das recuperações obtidas para a maioria das amostras não fortificadas e fortificadas, são obtidas recuperações da fortificação acima de 110 % para todas as formulações farmacêuticas.

Para três das amostras não fortificadas são encontrados erros de previsão, relativos à dosagem obtida por HPLC-UV, superiores a 10 %. Os erros de previsão encontrados variam desde 0.9 a 17 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Isinj e o

mais alto para a amostra Isret. Ao considerar-se todas as amostras é obtido um valor de EPM de 8.497 %, de EPT de 8.690 % e de RMSEP de 9.833.

Atendendo à comparação das funções lineares previamente efectuada, estes resultados não confirmam um possível desvio sistemático positivo associado ao próprio método e confirmam a não existência de qualquer tipo de interferências. Eventualmente, só a estimativa inferior da amostra Ve40ra, e tendo em conta o menor valor de ordenada na origem obtido com a curva de calibração padrão desta amostra, poderia configurar um eventual desvio sistemático negativo.

Tabela 7.4 – Estimativas de concentração do a) solvente, padrão, amostras não fortificadas e b) amostras fortificadas obtidas por análise directa ao c.d.o. de excitação e emissão de intensidade de fluorescência máxima.*

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas						
	Solvente	Padrão	Ve40ra	Isinj	Is40co	Isret	Ishta
$C_{estimada}$ (ppm)	0.349 (0.071)	5.708 (0.057)	4.242 (0.112)	4.719 (0.279)	5.014 (0.368)	5.361 (0.512)	4.813 (0.125)
$C_{esperada}$ (ppm)	0.000	4.980	4.977	4.978	4.979	4.932	4.982
Recuperação (%)	----	114.634	85.231	94.795	100.708	108.692	96.613
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.239	0.095	0.219	0.517	0.662	0.889	0.230
$DOS_{estimada}$ (mg)	----	----	33.942	4.719	40.104	129.850	230.828
$DOS_{estimada}$ HPLC (mg)	----	----	38.979	4.679	37.362	111.183	220.724
EP (%)	----	14.619	12.922	0.855	7.339	16.789	4.578
c.d.o. excitação (nm)	263 (4)	263 (4)	268 (4)	268 (4)	263 (4)	263 (4)	263 (4)
c.d.o. emissão (nm)	289 (4)	289 (4)	289 (4)	289 (1) e 294 (3)	289 (4)	289 (4)	289 (4)
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)							
a	1577.674 (300.886)	23570.176 (109.997)	18488.451 (265.951)	18952.195 (580.125)	21761.109 (802.688)	20868.860 (966.031)	19977.549 (266.293)
b	4515.684 (65.882)	4129.041 (24.085)	4358.610 (58.233)	4016.533 (127.025)	4340.215 (175.757)	3892.797 (211.523)	4150.635 (58.308)
$S_{y/x}$	359.168	131.304	317.466	692.496	958.170	1153.153	317.874
R	0.9998	1.0000	0.9998	0.9990	0.9984	0.9971	0.9998

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Ve40raFo	IsinjFo	Is40coFo	IsretFo	IshtaFo
$C_{estimada}$ (ppm)	6.819 (0.516)	6.963 (0.324)	7.166 (0.387)	7.601 (0.647)	7.445 (0.624)
$C_{esperada}$ (ppm)	6.877	6.878	6.879	6.833	6.882
Recuperação (%)	99.160	101.241	104.175	111.250	108.174
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.778	0.482	0.566	0.912	0.890
c.d.o. excitação (nm)	263 (4)	263(2)e268(2)	263 (4)	263 (4)	263 (4)
c.d.o. emissão (nm)	289 (4)	289(2)e294(2)	289 (4)	289 (4)	289 (4)
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)					
$C_{estimada}$ (ppm)	2.577	2.244	2.152	2.240	2.632
$C_{esperada}$ (ppm)	1.900	1.900	1.900	1.900	1.900
Recuperação (%)	135.632	118.105	113.263	117.895	138.526
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	+0.677	+0.344	+0.252	+0.340	+0.732
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	27021.325 (861.162)	27131.315 (524.316)	28770.164 (634.434)	28148.454 (942.725)	27919.477 (932.445)
b	3962.413 (188.997)	3896.289 (115.070)	4014.701 (139.238)	3703.139 (206.898)	3750.180 (204.642)
$S_{y/x}$	1027.974	625.879	757.327	1125.336	1113.065
R	0.9977	0.9991	0.9988	0.9969	0.9970

* A dosagem esperada e estimada é dada em massa de composto por comprimido excepto para Isinj em que a dosagem vem em massa de composto por 2 mL; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados, excepto na avaliação do c.d.o. de excitação e de emissão em que o valor entre parêntesis corresponde ao número de vezes que é encontrado um determinado c.d.o. de excitação e de emissão de fluorescência máxima. Os c.d.o. de excitação e de emissão apresentados correspondem aos obtidos nas quatro determinações de cada uma das adições de padrão.

7.4.2. Análise multivariada

Para a análise multivariada todas as matrizes de dados obtidas foram previamente reduzidas à banda de fluorescência máxima e atendendo a zonas do espectro que possam não ser consideradas relevantes para esta análise.

As matrizes, com uma gama de c.d.o. de excitação de 251.70 a 546.93 nm (54 c.d.o.) e de c.d.o. de emissão de 252.27 a 715.04 nm (90 c.d.o.), foram reduzidas para matrizes analisadas numa gama de c.d.o. de excitação de 251.70 a 301.83 nm (10 c.d.o.) e de c.d.o. de emissão de 252.27 a 548.65 nm (58 c.d.o.). Um total de 580 pontos espectrais foi analisado.

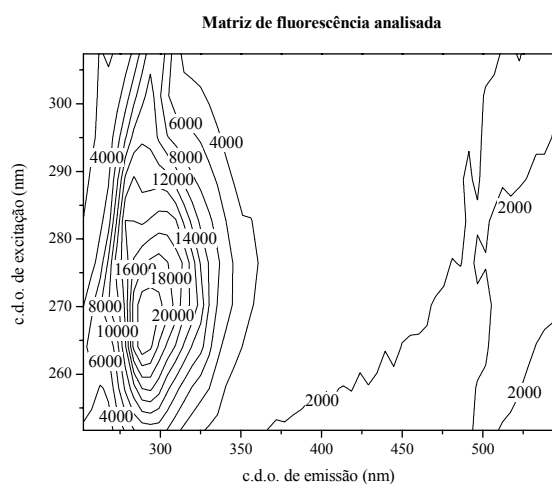


Fig. 7.3 – Matriz de fluorescência analisada de um padrão de Verapamil 4.980 ppm.

Na Fig. 7.4 são apresentados os espectros de excitação e emissão experimentais obtidos a intensidade de fluorescência máxima.

Uma menor variação está presente nos espectros de excitação e emissão experimentais obtidos. Assim o critério de avaliação na comparação das diferentes estimativas obtidas pelos diferentes métodos de decomposição tridimensional é um critério de maior semelhança possível ou seja um coeficiente correlação linear positivo alto.

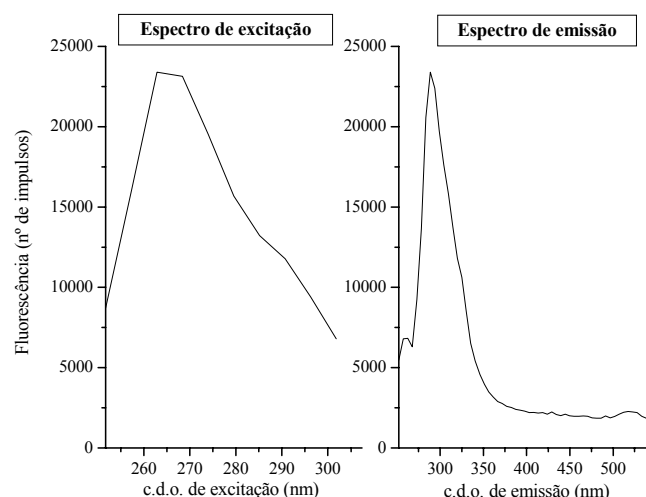


Fig. 7.4 – Espectros de excitação e emissão experimentais reduzidos do padrão de Verapamil 4.980 ppm ao máximo de intensidade de fluorescência (c.d.o. de excitação de 262.84 nm e c.d.o. de emissão de 288.67 nm).

Análise inicial

A representação gráfica (Fig. 7.5) dos valores singulares normalizados obtidos por decomposição de valor singular para os três tipos de amostras estudadas mostra que no mínimo quatro e no máximo oito componentes são necessários para a análise do tipo de matrizes avaliadas.

Para as matrizes singulares sem adição de padrão e para as matrizes de linha aumentada na dimensão dos espectros de emissão dos três tipos de amostra, é mais notório que um número maior de componentes é adequado para a sua análise. Assim mesmo, quer para a matriz singular do padrão quer para as matrizes de linha aumentada na dimensão dos espectros de emissão dos três tipos de amostra, o número de componentes mais provável parece ser um número próximo ao encontrado com os outros tipos de matrizes. Só para a matriz singular da amostra Isinj, nitidamente um número de oito componentes, e para a matriz singular do metanol, um número de dez componentes, parecem ser o número de componentes necessário para a sua análise. Com os outros tipos de matrizes um número de componentes entre quatro e seis parece ser o mais provável.

Com os outros tipos de matrizes, e relativamente às matrizes singulares sem adição de padrão e às matrizes de linha aumentada na dimensão dos espectros de emissão, parecem

ser necessários para a sua análise um número diferente de componentes. Assim é provável, pela diferença de ordem das matrizes, algum desvio a trilinearidade.

Tabela 7.5 – Variância explicada pelos primeiros seis componentes obtidos por análise de componentes principais.*

Variância explicada por PCA (%)						
Componente principal	Metanol	Metanol [exc.×(conc.×emi.)]	Padrão	Padrão [exc.×(conc.×emi.)]	Isinj	Isinj [exc.×(conc.×emi.)]
1	89.40	97.64	97.87	98.55	97.72	98.39
2	6.34	1.63	1.30	0.87	1.63	1.06
3	2.95	0.43	0.50	0.43	0.33	0.39
4	0.67	0.14	0.18	0.07	0.16	0.07
5	0.32	0.10	0.08	0.04	0.10	0.05
6	0.14	0.03	0.04	0.01	0.04	0.02
7	0.10	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01
8	0.05	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01

* [exc.×(conc.×emi.)] – Matriz linha aumentada em que as linhas são o espectro de excitação e as colunas os espectros de emissão obtidos nas quatro matrizes.

É possível também verificar na Tabela 7.5 que, na avaliação das matrizes singulares e de linha aumentada na dimensão do espectro de excitação, e excepto para a matriz singular do solvente metanol, três componentes parecem ser os necessários para explicar quase 100% de variância. Na análise da matriz singular do solvente metanol só cinco componentes explicam quase 100 % de variância. Só na análise da matriz do solvente é confirmado um possível desvio a trilinearidade na análise das matrizes obtidas por este método analítico.

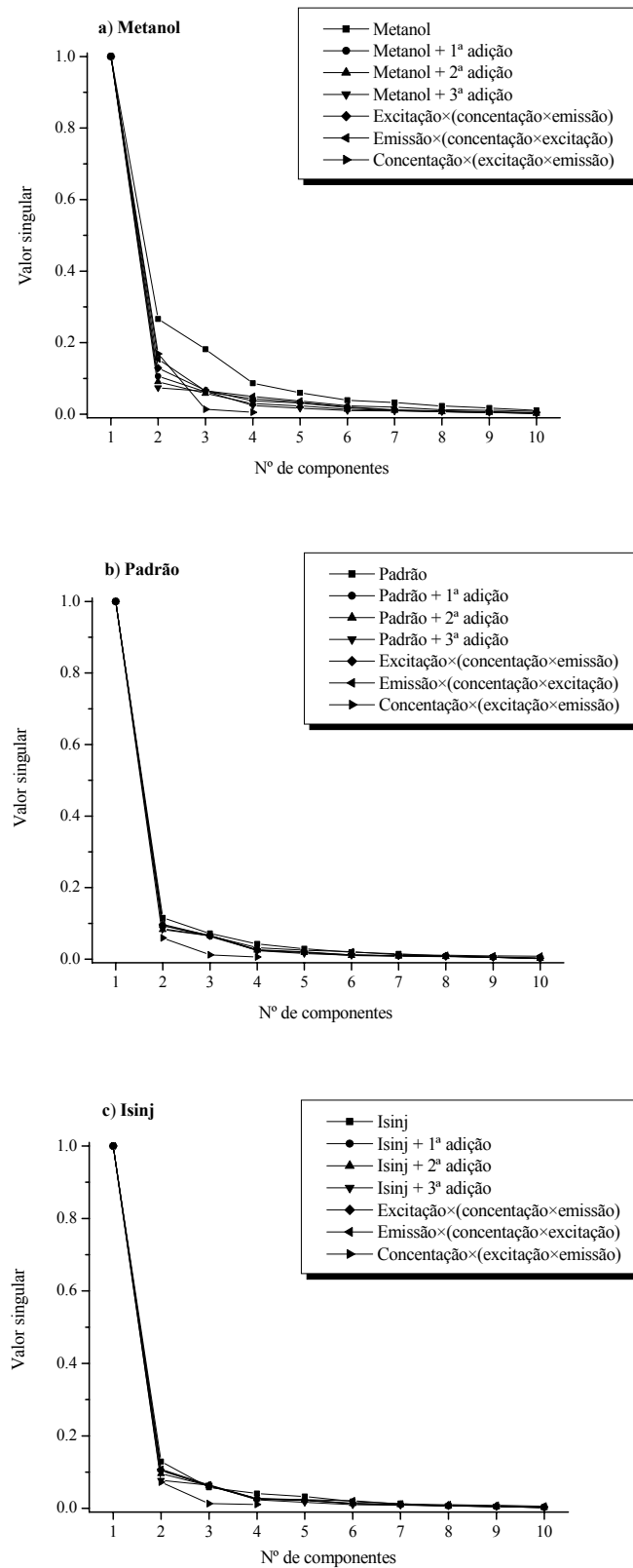


Fig. 7.5 – Gráficos de valor singular de cada uma das matrizes singulares e das respectivas matrizes aumentadas de a) metanol, b) padrão de Verapamil e c) amostra Isinj.

7.4.2.1 - PARAFAC

No ajuste pelo modelo PARAFAC foi de uma forma geral utilizada a matriz tridimensional [excitação × emissão × concentração] ($10 \times 58 \times 4$). As condições geralmente utilizadas para o ajuste foram a aplicação de restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições.

Solvente

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 7.6 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC, de um a nove componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por TLD na análise da matriz tridimensional do solvente metanol.

Como se pode verificar na Tabela 7.6, por validação cruzada, as menores diferenças de valores de ajuste foram encontradas para os modelos de cinco a nove componentes. De entre estes, os modelos de cinco, seis e sete componentes apresentam o número de iterações mais baixo. O modelo de dois componentes, com uma maior diferença de ajuste, apresenta o número mais baixo de iterações associado a um teste de consistência elevado. O modelo de seis componentes, apesar de mais baixo do que o obtido pelo modelo de dois componentes, apresenta também um teste de consistência do núcleo válido. Atendendo à baixa diferença de valor de ajuste, o número ainda baixo de iterações e a um teste de consistência válido o modelo de seis componentes parece ser o mais adequado.

Tabela 7.6 – Validação cruzada do modelo PARAFAC, de 1 a 9 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por TLD na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] do solvente metanol. São apresentados a diferença dos ajustes obtidos por validação cruzada entre os modelos na análise da matriz segmentada e total, o número de iterações e o valor do teste de consistência do núcleo (corcondia).

	Número de componentes								
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete	Oito	Nove
Número de Iterações	4	2	3	510	402	872	852	1352	2102
Corcondia	100	100	-4.50	-0.62	25.87	53.63	-0.11	0.73	0.71
$\Delta_{AjMS-AjMT}$	-0.24	-0.24	-0.13	-0.14	-0.09	-0.08	-0.07	-0.06	-0.06

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 7.7 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC na análise da matriz tridimensional do solvente metanol. Na Tabela 7.7 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições. Na Tabela 7.7 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Pode verificar-se na Tabela 7.7 b) que, com um teste de consistência não válido e uma maior percentagem de ajuste do modelo, é obtida a estimativa de concentração mais próxima de zero, com uma concentração de 0.001 ppm, pelo modelo de oito componentes e não negatividade nas três dimensões. Verifica-se também na Tabela 7.7 b) que, com um teste de consistência do núcleo válido mais alto, a estimativa de concentração mais próxima de zero, com uma estimativa de concentração de -0.032 ppm, é encontrada com o modelo de seis componentes, não negatividade nas três dimensões e unimodalidade na primeira dimensão. Assim mesmo, como se pode ver na Tabela 7.7 a), a estimativa de concentração positiva mais adequada, com uma concentração de 0.038 ppm, é encontrada para o modelo de seis componentes e não negatividade nas três dimensões. É encontrado por este modelo uma percentagem de ajuste do modelo e um teste de consistência mais altos assim como estimativas do componente principal adequadas nas três dimensões.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de PARAFAC de seis componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC de seis componentes sem restrições na análise da matriz [excitação × emissão × concentração].

Tabela 7.7 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] do solvente metanol com a) restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por PARAFAC sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) não negatividade nas três dimensões

	Número de componentes				
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
C_{estimada} (ppm)	-0.039(0.075)	-0.044(0.074)	0.118 (0.054)	0.038 (0.054)	-0.010(0.063)
Recuperação (%)	---	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.269	0.268	0.191	0.191	0.227
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	91.481	92.376	95.660	96.526	97.248
ssq_{resíduos}	5.053×10 ⁸	4.047×10 ⁸	1.311×10 ⁸	8.402×10 ⁷	5.273×10 ⁷
Iterações	222	30	600	400	240
Corcondia (%)	-0.467	15.321	69.966	70.464	17.352
R_{Excitação}	-0.676	-0.789	-0.813	-0.830	-0.529
R_{Emissão}	-0.099	+0.031	-0.061	-0.051	-0.083
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	-0.004(0.008)	-0.005(0.008)	0.013 (0.006)	0.004 (0.006)	-0.001(0.007)
b	0.110 (0.002)	0.110 (0.002)	0.107 (0.001)	0.109 (0.001)	0.110 (0.002)
S_{y/x}	0.010	0.010	0.007	0.007	0.008
R	0.9997	0.9997	0.9999	0.9999	0.9998

b) não negatividade nas três dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	8 componentes	5 componentes (unimodilidade na segunda dimensão)	5 componentes (matriz normalizada na primeira dimensão)	6 componentes (unimodilidade na primeira dimensão)
C_{estimada} (ppm)	0.001 (0.073)	-0.029 (0.069)	-0.047 (0.065)	-0.032 (0.050)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.260	0.248	0.235	0.182
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	97.640	94.433	99.999	96.066
ssq_{resíduos}	3.877×10 ⁷	2.158×10 ⁸	13.727	1.078×10 ⁸
Iterações	350	338	192	422
Corcondia (%)	5.035	47.094	74.957	53.057
R_{Excitação}	-0.443	-0.314	-0.897	-0.851
R_{Emissão}	-0.088	-0.081	-0.045	-0.031
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	1.218×10 ⁻⁴ (0.008)	-0.003 (0.008)	-0.005 (0.007)	-0.003 (0.006)
b	0.109 (0.002)	0.110 (0.002)	0.110 (0.002)	0.110 (0.001)
S_{y/x}	0.009	0.009	0.009	0.007
R	0.9997	0.9998	0.9998	0.9999

* Ver rodapé da Tabela 5.7.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de metanol pelo modelo de PARAFAC de seis componentes, o primeiro componente é o composto principal, o segundo componente é o composto principal a maior c.d.o. com pico de dispersão considerado como composto secundário, o terceiro componente é a linha de base de fluorescência elevada com pico de dispersão e o quarto, quinto e sexto componentes são também a linha de base com picos de dispersão de primeira ordem a c.d.o. distintos.

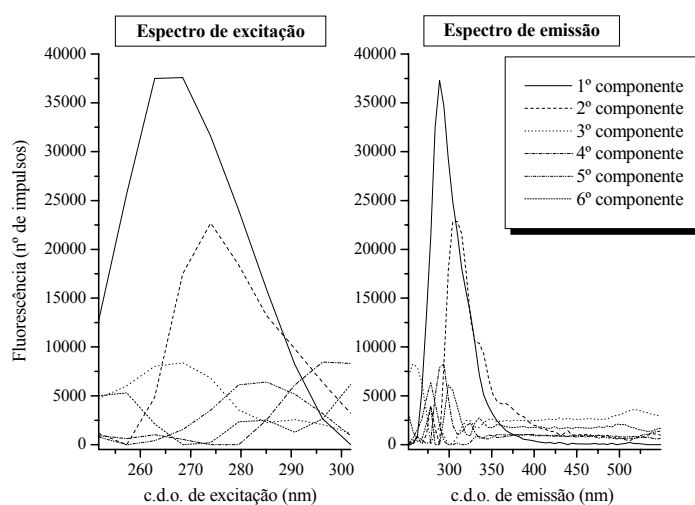


Fig. 7.6 – Espectro de excitação e de emissão estimados pelo modelo PARAFAC de 6 componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC de 6 componentes sem restrições na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] do solvente metanol.

Padrão

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 7.8 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC, de um a nove componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por TLD na análise da matriz do padrão de Verapamil 4.980 ppm.

Como se pode verificar na Tabela 7.8, por validação cruzada, as menores diferenças de valores de ajuste foram verificadas para os modelos de três a nove componentes. De entre estes, o modelo de cinco componentes além de um número de iterações baixo apresenta também um teste de consistência do núcleo válido de valor elevado. Para os modelos de seis e sete componentes, foram também encontrados testes de consistência do núcleo

válidos associados a um maior número de iterações. Atendendo à baixa diferença de valor de ajuste, o ainda baixo número de iterações e a um teste de consistência do núcleo elevado o modelo de cinco componentes parece ser o mais adequado.

Tabela 7.8 – Validação cruzada do modelo PARAFAC, de 1 a 9 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por TLD na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] de padrão de Verapamil 4.980 ppm. São apresentados a diferença dos ajustes obtidos por validação cruzada entre os modelos na análise da matriz segmentada e total, o número de iterações e o valor do teste de consistência do núcleo (corcondia).

	Número de componentes								
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete	Oito	Nove
Número de Iterações	3	2	2	1052	92	306	962	2500	2500
Corcondia	100	100	-4.94	0.22	89.48	78.76	58.87	25.85	-0.18
$\Delta_{A_{iMS}-A_{iMT}}$	-1.13	-0.13	-0.05	-0.07	-0.05	-0.04	-0.04	-0.04	-0.04

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 7.9 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC na análise da matriz tridimensional do padrão de Verapamil 4.980 ppm. Na Tabela 7.9 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições. Na Tabela 7.9 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como se pode ver na Tabela 7.9 a), a estimativa de concentração mais próxima do esperado, com uma concentração de 4.938 ppm, mas com um teste de consistência do núcleo não válido e uma mais baixa percentagem de ajuste do modelo, é obtida com o modelo de três componentes e não negatividade nas três dimensões.

Como é possível verificar na Tabela 7.9 a) e b) os modelos com testes de consistência válidos apresentam recuperações diferentes.

Os modelos de seis e sete componentes e não negatividade nas três dimensões, apresentam as estimativas mais afastadas do esperado com uma recuperação de cerca de 110 % e 89 %. São encontrados para o modelo de sete componentes, relativamente ao de seis componentes, um teste de consistência do núcleo e ajuste do modelo mais altos, um menor número de iterações mas piores estimativas do componente principal nas três dimensões.

Os modelos de cinco, seis e sete componentes, com matriz normalizada na primeira, são os que apresentam a estimativa mais próxima do esperado com uma recuperação de cerca

de 102 %. Com estes modelos, são obtidos testes de consistência do núcleo elevados e ajustes do modelo mais altos mas piores estimativas na primeira dimensão. Relativamente ao modelo de cinco componentes, o modelo de seis componentes apresenta ligeiramente melhores estimativas na segunda e terceira dimensões e ligeiramente piores estimativas na primeira dimensão, enquanto o de sete componentes, apresenta ligeiramente piores estimativas nas três dimensões. Apesar da pior estimativa do espectro de excitação, e atendendo, também a análise prévia por validação cruzada, o modelo mais adequado parece ser o modelo PARAFAC de cinco componentes.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo PARAFAC de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões, matriz normalizada na primeira dimensão e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC de cinco componentes sem restrições na análise da matriz [excitação × emissão × concentração].

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz do padrão pelo modelo PARAFAC de cinco componentes, o primeiro componente é o composto principal, o segundo componente é a linha de base de fluorescência elevada com pico de dispersão, o terceiro componente é o composto principal a maior c.d.o. com pico de dispersão considerado como composto secundário e o quarto e quinto componentes são a linha de base com picos de dispersão de primeira ordem a c.d.o. distintos.

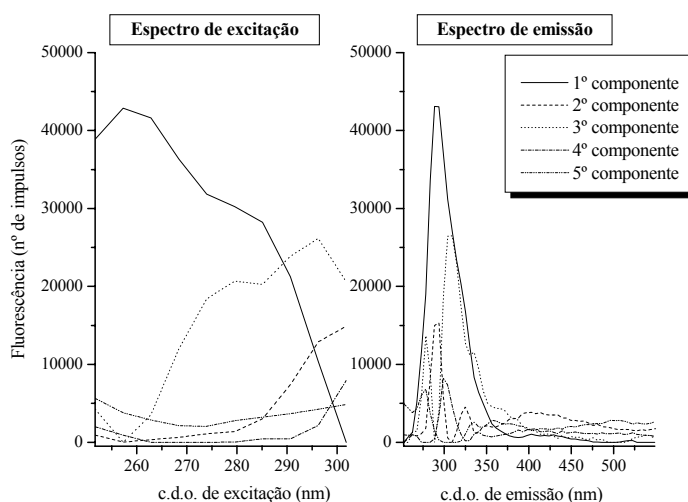


Fig. 7.7 – Espectro de excitação e de emissão estimados pelo modelo PARAFAC de 5 componentes, não negatividade nas três dimensões, matriz normalizada na primeira dimensão e estimativas iniciais de PARAFAC 5 componentes sem restrições na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] do padrão de Verapamil 4.980 ppm.

Tabela 7.9 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] de padrão de Verapamil 4.980 ppm com a) restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por PARAFAC sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) Não negatividade nas três dimensões

	Número de componentes				
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
C_{estimada} (ppm)	4.938 (0.203)	5.405 (0.097)	5.465 (0.130)	5.442 (0.113)	4.404 (0.236)
Recuperação (%)	99.161	108.542	109.747	109.285	88.448
LD (3S_{y/x}/b)	0.368	0.168	0.224	0.195	0.453
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	94.825	95.865	93.633	94.473	97.746
ssq_{resíduos}	5.837×10 ⁸	3.727×10 ⁸	8.835×10 ⁸	6.659×10 ⁸	1.108×10 ⁸
Iterações	120	686	2500 (máx.)	2500 (máx.)	474
Corcondia (%)	-0.351	4.626	11.485	40.579	87.343
R_{Excitação}	+0.452	+0.977	+0.958	+0.972	+0.895
R_{Emissão}	+0.951	+0.981	+0.993	+0.996	+0.985
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.274 (0.006)	0.285 (0.002)	0.287 (0.003)	0.286 (0.003)	0.259 (0.007)
b	0.055 (0.001)	0.053 (0.001)	0.052 (0.001)	0.053 (0.001)	0.059 (0.002)
S_{y/x}	0.007	0.003	0.004	0.003	0.009
R	0.9995	0.9999	0.9998	0.9999	0.9992

b) não negatividade nas três dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	2 componentes	5 componentes (matriz normalizada na primeira dimensão)	6 componentes (matriz normalizada na primeira dimensão)	7 componentes (matriz normalizada na primeira dimensão)
C_{estimada} (ppm)	4.828 (0.210)	5.076 (0.108)	5.054 (0.101)	5.053 (0.153)
Recuperação (%)	96.949	101.925	101.490	101.468
LD (3S_{y/x}/b)	0.385	0.193	0.180	0.274
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	91.747	99.999	100.000	100.000
ssq_{resíduos}	1.485×10 ⁹	7.814	5.247	3.400
Iterações	38	114	214	316
Corcondia (%)	98.080	94.554	91.838	88.804
R_{Excitação}	+0.964	+0.675	+0.646	+0.657
R_{Emissão}	+0.982	+0.984	+0.986	+0.982
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.271 (0.006)	0.277 (0.003)	0.277 (0.003)	0.277 (0.004)
b	0.056 (0.001)	0.055 (0.001)	0.055 (0.001)	0.055 (0.001)
S_{y/x}	0.007	0.004	0.003	0.005
R	0.9994	0.9999	0.9999	0.9997

* Ver rodapé da Tabela 4.6.

Formulações Farmacêuticas

Para todas as formulações farmacêuticas foram analisadas matrizes [excitação × emissão × concentração] pelo modelo PARAFAC de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC de cinco componentes sem restrições. Análises com outras condições de ajuste do modelo se consideradas mais adequadas foram efectuadas.

Na Tabela 7.10 são apresentadas as condições de ajuste do modelo PARAFAC consideradas mais adequadas na análise das matrizes obtidas com cada amostra analisada.

Tabela 7.10 – Condições de ajuste do modelo PARAFAC utilizadas na análise das matrizes obtidas com as amostras não fortificadas e fortificadas.

Matriz analisada	Condições de ajuste			Amostras analisadas
	Número de componentes	Restrições	Estimativas iniciais	
Excitação × emissão × concentração	Cinco Seis	Não negatividade nas três dimensões	PARAFAC sem restrições	Is40coFo Ve40ra
	Cinco	Não negatividade nas três dimensões e unimodilidade na primeira dimensão		Is40co
	Cinco Seis	Não negatividade nas três dimensões e unimodilidade na primeira e segunda dimensões		Isinj Ve40raFo
	Matriz normalizada na primeira dimensão			
	Cinco Seis	Não negatividade nas três dimensões	PARAFAC sem restrições	IsinjFo, IsretFo e Ishta Isret e IshtaFo

Como é possível verificar pela Tabela 7.10, as estimativas mais adequadas foram encontradas para a maioria das amostras com condições de ajuste diferentes das inicialmente consideradas. Para algumas amostras foram utilizados seis componentes. As outras condições de ajuste utilizadas foram, a restrição de unimodilidade na primeira dimensão ou na primeira e segunda dimensão e a normalização da matriz na primeira dimensão.

Para a maioria das formulações farmacêuticas as estimativas mais adequadas são encontradas com condições de ajuste do modelo diferentes na análise das amostras não fortificadas e fortificadas. As estimativas mais adequadas na análise das amostras não

fortificadas e fortificadas, são obtidas para as formulações farmacêuticas Isret e Ishta, com um número de componentes diferente e, para as formulações Ve40ra, Isinj e Is40co com outras condições de ajuste diferentes. Para as formulações Isret e Ishta na análise da amostra fortificada, com normalização da matriz na primeira dimensão, são utilizados respectivamente um número menor e maior de componentes. Para as formulações Isinj e Is40co na análise da amostra fortificada é aplicada a restrição de unimodalidade na primeira dimensão. Para a formulação Ve40ra na análise da amostra não fortificada é aplicada a restrição de unimodalidade na primeira e segunda dimensão. Para a formulação Isinj na análise da amostra fortificada a matriz é normalizada na primeira dimensão.

Na Tabela 7.11 são apresentados os resultados da análise pelo modelo PARAFAC das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas.

Para a maioria das amostras são encontrados ajustes lineares com coeficientes de correlação linear do ajuste de ordem de grandeza igual ou superior a 0.998. Para as amostras não fortificadas Ve40ra, Isret, Is40coFo e fortificada Ishta encontram-se mesmo valores de coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.999. Para a maioria das amostras, são obtidos desvios padrão relativos inferiores a 10 %. As exceções são, com um desvio padrão relativo da ordem dos 10 %, a amostra Is40co e, com um desvio padrão relativo ligeiramente superior a 10 %, as amostras Isinj e IsretFo.

Para todas as amostras não fortificadas e fortificadas são encontradas recuperações próximas de 100 %. Para a maioria das formulações são também encontradas recuperações de fortificação próximas de 100 %. A única exceção verifica-se para a formulação Ishta com um recuperação de fortificação ligeiramente acima de 110 %.

Para a maioria das análises efectuadas são obtidos testes de consistência do núcleo elevado. Valores de teste de consistência do núcleo mais baixos são encontrados para as amostras não fortificada e fortificada da formulação Ve40ra e para a amostra não fortificada Is40co. Tal facto, revela a dificuldade do ajuste, na análise das matrizes das amostras Ve40ra e Ve40raFo com o modelo de seis componentes e na análise da matriz da amostra Is40co com restrição de unimodalidade na primeira dimensão.

Para todas as amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas das dosagens estimadas por HPLC-UV. Para todas as amostras são encontrados erros de previsão inferiores a 10 %. Os erros de previsão encontrados variam desde 0.8 a 5 %. O

erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Ishta e o mais alto para a amostra Ve40ra. Na avaliação da quantificação por este modelo com todas as amostras não fortificadas é encontrado um valor de EPM de 1.897 %, de EPT de 1.113 % e de RMSEP de 1.259.

É de referir ainda que, com condições de ajuste diferentes, são também encontradas para algumas formulações estimativas de dosagem ou recuperações de fortificação mais próximas do esperado. É obtida uma estimativa de dosagem adequada, com um teste de consistência não válido, para a formulação Ve40ra com não negatividade e unimodalidade na primeira dimensão. São obtidas recuperações de fortificação adequadas, para a formulação Isinj, com um valor de teste de consistência menor, com um número maior de componentes e não negatividade e para a formulação Is40co, com um teste de consistência válido, com dois componentes e matriz normalizada na primeira dimensão.

Apesar do já avaliado por análise preliminar, em que desvios a trilinearidade podem ser esperados, são encontradas estimativas de concentração adequadas. Relativamente às estimativas obtidas por análise directa são encontradas com a maioria das amostras melhores estimativas de concentração. São também encontradas pelo modelo PARAFAC melhores estimativas de recuperação de fortificação.

Tabela 7.11 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas obtidas pelo modelo PARAFAC.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Ve40ra	Isinj	Is40co	Isret	Ishta
$C_{estimada}$ (ppm)	4.654 (0.156)	4.733 (0.686)	4.770 (0.483)	4.632 (0.225)	4.641 (0.136)
$C_{esperada}$ (ppm)	4.977	4.978	4.979	4.932	4.982
Recuperação (%)	93.509	95.076	95.805	93.914	93.153
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.292	1.271	0.891	0.421	0.254
$DOS_{estimada}$ (mg)	37.238	4.733	38.153	112.193	222.579
$DOS_{estimada}$ HPLC (mg)	38.979	4.679	37.362	111.183	220.724
EP (%)	4.467	1.154	2.117	0.908	0.840
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	94.226	96.342	95.516	100.000	99.999
$SSQ_{resíduos}$	6.165×10^8	2.363×10^8	4.103×10^8	4.772	7.909
Iterações	2500 (máx.)	580	2500 (máx.)	288	186
Corcondia (%)	23.819	91.285	37.549	96.593	94.214
$R_{Excitação}$	+0.705	+0.883	+0.737	+0.504	+0.221
$R_{Emissão}$	+0.974	+0.875	+0.654	+0.911	+0.964
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	0.266 (0.005)	0.268 (0.020)	0.269 (0.014)	0.265 (0.007)	0.265 (0.004)
b	0.057 (0.001)	0.057 (0.004)	0.056 (0.003)	0.057 (0.001)	0.057 (0.001)
$S_{y/x}$	0.006	0.024	0.020	0.008	0.005
R	0.9997	0.9940	0.9704	0.9993	0.9998

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Ve40raFo	IsinjFo	Is40coFo	IsretFo	IshtaFo
$C_{estimada}$ (ppm)	6.376 (0.427)	6.495 (0.456)	6.482 (0.327)	6.376 (0.795)	6.801 (0.586)
$C_{esperada}$ (ppm)	6.877	6.878	6.879	6.833	6.882
Recuperação (%)	92.714	94.423	94.223	93.318	98.819
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.671	0.707	0.508	1.249	0.885
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	96.905	99.999	95.808	99.999	100.000
$SSQ_{resíduos}$	2.375×10^8	9.332	4.877×10^8	11.417	3.602
Iterações	1502	234	1000	278	94
Corcondia (%)	47.309	98.106	91.336	86.620	95.917
$R_{Excitação}$	+0.816	+0.563	+0.974	+0.578	+0.688
$R_{Emissão}$	+0.976	+0.996	+0.961	+0.996	+0.997
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)					
$C_{estimada}$ (ppm)	1.722	1.762	1.712	1.744	2.160
$C_{esperada}$ (ppm)	1.900	1.900	1.900	1.900	1.900
Recuperação (%)	90.632	92.737	90.105	91.790	113.684
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	-0.178	-0.138	-0.188	-0.156	+0.260
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	0.307 (0.009)	0.309 (0.009)	0.309 (0.007)	0.307 (0.017)	0.315 (0.011)
b	0.048 (0.002)	0.048 (0.002)	0.048 (0.001)	0.048 (0.004)	0.046 (0.003)
$S_{y/x}$	0.011	0.011	0.008	0.020	0.014
R	0.9983	0.9981	0.9990	0.9942	0.9971

* máx. – corresponde a indicação de que o número máximo de iterações definido no ajuste do modelo foi atingido; A dosagem é dada em massa de composto por comprimido excepto para Isinj em que a dosagem vem em massa de composto por 2 mL; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

7.4.2.2 – PARAFAC2

No ajuste pelo modelo PARAFAC2 foi de uma forma geral utilizada a matriz tridimensional [emissão × excitação × concentração] ($58 \times 10 \times 4$). As condições geralmente utilizadas para o ajuste foram a aplicação de restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD.

Solvente

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 7.12 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC2, de um a nove componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SVD na análise da matriz tridimensional do solvente metanol.

Como se pode verificar na Tabela 7.12, a avaliação por validação cruzada permite concluir que, apesar de um ajuste do modelo mais baixo, mas considerando o número de iterações ainda baixo e a menor diferença de valores de ajuste, o modelo mais adequado é o modelo de três componentes. Apesar dos mais altos valores ajuste do modelo encontrados para os modelos com um número maior de componentes, estes, não podem ser considerados devido as maiores diferenças de ajuste encontradas. Assim mesmo, é para o modelo de quatro componentes que é encontrado um número de iterações próximo ao obtido com o modelo de três componentes.

Tabela 7.12 – Validação cruzada do Modelo PARAFAC2, de 1 a 9 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] de metanol. São apresentados os ajustes obtidos na análise da matriz segmentada e na matriz total, diferença de ajustes e o número de iterações necessários.

	Número de componentes								
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete	Oito	Nove
Número de Iterações	2	2000	1435	1547	2000	2000	2000	2000	2000
AjMS (%)	80.70	87.97	90.49	61.50	63.57	65.90	48.41	35.11	25.03
AjMT (%)	82.11	90.38	92.88	94.83	96.28	97.07	97.82	98.25	98.60
$\Delta_{AjMS-AjMT}$	-1.41	-2.41	-2.39	-33.33	-32.71	-31.17	-49.41	-63.14	-73.57

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 7.13 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC2 na análise da matriz tridimensional do solvente metanol. Na Tabela 7.13 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas obtidas por SVD. Na Tabela 7.13 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC2, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Apesar da avaliação prévia por validação cruzada, pode ver-se nas Tabela 7.13 a) e b) que, as estimativas mais próximas de zero são obtidas com modelos com um número maior de componentes.

Como se pode ver na Tabela 7.13 b), a estimativa de concentração mais próxima de zero, com uma concentração de 0.002 ppm, é obtida com o modelo de nove componentes e não negatividade na primeira e terceira dimensões. Excepto para este modelo, na análise da matriz [emissão × excitação × concentração], as estimativas mais adequadas são encontradas com modelos na análise de matrizes [concentração × excitação × emissão] ou [concentração × emissão × excitação]. A análise deste tipo de matrizes, como já verificado anteriormente, permite lidar com maiores desvios a trilinearidade. Com um número menor de componentes, todos os modelos na análise deste tipo de matrizes, apresentam uma percentagem de ajuste do modelo ligeiramente superior à obtida com o modelo de nove componentes na análise da matriz [emissão × excitação × concentração]. De entre estes modelos, apesar de na segunda e terceira dimensões apresentar piores estimativas do componente principal, o modelo de cinco componentes não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por números aleatórios na análise da matriz [concentração × excitação × emissão], com uma estimativa positiva de 0.009 ppm, parece ser o modelo mais adequado.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de PARAFAC2 de cinco componentes, não negatividade nas primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por números aleatórios na análise da matriz [concentração × excitação × emissão].

Tabela 7.13 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC2 na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] do solvente metanol com a) restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões

Número de componentes					
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
C_{estimada} (ppm)	-0.050(0.073)	0.885 (0.075)	1.751 (0.279)	0.756 (0.093)	0.979 (0.081)
Recuperação (%)	---	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.265	0.232	0.753	0.285	0.247
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	92.774	94.824	96.252	97.120	97.803
ssq_{resíduos}	3.636×10 ⁸	1.865×10 ⁸	9.780×10 ⁷	5.774×10 ⁷	3.360×10 ⁷
Iterações	58	1945	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	-0.951--0.678	-0.525--0.691	-0.838--0.786	-0.368--0.581	+0.001--0.264
R_{Emissão}	-0.690--0.684	-0.701--0.699	-0.768--0.772	-0.572--0.583	-0.343--0.385
R_{Emissão}	-0.069	-0.074	-0.045	-0.102	-0.067
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	-0.006(0.008)	0.094 (0.006)	0.144 (0.017)	0.073 (0.008)	0.091 (0.006)
b	0.110 (0.002)	0.083 (0.001)	0.082 (0.004)	0.096 (0.002)	0.093 (0.001)
S_{y/x}	0.010	0.007	0.021	0.009	0.008
R	0.9997	0.9998	0.9979	0.9997	0.9998

b) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e outras avaliações

Outras avaliações				
	9 componentes	4 componentes (matriz conc.×exc.×emi. e estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições)	5 componentes (matriz conc.×exc.×emi. e estimativas iniciais por números aleatórios)	6 componentes (matriz conc.×emi.×exc. e estimativas iniciais por números aleatórios)
C_{estimada} (ppm)	0.002 (0.087)	-0.004 (0.100)	0.009 (0.060)	-0.006 (0.052)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.311	0.358	0.214	0.186
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.588	99.611	99.361	99.649
ssq_{resíduos}	1.389×10 ⁷	1.052×10 ⁶	2.840×10 ⁶	8.600×10 ⁵
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	-0.394 - -0.652	-0.813 (máx.)	+0.093 (máx.)	-0.805
R_{Emissão}	-0.652 - -0.656	-0.813 (máx.)	+0.093 (máx.)	-0.805
R_{Emissão}	-0.141	-0.069	-0.047	-0.312 (máx.)
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	2.535×10 ⁻⁴ (0.010)	2.634×10 ⁻⁴ (0.011)	0.001 (0.007)	-0.001 (0.006)
b	0.109 (0.002)	0.110 (0.002)	0.109 (0.001)	0.110 (0.001)
S_{y/x}	0.011	0.013	0.008	0.007
R	0.9996	0.9995	0.9998	0.9999

* Ver rodapé da Tabela 5.13.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de metanol pelo modelo de PARAFAC2 de cinco componentes, o primeiro componente é a linha de base com fluorescência elevada, o segundo e quarto componentes são a linha de base com picos de dispersão de primeira ordem a diferentes c.d.o., o terceiro componente é o composto principal com pico de dispersão considerado como composto secundário e o quinto componente é o composto principal.

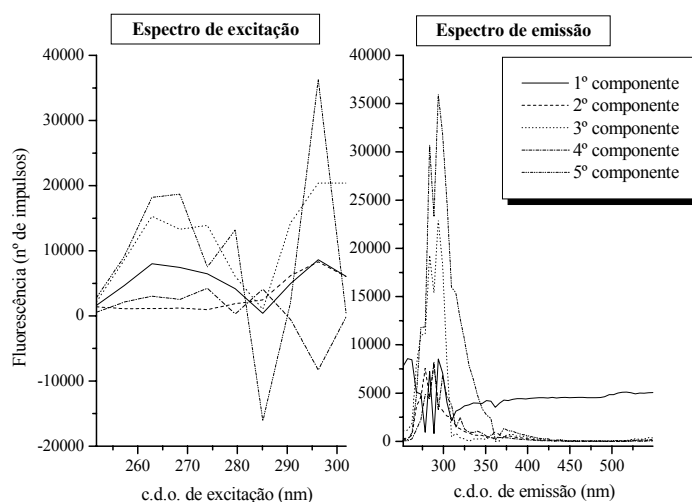


Fig. 7.8 – Espectro de excitação e de emissão estimados pelo modelo PARAFAC2 de 5 componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por números aleatórios na análise da matriz [concentração × excitação × emissão] do solvente metanol.

Padrão

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 7.14 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC2, de um a nove componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SVD na análise da matriz tridimensional do padrão de Verapamil 4.980 ppm.

Como se pode verificar na Tabela 7.14, por validação cruzada, tal como com o metanol, são encontradas para a maioria dos modelos grandes diferenças dos valores de ajuste. Só para o modelo de três componentes é obtida ainda uma diferença de valores de ajuste menor. Com uma maior percentagem de ajuste do modelo, o modelo de cinco componentes apresenta um menor número de iterações e uma menor diferença de ajuste. No entanto o modelo de três componentes parece ser o mais adequado.

Tabela 7.14 – Validação cruzada do Modelo PARAFAC2, de 1 a 9 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] de padrão de Verapamil 4.980 ppm. São apresentados os ajustes obtidos na análise da matriz segmentada e na matriz total, diferença de ajustes e o número de iterações necessários.

	Número de componentes								
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete	Oito	Nove
Número de Iterações	2	123	2000	2000	1953	2000	2000	2000	2000
AjMS (%)	85.60	-3.65	92.96	36.67	80.29	69.65	27.69	32.87	22.70
AjMT (%)	87.29	91.79	94.93	96.05	96.91	97.70	98.07	98.38	98.63
$\Delta_{AjMS-AjMT}$	-1.69	-95.44	-1.97	-59.38	-16.62	-28.05	-70.38	-65.51	-75.93

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 7.15 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC2 na análise da matriz tridimensional do padrão de Verapamil 4.980 ppm. Na Tabela 7.15 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas obtidas por SVD. Na Tabela 7.15 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC2, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como é possível verificar na Tabela 7.15 a) e b) as melhores estimativas de concentração são obtidas com os modelos apresentados na Tabela 7.15 b). A estimativa de concentração mais próxima da esperada, com uma concentração de 4.987 ppm, é encontrada com o modelo de sete componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC2 sem restrições na análise da matriz [emissão × excitação × concentração]. Para este modelo é encontrado uma percentagem de ajuste do modelo baixa, estimativas do componente principal adequadas na primeira e segunda dimensões e piores estimativas na terceira dimensão.

Estimativas de concentração próximas ao esperado são também encontradas, com percentagens de ajuste do modelo mais elevados, na análise de matrizes com a concentração na primeira dimensão, com um número menor de componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais por números aleatórios. É encontrada, uma recuperação de 101 % com o modelo de cinco componentes na análise da matriz [concentração × excitação × emissão] e uma recuperação de 99 % com o modelo de quatro componentes na análise da matriz [concentração × emissão × excitação]. De entre estes dois modelos, o modelo de cinco componentes, relativamente ao modelo de quatro componentes, apresenta uma percentagem de ajuste do modelo

ligeiramente superior, melhores estimativas na dimensão dos espectros de emissão e de concentração mas piores estimativas na dimensão dos espectros de excitação. Apesar da pior estimativa do espectro de excitação do componente principal, o modelo de cinco componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais por números aleatórios na análise da matriz [concentração \times excitação \times emissão] é considerado o mais adequado.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de PARAFAC2 de cinco componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por números aleatórios na análise da matriz [concentração \times excitação \times emissão]. A análise por este modelo, com estimativas iniciais por SVD, com estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC2 sem restrições bem como com outro tipo de matrizes foi posteriormente considerada.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz do padrão de Verapamil pelo modelo PARAFAC2 de cinco componentes o primeiro componente é a linha de base de fluorescência elevada, o segundo componente é a linha de base de fluorescência elevada com picos de dispersão de primeira ordem, o terceiro componente é o composto principal com pico de dispersão considerado como composto secundário, o quarto componente é a linha de base com picos de dispersão de primeira ordem a c.d.o. distintos e o quinto componente é o composto principal.

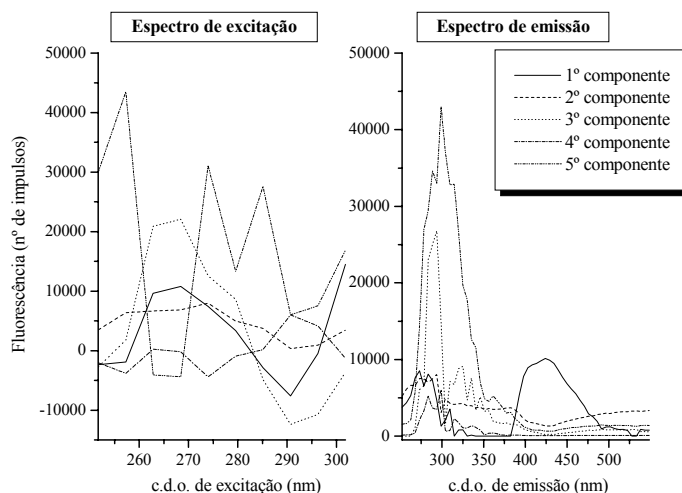


Fig. 7.9 – Espectro de excitação e de emissão estimados pelo modelo PARAFAC2 de 5 componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais por números aleatórios na análise da matriz [concentração \times excitação \times emissão] do padrão de Verapamil 4.980 ppm.

Tabela 7.15 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC2 na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] de padrão de Verapamil 4.980 ppm com a) restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões

	Número de componentes				
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
C_{estimada} (ppm)	4.177 (0.335)	1.961 (0.432)	2.087 (0.447)	5.883 (0.138)	4.657 (0.349)
Recuperação (%)	83.875	39.372	41.912	118.133	93.250
LD (3S_{y/x}/b)	0.660	1.129	1.148	0.227	0.653
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	94.929	96.052	96.894	97.692	98.064
ssq_{resíduos}	5.606×10 ⁸	3.397×10 ⁸	2.102×10 ⁸	1.161×10 ⁸	8.169×10 ⁷
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.931- +0.933	+0.908- +0.941	+0.877 -+0.958	+0.854 -+0.893	+0.982 -+0.984
	+0.936- +0.937	+0.945- +0.944	+0.969 -+0.969	+0.904 -+0.915	+0.986 -+0.976
R_{Emissão}	+0.994	+0.989	+0.982	+0.976	+0.977
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.252 (0.011)	0.157 (0.025)	0.164 (0.025)	0.296 (0.003)	0.266 (0.010)
b	0.060 (0.002)	0.080 (0.006)	0.078 (0.006)	0.050 (0.001)	0.057 (0.002)
S_{y/x}	0.013	0.030	0.030	0.004	0.012
R	0.9984	0.9953	0.9951	0.9998	0.9984

b) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	7 componentes (estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições)	5 componentes (matriz conc.×exc.×emi. e estimativas iniciais por números aleatórios)	4 componentes (matriz exc.×emi.×conc. e estimativas iniciais por números aleatórios)	4 componentes (matriz conc.×emi.×exc. e estimativas iniciais por números aleatórios)
C_{estimada} (ppm)	4.987 (0.255)	5.025 (0.111)	4.640 (0.101)	4.939 (0.222)
Recuperação (%)	100.152	100.913	93.182	99.192
LD (3S_{y/x}/b)	0.461	0.200	0.189	0.403
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.056	99.357	97.220	99.116
ssq_{resíduos}	8.241×10 ⁷	9.022×10 ⁷	1.684×10 ⁸	1.705×10 ⁷
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.982 - +0.986	-0.587 (máx.)	+0.959	+0.375 (máx.)
	+0.986 - +0.976			
R_{Emissão}	+0.977	+0.955	+0.909 - +0.958	+0.616
			+0.956 - +0.959	
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.275 (0.007)	0.276 (0.003)	0.265 (0.003)	0.274 (0.006)
b	0.055 (0.002)	0.055 (0.001)	0.057 (0.001)	0.055 (0.001)
S_{y/x}	0.008	0.004	0.004	0.007
R	0.9992	0.9999	0.9999	0.9994

* Ver rodapé da Tabela 5.13.

Formulações Farmacêuticas

Para todas as formulações farmacêuticas foram analisadas matrizes [concentração × excitação × emissão] pelo modelo PARAFAC2 de cinco componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais por números aleatórios. Análises com outras condições de ajuste do modelo se consideradas mais adequadas foram efectuadas.

Na Tabela 7.16 são apresentadas as condições de ajuste do modelo PARAFAC2 consideradas mais adequadas na análise das matrizes obtidas com cada amostra analisada.

Tabela 7.16 – Condições de ajuste do modelo PARAFAC2 utilizadas na análise das matrizes obtidas com as amostras não fortificadas e fortificadas.

Matriz analisada	Condições de ajuste			Amostras analisadas
	Número de componentes	Restrições (1ª e 3ª dimensões)	Estimativas iniciais	
Concentração × excitação × emissão	Cinco	Não negatividade	Números aleatórios	IsinjFo, Ishta e IshtaFo
	Seis			Isret
Concentração × emissão × excitação	Cinco			Isinj e Ve40raFo
	Seis			Ve40ra, Is40co, Is40coFo e IsretFo

Como é possível verificar na Tabela 7.16, para a maioria das amostras as estimativas mais adequadas foram encontradas com condições de ajuste diferentes das inicialmente consideradas. Para a maioria das amostras as estimativas mais adequadas foram obtidas na análise de matrizes [concentração × emissão × excitação] e com um número de seis componentes.

Na análise das amostras não fortificadas e fortificadas, para as formulações Is40co e Ishta as estimativas mais adequadas são obtidas com as mesmas condições de ajuste. Para as formulações farmacêuticas Ve40ra, Isinj e Isret as estimativas mais adequadas são encontradas com condições de ajuste do modelo diferentes na análise dos dois tipos de amostra. Para a formulação Ve40ra um número de componentes diferente e para as formulações Isinj e Isret um tipo de matriz diferente são utilizados na análise das amostras

não fortificadas e fortificadas. Com a formulação Ve40ra um número menor de componentes é utilizado na análise da amostra fortificada.

O facto de para todas as amostras as melhores estimativas de concentração serem encontradas na análise de matrizes que modelam melhor desvios a trilinearidade parece confirmar possíveis desvios a trilinearidade avaliados pela análise inicial efectuada.

Na Tabela 7.17 são apresentados os resultados da análise pelo modelo PARAFAC2 das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas.

Para a maioria das amostras são obtidos ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou inferior a 0.998. Para todas as formulações, ajustes lineares com coeficientes de correlação superiores são encontrados com as amostras não fortificadas. Assim mesmo, são encontrados para as amostras não fortificadas Ve40ra, Is40co e Ishta valores de coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.999. Para a maioria das amostras são encontrados desvios padrão relativos de uma forma geral inferiores a 10 %. As únicas excepções, com desvios padrão ligeiramente superiores a 10 %, são as amostras fortificadas IsinjFo e IshtaFo. De uma forma geral, são obtidos com a maioria das amostras, desvios padrão próximos aos encontrados com o modelo PARAFAC.

Recuperações dentro do esperado são obtidas para todas as amostras não fortificadas e fortificadas. A única excepção é a amostra Isret com uma recuperação ligeiramente abaixo dos 90 %. São ainda obtidas, para todas as formulações farmacêuticas recuperações de fortificação por volta de 100 %.

Para a maioria das amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas da dosagem estimada por HPLC-UV. São obtidos com todas as amostras não fortificadas erros de previsão inferiores 10 %. Os erros de previsão encontrados variam desde 0.6 a 4%. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Ishta e o mais alto para a amostra Isret. Na avaliação da quantificação por este modelo com todas as amostras não fortificadas é obtido um valor de EPM de 1.763 %, de EPT de 1.895 % e de RMSEP de 2.144.

É de referir ainda que, para a formulação Isinj é encontrada uma estimativa de dosagem próxima e uma recuperação de fortificação ligeiramente superior, com outras condições de ajuste, mas com uma pior percentagem do ajuste do modelo e pior estimativa do

componente principal na dimensão da emissão. Para as outras formulações, só para a formulação Ishta, com um tipo de matriz diferente na análise da amostra não fortificada e fortificada e com outras condições de ajuste, é encontrada uma estimativa de dosagem e recuperação de fortificação próximas às apresentadas.

São encontradas pelo modelo PARAFAC2 melhores estimativas de concentração relativamente às estimativas de concentração obtidas por análise directa e estimativas próximas relativamente às estimativas de concentração obtidas pelo modelo PARAFAC. Excepto para uma das formulações, pelo modelo PARAFAC2 são encontradas estimativas de recuperação de fortificação mais elevadas do que as obtidas com o modelo PARAFAC. Assim mesmo, de uma forma geral, são encontradas pelo modelo PARAFAC2 estimativas de recuperação de fortificação mais adequadas.

Tabela 7.17 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas obtidas pelo modelo PARAFAC2.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Ve40ra	Isinj	Is40co	Isret	Ishta
C_{estimada} (ppm)	4.804 (0.218)	4.612 (0.473)	4.629 (0.199)	4.402 (0.344)	4.629 (0.195)
C_{esperada} (ppm)	4.977	4.978	4.979	4.932	4.982
Recuperação (%)	96.520	92.649	92.974	89.249	92.910
LD (3S_{y/x}/b)	0.400	0.888	0.952	0.660	0.366
DOS_{estimada} (mg)	38.438	4.612	37.852	106.622	222.003
DOS_{estimada} HPLC (mg)	38.979	4.679	37.362	111.183	220.724
EP (%)	1.388	1.432	1.312	4.102	0.580
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	99.469	99.407	99.613	99.102	99.106
SSQ_{resíduos}	5.206×10 ⁸	6.201×10 ⁶	3.056×10 ⁸	1.495×10 ⁷	1.405×10 ⁷
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.817	+0.882	+0.943	+0.472(máx.)	-0.350 (máx.)
R_{Emissão}	+0.419(máx.)	+0.593(máx.)	+0.335(máx.)	+0.982	+0.950
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.270 (0.006)	0.265 (0.014)	0.284 (0.005)	0.258 (0.011)	0.265 (0.006)
b	0.056 (0.001)	0.057 (0.003)	0.053 (0.001)	0.059 (0.002)	0.057 (0.001)
S_{y/x}	0.008	0.017	0.006	0.013	0.007
R	0.9994	0.9971	0.9996	0.9984	0.9995

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Ve40raFo	IsinjFo	Is40coFo	IsretFo	IshtaFo
C_{estimada} (ppm)	6.726 (0.465)	6.469 (0.705)	6.611 (0.602)	6.374 (0.636)	6.406 (0.886)
C_{esperada} (ppm)	6.877	6.878	6.879	6.833	6.882
Recuperação (%)	97.799	94.048	96.101	93.294	93.080
LD (3S_{y/x}/b)	0.707	1.098	0.925	0.999	1.387
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	99.587	99.370	99.658	99.104	99.417
SSQ_{resíduos}	4.236×10 ⁶	1.047×10 ⁷	3.242×10 ⁶	1.928×10 ⁷	8.384×10 ⁶
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.959	-0.394 (máx.)	+0.773	+0.872	+0.725(máx.)
R_{Emissão}	+0.970(máx.)	+0.718	+0.752(máx.)	+0.926(máx.)	+0.912
Fortificação (C_{estimada} amostra fortificada – C_{estimada} amostra não fortificada)					
C_{estimada} (ppm)	1.922	1.857	1.982	1.972	1.777
C_{esperada} (ppm)	1.900	1.900	1.900	1.900	1.900
Recuperação (%)	101.158	97.737	104.316	103.790	93.526
Δ = C_{estimada} – C_{esperada}	+0.022	-0.043	+0.082	+0.072	-0.123
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.313 (0.009)	0.308 (0.015)	0.311 (0.012)	0.307 (0.013)	0.307 (0.019)
b	0.047 (0.002)	0.048 (0.003)	0.047 (0.003)	0.048 (0.003)	0.048 (0.004)
S_{y/x}	0.011	0.017	0.015	0.016	0.022
R	0.9981	0.9955	0.9968	0.9963	0.9929

* máx. – corresponde à indicação de que o número máximo de iterações definido no ajuste do modelo foi atingido ou de que o coeficiente de correlação linear apresentado corresponde ao calculado com a estimativa do espectro de excitação ou de emissão respectivamente ao c.d.o. de emissão ou de excitação de fluorescência máxima; A dosagem é dada em massa de composto por comprimido excepto para Isinj em que a dosagem vem em massa de composto por 2 mL; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

7.4.2.3 – MCR-ALS

No ajuste pelo modelo MCR-ALS foi de uma forma geral utilizada a matriz bidimensional [(concentração × excitação) × emissão] (40 × 58). As condições geralmente utilizadas para o ajuste foram a aplicação de restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições.

Solvente

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 7.18 são apresentados os valores de perda de ajuste do modelo MCR-ALS e do número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS de um a nove componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada do solvente metanol.

É possível verificar na Tabela 7.18 que, os valores mais baixos de perda de ajuste de MCR vs. PCA foram obtidos com os modelos de um a cinco componentes e, os valores mais baixos de perda de ajuste de MCR vs Exp. foram encontrados a partir do modelo de cinco componentes. As diminuições menores de perda de ajuste de MCR vs Exp. verificam-se a partir do modelo de sete componentes. Os menores números de iterações, para além dos modelos de um e de três componentes, foram obtidos com os modelos de cinco e sete componentes. Apesar de, com o modelo de sete componentes se obter um número de iterações e de perda de ajuste de MCR vs Exp. ligeiramente menores, o menor valor de perda de ajuste de MCR vs. PCA associado a um valor também baixo de perda de ajuste de MCR vs Exp. e a um também menor número de iterações, leva a considerar o modelo de cinco componentes como o mais adequado.

Tabela 7.18 – Perda de ajuste de MCR-ALS vs. PCA, de MCR-ALS vs. experimental e número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS, de 1 a 9 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão] do solvente metanol.

	Número de componentes								
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete	Oito	Nove
Número de Iterações	1	12	1	16	9	26	3	16	23
LOF _{MCR vs. PCA} (×10 ⁻¹⁴)	2.02	2.65	2.64	2.41	2.50	3.02	3.89	3.82	3.93
LOF _{MCR vs Exp}	17.90	9.58	7.12	5.17	3.70	2.85	2.12	1.71	1.34

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 7.19 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo MCR-ALS na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada do solvente metanol. Na Tabela 7.19 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições. Na Tabela 7.19 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo MCR-ALS, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como é possível verificar pela Tabela 7.19 c), a estimativa de concentração mais próxima de zero, com uma concentração de 3.165×10^{-4} ppm, é obtida com o modelo de seis componentes, não negatividade nas duas dimensões e com indicação de ausência do composto principal na primeira matriz na análise da matriz [(concentração \times emissão) \times excitação]. Uma estimativa aproximadamente da mesma ordem de grandeza mas negativa, com uma concentração de -4.864×10^{-4} ppm, é encontrada (Tabela 7.19 b), na análise do mesmo tipo de matriz, com o mesmo número de componentes, não negatividade nas duas dimensões e trilinearidade no componente principal e no secundário. Com este último modelo são obtidos um número de iterações e diferença de perdas de ajuste menores. No entanto, com o modelo de seis componentes com indicação de ausência do composto principal na primeira matriz, é obtida uma percentagem de ajuste do modelo mais elevada associada a melhores estimativas do componente principal na dimensão do espectro de excitação e de concentração.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de MCR-ALS de seis componentes, não negatividade nas duas dimensões, componente principal da primeira matriz não relacionado com o componente principal das outras matrizes e estimativas iniciais por estimativas do modelo MCR-ALS de seis componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração \times emissão) \times excitação].

Tabela 7.19 – Estimativas de concentração obtidas por MCR-ALS na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão] do solvente metanol com a) tridimensionalidade, restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por MCR-ALS sem restrições, b) o mesmo que em a) e outras avaliações e c) o mesmo que em a) mas com indicação de ausência de componente principal na primeira matriz.*

a) com restrição de não negatividade nas duas dimensões

Número de componentes					
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
C_{estimada} (ppm)	0.187 (0.108)	0.147 (0.115)	0.080 (0.069)	-0.040(0.176)	0.072 (0.067)
Recuperação (%)	---	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.375	0.401	0.245	0.636	0.236
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	92.885	94.825	96.293	96.953	97.719
ssq_{resíduos}	3.525×10 ⁸	1.865×10 ⁸	9.567×10 ⁷	6.465×10 ⁷	3.622×10 ⁷
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	0.036	0.391	0.248	1.085	0.840
Δ_{LOFMCR} (PCA - Exp.)	-7.081	-4.785	-3.459	-1.963	-1.441
R_{Excitação}	+0.771 - -0.676	+0.786 - -0.676	+0.346 - -0.705	+0.548 - -0.645	+0.904 - -0.692
R_{Emissão}	-0.712 - -0.721	-0.715 - -0.724	-0.719 - -0.723	-0.730 - -0.733	-0.750 - -0.776
R_{Emissão}	-0.067	-0.059	-0.065	-0.002	-0.001
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	2046.866 (1146.362)	1597.434 (1216.099)	914.675 (779.505)	-426.231 (1881.352)	720.894 (662.050)
b	10946.639 (251.008)	10848.542 (266.278)	11389.039 (170.681)	10593.326 (411.942)	10036.597 (144.963)
s_{y/x}	1368.414	1451.659	930.497	2245.773	790.290
R	0.9995	0.9994	0.9998	0.9985	0.9998

b) com restrição de não negatividade nas duas dimensões e outras avaliações

Outras avaliações				
	5 componentes (trilinearidade no componente secundário)	6 componentes (trilinearidade no componente principal e no componente secundário)	6 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc. e trilinearidade no componente principal e no componente secundário)	6 componentes (matriz (conc.×emi.) ×exc., unimodalidade no componente principal na 1 ^a dimensão e trilinearidade no componente principal)
C_{estimada} (ppm)	0.022 (0.075)	0.019 (0.162)	-4.864×10 ⁻⁴ (0.092)	0.011 (0.068)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.268	0.577	0.330	0.242
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	96.106	96.391	94.322	95.703
ssq_{resíduos}	1.056×10 ⁸	9.070×10 ⁷	2.244×10 ⁸	1.286×10 ⁸
Iterações	37	50 (máx.)	46	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	1.227	2.222	5.416	3.950
Δ_{LOFMCR} (PCA - Exp.)	-2.668	-1.387	-0.262	-0.347
R_{Excitação}	+0.427 - -0.702	-0.734 - -0.734	-0.671	-0.631
R_{Emissão}	-0.718 - -0.721	-0.734 - -0.734	-0.052 - -0.052	-0.051 - -0.051
R_{Emissão}	-0.068	+0.008	-0.052 - -0.052	-0.051 - -0.051
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	259.977 (869.764)	207.384 (1713.376)	-3.681 (698.374)	82.538 (493.925)
b	11602.243 (190.444)	10641.459 (375.162)	7568.227 (152.916)	7295.758 (108.150)
s_{y/x}	1038.239	2045.260	833.650	589.599
R	0.9997	0.9988	0.9996	0.9998

(Continua)

Tabela 7.19 (Continuação)

c) com restrição de não negatividade nas duas dimensões e indicação de ausência de composto principal na primeira matriz

	Número de componentes			
	Cinco	Seis	Cinco (matriz (conc.×emi.)×exc.)	Seis (matriz (conc.×emi.)×exc.)
C_{estimada} (ppm)	-0.017 (0.070)	-0.032 (0.046)	0.044 (0.065)	3.165×10 ⁻⁴ (0.054)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.252	0.164	0.232	0.195
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	96.236	96.991	95.543	96.230
SSQ_{resíduos}	9.864×10 ⁷	6.304×10 ⁷	1.383×10 ⁸	9.894×10 ⁷
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	0.703	0.984	3.708	3.372
Δ_{LOFMCR (PCA - Exp.)}	-3.061	-0.203	-0.750	-0.390
R_{Excitação}	np - -0.715 -0.728 - -0.729	np - -0.731 -0.758 - -0.769	-0.705	-0.700
R_{Emissão}	-0.068	+0.018	np - +0.004 -0.049 - -0.071	np - +0.005 -0.048 - -0.072
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	-192.313 (815.860)	-284.977 (411.966)	355.717 (521.204)	-2.696 (463.748)
b	11602.975 (178.641)	8982.785 (90.204)	8061.155 (114.123)	8517.622 (101.543)
s_{y/x}	973.894	491.764	622.162	553.577
R	0.9998	0.9999	0.9998	0.9999

* Ver rodapé da Tabela 4.17.

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de metanol pelo modelo de MCR-ALS de seis componentes, o primeiro, terceiro e quinto componentes são a linha de base com picos de dispersão de primeira ordem a distintos c.d.o., o segundo componente é o composto principal, o quarto componente é o composto principal com pico de dispersão considerado como composto secundário e o sexto componente é a linha de base de fluorescência elevada com pico de dispersão de primeira ordem.

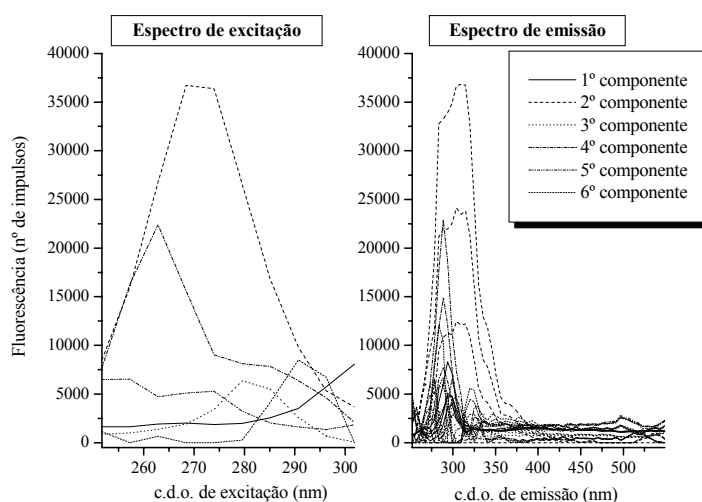


Fig. 7.10 – Espectro de excitação e de emissão estimados pelo modelo MCR-ALS de 6 componentes, não negatividade nas duas dimensões, componente principal da primeira matriz não relacionado com o componente principal das outras matrizes e estimativas iniciais por MCR-ALS de 6 componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação] do solvente metanol.

Padrão

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 7.20 são apresentados os valores de perda de ajuste do modelo MCR-ALS e do número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS de um a nove componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada [(concentração × excitação) × emissão] do padrão de Verapamil 4.980 ppm.

Como é possível verificar na Tabela 7.20, foram obtidos valores de perda de ajuste de MCR vs. PCA menores entre um e quatro e ligeiramente maiores entre cinco e nove componentes. Os menores valores de perda de ajuste de MCR vs Exp. foram encontrados a

partir do modelo de seis componentes. O menor número de iterações foi encontrado com o modelo de seis componentes. Para a análise da matriz de padrão, o modelo mais adequado parece ser o modelo de seis componentes.

Tabela 7.20 – Perda de ajuste de MCR-ALS vs. PCA, de MCR-ALS vs. experimental e número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS, de 1 a 9 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão] do padrão de Verapamil 4.980 ppm.

	Número de componentes								
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete	Oito	Nove
Número de Iterações	36	19	23	13	22	10	13	21	16
LOF _{MCR vs. PCA} (×10 ⁻¹⁴)	2.11	2.15	2.36	2.26	3.32	2.94	3.07	3.49	3.34
LOF _{MCR vs Exp}	12.71	8.21	5.06	3.93	3.07	2.28	1.91	1.60	1.32

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 7.21 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo MCR-ALS na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada [(concentração × excitação) × emissão] do padrão de Verapamil 4.980 ppm. Na Tabela 7.21 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições. Na Tabela 7.21 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo MCR-ALS, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como se pode ver na Tabela 7.21 b), a estimativa de concentração mais próxima do esperado, com uma concentração de 4.972 ppm, é obtida com o modelo de cinco componentes, não negatividade nas duas dimensões, trilinearidade no componente principal e no secundário e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação]. Com condições de ajuste idênticas mas com quatro componentes é encontrada uma estimativa de concentração próxima. O modelo de cinco componentes, relativamente ao modelo de quatro componentes, apresenta um menor número de iterações, uma percentagem de ajuste do modelo mais alta, melhores estimativas do componente principal na dimensão do espectro de emissão e da concentração e ligeiramente pior estimativa na dimensão do espectro de excitação.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado é o modelo de MCR-ALS de cinco componentes, não negatividade nas duas dimensões, trilinearidade no componente principal e secundário e estimativas iniciais por estimativas do modelo MCR-

ALS de cinco componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação].

Estimativas do modelo mais adequado

No ajuste da matriz de padrão pelo modelo de MCR-ALS de cinco componentes, o primeiro componente é o composto principal, o segundo é o composto principal com pico de dispersão considerado como composto secundário, o terceiro componente é a linha de base de fluorescência elevada com pico de dispersão e o quarto e quinto componentes são a linha de base com picos de dispersão de primeira ordem a c.d.o. distintos.

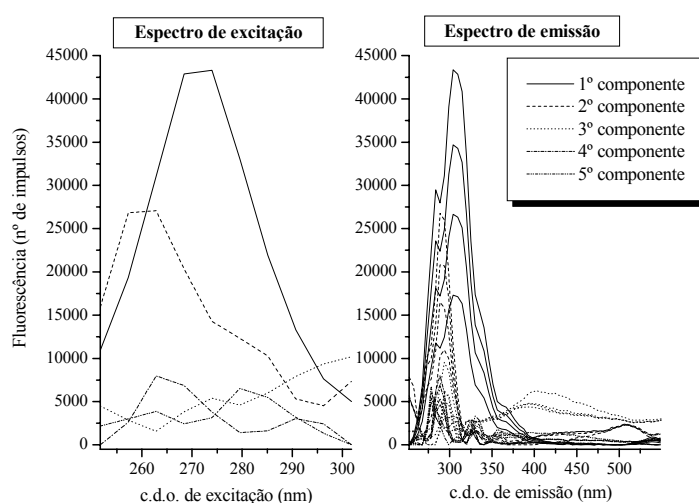


Fig. 7.11 – Espectro de excitação e de emissão estimados pelo modelo MCR-ALS de 5 componentes, não negatividade nas duas dimensões, trilinearidade no componente principal e secundário e estimativas iniciais por MCR-ALS de 5 componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação] do padrão de Verapamil 4.980 ppm.

Tabela 7.21 – Estimativas de concentração obtidas por MCR-ALS na análise da matriz [(Concentração × excitação) × emissão] de padrão de Verapamil 4.980 ppm com a) tridimensionalidade, restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por MCR-ALS sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade nas duas dimensões

	Número de componentes				
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
C_{estimada} (ppm)	4.798 (0.147)	3.885 (0.248)	3.318 (0.338)	3.029 (0.467)	1.679 (0.332)
Recuperação (%)	96.343	78.013	66.627	60.832	33.722
LD (3S_{y/x}/b)	0.271	0.505	0.737	0.990	0.904
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	94.937	96.062	96.922	97.694	97.773
SSQ_{resíduos}	5.587×10 ⁸	3.381×10 ⁸	2.065×10 ⁸	1.159×10 ⁸	1.081×10 ⁸
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	10
LOF_{MCR vs. PCA}	0.074	0.259	0.279	0.350	1.165
Δ_{LOFMCR} (PCA – Exp.)	-4.989	-3.680	-2.799	-1.956	-1.062
R_{Excitação}	+0.947- +0.951	+0.712- +0.832	+0.580- +0.764	+0.627- +0.769	+0.708- +0.764
	+0.953- +0.943	+0.851- +0.842	+0.791- +0.781	+0.800- +0.791	+0.731- +0.738
R_{Emissão}	+0.994	+0.991	+0.989	+0.991	+0.989
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	47660.715 (752.545)	33206.575 (1206.348)	29530.695 (1831.011)	31018.388 (2416.361)	20490.267 (3080.341)
b	9934.262 (164.778)	8547.771 (264.143)	8900.664 (400.919)	8739.602 (529.088)	20490.267 (674.473)
S_{y/x}	898.314	1440.020	2185.680	2884.414	3677.007
R	0.9997	0.9990	0.9980	0.9964	0.9970

b) com restrição de não negatividade nas duas dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	3 componentes (trilinearidade no componente principal e no secundário)	3 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc. e trilinearidade no componente principal e no secundário)	4 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc. e trilinearidade no componente principal)	5 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc. e trilinearidade no componente principal e no secundário)
C_{estimada} (ppm)	4.865 (0.232)	4.949 (0.172)	4.915 (0.174)	4.972 (0.166)
Recuperação (%)	97.704	99.379	98.697	99.851
LD (3S_{y/x}/b)	0.424	0.312	0.317	0.300
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	96.643	94.272	95.656	96.044
SSQ_{resíduos}	2.456×10 ⁸	7.152×10 ⁸	4.113×10 ⁸	3.412×10 ⁸
Iterações	26	4	45	24
LOF_{MCR vs. PCA}	1.367	4.284	3.351	3.478
Δ_{LOFMCR} (PCA – Exp.)	-1.989	-1.445	-0.993	-0.478
R_{Excitação}	+0.690 - +0.690	+0.907	+0.884	+0.896
	+0.690 - +0.690			
R_{Emissão}	+0.992	+0.907 - +0.907	+0.960 - +0.960	+0.912 - +0.912
		+0.907 - +0.907	+0.960 - +0.960	+0.912 - +0.912
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	39667.136 (964.484)	35061.127 (617.000)	29904.515 (538.641)	28971.056 (488.477)
b	8152.939 (211.184)	7084.817 (135.099)	6084.538 (117.941)	28971.056 (106.957)
S_{y/x}	1151.306	736.514	642.977	583.095
R	0.9993	0.9996	0.9996	0.9997

* Ver rodapé da Tabela 4.6.

Formulações Farmacêuticas

Para todas as formulações farmacêuticas foram analisadas matrizes [(concentração × emissão) × excitação] pelo modelo MCR-ALS de cinco componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo MCR-ALS de cinco componentes sem restrições. Análises com outras condições de ajuste do modelo se consideradas mais adequadas foram efectuadas.

Na Tabela 7.22 são apresentadas as condições de ajuste do modelo MCR-ALS consideradas mais adequadas na análise das matrizes obtidas com cada amostra analisada.

Tabela 7.22 – Condições de ajuste do modelo MCR-ALS utilizadas na análise das matrizes obtidas com as amostras não fortificadas e fortificadas.

Matriz analisada	Condições de ajuste			Amostras analisadas
	Número de componentes	Restrições (duas dimensões)	Estimativas iniciais	
(Concentração × emissão) × excitação	Quatro ----- Cinco	Não negatividade	MCR-ALS sem restrições	IsinjFo Is40coFo ----- Isinj e Is40co
	Quatro	Não negatividade e trilinearidade no composto secundário		Ishta e IshtaFo
	Quatro ----- Cinco	Não negatividade e trilinearidade no composto principal e secundário		IsretFo ----- Isret
	Cinco	Não negatividade, trilinearidade no composto secundário e unimodilidade no composto secundário na primeira dimensão		Ve40raFo
	Cinco	Não negatividade, trilinearidade no composto secundário e unimodilidade no composto secundário nas duas dimensões		Ve40ra

Como é possível verificar na Tabela 7.22, para a maioria das amostras as estimativas mais adequadas foram encontradas com condições de ajuste diferente das inicialmente consideradas. Com todas as amostras as estimativas mais adequadas foram obtidas com um número de componentes entre quatro e cinco na análise de matrizes [(concentração × emissão) × excitação]. As outras condições de ajuste foram a aplicação a restrição de trilinearidade ou além desta a restrição de unimodilidade.

Só para a formulação Ishta são utilizadas as mesmas condições de ajuste na análise da amostra não fortificada e fortificada. Para a formulação Ve40ra, na análise da amostra não fortificada a restrição de unimodalidade é aplicada no composto secundário nas duas dimensões e na análise da amostra fortificada é aplicada unicamente na primeira dimensão. Para as outras três formulações farmacêuticas, só um número menor de componentes é utilizado na análise das amostras fortificadas. No entanto, com estas formulações o mesmo número de componentes é utilizado quer na análise das amostras não fortificadas quer das fortificadas.

Na Tabela 7.23 são apresentados os resultados da análise pelo modelo MCR-ALS das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas.

Para a maioria das amostras são obtidos ajustes lineares com coeficientes de correlação de ordem de grandeza igual ou superior a 0.998. Mesmo, valores de coeficientes de correlação linear de ajuste linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.999 são encontrados para as amostras não fortificadas e fortificadas das formulações Isinj e Ishta. É encontrado para a amostra fortificada IsretFo, um coeficiente ligeiramente inferior a 0.998 e, só com a formulação Ve40ra, na análise dos dois tipos de amostra, são obtidos valores de coeficientes de correlação mais baixos. Excepto para a formulação Ve40ra na análise dos dois tipos de amostra, com desvios padrão relativos ligeiramente superiores a 10 %, são encontrados para as outras amostras desvios padrão relativos inferiores a 10 %.

Para a maioria das amostras fortificadas e não fortificadas são obtidas recuperações próximas de 100 %. A única exceção, com uma recuperação inferior a 90 %, é encontrada para a amostra não fortificada Ishta. Para a maioria das formulações são também obtidas recuperações de fortificação por volta de 100 %. Também, a única exceção é a formulação Ishta, com uma recuperação superior de fortificação da ordem de 120 %.

Para a maioria das amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas das dosagens estimadas por HPLC-UV. Para a maioria das amostras não fortificadas são encontrados erros de previsão inferiores a 10 %. Só para a amostra não fortificada Ishta é encontrado um erro de previsão ligeiramente superior da ordem de 12 %. Os erros de previsão encontrados variam desde 0.2 a 12 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Isret e o mais alto para a amostra Ishta.

Na avaliação da quantificação por este modelo com todas as amostras não fortificadas é obtido um valor de EPM de 3.721 %, de EPT de 10.393 % e de RMSEP de 11.759. Atendendo à pior estimativa de concentração da amostra Ishta esta pode não ser considerada para a avaliação global. Assim, ao não ser considerada a amostra Ishta, é obtido um valor de EPM de 1.678 %, de EPT de 1.254 % e de RMSEP de 0.775. Ao não ser considerada a amostra Ishta os valores encontrados diminuem significativamente.

É de referir ainda que, com condições de ajuste diferentes, são obtidas para algumas formulações estimativas de dosagem mais próximas ou uma melhor recuperação de fortificação. Para a formulação Isinj, com aplicação de restrição de trilinearidade no componente secundário e unimodalidade no componente secundário na primeira dimensão, é encontrada uma estimativa de dosagem próxima e uma recuperação de fortificação ligeiramente maior, associada a um pior ajuste do modelo e pior estimativas na dimensão da concentração. Ainda, para a formulação Is40co, com seis componentes e aplicação de restrição de trilinearidade no componente principal, é obtida uma estimativa de dosagem mais próxima do esperado associado a uma recuperação de fortificação e um ajuste do modelo ligeiramente menores.

São encontradas pelo modelo MCR-ALS melhores estimativas de concentração, do que as obtidas por análise directa e, exceptuando a amostra Ishta, estimativas de uma forma geral próximas às obtidas pelos modelos PARAFAC e PARAFAC2. Excepto também a formulação Ishta, são encontradas pelo modelo MCR-ALS, de uma forma geral, estimativas de recuperação de fortificação mais adequadas do que as encontradas pelos modelos PARAFAC e PARAFAC2.

Tabela 7.23 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas obtidas pelo modelo MCR-ALS.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Ve40ra	Isinj	Is40co	Isret	Ishta
C_{estimada} (ppm)	4.831 (0.833)	4.757 (0.177)	4.484 (0.413)	4.581 (0.379)	4.055 (0.184)
C_{esperada} (ppm)	4.977	4.978	4.979	4.932	4.982
Recuperação (%)	97.065	95.572	90.070	92.882	81.404
LD (3S_{y/x}/b)	1.527	0.327	0.786	0.714	0.368
Dosagem estimada (mg)	38.654	4.757	35.865	110.957	194.475
Dos. est., HPLC-UV (mg)	38.979	4.679	37.362	111.183	220.724
Erro de previsão	0.834	1.667	4.007	0.203	11.892
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	96.011	97.827	97.564	96.727	96.788
ssq_{resíduos}	2.943×10 ⁸	8.337×10 ⁷	1.211×10 ⁸	1.986×10 ⁸	1.813×10 ⁸
Iterações	19	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	11
LOF_{MCR vs. PCA}	3.188	0.889	0.413	2.456	2.371
Δ_{LOFMCR (PCA – Exp.)}	-0.801	-1.285	-2.023	-0.817	-0.840
R_{Excitação}	+0.717	+0.893	+0.837	+0.880	+0.907
R_{Emissão}	+0.753-+0.698	+0.749-+0.827	+0.699-+0.779	+0.960-+0.960	+0.916-+0.927
	+0.971-+0.976	+0.856-+0.884	+0.850-+0.884	+0.960-+0.960	+0.939-+0.953
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	23345.857 (2060.584)	26653.668 (510.978)	25670.193 (1257.247)	20554.846 (894.223)	25316.422 (641.540)
b	4832.797 (451.187)	5602.763 (111.884)	5724.537 (27.288)	4486.833 (195.800)	6242.572 (140.472)
S_{y/x}	2459.723	609.955	1500.778	1067.435	765.807
R	0.9914	0.9996	0.9977	0.9981	0.9995

b) amostras fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Ve40raFo	IsinjFo	Is40coFo	IsretFo	IshtaFo
C_{estimada} (ppm)	6.662 (0.829)	6.526 (0.191)	6.351 (0.489)	6.430 (0.601)	6.384 (0.380)
C_{esperada} (ppm)	6.877	6.878	6.879	6.833	6.882
Recuperação (%)	96.866	94.879	92.326	94.111	92.578
LD (3S_{y/x}/b)	1.268	0.295	0.769	0.939	1.484
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	97.179	96.351	95.946	96.193	97.330
ssq_{resíduos}	1.973×10 ⁸	3.515×10 ⁸	4.562×10 ⁸	3.481×10 ⁸	1.759×10 ⁸
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	27	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	2.003	0.175	0.125	2.143	1.672
Δ_{LOFMCR (PCA – Exp.)}	-0.818	-3.475	-3.929	-1.664	-0.998
R_{Excitação}	+0.896	+0.870	+0.895	+0.950	+0.909
R_{Emissão}	+0.884- +0.976	+0.927-+0.951	+0.951- +0.962	+0.981- +0.981	+0.816- +0.854
	+0.983- +0.986	+0.959-+0.970	+0.970- +0.948	+0.981- +0.981	+0.951- +0.966
Fortificação (C_{estimada amostra fortificada} – C_{estimada amostra não fortificada})					
C_{estimada} (ppm)	1.831	1.769	1.867	1.849	2.329
C_{esperada} (ppm)	1.900	1.900	1.900	1.900	1.900
Recuperação (%)	96.368	93.105	98.263	97.316	122.579
Δ = C_{estimada} – C_{esperada}	-0.069	-0.131	-0.033	-0.051	+0.429
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	28901.045 (1536.053)	38194.696 (482.463)	36950.053 (1248.946)	39834.103 (1624.920)	44082.053 (839.455)
b	4338.389 (337.114)	5852.887 (105.885)	5817.914 (274.103)	6194.826 (356.617)	5690.243 (184.233)
S_{y/x}	1833.595	575.919	1490.873	1939.675	1002.062
R	0.9940	0.9997	0.9978	0.9967	0.9990

* máx. – corresponde à indicação de que o número máximo de iterações definido no ajuste do modelo foi atingido. A dosagem é dada em massa de composto por comprimido exceto para Isinj em que a dosagem vem em massa de composto por 2 mL; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

7.4.2.4 – Avaliação global

Na Fig. 7.12 são apresentadas as representações gráficas das percentagens de ajuste do modelo obtidas com os modelos de análise multivariada na análise da matriz de metanol e do padrão de Verapamil 4.980 ppm em função do número de componentes.

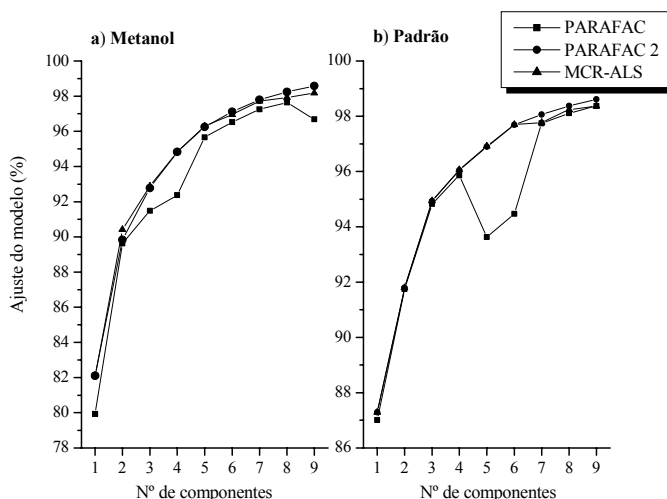


Fig. 7.12 – Gráfico dos valores de percentagem de ajuste dos modelos PARAFAC obtidos na análise da matriz [excitação × emissão × concentração], PARAFAC2 na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] e MCR-ALS na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão] do a) solvente metanol e b) padrão de Verapamil 4.891 ppm com não negatividade em todas as dimensões para os modelos PARAFAC e MCR-ALS e na primeira e terceira dimensões para o modelo PARAFAC2.

Da avaliação dos gráficos apresentados na Fig. 7.12 pode verificar-se que, na análise dos dois tipos de matriz, são obtidos para os modelos PARAFAC2 e MCR-ALS percentagens de ajuste do modelo de uma forma geral mais próximas e ligeiramente superiores às obtidas com o modelo PARAFAC.

Na análise da matriz de metanol e de padrão são obtidos resultados ligeiramente diferentes na comparação das percentagens de ajuste do modelo obtidas com os três modelos. Na análise da matriz de metanol são obtidos com o modelo PARAFAC2 ajustes do modelo ligeiramente superiores aos obtidos com o modelo MCR-ALS a partir de cinco componentes, enquanto que na análise da matriz de padrão isso só acontece a partir de sete componentes. Com a matriz de metanol verificam-se maiores diferenças de percentagens de ajuste do modelo PARAFAC, relativamente aos outros dois modelos, com quatro e cinco componentes enquanto que com a matriz de padrão isso acontece com cinco e seis componentes. Com o modelo PARAFAC, na análise da matriz de metanol, são obtidas

com todos os números de componentes percentagens de ajuste do modelo inferiores, enquanto que com a matriz de padrão, são obtidas percentagens próximas com os outros dois modelos para dois e três componentes e com o modelo MCR-ALS a partir de sete componentes.

Atendendo à avaliação com os dois tipos de amostras, e apesar da estrutura trilinear dos dados, algum desvio a trilinearidade é esperado e os modelos mais adequados parecem ser os dois modelos que não assumem a estrutura trilinear dos dados. No entanto para determinados números de componentes o modelo PARAFAC parece também ser adequado.

Na Fig. 7.13 são apresentadas as representações gráficas dos coeficientes de correlação linear das estimativas do componente principal na dimensão do espectro de excitação, de emissão e concentração obtidos com os três modelos na análise de cada uma das amostras não fortificadas e os verificados experimentalmente. Para representação gráfica, se mais que um espectro de excitação ou emissão é estimado, com o modelo MCR-ALS é considerado o primeiro espectro estimado e com o modelo PARAFAC2 o espectro estimado ao c.d.o. respectivamente de emissão ou excitação de fluorescência máxima.

Como se pode verificar nos gráficos da Fig. 7.13, de uma forma geral, são obtidas melhores estimativas do componente principal nas três dimensões pelo modelo MCR-ALS. Tal facto é mais notório para as estimativas do espectro de excitação.

No que diz respeito às estimativas do espectro de excitação, só para as amostras Ve40ra e Is40co as estimativas obtidas com o modelo PARAFAC2 apresentam um coeficiente correlação superior ao obtido com o modelo MCR-ALS. Uma maior proximidade no coeficiente de correlação linear obtido é encontrada para a amostra Isinj com os três modelos, para a amostra Ve40ra com os modelos PARAFAC e MCR-ALS e para a amostra Isret com os modelos PARAFAC e PARAFAC2. A maior diferença nos coeficientes de correlação linear é encontrada para amostra Ishta, o coeficiente maior é obtido com o modelo MCR-ALS e o coeficiente menor, negativo, é obtido com o modelo PARAFAC2. Assim mesmo, e de uma forma geral, relativamente às estimativas obtidas com o modelo PARAFAC, são encontradas melhores estimativas pelo modelo PARAFAC2.

No que diz respeito às estimativas do espectro de emissão, as estimativas obtidas com o modelo PARAFAC apresentam de uma forma geral coeficientes de correlação superiores e mais próximas aos coeficientes de correlação obtidos com o modelo MCR-ALS. Coeficientes de correlação linear de uma forma geral mais baixos são encontrados com o modelo PARAFAC2. Só para duas das amostras são obtidos coeficientes correlação linear superiores com outros modelos que não o modelo PARAFAC. Para a amostra Is40co é obtido um coeficiente correlação linear superior com o modelo MCR-ALS e para amostra Isret com o modelo PARAFAC2. Uma maior proximidade nos coeficientes de correlação linear obtidos com os três modelos é encontrada para as amostras Isret e Ishta e, com os modelos PARAFAC e MCR-ALS para a amostra Is40co. A maior diferença nos coeficientes de correlação linear obtidos é encontrada para amostra Ve40ra com o maior coeficiente obtido com o modelo PARAFAC e o menor coeficiente, negativo, obtido com o modelo PARAFAC2.

De uma forma geral, são obtidos coeficientes de correlação linear de ajuste linear na dimensão de concentração, mais altos com o modelo PARAFAC2 mas também mais próximos aos obtidos com o modelo MCR-ALS. De uma forma geral, são também obtidos coeficientes de correlação linear de ajuste linear na dimensão de concentração próximos com os três modelos. A maior diferença verifica-se para a amostra Is40co, em que se encontra um baixo coeficiente de correlação linear com o modelo PARAFAC. Além desta amostra, as maiores diferenças nos coeficientes de correlação linear encontrados, verificam-se para a amostra Isinj, entre os três modelos e, para a amostra Ve40ra entre os modelos PARAFAC e PARAFAC2 e o modelo MCR-ALS.

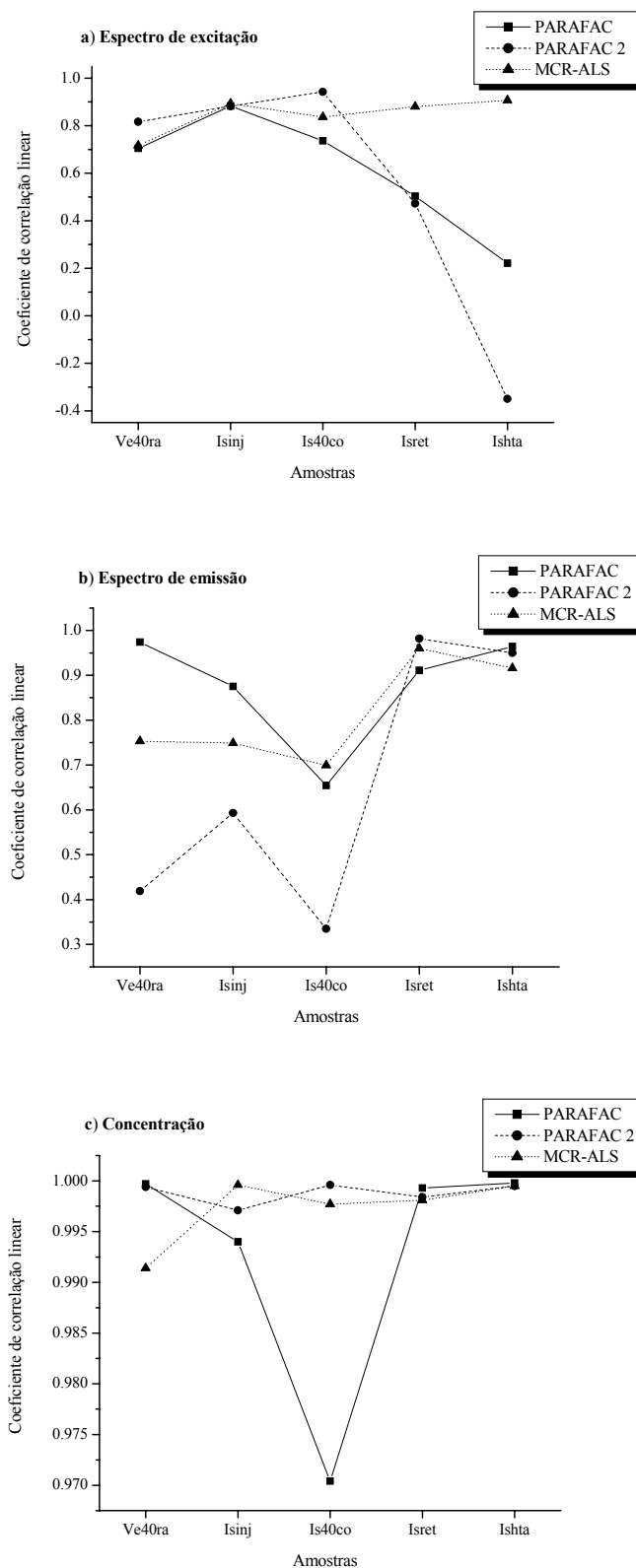


Fig. 7.13 – Comparação dos coeficientes de correlação linear do componente principal entre os espectros de excitação a), espectros de emissão b) e concentração c) estimados na análise das amostras não fortificadas pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS e os obtidos experimentalmente.

Na Fig. 7.14 são apresentadas as representações gráficas das recuperações e dos erros de previsão obtidos na análise das amostras não fortificadas com os três modelos. As recuperações e erros de previsão obtidos por análise directa são também representados.

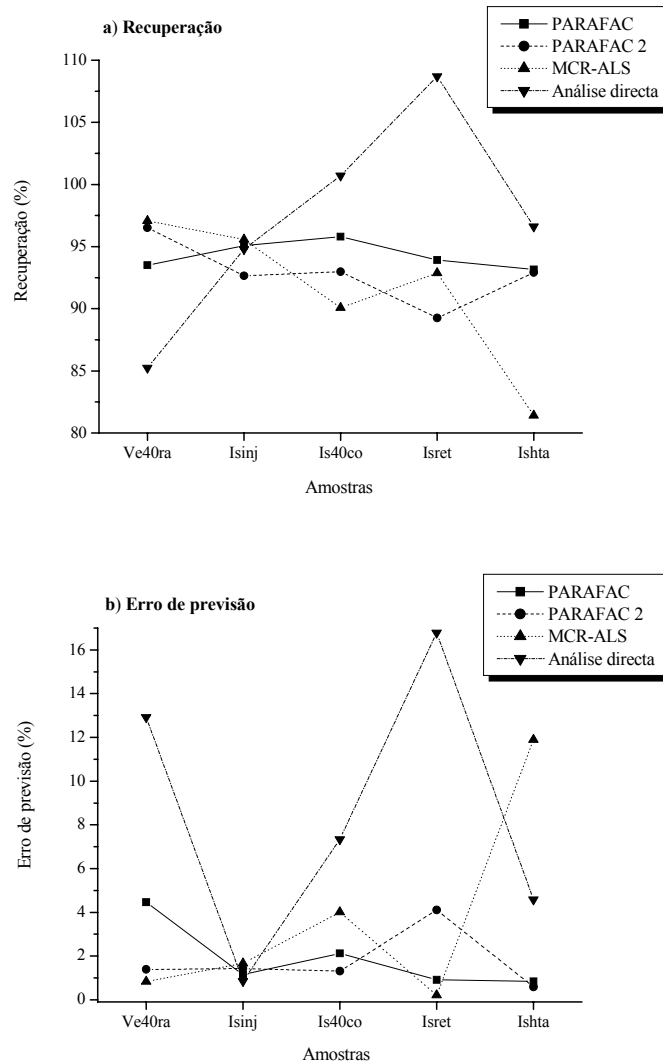


Fig. 7.14 – Comparação da recuperação a) e erros de previsão b) obtidos com cada amostra não fortificada por análise directa e pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS.

Como se pode ver na Fig. 7.14, são encontrados por análise directa recuperações e erros de previsão mais altos. De uma forma geral com os três modelos são encontradas para todas as amostras recuperações próximas. De entre os três modelos é com o modelo PARAFAC que para a maioria das amostras são obtidas recuperações mais elevadas. Erros de previsão de uma forma geral menores são encontrados para a maioria das amostras para o modelo PARAFAC2. Com o modelo PARAFAC são encontrados os erros de previsão mais próximos aos obtidos com o modelo PARAFAC2. Os erros de previsão mais baixos

são encontrados com o modelo PARAFAC2 para as amostras Is40co e Ishta, com o modelo MCR-ALS para as amostras Ve40ra e Isret e por análise directa para a amostra Isinj. Note-se que é para a amostra Isinj que são obtidos por análise directa e pelos três modelos os erros de previsão mais próximos.

Na Tabela 7.24, são apresentados os valores de EPT, RMSEP, EPM e LDM obtidos com o conjunto das amostras não fortificadas analisadas por análise directa e pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS. Para os modelos de análise multivariada, é também apresentado o valor de AjMM.

Tabela 7.24 – Valores de EPM, EPT, RMSEP, LDM e AjMM obtidos com todas as amostras não fortificadas.

Modelo	Parâmetros avaliados				
	EPT (%)	RMSEP	EPM (%)	LDM (ppm)	AjMM (%)
Análise directa	8.690	9.833	8.497	0.503	----
PARAFAC	1.113	1.259	1.897	0.626	97.217
PARAFAC2	1.899	2.144	1.763	0.653	99.339
MCR-ALS	10.393	11.759	3.721	0.744	96.983

São encontrados pelos modelos PARAFAC e PARAFAC2 valores de EPT, RMSEP e EPM bastante inferiores aos obtidos por análise directa e pelo modelo MCR-ALS. Note-se no entanto que, com o modelo MCR-ALS, e como já referido anteriormente, ao não ser considerada a amostra com o erro de previsão mais alto, são encontrados valores mais próximos aos obtidos com os outros dois modelos. Relativamente ao modelo PARAFAC2 são encontrados pelo modelo PARAFAC valores menores de EPT e de RMSEP e um valor ligeiramente superior de EPM. De entre os três modelos o maior valor de AjMM é encontrado com o modelo PARAFAC2 e o menor valor de LDM é encontrado com o modelo MCR-ALS.

Atendendo a todos os critérios avaliados as estimativas concentração mais adequadas são obtidas com o modelo PARAFAC. Estimativas de concentração de uma forma geral adequadas são também obtidas com o modelo PARAFAC2 apesar com este modelo serem obtidas piores estimativas de espectro de excitação e emissão. É no entanto de realçar que é com o modelo MCR-ALS que de uma forma geral são obtidas as melhores estimativas nas três dimensões.

7.5. Referências

- [1] – Chang, Z. L., Verapamil, in *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, Vol. 17*. Academic Press, New York, 1988, pp. 646 – 674.
- [2] – McAllister, R. G. e Howell, S. M., Fluorometric assay of Verapamil in biological fluids and tissues. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **65** (1976) 431 – 432.



8. REACÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS COM ANIDRIDO ACÉTICO

8.1. Fundamento

Quimicamente o Diltiazem é uma benzotiazepina, ver Fig. 1.6 do capítulo 1, e o Verapamil, ver Fig. 1.8 do capítulo 1, é uma difenilalquilamina e ambas as moléculas contêm uma amina terciária nas suas moléculas [1,2].

Os ácidos orgânicos em solução de anidrido acético dão origem a produtos corados na presença de compostos que contêm um grupo de uma amina terciária [3,4]. A formação destes compostos corados envolve a condensação dos ácidos orgânicos com o anidrido acético catalizada pelo carácter básico do grupo amina terciária. Esta reacção de condensação, além da identificação de compostos com um grupo amina terciária [3], permite também a sua quantificação por espectrofotometria de UV-Vis [4]. Os ácidos orgânicos normalmente utilizados nesta reacção são o ácido cítrico, ácido malónico e o ácido aconítico. Uma vez que os produtos corados apresentam também fluorescência esta reacção poderá também permitir a quantificação deste tipo de compostos por espectrofluorimetria.

A reacção de condensação de ácidos orgânicos com anidrido acético é também utilizada na quantificação de fármacos contendo um grupo de amina terciária. O ácido cítrico foi utilizado para a quantificação espectrofotométrica de UV-Vis da reserpina [5] e de anti histamínicos H₁ [6] e o ácido malónico foi utilizado para a quantificação de alcalóides por espectrofotometria de UV-Vis [7] e por espectrofluorimetria [8].

Para o Verapamil, é descrito um método de determinação espectrofotométrica de UV-Vis baseado na reacção de condensação do ácido cítrico com o anidrido acético [9]. A reacção de condensação, é levada a cabo em banho de água a temperatura de 40 °C durante 40 min, após dissolução do Verapamil em clorofórmio e evaporação a secura da solvente.

O Diltiazem não apresenta fluorescência e o Verapamil é fluorescente. A possibilidade de quantificação espectrofluorimétrica do Diltiazem e da quantificação espectrofluorimétrica do Verapamil a c.d.o. de excitação e emissão mais altos, na presença de possíveis interferentes através da obtenção de estruturas de dados tridimensionais e utilização de métodos de decomposição tridimensional levou a considerar a possibilidade de quantificação do Diltiazem e do Verapamil através desta reacção.

8.2. Procedimento experimental

O registo de cada uma das matrizes obtidas por reacção do ácido cítrico e malónico foi feito em condições diferentes. Na fase de quantificação, as medições de fluorescência molecular foram feitas, com o ácido cítrico com fendas de excitação e emissão 0.25 mm e com um tempo de integração 1 s e, com o ácido malónico com fendas de 0.1 mm e com um tempo de integração de 0.4 s. Na fase de optimização, de forma a uma avaliação prévia das condições de reacção, foram também efectuadas medições com fendas e tempos de integração diferentes, assim como registos de avaliação com o tempo em modo cromatográfico.

Para evitar possíveis interferências, devido a contaminação do vidro, todo o material de vidro utilizado foi deixado durante a noite em ácido nítrico diluído e passado por acetona previamente a sua secagem.

As soluções padrão de Diltiazem e Verapamil foram preparadas por pesagem rigorosa dos respectivos padrões para uma concentração final de 1000 ppm após secagem dos compostos em forno a 105 °C durante 2 horas. Na fase de optimização as soluções padrão foram preparadas em etanol, metanol e água. Na fase de quantificação o solvente utilizado foi o etanol.

De acordo com a dosagem dos dois compostos nas diferentes formas farmacêuticas, as soluções amostras foram preparadas para uma concentração final de 1000 ppm em etanol, por pesagem rigorosa do pó, a partir de uma mistura de 20 comprimidos ou cápsulas, correspondente a um comprimido. No caso da forma farmacêutica injectável Isinj, o volume de solução de uma ampola foi adicionado para um volume total de solução de forma a ser obtida a concentração pretendida. Excepto para a amostra Isinj as soluções amostra assim preparadas foram posteriormente decantadas e centrifugadas a 13000 rpm durante 10 min.

A diluição das diferentes soluções padrão e amostra a 1000 ppm para uma concentração intermédia de 10 ppm foram efectuadas de forma a obtenção do derivado de condensação fluorescente. Assim, para um volume final de 10 mL, a diluição foi efectuada por evaporação a secura do volume adequado de cada uma das soluções mais concentradas, posterior adição de 2 mL do reagente de ácido orgânico a 0.5 %, promoção da reacção e posterior ajuste a 10 mL com etanol. Diluições posteriores nas concentrações avaliadas,

para a quantificação pelo método de adição de padrão, foram feitas com etanol em quatro balões de diluição para um volume final de 5 mL.

Os reagentes dos ácidos orgânicos em anidrido acético foram preparados diariamente. O reagente de ácido cítrico em anidrido acético foi preparado por adição inicial de um volume adequado de metanol de forma à total dissolução do ácido cítrico e ajuste posterior do volume total de solução com anidrido acético. O reagente de ácido malónico foi preparado por dissolução simples do ácido em anidrido acético. As concentrações de ácidos orgânicos em anidrido acético utilizadas na fase de otimização foram de 0.25 a 2% e na fase de quantificação de 0.5 %.

As condições de reação utilizadas foram temperatura de reação de 100 °C e tempo de reação de 5 min. Os tempos de espera utilizados na fase de quantificação foram, no arrefecimento de 5 min e, de desde antes do ajuste do volume a 10 mL na diluição da concentração de 10 ppm até ao início da diluição para a concentração estimada da amostra e das adições de padrão, de 4 min para os dois ácidos orgânicos na determinação com o Verapamil, de 2 min e 30 s com o ácido cítrico e de 11 min com o ácido malónico na determinação do Diltiazem. Atendendo a estabilidade do derivado fluorescente, a diluição da amostra e das adições de padrão na gama linear de determinação assim como a determinação espectrofluorimétrica foram feitas de forma rápida.

8.3. Optimização

Na fase de optimização pretendeu-se verificar quais as condições mais adequadas de reacção no que respeita à sensibilidade, velocidade e capacidade de estimativa da concentração com o objectivo de se desenvolver uma metodologia analítica robusta que permitisse a obtenção de matrizes de excitação-emissão e a possibilidade de avaliação pelos métodos de decomposição tridimensional.

A temperatura de reacção, o solvente, o tempo de reacção, o tempo total de análise, a concentração dos ácidos orgânicos em anidrido acético e a estabilidade do produto fluorescente obtido foram avaliadas para os dois ácidos orgânicos e para os dois compostos a quantificar. A avaliação destas condições foi efectuada verificando a intensidade de fluorescência ao c.d.o. de excitação e emissão máximos, a gama linear obtida, o limite de detecção e a estimativa de concentração de uma solução padrão. De uma forma geral procurou-se a obtenção de uma concentração estimada próxima da esperada, com intensidade de fluorescência mais elevada e aos c.d.o. de excitação e emissão maiores obtidos com um tempo de reacção menor.

Tendo em atenção as características de reacção, com uma variação de intensidade de fluorescência obtida apreciável por alteração das condições de reacção, não foi possível a utilização de técnicas de planeamento experimental. Assim a metodologia seguida na fase de optimização foi uma metodologia univariada de forma que cada um dos factores avaliados fosse avaliado ao mesmo tempo em condições idênticas de reacção.

8.3.1. Resultados

Avaliação prévia

Das avaliações iniciais verificou-se que, o branco também apresentava fluorescência resultante da condensação do ácido orgânico e do anidrido acético. No entanto, para todas as avaliações conjuntas de um branco e de um padrão de Diltiazem ou Verapamil, verificou-se que a intensidade de fluorescência obtida na presença do padrão foi sempre superior à obtida na sua ausência.

Atendendo à maior facilidade na execução técnica e à não necessidade de correção de volume de solvente adicionado, de forma a manter as mesmas condições de reação, optou-se por um método em que previamente à obtenção do derivado fluorescente o solvente fosse evaporado. Estudos iniciais demonstraram também que, nas mesmas condições de reação, foram obtidas para os padrões intensidades de fluorescência maiores, assim como maiores diferenças para a intensidade de fluorescência obtida com o branco, com evaporação prévia do solvente.

Avaliação da temperatura de reação

Avaliações em etanol nas mesmas condições de reação a temperaturas de reação de 70 °C e de 100 °C demonstraram que a 70 °C eram obtidos tempos para a obtenção de intensidade de fluorescência máxima demasiado longos. Na Fig. 8.1 são apresentados os resultados obtidos com os dois compostos a uma concentração de 10 ppm com o reagente de ácido cítrico em anidrido acético. Resultados idênticos foram obtidos para a reação de condensação do ácido malónico com o anidrido acético.

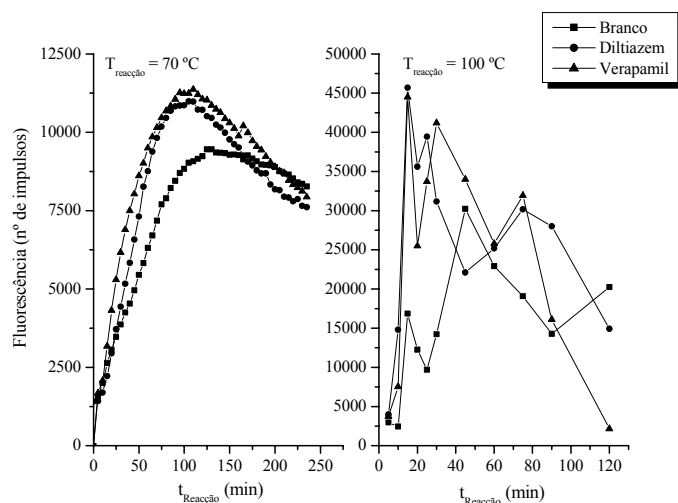


Fig. 8.1 – Variação de intensidade de fluorescência com o tempo de reação obtida a temperaturas de 70 °C e 100 °C por reação de condensação de ácido cítrico com o anidrido acético.

É de notar que a variação da intensidade de fluorescência com o tempo de reação às duas temperaturas foram obtidas em condições diferentes. A variação a 70 °C foi obtida em cubete de quartzo para um volume total de 3 mL por avaliação no fluorímetro em modo cromatográfico com tempo de registo de 260 min, tempo de ciclo de 5 min e tempo de

integração de 1 s. A variação a 100 °C foi obtida em balões de diluição para um volume total de 5 mL, em banho de água e por avaliação no fluorímetro com um tempo de integração de 3 s. Atendendo à diferença de tempos de integração utilizados, uma intensidade de fluorescência aproximadamente igual foi obtida para as duas temperaturas de reacção. Além do tempo para a obtenção de intensidade de fluorescência máxima obtido a temperatura de 70 °C ser demasiado longo, cerca de 100 min, verificou-se para os dois compostos que um tempo no máximo de 15 min era o tempo adequado para a obtenção de intensidade de fluorescência máxima a uma temperatura de reacção de 100 °C.

Avaliação de solvente e tempo de reacção

Tempos de reacção até 15 min foram avaliados com o ácido cítrico e com o ácido malónico em anidrido acético em etanol, metanol e água. Desta avaliação verificou-se que em água o produto obtido é de difícil dissolução e só após agitação vigorosa foi obtida uma solução homogénea. De qualquer forma, para a água foram obtidas intensidades de fluorescência mais baixas com tempos de reacção próximos. Na Tabela 8.1 são apresentados os resultados obtidos de intensidade de fluorescência máxima a temperatura de 100 °C com tempos de reacção de 1 min até 15 min. Entre parêntesis é apresentada a diferença da intensidade de fluorescência obtida com o padrão para a intensidade de fluorescência obtida com o branco.

Tabela 8.1 – Intensidade de fluorescência obtida por reacção de condensação do ácido cítrico e ácido malónico com anidrido acético em etanol e metanol na presença de Diltiazem e Verapamil a temperatura de 100 °C e a tempos de reacção desde 1 min até 15 min.

$t_{\text{reacção}}$ (min)	Intensidade de fluorescência (tempos de reacção curtos)							
	Diltiazem				Verapamil			
	Ác. Cítrico		Ác. Malónico		Ác. Cítrico		Ác. Malónico	
	Etanol	Metanol	Etanol	Metanol	Etanol	Metanol	Etanol	Metanol
1	2181	14935	33383	37471	7382	18593	37671	34416
	(+320)	(+13100)	(+27000)	(+31100)	(+5400)	(+4100)	(+31000)	(+28000)
2.5	7127	26558	60470	74863	7107	19329	65647	20340
	(+4800)	(+23000)	(+41000)	(+59000)	(+ 6800)	(+15329)	(+47000)	(+4000)
5	42873	53349	91024	99918	56982	54910	95650	18036
	(+34000)	(+49500)	(+52000)	(+58000)	(+ 47900)	(+51400)	(+57000)	(-23000)
7.5	54671	39097	85470	96256	57775	28732	95631	13793
	(+24700)	(+34700)	(+38000)	(+36000)	(+ 27000)	(+24450)	(+21000)	(-46000)
10	42198	28523	23318	89918	43295	15078	81216	10987
	(+18000)	(+7500)	(-42000)	(+25000)	(+18500)	(-6000)	(-16000)	(-54000)
15	35785	23294	92272	77760	34247	10048	77981	7690
	(+6000)	(-1000)	(+16000)	(+5000)	(+4000)	(-14000)	(+2000)	(-65000)

Para a reacção de condensação do ácido cítrico com o anidrido acético verificou-se que são obtidas intensidades de fluorescência ligeiramente mais altas com o etanol. Verificou-se ainda uma diferença para o branco igual com os dois solventes na presença do Verapamil enquanto na presença do Diltiazem é obtida uma maior diferença com o metanol. Para a reacção de condensação do ácido malónico com o anidrido acético verificou-se que é obtida uma intensidade de fluorescência mais alta com o metanol na presença do Diltiazem e com o etanol na presença do Verapamil. Foi obtida uma diferença para o branco igual com os dois solventes na presença do Diltiazem e uma maior diferença com o etanol na presença do Verapamil.

O etanol apresenta de uma forma geral tempos de reacção idênticos aos obtidos com o metanol. Excepto para a reacção de condensação do ácido malónico com o anidrido acético em metanol na presença do Verapamil, em que é obtido um tempo de reacção de 1 min, para a maioria das avaliações um tempo de reacção próximo dos 5 min parece ser o tempo de reacção mais indicado. De uma forma geral verificou-se também que um decréscimo mais rápido da intensidade de fluorescência máxima, após atingir esse máximo, é obtido com o metanol. Tal facto, leva que a tempos de reacção maiores o branco apresente uma intensidade de fluorescência superior. Atendendo à sua menor toxicidade ambiental o solvente escolhido foi o etanol.

Avaliação da concentração de ácido orgânico

Da avaliação da concentração de ácido orgânico mais adequada para a quantificação do Diltiazem e do Verapamil constatou-se que uma quantidade de ácido orgânico cem vezes superior à quantidade de qualquer dos dois compostos era a quantidade adequada para a obtenção de uma maior intensidade de fluorescência. Assim para uma quantidade de composto presente após evaporação do solvente de 0.0001 g teria que se ter 0.01 g de ácido orgânico o que correspondia a adição de 1 mL de ácido cítrico 1 %. Estudos com adição da mesma quantidade de ácido orgânico, mas com adições de volumes adequados dos reagentes de ácidos orgânicos a concentrações de 0.25, 0.5, 1 e 2 %, vieram demonstrar que a adição de 2 mL de reagente de ácido orgânico a 0.5 % era a que permitia obter estimativas mais robustas atendendo ao maior volume de reagente em contacto com o Diltiazem e o Verapamil.

Avaliação da gama linear

A avaliação da gama linear de trabalho do Diltiazem e Verapamil, por reacção de condensação do ácido cítrico e malónico com o anidrido acético, foi efectuada por diluição do padrão de 10 ppm, após obtenção do derivado fluorescente, para uma de gama de concentrações entre 0.001 e 10 ppm. O tempo de integração utilizado em cada uma das avaliações foi aquele que para a concentração de 10 ppm se obteria uma intensidade de fluorescência próxima do número de impulsos máximo (65000). Na Fig. 8.2 são apresentados para comparação os gráficos obtidos com os dois compostos com cada um dos ácidos orgânicos.

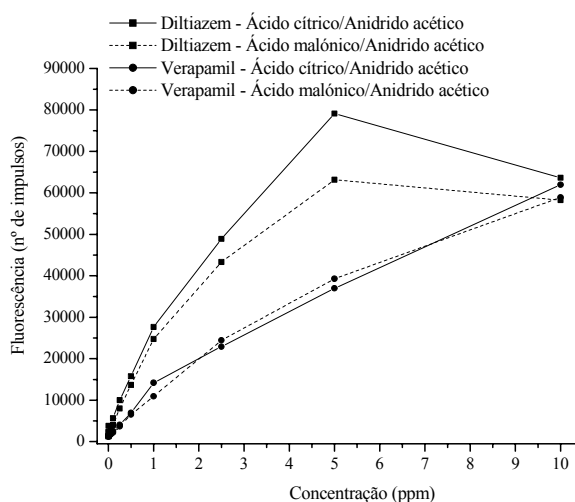


Fig. 8.2 – Avaliação da gama linear do padrão de Diltiazem e Verapamil no máximo de intensidade de fluorescência obtida por reacção do ácido cítrico e malónico com anidrido acético.

No gráfico da Fig. 8.2 pode verificar-se que nas condições avaliadas o limite superior da gama linear para o Diltiazem e Verapamil com os dois ácidos orgânicos avaliados é de 1 ppm. Verificou-se também que uma sensibilidade maior na determinação é obtida para o Diltiazem. Da avaliação da gama linear com variação do limite superior da gama linear, excepto para o Diltiazem com o ácido malónico em anidrido acético em que foi encontrado um melhor ajuste com um limite superior de 2.5 ppm, para as outras três avaliações confirma-se o limite superior de 1 ppm. Também, excepto para a avaliação com o Diltiazem com o ácido cítrico em anidrido acético, em que é obtido um limite inferior de

0.01 ppm, nas outras três avaliações são obtidos experimentalmente limites inferiores de gama linear de 0.001 ppm.

Na Tabela 8.2 são apresentados os valores dos parâmetros de regressão linear encontrados pelo método dos mínimos quadrados das curvas de calibração padrão obtidas para o Diltiazem e Verapamil com os dois ácidos orgânicos na gama de concentrações de 0.01 a 1 ppm.

Da avaliação dos parâmetros obtidos na gama linear de 0.01 a 1 ppm para todos os gráficos de calibração verifica-se que são obtidos ajustes com coeficiente de correlação linear de ordem de grandeza superior a 0.998 e limites de detecção acima de 0.01 ppm. Outro facto relevante é que são obtidos para o Verapamil com os dois ácidos orgânicos ordenadas na origem de valor inferior.

Tabela 8.2 – Regressões lineares obtidas na gama de concentrações indicadas do padrão de Diltiazem e Verapamil ao máximo de intensidade de fluorescência por reacção do ácido cítrico e malónico com o anidrido acético.*

Parâmetros avaliados	Calibração ($y = bx + a$, $m = 6$ e Gama - 0.01 a 1 ppm)			
	Diltiazem		Verapamil	
	Ácido Cítrico	Ácido Malónico	Ácido Cítrico	Ácido Malónico
a	3297.928 (678.595)	1788.428 (672.338)	606.301 (1072.036)	910.008 (341.129)
b	56766.300 (1443.982)	62444.885 (1430.667)	62040.364 (2281.187)	63156.152 (725.889)
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.065	0.058	0.093	0.029
$S_{y/x}$	1222.775	1211.500	1931.727	614.688
R	0.9987	0.9990	0.9973	0.9997

* Ver rodapé da Tabela 3.1.

Assim uma gama linear de 0.01 até 1 ppm é considerada a gama linear adequada para a quantificação do Verapamil e Diltiazem através da reacção de condensação do ácido cítrico ou malónico com o anidrido acético.

Avaliação da estabilidade do derivado fluorescente

A estabilidade do derivado fluorescente obtido com os dois compostos com o ácido cítrico e ácido malónico, foi avaliada, após a obtenção do derivado fluorescente, na concentração intermédia de 10 ppm e na concentração de quantificação de 0.3 ppm. Esta avaliação foi efectuada no fluorímetro em modo cromatográfico com tempo de registo de 20 min, tempo de ciclo de 30 s e com fendas e tempo de integração diferentes.

Esta avaliação, para as duas concentrações foi feita após um tempo de espera no arrefecimento de 5 min. Tempo considerado adequado para o arrefecimento prévio à diluição com etanol. Foi efectuada para a concentração de 10 ppm a seguir ao acerto de volume e para a concentração de 0.3 ppm após um período de espera de 2 min, depois da diluição a 10 ppm, para estabilização do derivado fluorescente.

Na Fig. 8.3 são apresentados os resultados obtidos com esta avaliação. Verifica-se que a uma concentração de 0.3 ppm o derivado fluorescente apresenta um aumento progressivo da intensidade de fluorescência até aos 20 min. Tal facto, leva a considerar uma quantificação feita de forma rápida após diluição para as concentrações na gama linear avaliada. Na concentração de 10 ppm o derivado fluorescente apresenta ao longo do tempo uma diminuição de fluorescência com o ácido cítrico e um aumento de fluorescência com o ácido malónico.

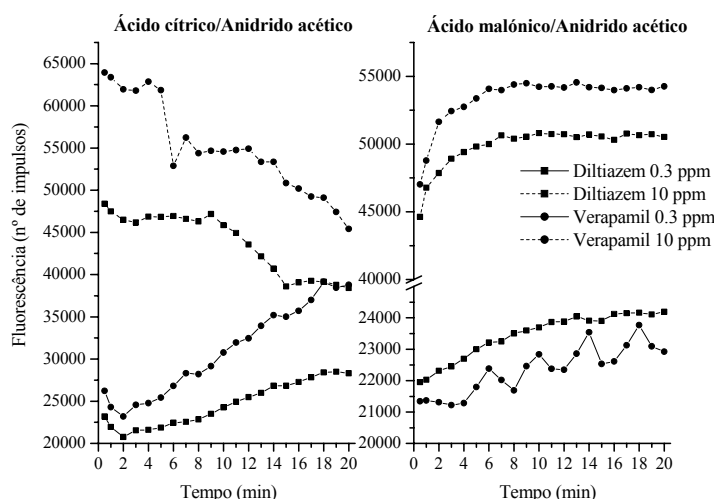


Fig. 8.3 – Avaliação da estabilidade do derivado fluorescente da reacção de condensação com o ácido cítrico e malónico em anidrido acético obtidos com o padrão de Diltiazem e Verapamil na concentração de 0.3 e 10 ppm.

Para os dois compostos com os dois ácidos orgânicos é no entanto possível definir zonas de estabilidade do derivado fluorescente. Com o ácido malónico, quer para o Diltiazem quer para o Verapamil verifica-se de início um aumento da intensidade de fluorescência até aos 6 min com manutenção da intensidade de fluorescência até aos 20 min. Com o ácido cítrico verifica-se um decréscimo de intensidade de fluorescência com zonas de estabilidade a tempos diferentes para os dois compostos. Para o Diltiazem uma zona de estabilidade dos 0 aos 9 min e dos 15 aos 20 min e para o Verapamil dos 0 aos 5

min e dos 6 aos 12 min. Como se pode ver pelos gráficos da Fig. 8.3, as segundas zonas de estabilidade estão situadas a intensidades de fluorescência menores. Estas zonas de estabilidades bem definidas definem tempos de espera após diluição a 10 ppm onde será mais adequado a diluição da amostra e do padrão nas concentrações adequadas dentro da gama linear para quantificação.

Avaliação do tempo total de análise

Na avaliação do tempo total de análise, além do tempo de exposição à temperatura de 100 °C e tempo de espera no arrefecimento, foi também necessário avaliar tempos de espera prévios à análise. Estes tempos de espera têm muito a ver com a estabilidade do derivado fluorescente obtidos aos níveis de concentração previamente avaliados mas também com a capacidade de uma estimativa adequada de concentração no tempo requerido de análise.

A um tempo de reacção e de espera no arrefecimento de 5 min foram encontradas estimativas de concentração próximas à concentração esperada, com diferentes tempos de espera de desde antes da diluição a 10 ppm até ao início da diluição de amostras e das adições de padrão na gama linear avaliada. Para o Verapamil de 4 min com os dois ácidos orgânicos e para o Diltiazem de 2 min e 30 s com o ácido cítrico e de 11 min com o ácido malónico.

Verificou-se ainda nas condições a seguir indicadas a função linear e o limite de detecção obtidos. As condições de reacção definidas para a quantificação foram:

- Etanol como solvente.
- Evaporação à secura do solvente da solução amostra e padrão prévio a obtenção do derivado fluorescente.
- Volume de 2 mL do reagente de ácido orgânico 0.5 %.
- Temperatura de reacção de 100 °C.
- Tempo de reacção de 5 min.
- Tempo de espera no arrefecimento de 5 min.
- Tempo de espera de desde antes da diluição a 10 mL até a diluição a 0.3 ppm.
 - Diltiazem com ácido cítrico – 2 min e 30 s.
 - Diltiazem com ácido malónico – 11 min.

— Verapamil com ácido cítrico – 4 min.

— Verapamil com ácido malónico – 4 min.

— Determinação de forma rápida de amostra e adições de padrão.

O método analítico baseado na detecção espectrofluorimétrica do Diltiazem e do Verapamil, pela catálise básica dos seus grupos contendo uma amina terciária da reacção de condensação dos dois ácidos orgânicos avaliados com o anidrido acético foi, nas condições avaliadas, desenvolvido de forma a permitir a quantificação adequada do Diltiazem e do Verapamil.

8.4. Quantificação

Na quantificação, o método de calibração de adição de padrão foi efectuado, em diferentes balões de diluição de 5 mL, por adição da solução padrão de Diltiazem ou Verapamil 10 ppm a um volume adequado do branco, da solução padrão ou das soluções amostra com uma concentração estimada de 10 ppm. A determinação de solução padrão e das soluções amostra foi feita para uma concentração estimada de 0.3 ppm. A fortificação avaliada foi de 0.1 ppm. As soluções padrão obtidas encontravam-se numa gama de 0.1-0.5 ppm.

A comparação das funções lineares obtidas com a solução padrão e com as soluções amostra foi efectuada na gama de 0.05 a 1 ppm.

Análise de registos

Na Fig. 8.4 são apresentadas as matrizes de um padrão a) Diltiazem e de b) Verapamil 0.3 ppm obtidas por reacção de ácido cítrico ou ácido malónico com anidrido acético.

Da análise das matrizes de fluorescência obtidas com os padrões de Diltiazem e Verapamil por reacção do ácido cítrico com o anidrido acético verificou-se que o produto fluorescente obtido para os dois compostos apresenta c.d.o. de excitação máximo igual de 379.82 nm e c.d.o. de emissão máximos próximos. É encontrado para o Diltiazem um c.d.o. de emissão de 481.05 nm e para o Verapamil de 475.85 nm. A dispersão de primeira ordem é próxima da banda de fluorescência principal com interferência na banda de fluorescência do composto principal.

Da análise das matrizes de fluorescência obtidas com os padrões de Diltiazem e Verapamil por reacção do ácido malónico com o anidrido acético verificou-se que o produto fluorescente obtido apresenta c.d.o. de excitação e de emissão máximos diferentes para os dois compostos. O Diltiazem apresenta um c.d.o. de excitação de 374.25 nm e de emissão de 434.26 nm e o Verapamil apresenta um c.d.o. de excitação de 413.24 nm e de emissão de 470.65 nm. Aqui, tal como com o ácido cítrico em anidrido acético, a dispersão de primeira ordem é próxima da banda de fluorescência principal e tem interferência na banda de fluorescência do composto principal.

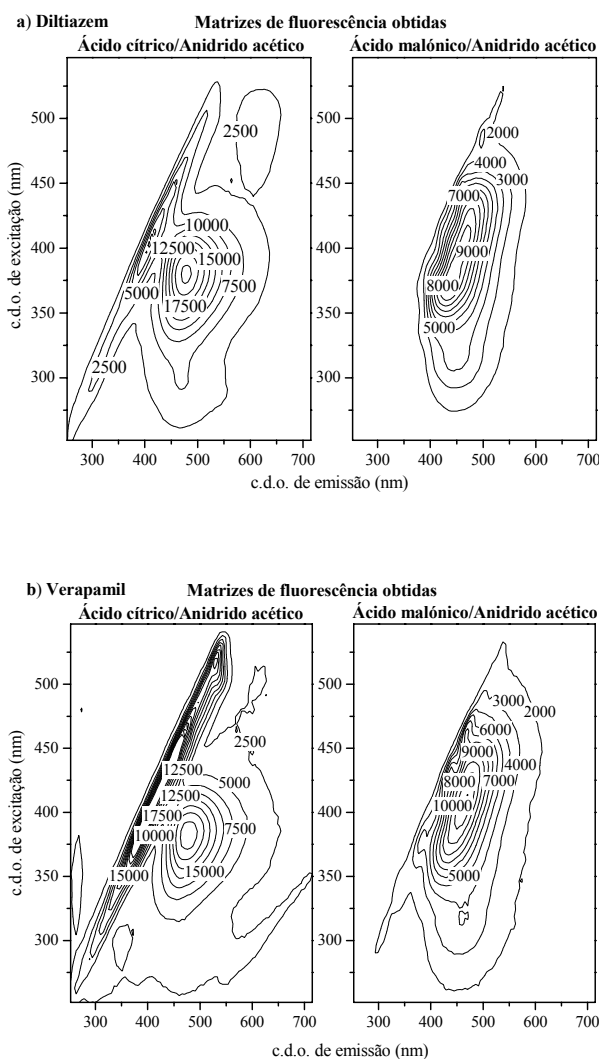


Fig. 8.4 – Matrizes de fluorescência do padrão de a) Diltiazem e de b) Verapamil 0.3 ppm obtidas por reacção de ácido cítrico ou ácido malónico com anidrido acético.

A escolha de intensidade de fluorescência máxima utilizada na determinação por análise directa foi feita para cada um dos registos obtidos tendo em atenção a intensidade máxima de fluorescência ao c.d.o. de excitação e emissão desse máximo de cada um dos registos.

Curvas de calibração padrão

Na Tabela 8.3 são apresentados os valores dos parâmetros de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados das curvas de calibração padrão obtidas com os padrões e com as amostras de Diltiazem e Verapamil. Para o padrão, são apresentados o valor dos parâmetros obtidos de uma regressão linear.

Tabela 8.3 – Comparação da curva de calibração padrão de um padrão e das amostras farmacêuticas obtidas no máximo de intensidade de fluorescência para o a) Diltiazem e para o b) Verapamil por reacção do ácido cítrico e ácido malónico com o anidrido acético.*

a) Diltiazem

Parâmetros avaliados	Calibração ($y = bx + a$, $m = 5$ e Gama - 0.05 a 1 ppm)				
	Padrão	Al60co	Df60co	Ba90re	Dt60co
Reacção do ácido cítrico com anidrido acético					
a	5975.436 (2966.618)	221.775 (2231.026)	151.223 (1372.974)	1545.306 (353.059)	728.561 (985.247)
b	65970.013 (5690.707)	89807.851 (4285.818)	55909.296 (2638.769)	10425.604 (677.254)	27989.101 (1890.865)
LD (3S_{y/x}/b)	0.199	0.110	0.109	0.150	0.156
s_{y/x}	4385.955	3297.710	2029.541	521.975	1456.298
R	0.9890	0.9966	0.9967	0.9937	0.9932
Reacção do ácido malónico com anidrido acético					
a	-1453.112 (1146.875)	-499.149 (1365.788)	-200.448 (1008.607)	1141.289 (503.928)	-4302.461 (3923.500)
b	63102.955 (2199.989)	69157.844 (2623.689)	71148.233 (1938.478)	20070.497 (966.659)	62243.902 (7529.902)
LD (3S_{y/x}/b)	0.081	0.088	0.063	0.111	0.280
s_{y/x}	1695.581	2018.790	1490.931	745.026	5799.343
R	0.9982	0.9978	0.9989	0.9965	0.9787

a) Diltiazem (continuação)

Parâmetros avaliados	Calibração ($y = bx + a$, $m = 5$ e Gama - 0.05 a 1 ppm)				
	Dtap	Di60me	Di120me	He60co	He120sr
Reacção do ácido cítrico com anidrido acético					
a	151.623 (838.657)	4790.434 (1977.231)	1847.741 (1152.709)	483.267 (2639.828)	4510.476 (1681.394)
b	64481.941 (1612.504)	64571.838 (3797.688)	75381.195 (2215.976)	77862.898 (5070.865)	59932.519 (3227.829)
LD (3S_{y/x}/b)	0.058	0.136	0.068	0.150	0.124
s_{y/x}	1240.685	2921.768	1703.834	3901.973	2485.286
R	0.9991	0.9949	0.9987	0.9937	0.9957
Reacção do ácido malónico com anidrido acético					
a	673.331 (1515.950)	-760.530 (1012.661)	-1314.058 (1113.761)	1582.705 (1102.254)	444.920 (1787.908)
b	56839.715 (2914.750)	53652.101 (1946.101)	77210.554 (2141.102)	45873.514 (2116.936)	44010.173 (3432.307)
LD (3S_{y/x}/b)	0.118	0.084	0.064	0.107	0.180
s_{y/x}	2242.653	1496.826	1646.264	1629.110	2642.725
R	0.9961	0.9980	0.9988	0.9968	0.9910

(Continua)

Tabela 8.3 (Continuação)

b) Verapamil

Parâmetros avaliados	Calibração Padrão ($y = bx + a$, $m = 5$ e Gama - 0.05 a 1 ppm)					
	Padrão	Ve40ra	Isinj	Is40co	Isret	Ishta
Reacção do ácido cítrico com anidrido acético						
a	1183.601 (240.997)	1600.482 (199.922)	4223.604 (1277.754)	4949.332 (2176.312)	2482.131 (474.198)	5819.024 (1595.335)
b	64031.047 (462.272)	54768.536 (383.666)	129441.311 (4913.531)	55900.516 (4180.202)	63316.639 (911.345)	47243.673 (3065.836)
LD (3S_{y/x}/b)	0.017	0.016	0.044	0.173	0.033	0.150
s_{y/x}	356.315	295.760	1890.273	3217.683	700.913	2358.080
R	0.9999	0.9999	0.9978	0.9917	0.9997	0.9937
Reacção do ácido malónico com anidrido acético						
a	2.440 (684.725)	286.247 (749.868)	890.229 (1574.536)	113.794 (559.047)	-704.942 (819.595)	1527.162 (1128.237)
b	63025.027 (1313.417)	68165.544 (1435.597)	59781.208 (3027.395)	62184.954 (1073.803)	52841.254 (1575.151)	32694.639 (2168.189)
LD (3S_{y/x}/b)	0.048	0.049	0.117	0.040	0.069	0.153
s_{y/x}	1012.371	1110.118	2329.324	826.553	1211.444	1667.657
R	0.9993	0.9993	0.9962	0.9996	0.9987	0.9935

* Ver rodapé da Tabela 3.1.

Para a maioria das amostras são obtidos ajustes com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.990, próximos dos valores obtidos com o padrão. A única excepção, verifica-se para o Diltiazem, por reacção do ácido malónico com o anidrido acético, com a amostra Dt60co. De uma forma geral, são encontrados para o Verapamil, ajustes lineares com coeficientes de correlação superiores com os dois ácidos orgânicos.

São encontrados valores de ordenada na origem próximos de zero tanto para o padrão como para as amostras. De uma forma geral com o ácido cítrico, quer para o Diltiazem quer para o Verapamil, os valores de ordenada na origem são superiores a zero e em valor absoluto superiores aos obtidos com o ácido malónico. Com o ácido cítrico os maiores valores de ordenada na origem são obtidos para o Diltiazem com o padrão e com as amostras Di60me e He120sr e para o Verapamil com as amostras Isinj, Is40co e Ishta. Este facto pode configurar na determinação para o Diltiazem e para o Verapamil com o ácido cítrico um possível desvio sistemático positivo inerente ao próprio método.

Atendendo à já referida variabilidade da intensidade de fluorescência obtida devido a pequenas diferenças nas condições de reacção e ao facto da comparação dos declives ser feita com os valores de calibração padrão obtidos com um único padrão, o critério utilizado

para comparação do declive é mais alargado. Assim, uma diferença até $\pm 10\,000$ impulsos é considerada para que o declive de uma amostra seja considerado igual ao do padrão.

Para a maioria das amostras são encontrados valores de declive próximos ao valor obtido com o padrão. Valores de declive diferentes do valor obtido com o padrão são no entanto encontrados para algumas amostras. Com os dois ácidos orgânicos, para o Diltiazem com a amostra Ba90re e para o Verapamil com a amostra Ishta, são obtidos declives com um valor bastante inferior ao esperado. Além destas duas amostras são encontradas para o Diltiazem um maior número de amostras com valores de declive diferentes do declive do padrão. Para o Diltiazem, são obtidos com o ácido cítrico, para as amostras Al60co e He60co declives superiores e para a amostra Dt60co inferior e, com o ácido malónico, para a amostra Di120me superior e para as amostras He60co e He120sr inferiores. Para o Verapamil é obtido somente para a amostra Isinj com o ácido cítrico um declive superior ao esperado. Atendendo aos declives bastante inferiores relativamente ao declive do padrão obtidos para o Diltiazem, com a amostra Ba90re com os dois ácidos orgânicos e com a amostra Dt60co com o ácido cítrico, assim como para o Verapamil, com a amostra Ishta com os dois ácidos orgânicos, uma possível interferência negativa pode ser considerada para estas amostras.

8.4.1. Análise directa

Diltiazem por reacção de ácido cítrico com anidrido acético

Da avaliação de todas as adições padrão efectuadas verificou-se para o padrão e para a maioria das amostras intervalos de variação do c.d.o. de excitação e de emissão dentro da resolução da determinação de 5 nm. São obtidos intervalos no c.d.o. de excitação de 374 a 380 nm ou 380 a 385 nm e no c.d.o. de emissão de 476 a 481 nm. Só para a determinação com o solvente no c.d.o. de excitação e de emissão e para a amostra não fortificada He60co no c.d.o. de emissão são encontrados intervalos superiores a 5 nm.

As estimativas de concentração do solvente, padrão, amostras não fortificadas e amostras fortificadas obtidas por análise directa ao máximo de intensidade de fluorescência são apresentadas na Tabela 8.4 a) e b). Excepto para as amostras não fortificadas Dtap e Di120me, são obtidos para todas as amostras ajustes com coeficientes de correlação linear

de ordem de grandeza igual ou superior a 0.990. Para a maioria das amostras são encontrados desvios padrão relativos de ordem de grandeza superior a 10 %. As excepções verificam-se com as amostras não fortificadas Al60co, Ba90re, Dt60co, Di60me e He60co e as amostras fortificadas He60coFo e He120srFo. Para as amostras Dtap e Di120me, com coeficientes de correlação linear mais baixos, são mesmo encontrados desvios padrão relativos superiores a 20 %.

Como se pode verificar na Tabela 8.4 a) foram obtidas para o solvente e para o padrão estimativas de concentração adequadas. Foi encontrada para o solvente uma estimativa próxima de zero e para o padrão uma estimativa próxima de 0.300 ppm. É de notar no entanto que para o padrão é obtida uma recuperação próxima de 90 %.

Também, para a maioria das amostras não fortificadas e fortificadas, foram obtidas estimativas dentro da concentração esperada. No entanto, para a maioria das amostras são encontradas recuperações ligeiramente acima de 100 %. Recuperações ligeiramente superiores a 110 % são encontradas para a amostra não fortificada e fortificada da formulação farmacêutica Df60co, a amostra não fortificada Dt60co e a fortificada Ba90reFo. Quanto à recuperação de fortificação, só para as formulações Di60me, Di120me e He120sr são encontradas recuperações próximas de 100 %. São obtidas, com as formulações farmacêuticas Df60co, Ba90re e He60co, uma recuperação superior a 110 % e, com as formulações Al60co, Dt60co e Dtap, uma recuperação inferior a 90 %.

Para a maioria das amostras não fortificadas são encontrados erros de previsão superiores a 10 %. Para todas as amostras os erros de previsão encontrados variam entre 9 e 18 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Dtap e o mais alto para a amostra Ba90re. Ao considerar-se todas as amostras é obtido um valor de EPM de 13.776 %, de EPT de 12.152 % e de RMSEP de 11.971.

Atendendo aos resultados obtidos por análise directa com as adições de padrão só o facto de a maioria das estimativas de concentração encontradas serem ligeiramente superiores ao esperado poderá confirmar um possível desvio sistemático positivo avaliado previamente por comparação das funções lineares.

Tabela 8.4 – Estimativas de concentração do a) solvente, padrão, amostras não fortificadas e b) amostras fortificadas do Diltiazem por reacção do ácido cítrico com anidrido acético obtidas por análise directa ao c.d.o. de excitação e emissão de intensidade de fluorescência máxima.*

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Reacção do ácido cítrico com anidrido acético					
	Solvente	Padrão	Al60co	Df60co	Ba90re	Dt60co
C_{estimada} (ppm)	0.042 (0.031)	0.266 (0.047)	0.305 (0.055)	0.336 (0.027)	0.321 (0.042)	0.337 (0.045)
C_{esperada} (ppm)	0.000	0.300	0.301	0.300	0.300	0.301
Recuperação (%)	---	88.669	101.525	111.892	107.005	111.956
LD (3S_{y/x}/b)	0.109	0.104	0.113	0.052	0.084	0.088
DOS_{estimada} (mg)	----	----	60.874	67.112	96.177	67.196
DOS_{estimada} HPLC (mg)	----	----	54.645	57.019	81.617	57.184
EP (%)	----	11.333	11.399	17.701	17.839	17.508
c.d.o. excitação (nm)	380 (2), 385 e 391	380 (4)	380(4)	380(4)	380(2) e 385(2)	380 (3) e 385
c.d.o. emissão (nm)	481 (2), 471 e 476	476(3) e 481	476 e 481(3)	481(4)	476 e 481(3)	476 e 481(3)
Calibração (y = bx + a, m = 4)						
a	1932.300 (1282.594)	22032.619 (2199.078)	16656.567 (1577.411)	22410.921 (883.268)	18322.431 (1222.371)	16946.066 (1141.582)
b	45965.057 (4321.335)	82721.249 (7409.169)	54574.749 (5314.639)	66676.244 (2975.920)	57003.494 (4118.431)	50301.979 (3846.237)
S_{y/x}	1664.966	2854.677	2047.676	1146.592	1586.789	1481.916
R	0.9913	0.9921	0.9906	0.9980	0.9948	0.9942

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Reacção do ácido cítrico com anidrido acético				
	Dtap	Di60me	Di120me	He60co	He120sr
C_{estimada} (ppm)	0.323 (0.018)	0.320 (0.054)	0.319 (0.010)	0.313 (0.023)	0.321 (0.018)
C_{esperada} (ppm)	0.300	0.301	0.301	0.301	0.301
Recuperação (%)	107.665	106.446	106.056	104.146	106.568
LD (3S_{y/x}/b)	0.036	0.109	0.019	0.047	0.035
DOS_{estimada} (mg)	215.333	63.893	127.351	62.467	128.049
DOS_{estimada} HPLC (mg)	198.300	57.689	115.152	54.870	110.619
EP (%)	8.590	10.754	10.594	13.846	15.757
c.d.o. excitação (nm)	380 (4)	374 e 380(4)	380 (4)	374 e 380(3)	380 (4)
c.d.o. emissão (nm)	476 e 481(3)	476(2) e 481(2)	476 e 481(3)	471, 476 e 481(2)	476 e 481(3)
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	15276.313 (435.581)	22396.869 (1952.989)	18152.706 (284.172)	16137.851 (623.754)	19204.129 (544.912)
b	47295.882 (1467.565)	70018.076 (6580.043)	56942.484 (957.438)	51541.916 (2101.562)	59904.652 (1835.927)
S_{y/x}	565.438	2535.223	368.891	809.710	707.364
R	0.9990	0.9913	0.9997	0.9983	0.9991

(Continua)

Tabela 8.4 (Continuação)

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Reacção do ácido cítrico com anidrido acético				
	Al60coFo	Df60coFo	Ba90reFo	Dt60coFo	DtapFo
$C_{\text{estimada total}}$ (ppm)	0.392 (0.068)	0.489 (0.084)	0.458 (0.067)	0.401 (0.057)	0.396 (0.098)
$C_{\text{esperada total}}$ (ppm)	0.401	0.401	0.401	0.402	0.402
Recuperação (%)	97.634	121.916	114.161	99.927	98.721
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.122	0.131	0.109	0.100	0.175
c.d.o. excitação (nm)	380(4)	380(4)	380(4)	380 (4)	380 (4)
c.d.o. emissão (nm)	476 e 481(3)	476(3) e 481	476(3) e 481	476 e 481 (3)	476(3) e 481
Fortificação ($C_{\text{estimada amostra fortificada}} - C_{\text{estimada amostra não fortificada}}$)					
C_{estimada} (ppm)	0.087	0.153	0.137	0.064	0.073
C_{esperada} (ppm)	0.100	0.100	0.100	0.100	0.101
Recuperação (%)	86.743	152.549	136.596	63.811	72.421
$\Delta = C_{\text{estimada}} - C_{\text{esperada}}$	-0.013	+0.053	+0.037	-0.036	-0.028
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	17267.861 (1376.158)	21763.629 (1493.308)	21737.363 (1332.089)	21424.531 (1367.458)	19970.735 (2259.329)
b	44059.252 (4636.575)	44495.419 (5031.278)	47461.745 (4488.097)	53372.467 (4607.263)	50372.092 (7612.167)
$S_{y/x}$	1786.425	1938.500	1729.218	1775.131	2932.890
R	0.9891	0.9875	0.9912	0.9926	0.9779

b) amostras fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Reacção do ácido cítrico com anidrido acético			
	Di60meFo	Di120meFo	He60coFo	He120srFo
$C_{\text{estimada total}}$ (ppm)	0.427 (0.066)	0.429 (0.209)	0.439 (0.020)	0.412 (0.033)
$C_{\text{esperada total}}$ (ppm)	0.401	0.401	0.401	0.402
Recuperação (%)	106.443	106.848	109.341	102.339
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.112	0.355	0.034	0.057
c.d.o. excitação (nm)	380(3) e 385	380(4)	380(4)	380(4)
c.d.o. emissão (nm)	476 e 481(3)	476 e 481(3)	476 (2) e 481(2)	476 e 481(3)
Fortificação ($C_{\text{estimada amostra fortificada}} - C_{\text{estimada amostra não fortificada}}$)				
C_{estimada} (ppm)	0.107	0.110	0.126	0.091
C_{esperada} (ppm)	0.101	0.100	0.100	0.101
Recuperação (%)	106.684	109.675	125.628	90.284
$\Delta = C_{\text{estimada}} - C_{\text{esperada}}$	+0.006	+0.010	+0.026	-0.010
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	30900.809 (2071.495)	17598.582 (3737.790)	19985.431 (395.971)	22283.420 (785.536)
b	72340.186 (6979.313)	41034.448 (12593.422)	45531.550 (1334.112)	54148.463 (2648.017)
$S_{y/x}$	2689.058	4852.117	514.020	1019.896
R	0.9908	0.9173	0.9991	0.9976

* A dosagem é dada em massa de composto por comprimido; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados, excepto na avaliação do c.d.o. de excitação e de emissão em que o valor entre parêntesis corresponde ao número de vezes que é encontrado um determinado c.d.o. de excitação e de emissão de fluorescência máxima. Os c.d.o. de excitação e de emissão apresentados correspondem aos obtidos nas quatro determinações de cada uma das adições de padrão.

Diltiazem por reacção de ácido malónico com anidrido acético

Da avaliação de todas as adições padrão efectuadas verificou-se alguma variabilidade nos intervalos de variação do c.d.o. de excitação e de emissão. Verificou-se alguma variação nos limites inferior e superior encontrados para os intervalos de variação do c.d.o. de excitação e de emissão e foi encontrado um número maior de determinações com intervalos de variação maiores que o da resolução da determinação de 5 nm. Os intervalos encontrados dentro da resolução de determinação de 5 nm foram os intervalos para o c.d.o. de excitação de 374 a 380 nm, 380 a 385 nm e 402 a 408 nm e para o c.d.o. de emissão de 434 a 440 nm, 445 a 450 nm, 460 a 466 nm e 466 a 471 nm. Intervalos maiores do que 5 nm foram encontrados para o c.d.o. de excitação e de emissão com o solvente, padrão e amostra não fortificada Dt60co, para o c.d.o. de excitação com as amostras não fortificadas Df60co e Di60me e para o c.d.o. de emissão para amostra fortificada Dtap.

As estimativas de concentração do solvente, padrão, amostras não fortificadas e amostras fortificadas obtidas por análise directa ao máximo de intensidade de fluorescência são apresentadas na Tabela 8.5 a) e b). Para a maioria das amostras são obtidos ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza inferior aos encontrados anteriormente com as curvas de calibração padrão. Só para as amostras não fortificadas Ba90re, Dt60co, Di60me, Dt60co e fortificadas Ba90reFo, Di60meFo e He120srFo são encontrados ajustes com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza superior a 0.990. São encontradas para a maioria das amostras desvios padrão relativos de ordem de grandeza superior a 10 %. As excepções são a amostra não fortificada e fortificada da formulação He120sr e as amostras fortificadas Ba90reFo e Di60meFo. Para um maior número de amostras são encontrados desvios padrão relativos superiores a 20 %. Tal facto poderá ser explicado pelos ajustes lineares com coeficientes de correlação linear baixos encontrados.

Como se pode verificar na Tabela 8.5 a), foi encontrado para o solvente uma estimativa próxima de zero e para o padrão uma estimativa de concentração acima do esperado com uma concentração de 0.384 ppm.

Para a maioria das amostras, não fortificadas e fortificadas, foram obtidas estimativas dentro da concentração esperada. Somente para as amostras não fortificadas Dt60co e

He60co e amostra fortificada DtapFo são obtidas recuperações ligeiramente superiores a 110 %. Quanto à recuperação de fortificação, só para as formulações Ba90re e Di60me são encontradas recuperações próximas de 100 %. São obtidas, com as formulações farmacêuticas Al60co, Dtap e Di120me uma recuperação superior a 110 % e com as formulações Df60co, Dt60co, He60co e He120sr uma recuperação inferior a 90 %.

Para a maioria das amostras não fortificadas são encontrados erros de previsão inferiores a 10 %. As únicas excepções verificam-se para as amostras Ba90re, Dt60co e He60co com erros respectivamente de 15, 18 e 23 %. Para todas as amostras não fortificadas os erros de previsão encontrados variam entre 4 e 23 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Dtap e o mais alto para a amostra He60co. Ao considerar-se todas as amostras não fortificadas é obtido um valor de EPM de 10.063 %, de EPT de 8.121 % e de RMSEP de 8.001.

Atendendo aos resultados obtidos por análise directa com as adições de padrão nenhuma possível interferência negativa é confirmada.

Tabela 8.5 – Estimativas de concentração do a) solvente, padrão, amostras não fortificadas e b) amostras fortificadas de Diltiazem por reacção do ácido malónico com anidrido acético obtidas por análise directa ao c.d.o. de excitação e emissão de intensidade de fluorescência máxima.*

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Reacção do ácido malónico com anidrido acético					
	Solvente	Padrão	Al60co	Df60co	Ba90re	Dt60co
C_{estimada} (ppm)	0.011 (0.049)	0.384 (0.121)	0.291 (0.074)	0.308 (0.072)	0.312 (0.039)	0.338 (0.046)
C_{esperada} (ppm)	0.000	0.301	0.301	0.300	0.300	0.301
Rec. (%)	---	127.609	96.785	102.368	103.949	112.315
LD (3S_{y/x}/b)	0.186	0.219	0.154	0.147	0.078	0.090
DOS_{estimada} (mg)	----	----	58.080	61.519	93.480	67.396
DOS_{estimada} HPLC (mg)	----	----	54.645	57.019	81.617	57.184
EP (%)	----	27.575	6.286	7.892	14.535	17.858
c.d.o. excitação (nm)	374, 402 e 408(2)	374 (2) e 402(2)	402 e 408(3)	397 e 402(3)	402(3) e 408	369 e 374(3)
c.d.o. emissão (nm)	440, 460, 466 e 471	434, 440, 460 e 466	466(4)	455, 460(2) e 466	460 (4)	429 e 440(3)
Calibração (y = bx + a, m = 4)						
a	871.160 (3905.850)	10818.120 (1585.742)	21937.115 (2989.314)	12761.380 (1564.467)	19028.184 (1226.499)	11893.889 (812.009)
b	81756.255 (13166.488)	28177.582 (5345.483)	75396.683 (10076.876)	41499.345 (5273.764)	60939.662 (4132.339)	35192.483 (2735.833)
S_{y/x}	5071.136	2058.838	3881.157	2031.215	1592.148	1054.088
R	0.9750	0.9658	0.9826	0.9842	0.9954	0.9940

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Reacção do ácido malónico com anidrido acético				
	Dtap	Di60me	Di120me	He60co	He120sr
C_{estimada} (ppm)	0.286 (0.065)	0.310 (0.044)	0.272 (0.069)	0.337 (0.066)	0.290 (0.014)
C_{esperada} (ppm)	0.300	0.301	0.301	0.301	0.301
Recuperação (%)	95.218	103.155	90.593	111.941	96.420
LD (3S_{y/x}/b)	0.138	0.089	0.149	0.128	0.029
DOS_{estimada} (mg)	190.667	61.896	108.588	67.257	115.683
DOS_{estimada} HPLC (mg)	198.300	57.689	115.152	54.870	110.619
EP (%)	3.849	7.293	5.700	22.575	4.578
c.d.o. excitação (nm)	402 (2) e 408(2)	402, 408 e 413 (2)	374 e 380 (3)	402 (2) e 408(2)	408 (4)
c.d.o. emissão (nm)	460 e 466(3)	466(3) e 471	434 e 440(3)	460(2) e 466(2)	466(2) e 471(2)
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	10754.548 (1332.914)	21185.712 (1557.009)	9258.683 (1297.357)	18932.634 (1854.758)	17696.098 (451.092)
b	37648.711 (4490.875)	68344.249 (5248.624)	34000.608 (4373.348)	56257.434 (6249.079)	61010.224 (1520.615)
S_{y/x}	1730.288	2021.533	1684.416	2407.706	585.672
R	0.9861	0.9942	0.9839	0.9879	0.9994

(Continua)

Tabela 8.5 (Continuação)

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Reacção do ácido malónico com anidrido acético				
	Al60coFo	Df60coFo	Ba90reFo	Dt60coFo	DtapFo
$C_{\text{estimada total}}$ (ppm)	0.415 (0.071)	0.376 (0.096)	0.404 (0.034)	0.377 (0.102)	0.445 (0.115)
$C_{\text{esperada total}}$ (ppm)	0.402	0.401	0.401	0.402	0.402
Recuperação (%)	103.350	93.783	100.602	93.640	110.708
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.122	0.176	0.059	0.187	0.190
c.d.o. excitação (nm)	408 (4)	402 (2) e 408(2)	402 (3) e 408	374 (4)	402 (3) e 408
c.d.o. emissão (nm)	460 (2) e 466(2)	460(4)	460(3) e 466	434(4)	460(2), 466 e 471
Fortificação ($C_{\text{estimada amostra fortificada}} - C_{\text{estimada amostra não fortificada}}$)					
C_{estimada} (ppm)	0.124	0.068	0.092	0.039	0.159
C_{esperada} (ppm)	0.101	0.100	0.100	0.100	0.101
Recuperação (%)	123.024	67.799	91.729	38.693	156.960
$\Delta = C_{\text{estimada}} - C_{\text{esperada}}$	+0.023	-0.032	-0.008	-0.061	+0.058
Calibração ($y = bx + a, m = 4$)					
a	25013.465 (1882.696)	18162.582 (2176.846)	24487.903 (923.374)	12102.438 (1542.160)	23665.129 (2594.951)
b	60217.534 (6346.506)	48259.081 (7334.265)	60674.064 (3111.045)	32133.715 (5198.569)	53161.474 (8747.493)
$S_{y/x}$	0.122	2825.817	1198.654	2002.254	3369.139
R	0.9891	0.9777	0.9974	0.9748	0.9740

b) amostras fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Reacção do ácido malónico com anidrido acético			
	Di60meFo	Di120meFo	He60coFo	He120srFo
$C_{\text{estimada total}}$ (ppm)	0.411 (0.022)	0.411 (0.123)	0.415 (0.084)	0.373 (0.021)
$C_{\text{esperada total}}$ (ppm)	0.402	0.402	0.401	0.402
Recuperação (%)	102.222	102.344	103.336	92.670
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.039	0.213	0.146	0.039
c.d.o. excitação (nm)	408 (4)	402 e 408 (3)	380 (3) e 385	402 (3) e 408
c.d.o. emissão (nm)	460 e 466(3)	466 (4)	445 (3) e 450	466 (3) e 471
Fortificação ($C_{\text{estimada amostra fortificada}} - C_{\text{estimada amostra não fortificada}}$)				
C_{estimada} (ppm)	0.101	0.139	0.078	0.083
C_{esperada} (ppm)	0.101	0.101	0.100	0.101
Recuperação (%)	100.205	137.906	77.770	82.347
$\Delta = C_{\text{estimada}} - C_{\text{esperada}}$	0.000	+0.038	-0.022	-0.018
Calibração ($y = bx + a, m = 4$)				
a	21405.542 (520.002)	21349.817 (2838.322)	14734.079 (1330.550)	22093.757 (597.303)
b	52115,971 (1752.911)	51907.569 (9567.889)	35518.273 (4482.912)	59288.894 (2013.487)
$S_{y/x}$	675.142	3685.118	1727.220	775.504
R	0.9989	0.9677	0.9844	0.9988

* Ver rodapé da Tabela 8.4.

Verapamil por reacção de ácido cítrico com anidrido acético

Da avaliação de todas as adições padrão efectuadas verificou-se que são encontrados intervalos de variação do c.d.o. de excitação e de emissão dentro da resolução da determinação de 5 nm. Os intervalos encontrados dentro da resolução de determinação de 5 nm foram os intervalos para o c.d.o. de excitação de 380 a 385 nm e para o c.d.o. de emissão de 476 a 481 nm. Só com o solvente, para o c.d.o. de emissão e, com a amostra não fortificada Isinj, para os c.d.o. de excitação e de emissão, são encontrados intervalos maiores do que 5 nm.

As estimativas de concentração do solvente, padrão, amostras não fortificadas e amostras fortificadas obtidas por análise directa ao máximo de intensidade de fluorescência são apresentadas na Tabela 8.6 a) e b). Excepto para a amostra não fortificada Isinj e as amostras fortificadas IsinjFo, Is40coFo e IshtaFo, são encontrados para todas as amostras ajustes com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.990. Excepto para as amostras não fortificadas Ve40ra e Is40co, com um desvio padrão relativo inferior a 10 %, são encontradas para a maioria das amostras desvios padrão relativos de cerca de 10 %. Para algumas amostras são ainda encontrados desvios padrão relativos superiores a 20 %.

Na Tabela 8.6 a) pode-se verificar que para o solvente e para o padrão foram obtidas estimativas adequadas. É encontrada para o solvente uma estimativa próxima de zero e para o padrão uma estimativa próxima de 0.300 ppm.

Também para a maioria das amostras, não fortificadas e fortificadas, foram obtidas estimativas adequadas. Só com a amostra não fortificada Ve40ra é obtida uma recuperação ligeiramente superior a 110 %. Quanto à recuperação de fortificação, são obtidas recuperações próximas de 100 % com as formulações farmacêuticas Ve40ra e Ishta, superiores a 110 % com as formulações Isinj e Is40co e inferior a 90 % com a formulação Isret.

Para duas das amostras não fortificadas são encontrados erros de previsão inferiores a 10 %. Os erros de previsão encontrados variam entre 2 e 18 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Isinj e o mais alto para a amostra Isret. Ao considerar-se

todas as amostras é obtido um valor de EPM de 11.202 %, de EPT de 16.537 % e de RMSEP de 18.712.

Atendendo aos resultados obtidos por análise directa com as adições de padrão, e ao contrário dos resultados obtidos com o Diltiazem com o ácido cítrico em anidrido acético, um possível desvio sistemático positivo avaliado previamente por comparação das funções lineares não é confirmado por estes resultados. Também nenhuma possível interferência negativa é confirmada.

Tabela 8.6 – Estimativas de concentração do a) solvente, padrão, amostras não fortificadas e amostras fortificadas de Verapamil por reacção do ácido cítrico com anidrido acético obtidas por análise directa ao c.d.o. de excitação e emissão de intensidade de fluorescência máxima.*

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Reacção do ácido cítrico com anidrido acético						
	Solvente	Padrão	Ve40ra	Isinj	Is40co	Isret	Ishta
C_{estimada} (ppm)	0.079 (0.011)	0.287 (0.055)	0.343 (0.020)	0.275 (0.064)	0.289 (0.014)	0.327 (0.048)	0.322 (0.059)
C_{esperada} (ppm)	0.000	0.301	0.301	0.300	0.301	0.301	0.301
Recuperação (%)	----	95.292	114.116	91.793	96.080	108.697	107.118
LD (3S_{y/x}/b)	0.036	0.117	0.038	0.138	0.030	0.095	0.118
DOS_{estimada} (mg)	----	----	45.647	4.583	38.437	130.601	257.166
DOS_{estimada} HPLC (mg)	----	----	38.979	4.679	37.362	111.183	220.724
EP (%)	----	4.651	17.107	2.052	2.877	17.465	16.510
c.d.o. excitação (nm)	380 (2) e 385 (2)	380 (2) e 385 (2)	380 (3) e 385	352, 380, 385 (2)	380 e 385(3)	380(4)	380 (3) e 385
c.d.o. emissão (nm)	471, 476(2) e 481	476 (4)	476 (4)	455, 476 e 481 (2)	481 (4)	476 (2) e 481 (2)	476 (2) e 481 (2)
Calibração (y = bx + a, m = 4)							
a	4871.090 (575.504)	20613.624 (2153.675)	20180.825 (573.615)	12410.469 (1598.833)	14573.783 (390.062)	19613.226 (1466.401)	12005.904 (1129.684)
b	61681.210 (1938.073)	71829.484 (7252.733)	58836.608 (1931.710)	45066.991 (5384.242)	50435.157 (1317.889)	60054.562 (4938.264)	37297.323 (3804.333)
S_{y/x}	747.202	2796.210	744.749	2075.834	506.437	1903.893	1466.718
R	0.9990	0.9900	0.9989	0.9860	0.9993	0.9933	0.9898

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Reacção do ácido cítrico com anidrido acético				
	Ve40raFo	IsinjFo	Is40coFo	IsretFo	IshtaFo
C_{estimada} (ppm)	0.442 (0.080)	0.387 (0.161)	0.416 (0.094)	0.415 (0.040)	0.422 (0.101)
C_{esperada} (ppm)	0.403	0.401	0.401	0.402	0.403
Recuperação (%)	109.672	96.342	103.856	103.152	104.586
LD (3S_{y/x}/b)	0.133	0.289	0.162	0.068	0.173
c.d.o. excitação (nm)	380 (4)	380 (4)	380 (4)	380 (4)	380 (4)
c.d.o. emissão (nm)	476 (3) e 481	476 (2) e 481(2)	476 e 481 (3)	476 (3) e 481	476 (3) e 481
Fortificação (C_{estimada amostra fortificada} – C_{estimada amostra não fortificada})					
C_{estimada} (ppm)	0.099	0.112	0.127	0.088	0.100
C_{esperada} (ppm)	0.101	0.101	0.101	0.101	0.102
Recuperação (%)	97.633	110.454	125.876	87.221	98.129
Δ = C_{estimada} – C_{esperada}	-0.002	+0.011	+0.026	-0.013	-0.002
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	27163.710 (2106.854)	16818.369 (3231.061)	27203.835 (2715.656)	24179.515 (1023.271)	20111.425 (2119.308)
b	61494.622 (7095.061)	43490.197 (10880.950)	65331.451 (9145.267)	58331.053 (3445.976)	47710.300 (7137.001)
S_{y/x}	2735.421	4195.029	3525.856	1328.558	2751.591
R	0.9869	0.9427	0.9810	0.9965	0.9783

* Ver rodapé da Tabela 7.4.

Verapamil por reacção de ácido malónico com anidrido acético

Da avaliação de todas as adições padrão efectuadas verificou-se um maior número de determinações com intervalos de variação do c.d.o. de excitação e de emissão maiores que a resolução da determinação de 5 nm. Os intervalos encontrados dentro da resolução de determinação de 5 nm foram os intervalos para o c.d.o. de excitação de 374 a 380 nm e de 402 a 408 nm e para o c.d.o. de emissão de 434 a 440 nm e de 460 a 466 nm. Intervalos maiores do que 5 nm foram encontrados, para o c.d.o. de excitação e de emissão, com o solvente, amostra não fortificada Isret e amostras fortificadas Ve40raFo e Is40coFo e ,para o c.d.o. de excitação, com o padrão e amostra não fortificada Ve40ra.

As estimativas de concentração do solvente, padrão, amostras não fortificadas e amostras fortificadas obtidas por análise directa ao máximo de intensidade de fluorescência são apresentadas na Tabela 8.7 a) e b). Para a maioria de amostras são obtidos ajustes com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.990. As excepções verificam-se para as amostras não fortificadas Isinj e Is40co e fortificadas Ve40raFo, IsinjFo e IshtaFo. Para a maioria das amostras são encontrados desvios padrão relativos de ordem de grandeza superior a 10 %. Só a amostra não fortificada Isret e fortificada Is40coFo apresentam desvios padrão relativos inferiores. Para as amostras com um ajuste com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza inferior são mesmo encontrados desvios padrão relativos superiores a 20 %.

Na Tabela 8.7 a) pode-se verificar que para o solvente e para o padrão foram obtidas estimativas adequadas. É encontrada para o solvente uma estimativa próxima de zero e para o padrão uma estimativa próxima de 0.300 ppm. É de notar no entanto que para o padrão é obtida uma recuperação ligeiramente inferior a 110 %.

De uma forma geral, para a maioria das amostras não fortificadas e fortificadas foram obtidas estimativas adequadas. As excepções, com recuperações ligeiramente superiores a 110 %, verificam-se para a amostra não fortificada Isinj e fortificadas IsinjFo e IshtaFo e, com uma recuperação ligeiramente inferior a 90 %, verifica-se para a amostra fortificada Is40coFo. Quanto à recuperação de fortificação, são obtidas recuperações superiores a 110% com as formulações Ve40ra, Isinj e Ishta e recuperações inferiores a 90 % com as formulações Is40co e Isret.

Para duas das amostras não fortificadas são encontrados erros de previsão inferiores a 10 %. Os erros de previsão encontrados variam entre 5 e 21 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Ve40ra e o mais alto para a amostra Isinj. Ao considerar-se todas as amostras é obtido um valor de EPM de 13.251 %, de EPT de 16.656 % e de RMSEP de 18.846.

Atendendo aos resultados obtidos por análise directa com as adições de padrão nenhuma possível interferência negativa é confirmada.

Tabela 8.7 – Estimativas de concentração do solvente, padrão, amostras não fortificadas e amostras fortificadas de Verapamil por reacção do ácido malónico com anidrido acético obtidas por análise directa ao c.d.o. de excitação e emissão de intensidade de fluorescência máxima.*

a) solvente, padrão e amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Reacção do ácido malónico com anidrido acético						
	Solvente	Padrão	Ve40ra	Isinj	Is40co	Isret	Ishta
$C_{estimada}$ (ppm)	0.053 (0.033)	0.331 (0.058)	0.278 (0.047)	0.340 (0.118)	0.300 (0.115)	0.323 (0.029)	0.324 (0.037)
$C_{esperada}$ (ppm)	0.000	0.303	0.301	0.300	0.301	0.301	0.301
Recuperação (%)	----	109.235	92.501	113.462	99.917	107.647	107.665
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.113	0.114	0.101	0.227	0.237	0.057	0.073
$DOS_{estimada}$ (mg)	----	----	36.997	5.667	39.900	129.003	258.764
$DOS_{estimada}$ HPLC (mg)	----	----	38.979	4.679	37.362	111.183	220.724
EP (%)	----	9.241	5.085	21.116	6.793	16.028	17.234
c.d.o. excitação (nm)	380 e 408(3)	402 e 408(3)	402 (3) e 408	402 (2) e 408 (2)	408 (4)	380 e 408(3)	374 e 380(3)
c.d.o. emissão (nm)	434 e 460(3)	460 (2) e 466 (2)	460 (3) e 466	460 e 466(3)	460 e 466(3)	440 e 466(3)	434 e 440(3)
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)							
a	3540.527 (1939.682)	16432.102 (1449.432)	16683.394 (1551.966)	15063.550 (2582.275)	17608.913 (3563.619)	14242.135 (644.116)	10671.362 (622.250)
b	66853.366 (6553.539)	49650.350 (4851.844)	60005.801 (5243.575)	44254.216 (8696.091)	58598.752 (12040.283)	44033.958 (2176.252)	32983.078 (2095.493)
$S_{y/x}$	2518.385	1881.871	2014.994	3352.681	4626.823	836.287	807.894
R	0.9905	0.9906	0.9925	0.9635	0.9603	0.9976	0.9960

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Reacção do ácido malónico com anidrido acético				
	Ve40ra	Isinj	Is40co	Isret	Ishta
$C_{estimada}$ (ppm)	0.411 (0.104)	0.457 (0.096)	0.344 (0.007)	0.413 (0.058)	0.470 (0.086)
$C_{esperada}$ (ppm)	0.403	0.401	0.402	0.402	0.404
Recuperação (%)	102.121	113.820	85.723	102.851	116.435
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.181	0.157	0.014	0.101	0.137
c.d.o. excitação (nm)	385, 402 e 408(2)	402(3) e 408	380 (3) e 402	402 (4)	374 (4)
c.d.o. emissão (nm)	445 e 460 (3)	460 (4)	440 (2), 445 e 466	460 (4)	434 (4)
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)					
$C_{estimada}$ (ppm)	0.133	0.117	0.044	0.090	0.146
$C_{esperada}$ (ppm)	0.101	0.101	0.101	0.101	0.103
Recuperação (%)	131.164	115.385	43.611	89.203	141.748
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	+0.032	+0.016	-0.057	-0.011	+0.043
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	11717.264 (1325.632)	22875.998 (2017.157)	17710.490 (190.036)	14112.964 (887.092)	12418.256 (931.936)
b	28487.564 (4464.210)	50070.845 (6792.993)	51529.685 (639.966)	34145.908 (2987.378)	26415.820 (3148.703)
$S_{y/x}$	1721.126	2618.963	246.732	1151.750	1209.979
R	0.9763	0.9821	0.9998	0.9924	0.9861

* Ver rodapé da Tabela 7.4.

8.4.2. Análise multivariada

Para a análise multivariada todas as matrizes de dados obtidas foram previamente reduzidas à banda de fluorescência máxima e atendendo a zonas do espectro que possam não ser consideradas relevantes para esta análise. Quer para a determinação com o Diltiazem quer para a determinação com o Verapamil com os dois ácidos orgânicos a gama de c.d.o. de excitação e de emissão foi reduzida.

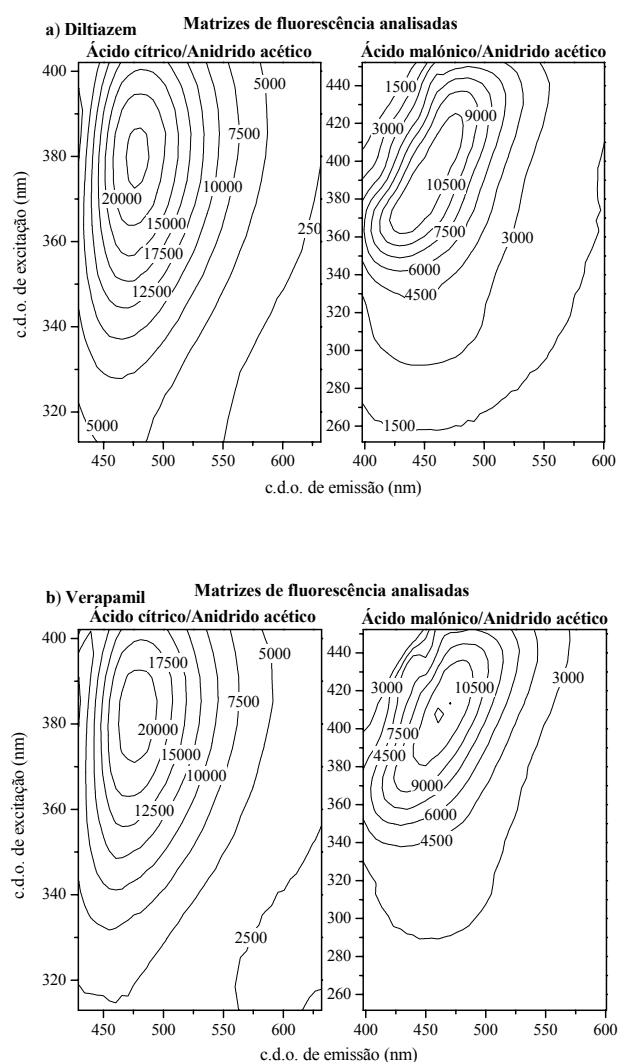


Fig. 8.5 – Matrizes de fluorescência analisadas do padrão de a) Diltiazem e de b) Verapamil 0.3 ppm obtidas por reacção de ácido cítrico e ácido malónico com o anidrido acético.

Para o mesmo ácido orgânico foi efectuada para o Diltiazem e para o Verapamil uma redução idêntica de c.d.o. de excitação e de emissão. A gama de c.d.o. de excitação de 251.70 a 546.93 nm (54 c.d.o.) foi com o ácido cítrico em anidrido acético reduzida para

uma gama de 312.97 a 402.10 (17 c.d.o.) e, com o ácido malónico em anidrido acético reduzida para uma gama de 251.70 a 452.23 (37 c.d.o.). A gama de c.d.o. de emissão de 252.27 a 715.03 nm (90 c.d.o.) foi, com o ácido cítrico em anidrido acético, reduzida para uma gama de 429.06 a 631.84 nm (40 c.d.o.) e, com o ácido malónico em anidrido acético, reduzida para uma gama de c.d.o. de 397.86 a 600.64 nm (40 c.d.o.). Foi analisado com o ácido cítrico um total de pontos espectrais de 680 e com o ácido malónico de 1480.

Na Fig. 8.6 a) e b) são apresentados os espectros de excitação e emissão experimentais obtidos aos c.d.o. de excitação e de emissão de intensidade de fluorescência máxima.

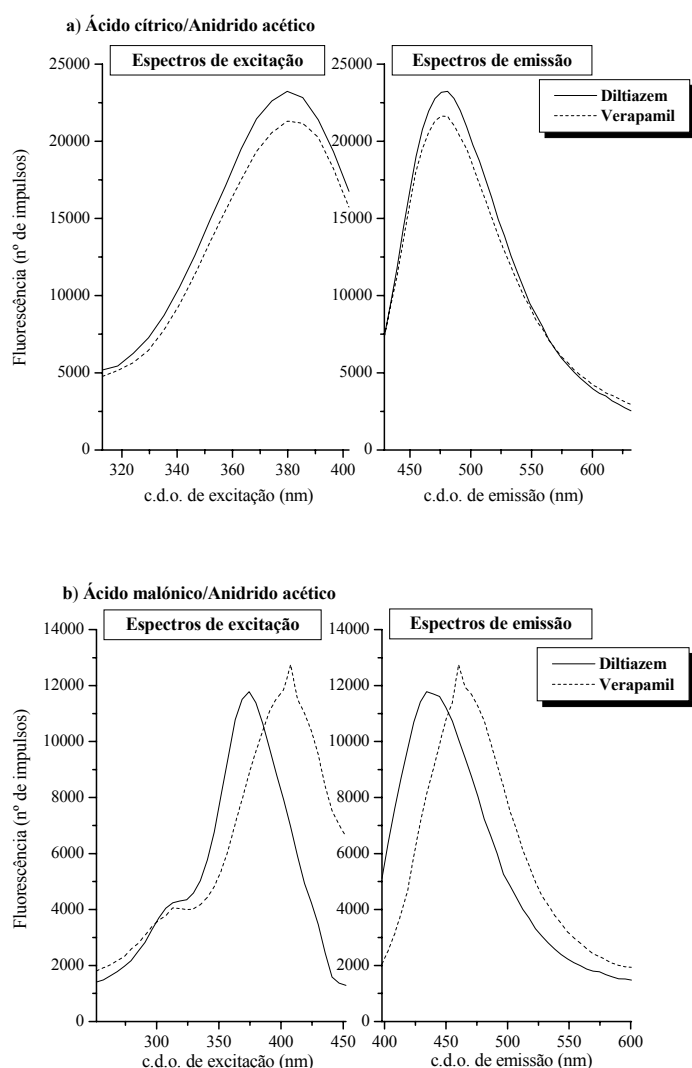


Fig. 8.6 – Espectros de excitação e emissão experimentais reduzidos do padrão de Diltiazem e de Verapamil 0.3 ppm obtidos por reacção de a) ácido cítrico e b) ácido malónico com o anidrido acético ao máximo de intensidade de fluorescência de cada uma das matrizes.

Uma menor variação esta presente nos espectros de excitação e emissão experimentais obtidos. Assim, o critério de avaliação na comparação das diferentes estimativas obtidas pelos diferentes métodos de decomposição tridimensional é um critério de maior semelhança possível ou seja um coeficiente correlação linear positivo alto.

A discussão dos resultados tanto na análise inicial multivariada efectuada como na análise com os três modelos é feita para o Diltiazem com a reacção do ácido cítrico com o anidrido acético e para o Verapamil com a reacção do ácido malónico com o anidrido acético. Uma estrutura de dados próxima é esperada para os dois compostos nas estruturas de dados obtidas com cada um dos ácidos orgânicos por reacção com o anidrido acético.

Também na análise pelo modelo PARAFAC2 das matrizes das amostras não fortificadas e fortificadas de Diltiazem obtidas por reacção de ácido cítrico com anidrido acético e de Verapamil obtidas por reacção de ácido malónico com anidrido acético, e apesar de ser considerado na análise do padrão e do solvente, não se procedeu a avaliação com estimativas iniciais por números aleatórios. Apesar da obtenção provável de piores estimativas do componente principal nas três dimensões, pode ser esperada uma melhoria provável na estimativa de concentração obtida por este modelo.

Assim um estudo mais aprofundado, alargado aos resultados obtidos para o Diltiazem por reacção do ácido malónico com o anidrido acético e para o Verapamil por reacção do ácido cítrico com o anidrido acético, bem como a análise pelo modelo PARAFAC2 das matrizes das amostras não fortificadas e fortificadas com estimativas iniciais por números aleatórios, será posteriormente efectuado.

Análise inicial

A representação gráfica (Fig. 8.7) dos valores singulares normalizados obtidos por decomposição de valor singular para os três tipos de amostras estudadas mostra que, são necessários para o Diltiazem por reacção do ácido cítrico com o anidrido acético entre quatro a cinco componentes e, para o Verapamil por reacção do ácido malónico com o anidrido acético entre seis e sete componentes, para a análise do tipo de matrizes avaliadas.

Quer para o Diltiazem por reacção do ácido cítrico com o anidrido acético quer para o Verapamil por reacção do ácido malónico com o anidrido acético o mesmo número de componentes parece ser necessário para a análise das matrizes singulares e de linha

aumentada do padrão e das amostras. Só para a matriz singular de etanol sem adição de padrão com os dois compostos um número de componentes superior parece ser mais adequado.

Excepto para as matrizes singulares de etanol sem adição de padrão um mesmo número de componentes parece ser necessário na análise de todos os tipos de matrizes. Pela avaliação de ordem das matrizes não é provável qualquer desvio a trilinearidade.

Tabela 8.8 – Variância explicada pelos primeiros nove componentes obtidos por análise de componentes principais da matriz singular e de linha aumentada na dimensão do espectro de excitação do etanol, padrão e amostra (Ba90re para o Diltiazem e Isinj para o Verapamil) de Diltiazem por reacção do ácido cítrico com o anidrido acético e Verapamil por reacção do ácido malónico com o anidrido acético.*

Variância explicada por PCA (%)						
Matrizes de Diltiazem obtidas por reacção do ácido cítrico com o anidrido acético						
Componente principal	Etanol	Etanol [exc.×(conc.×emi.)]	Padrão	Padrão [exc.×(conc.×emi.)]	Amostra	Amostra [exc.×(conc.×emi.)]
1	99.22	98.77	99.31	99.13	99.23	99.40
2	0.42	0.76	0.55	0.78	0.53	0.48
3	0.33	0.38	0.13	0.08	0.20	0.11
4	0.03	0.08	0.01	0.00	0.04	0.01
5	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Matrizes de Verapamil obtidas por reacção do ácido malónico com o anidrido acético						
1	93.63	90.54	95.84	89.81	92.13	90.32
2	5.34	8.09	3.06	8.47	6.60	8.26
3	0.88	1.20	0.97	1.42	1.16	1.28
4	0.07	0.11	0.05	0.18	0.08	0.09
5	0.04	0.04	0.03	0.07	0.02	0.04
6	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.00
7	0.01	0.01	0.01	0.02	0.00	0.00

* [exc.×(conc.×emi.)] – Matriz linha aumentada em que as linhas são os espectros de excitação e as colunas os espectros de emissão obtidos nas quatro matrizes.

Na Tabela 8.8 é também possível verificar que, na avaliação das matrizes singulares e de linha aumentada na dimensão do espectro de excitação, para o Diltiazem por reacção do ácido cítrico com o anidrido acético dois componentes e, para o Verapamil por reacção do ácido malónico com o anidrido acético três componentes parecem ser os necessários para explicar quase 100 % de variância. A mesma ordem de matriz é encontrada para os dois tipos de matrizes avaliadas com cada uma das amostras para os dois compostos pelas duas reacções. Tal confirma o não provável desvio à trilinearidade das matrizes obtidas.

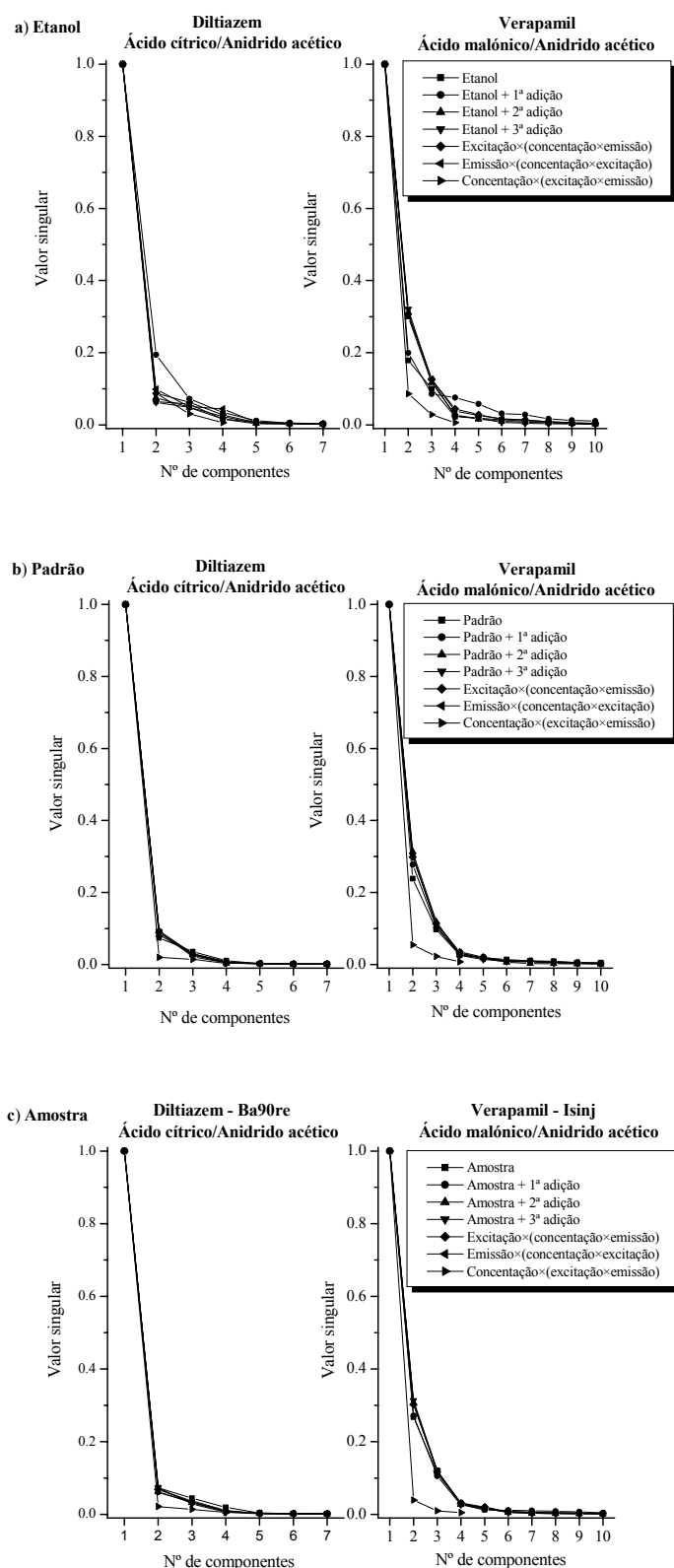


Fig. 8.7– Gráficos de valor singular de cada uma das matrizes singulares e das respectivas matrizes aumentadas de a) etanol, b) padrão, e c) amostra obtidas para o Diltiazem por reacção do ácido cítrico com o anidrido acético e para o Verapamil por reacção do ácido malónico com o anidrido acético.

8.4.2.1 - PARAFAC

No ajuste pelo modelo PARAFAC foram utilizadas de uma forma geral as matrizes tridimensionais [excitação × emissão × concentração] ($17 \times 40 \times 4$) para o Diltiazem por reacção do ácido cítrico com anidrido acético e ($37 \times 40 \times 4$) para o Verapamil por reacção do ácido malónico com anidrido acético. As condições geralmente utilizadas para o ajuste foram a aplicação de restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições.

Solvente

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 8.9 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC, de um a oito componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por TLD na análise da matriz tridimensional do solvente etanol obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem e por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil.

Como se pode verificar na Tabela 8.9, por validação cruzada, para a matriz de etanol obtida quer por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem quer por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil, as menores diferenças de valores de ajuste foram encontradas para os modelos de cinco componentes. Associados a estas menores diferenças de valores de ajuste foram também encontrados um número de iterações baixo e testes de consistência do núcleo de valor elevado. Na análise da matriz de etanol obtida quer por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem quer por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil o modelo de cinco componentes parece ser o mais adequado.

Tabela 8.9 – Validação cruzada do modelo PARAFAC, de 1 a 8 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por TLD na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] do solvente etanol por reação de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem e por reação de ácido malônico com anidrido acético catalizado pelo Verapamil. São apresentados a diferença dos ajustes obtidos por validação cruzada entre os modelos na análise da matriz segmentada e total, o número de iterações e o valor do teste de consistência do núcleo (corcondia).

	Número de componentes							
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete	Oito
Reação de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem								
Número de Iterações	4	2	74	922	618	1668	2500	2500
Corcondia	100	100	97.567	63.345	91.384	60.748	9.269	-0.009
$\Delta_{\text{AjMS-AjMT}}$	-0.032	-0.064	-0.052	-0.013	-0.004	-0.005	-0.005	-0.008
Reação de ácido malônico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil								
Número de Iterações	4	2	500	254	726	1320	2500	2500
Corcondia	100	100	-1.691	-1.899	98.251	20.324	0.906	0.094
$\Delta_{\text{AjMS-AjMT}}$	-0.008	-0.013	-0.015	-0.015	-0.013	-0.019	-0.017	-0.024

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 8.10 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC na análise da matriz tridimensional do solvente etanol obtida por reação de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem. Na Tabela 8.10 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições. Na Tabela 8.10 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Pode verificar-se na Tabela 8.10 b) que, a estimativa de concentração mais próxima de zero, com uma concentração de 0.007 ppm, é obtida pelo modelo de seis componentes, não negatividade nas três dimensões e unimodilidade na primeira e segunda dimensões. Associado a esta estimativa de concentração, encontra-se um teste de consistência mais baixo, uma percentagem de ajuste do modelo também alta, melhor estimativa do componente principal na dimensão do espectro de excitação e piores estimativas na dimensão do espectro de emissão e concentração.

Também se pode verificar nessa tabela que são encontradas estimativas de concentração próximas às encontradas com este modelo com o modelo de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e unimodilidade na primeira e segunda dimensões, bem como com, o modelo de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e matriz normalizada na primeira e segunda dimensões. Associadas a estas estimativas de

concentração adequadas são encontradas percentagens de ajuste do modelo ligeiramente mais altas e valores de testes de consistência mais elevados. Com o modelo de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e unimodalidade na primeira e segunda dimensões é obtida uma melhor estimativa do componente principal na dimensão do espectro de emissão e um maior número de iterações. Com o modelo de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e matriz normalizada na primeira e segunda dimensões é encontrado o valor de teste de consistência mais alto, o menor número de iterações e uma pior estimativa do componente principal na dimensão do espectro de emissão.

Atendendo aos resultados prévios de validação cruzada e, apesar da estimativa de concentração ligeiramente mais elevada e do número maior de iterações, o modelo de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e unimodalidade na primeira e segunda dimensões com um teste de consistência mais alto e com estimativas adequadas nas três dimensões é considerado o modelo com a estimativa de concentração mais adequada.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado na análise da matriz de etanol obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem é, o modelo de PARAFAC de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões, unimodalidade na primeira e segunda dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC de cinco componentes sem restrições.

Tabela 8.10 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] do solvente etanol por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem com a) restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por PARAFAC sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) não negatividade nas três dimensões

	Número de componentes				
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
$C_{estimada}$ (ppm)	0.013 (0.032)	0.013 (0.032)	0.012 (0.032)	0.011 (0.030)	0.018 (0.027)
Recuperação (%)	---	---	---	---	---
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.121	0.120	0.120	0.115	0.099
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	95.069	98.643	98.779	99.124	99.327
$ssq_{resíduos}$	2.890×10^8	2.184×10^7	1.772×10^7	9.119×10^6	5.378×10^6
Iterações	14	504	226	2006	2134
Corcondia (%)	96.230	11.478	9.571	80.133	6.079
$R_{Excitação}$	+0.994	+0.982	+0.995	+0.968	+0.969
$R_{Emissão}$	+0.927	+0.900	+0.909	+0.789	+0.819
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	0.022 (0.051)	0.022 (0.050)	0.019 (0.050)	0.019 (0.148)	0.029 (0.041)
b	1.621 (0.170)	1.621 (0.169)	1.628 (0.169)	1.630 (0.162)	1.604 (0.137)
$S_{y/x}$	0.066	0.065	0.065	0.062	0.053
R	0.9892	0.9893	0.9895	0.9903	0.9928

b) não negatividade nas três dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	5 componentes (unimodalidade na primeira e segunda dimensões)	6 componentes (unimodalidade na primeira e segunda dimensões)	5 componentes (matriz normalizada na segunda dimensão)	5 componentes (matriz normalizada na primeira e segunda dimensões)
$C_{estimada}$ (ppm)	0.009 (0.032)	0.007 (0.032)	0.010 (0.031)	0.008 (0.031)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.120	0.122	0.119	0.119
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.842	98.809	100.000	100.000
$ssq_{resíduos}$	1.593×10^7	1.686×10^7	1.911	1.258
Iterações	2500 (máx.)	1374	196	174
Corcondia (%)	64.191	39.665	94.040	95.291
$R_{Excitação}$	+0.956	+0.986	+0.960	+0.984
$R_{Emissão}$	+0.914	+0.862	-0.217	-0.242
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	0.015 (0.051)	0.012 (0.051)	0.017 (0.050)	0.013 (0.050)
b	1.637 (0.051)	1.647 (0.173)	1.635 (0.168)	1.643 (0.170)
$S_{y/x}$	0.066	0.067	0.065	0.065
R	0.9893	0.9891	0.9896	0.9895

* Ver rodapé da Tabela 4.6.

Na Tabela 8.11 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC na análise da matriz tridimensional do solvente etanol obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil. Na Tabela 8.11 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições. Na Tabela 8.11 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como é possível constatar, só os modelos apresentados em Tabela 8.11 b) apresentam testes de consistência do núcleo válidos. De entre estes, o modelo que apresenta uma estimativa de concentração mais próxima de zero, com uma concentração de -0.001 ppm, é o modelo de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e unimodilidade na primeira e segunda dimensões. Com um valor de concentração positivo, a estimativa de concentração mais adequada, com uma concentração de 0.008 ppm, é encontrada para o modelo de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e matriz centrada na primeira e segunda dimensões. No entanto com este modelo, associado à mais baixa percentagem de ajuste do modelo são encontradas nas três dimensões as piores estimativas do componente principal.

Tal como na avaliação da matriz tridimensional do solvente etanol, obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem, o modelo de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e unimodilidade na primeira e segunda dimensões é considerado o modelo com a estimativa de concentração mais adequada.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado na análise da matriz de etanol obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil é, o modelo de PARAFAC de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões, unimodilidade na primeira e segunda dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC de cinco componentes sem restrições.

Tabela 8.11 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] do solvente etanol por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil com a) restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por PARAFAC sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) não negatividade nas três dimensões

	Número de componentes				
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
$C_{estimada}$ (ppm)	0.033 (0.030)	0.009 (0.030)	-0.039(0.046)	0.048 (0.033)	0.057 (0.031)
Recuperação (%)	---	---	---	---	---
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.108	0.113	0.197	0.112	0.106
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	91.126	94.469	95.814	96.482	97.231
$ssq_{resíduos}$	2.916×10^9	1.133×10^9	6.488×10^8	9.583×10^8	2.840×10^8
Iterações	60	300	426	440	872
Corcondia (%)	11.794	3.968	0.281	1.133	1.788
$R_{Excitação}$	+0.783	+0.801	+0.689	+0.833	+0.826
$R_{Emissão}$	+0.760	+0.748	+0.748	+0.889	+0.861
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	0.051 (0.043)	0.015 (0.048)	-0.072(0.093)	0.072 (0.043)	0.084 (0.040)
b	1.550 (0.145)	1.644 (0.161)	0.843 (0.314)	1.492 (0.146)	1.460 (0.134)
$S_{y/x}$	0.056	0.062	0.121	0.056	0.051
R	0.9914	0.9905	0.9722	0.9906	0.9917

b) não negatividade nas três dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	5 componentes (unimodalidade na segunda dimensão)	5 componentes (unimodalidade na primeira e segunda dimensões)	5 componentes (matriz centrada na primeira e segunda dimensões)	5 componentes (matriz normalizada na primeira dimensão)
$C_{estimada}$ (ppm)	-0.009 (0.029)	-0.001 (0.032)	0.008 (0.035)	0.026 (0.029)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.117	0.124	0.135	0.107
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	95.127	95.080	70.786	99.999
$ssq_{resíduos}$	8.719×10^8	8.963×10^8	3.160×10^{10}	21.274
Iterações	784	368	18	378
Corcondia (%)	71.579	71.274	60.108	89.508
$R_{Excitação}$	+0.895	+0.944	+0.812	+0.464
$R_{Emissão}$	+0.887	+0.878	+0.754	+0.771
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	-0.016 (0.052)	-0.002 (0.054)	0.012 (0.057)	0.041 (0.043)
b	1.722 (0.175)	1.687 (0.182)	1.648 (0.192)	1.575 (0.146)
$S_{y/x}$	0.067	0.070	0.074	0.056
R	0.9898	0.9886	0.9866	0.9915

* Ver rodapé da Tabela 5.7.

Estimativas do modelo mais adequado

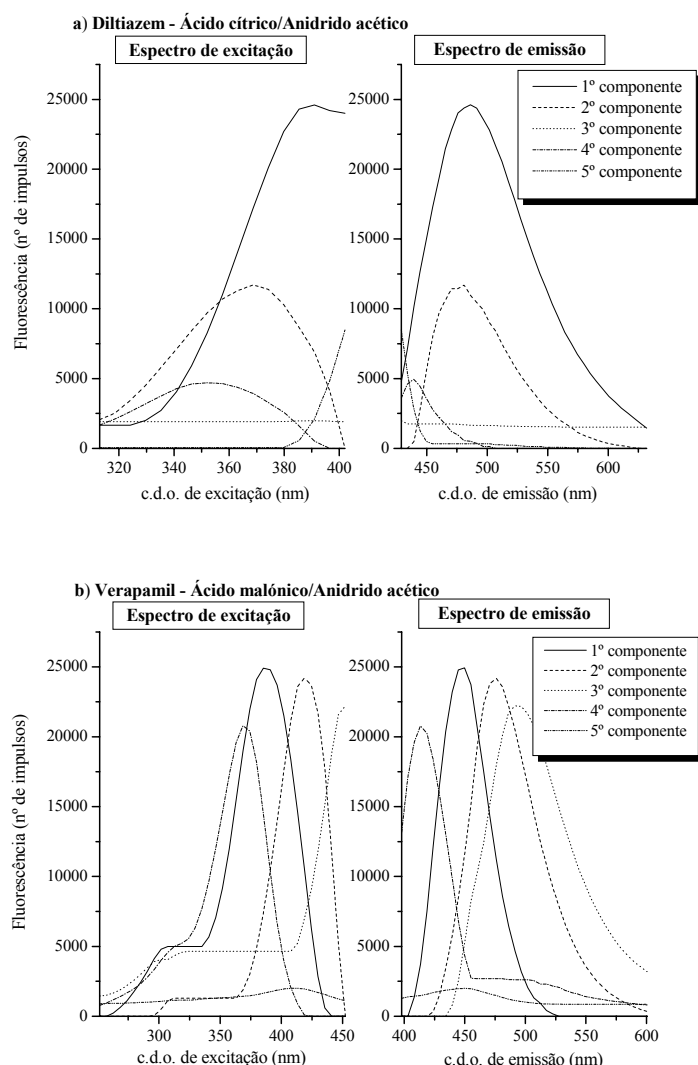


Fig. 8.8 – Espectros de excitação e de emissão estimados pelo modelo PARAFAC de 5 componentes, não negatividade nas três dimensões, unimodalidade na primeira e segunda dimensões e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC de 5 componentes sem restrições na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] do solvente etanol obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo a) Diltiazem e obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo b) Verapamil.

No ajuste da matriz de etanol, obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem, pelo modelo de PARAFAC de cinco componentes, o primeiro componente é o composto principal, o segundo e quarto componentes são o composto principal com máximo a c.d.o. diferentes considerados como composto secundário, o

terceiro componente é a linha de base e o quarto componente é a linha de base com início de fluorescência elevada.

No ajuste da matriz de etanol, obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil, pelo modelo de PARAFAC de cinco componentes, o primeiro componente é o composto principal, o segundo, terceiro e quarto componente são o composto principal com máximo a c.d.o. diferentes considerados como composto secundário e o quinto componente é a linha de base.

Padrão

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 8.12 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC, de um a oito componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por TLD na análise da matriz do padrão de Diltiazem 0.300 ppm obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético e Verapamil 0.303 ppm obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético.

Como se pode verificar na Tabela 8.12, por validação cruzada, para a matriz do padrão de Diltiazem obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético, as menores diferenças de valores de ajuste foram encontradas para os modelos de cinco a sete componentes. De entre estes, o modelo de seis componentes além de um número de iterações baixo apresenta também um teste de consistência válido de maior valor. É de notar que o modelo de cinco componente apresenta um teste de consistência válido menor e um número de iterações maior.

Para a matriz do padrão de Verapamil obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético, excepto com o modelo de um componente com uma menor diferença de valores de ajuste do modelo, foram verificadas para todos os outros modelos diferenças de ajuste próximas entre si. Excepto com os modelos de um e dois componentes, o modelo de cinco componentes apresenta um número de iterações ainda baixo e um teste de consistência válido maior. É de notar que o modelo de seis componente apresenta também um teste de consistência válido menor e um número de iterações maior.

Na análise da matriz de padrão de Diltiazem obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético o modelo de seis componentes e na análise da matriz de padrão de Verapamil obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético o modelo de cinco

componentes parecem ser os mais adequados. Um modelo entre cinco e seis componentes parece ser o mais adequado na análise de matrizes de padrão de Diltiazem ou Verapamil obtidas por reacção de um ácido orgânico com anidrido acético.

Tabela 8.12 – Validação cruzada do modelo PARAFAC, de 1 a 8 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por TLD na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] do padrão de Diltiazem 0.300 ppm por reacção de ácido cítrico com anidrido acético e de Verapamil 0.303 ppm por reacção de ácido malónico com anidrido acético. São apresentados a diferença dos ajustes obtidos por validação cruzada entre os modelos na análise da matriz segmentada e total, o número de iterações e o valor do teste de consistência do núcleo (corcondia).

	Número de componentes							
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete	Oito
Reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem								
Número de Iterações	3	2	478	1072	2500	900	2500	2500
Corcondia	100	100	72.220	3.595	45.087	80.926	0.810	1.393
$\Delta_{AjMS-AjMT}$	-0.004	-0.004	-0.007	-0.002	-8×10^{-4}	-9×10^{-4}	-9×10^{-4}	-0.001
Reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil								
Número de Iterações	3	2	190	868	1114	2500	2500	2500
Corcondia	100	100	24.685	2.320	98.088	33.891	5.400	-0.674
$\Delta_{AjMS-AjMT}$	-0.002	-0.005	-0.008	-0.009	-0.009	-0.008	-0.006	-0.007

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 8.13 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC na análise da matriz tridimensional do padrão de Diltiazem 0.300 ppm por reacção de ácido cítrico com anidrido acético. Na Tabela 8.13 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições. Na Tabela 8.13 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como é possível verificar na Tabela 8.13 a) e b), as estimativas de concentração encontram-se abaixo do esperado com recuperações entre 85 e 90 %. As estimativas de concentração mais próxima do esperado, são encontradas para o modelo de dois componentes e não negatividade nas três dimensões, com uma concentração de 0.271 ppm e, para o modelo de cinco componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e ortogonalidade na segunda dimensão, com uma concentração de 0.269 ppm. Uma estimativa de concentração próxima a encontrada com os modelos anteriores, com uma concentração de 0.265 ppm, é também obtida com o modelo de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e matriz normalizada na primeira dimensão. São

encontrados para estes modelos testes de consistência do núcleo válidos elevados e um número iterações baixo. Com os modelos com cinco componentes são também encontradas percentagens de ajuste do modelo mais altas.

De entre estes três modelos é, com o modelo de dois componentes que é encontrada a melhor estimativa do componente principal na dimensão do espectro de emissão, com o modelo de cinco componentes e ortogonalidade na segunda dimensão que é encontrada a melhor estimativa na dimensão do espectro de excitação e, com modelo de cinco componentes e matriz normalizada na primeira dimensão do componente principal que é encontrada a melhor estimativa na dimensão da concentração.

De entre os modelos de cinco componentes, com maior percentagem de ajuste do modelo, é encontrado para o componente principal com o modelo de cinco componentes e ortogonalidade na segunda dimensão uma melhor estimativa na dimensão do espectro de excitação, estimativas próximas na dimensão do espectro de emissão e uma pior estimativa na dimensão da concentração. É de referir ainda que, com o modelo de cinco componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões, ortogonalidade na segunda dimensão são encontradas para outros componentes, que não o principal, piores estimativas.

Apesar da ligeiramente mais baixa estimativa de concentração assim como da ligeiramente pior estimativa do componente principal na dimensão do espectro de excitação, mas atendendo à avaliação prévia por validação cruzada e, tendo em atenção as piores estimativas obtidas com o modelo de cinco componentes e ortogonalidade na segunda dimensão, o modelo considerado mais adequado na análise da matriz do padrão de Diltiazem é o modelo de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e matriz normalizada na primeira dimensão.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado na análise da matriz de padrão obtida por reacção de ácido cítrico e anidrido acético catalizada pelo Diltiazem é, o modelo de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões, matriz normalizada na primeira dimensão e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC de cinco componentes sem restrições.

Tabela 8.13 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] de padrão de Diltiazem 0.300 ppm por reacção de ácido cítrico com anidrido acético com a) restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por PARAFAC sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) Não negatividade nas três dimensões

	Número de componentes				
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
C_{estimada} (ppm)	0.243 (0.045)	0.245 (0.045)	0.249 (0.050)	0.252 (0.049)	0.196 (0.052)
Recuperação (%)	80.943	81.496	83.053	83.807	65.157
LD (3S_{y/x}/b)	0.104	0.103	0.113	0.111	0.129
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	99.039	99.274	98.684	99.535	99.614
ssq_{resíduos}	8.855×10 ⁸	5.056×10 ⁷	1.663×10 ⁸	2.076×10 ⁷	1.431×10 ⁷
Iterações	144	722	2500 (máx.)	2500 (máx.)	2500 (máx.)
Corcondia (%)	71.910	8.646	18.641	86.831	-4.671
R_{Excitação}	+0.983	+0.978	+0.994	+0.945	+0.995
R_{Emissão}	+0.988	+0.987	+0.999	+0.957	+0.994
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.240 (0.026)	0.240 (0.026)	0.243 (0.028)	0.244 (0.028)	0.211 (0.036)
b	0.985 (0.088)	0.986 (0.088)	0.974 (0.095)	0.970 (0.093)	1.077 (0.120)
S_{y/x}	0.034	0.034	0.037	0.036	0.046
R	0.9921	0.9921	0.9905	0.9909	0.9878

b) não negatividade nas três dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	2 componentes	5 componentes (unimodalidade na primeira e segunda dimensões)	5 componentes (ortogonalidade na segunda dimensão)	5 componentes (matriz normalizada na primeira dimensão)
C_{estimada} (ppm)	0.271 (0.050)	0.260 (0.050)	0.269 (0.057)	0.265 (0.044)
Recuperação (%)	90.270	86.701	89.547	88.362
LD (3S_{y/x}/b)	0.109	0.111	0.123	0.097
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	96.686	97.943	98.412	100.000
ssq_{resíduos}	1.054×10 ⁹	4.060×10 ⁸	2.420×10 ⁸	0.251
Iterações	14	2500 (máx.)	224	752
Corcondia (%)	99.976	92.036	94.635	92.831
R_{Excitação}	+0.982	+0.873	+0.999	+0.764
R_{Emissão}	+0.995	+0.999	+0.986	+0.980
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.254 (0.026)	0.249 (0.027)	0.253 (0.030)	0.251 (0.024)
b	0.937 (0.088)	0.955 (0.091)	0.940 (0.100)	0.947 (0.080)
S_{y/x}	0.034	0.035	0.039	0.031
R	0.9912	0.9910	0.9888	0.9930

* Ver rodapé da Tabela 4.6.

Na Tabela 8.14 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC na análise da matriz tridimensional do padrão de Verapamil 0.303 ppm por reação de ácido malónico com anidrido acético. Na Tabela 8.14 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo PARAFAC sem restrições. Na Tabela 8.14 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como se pode ver na Tabela 8.14 a) e b), excepto para os modelos de três e seis componentes e não negatividade nas três dimensões, em que uma estimativa mais próxima do esperado é obtida com testes de consistência baixos, as estimativas mais próximas da concentração esperada com testes de consistência elevados são obtidas com os modelos apresentados na Tabela 8.14 b).

De entre estes modelos, o modelo que apresenta a estimativa de concentração mais próxima do esperado, com uma concentração de 0.300 ppm, é o modelo de cinco componentes, não negatividade na segunda e terceira dimensões e ortogonalidade na primeira dimensão. Para este modelo é encontrada uma percentagem de ajuste do modelo mais baixa e estimativas adequadas do componente principal nas três dimensões.

Os outros modelos que apresentam uma estimativa de concentração adequada, mas ligeiramente mais baixa, são o modelo de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e matriz normalizada na primeira e segunda dimensões, com uma concentração de 0.287 ppm e, o modelo de seis componentes, não negatividade nas três dimensões e matriz normalizada na primeira dimensão, com uma concentração de 0.293 ppm. Relativamente ao modelo que apresenta a melhor estimativa de concentração, estes dois modelos apresentam percentagens de ajuste do modelo mais elevadas, um valor teste de consistência mais alto com o modelo de cinco componentes e mais baixo com o de seis componentes e, excepto com o modelo de seis componentes na dimensão de concentração, piores estimativas do componente principal nas três dimensões.

Atendendo à melhor estimativa de concentração, e também à análise prévia por validação cruzada, o modelo mais adequado na análise da matriz de padrão de Verapamil é o modelo de cinco componentes, não negatividade na segunda e terceira dimensões e ortogonalidade na primeira dimensão.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado na análise da matriz de padrão obtida por reacção de ácido malónico e anidrido acético catalizada pelo Verapamil é, o modelo de PARAFAC de cinco componentes, não negatividade na segunda e terceira dimensões, ortogonalidade na primeira dimensão e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC de cinco componentes sem restrições.

Estimativas do modelo mais adequado

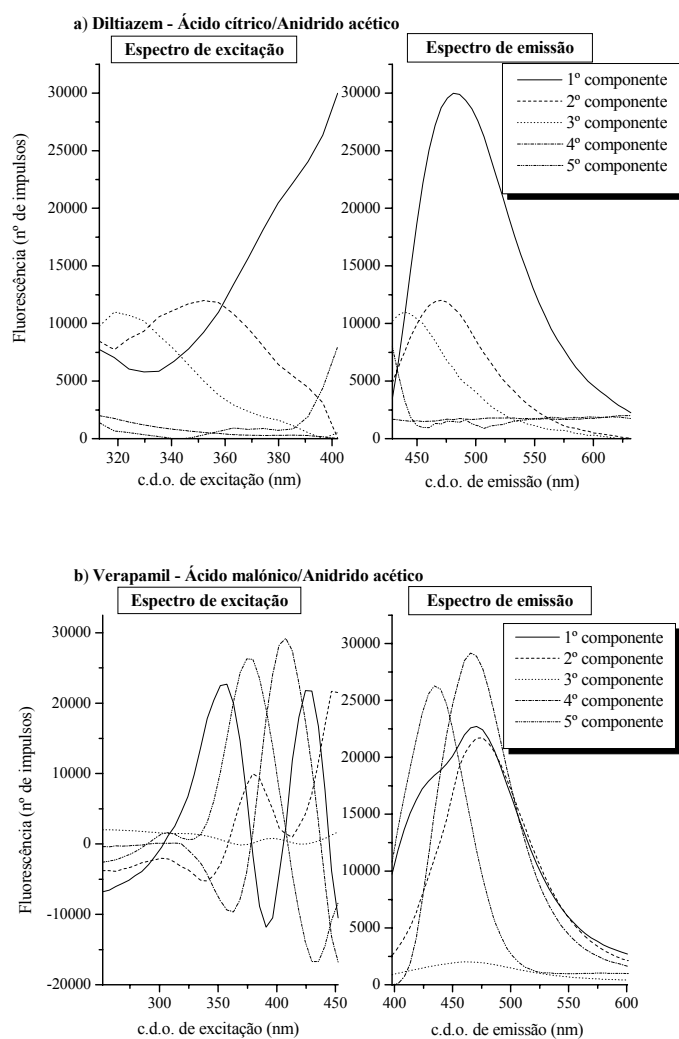


Fig. 8.9 – Espectros de excitação e de emissão estimados pelo modelo PARAFAC de 5 componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC 5 componentes sem restrições na análise da matriz [excitação × emissão × concentração]. As outras condições de ajuste utilizadas são, na análise da matriz do padrão de a) Diltiazem 0.300 ppm por reacção de ácido cítrico com anidrido acético a matriz normalizada na primeira dimensão e, na análise da matriz de padrão de b) Verapamil 0.303 ppm por reacção de ácido malónico com anidrido acético a ortogonalidade na primeira dimensão.

No ajuste da matriz de padrão de Diltiazem 0.300 ppm, obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético, pelo modelo de PARAFAC de cinco componentes, o primeiro componente é o composto principal, o segundo e terceiro componente são o composto principal com máximo a c.d.o. diferentes considerados como composto secundário, o terceiro componente é a linha de base com início de fluorescência elevada e o quarto componente é a linha de base.

No ajuste da matriz de padrão de Verapamil 0.303 ppm, obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil, pelo modelo de PARAFAC de cinco componentes, o primeiro, segundo e quinto componentes são o composto principal com máximo a c.d.o. diferentes considerados como composto secundário, o terceiro componente é a linha de base e o quarto componente é o composto principal.

Tabela 8.14 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] de padrão de Verapamil 0.303 ppm por reacção de ácido malónico com anidrido acético com a) restrição de não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por PARAFAC sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) Não negatividade nas três dimensões					
	Número de componentes				
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
C_{estimada} (ppm)	0.280 (0.044)	0.268 (0.047)	0.243 (0.052)	0.311 (0.091)	0.264 (0.098)
Recuperação (%)	92.295	88.292	80.095	102.692	86.988
LD (3S_{y/x}/b)	0.095	0.102	0.118	0.186	0.215
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	93.938	96.536	97.198	97.882	98.297
ssq_{resíduos}	2.407×10 ⁹	7.861×10 ⁸	5.145×10 ⁸	2.938×10 ⁸	1.900×10 ⁸
Iterações	246	364	360	1592	766
Corcondia (%)	32.932	26.894	92.618	2.455	-1.898
R_{Excitação}	+0.891	+0.877	+0.768	+0.271	+0.214
R_{Emissão}	+0.962	+0.911	+0.811	+0.414	+0.352
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.257 (0.022)	0.251 (0.025)	0.238 (0.030)	0.271 (0.042)	0.246 (0.052)
b	0.921 (0.075)	0.940 (0.083)	0.982 (0.100)	0.871 (0.139)	0.935 (0.173)
S_{y/x}	0.029	0.032	0.039	0.054	0.067
R	0.9934	0.9923	0.9898	0.9754	0.9674
b) não negatividade nas três dimensões e outras avaliações					
Outras avaliações					
	5 componentes (matriz ortogonalidade na primeira dimensão)	5 componentes (matriz normalizada na primeira dimensão)	5 componentes (matriz normalizada na primeira e segunda dimensões)	6 componentes (matriz normalizada na primeira dimensão)	
C_{estimada} (ppm)	0.300 (0.042)	0.282 (0.057)	0.287 (0.075)	0.293 (0.020)	
Recuperação (%)	98.928	93.214	94.781	96.651	
LD (3S_{y/x}/b)	0.087	0.122	0.158	0.042	
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	96.102	100.000	100.000	100.000	
ssq_{resíduos}	9.951×10 ⁸	14.283	7.251	9.854	
Iterações	252	968	760	668	
Corcondia (%)	84.951	97.104	96.131	70.703	
R_{Excitação}	+0.576	+0.458	+0.555	+0.503	
R_{Emissão}	+0.972	+0.803	+0.627	+0.876	
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.267 (0.020)	0.259 (0.029)	0.261 (0.037)	0.264 (0.010)	
b	0.890 (0.066)	0.916 (0.096)	0.907 (0.123)	0.901 (0.033)	
S_{y/x}	0.026	0.037	0.048	0.013	
R	0.9945	0.9892	0.9821	0.9987	

* Ver rodapé da Tabela 5.7.

Formulações Farmacêuticas

Para todas as formulações farmacêuticas foram analisadas as matrizes [excitação × emissão × concentração] pelo modelo PARAFAC de cinco componentes, não negatividade nas três dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC de cinco componentes sem restrições. Análises com outras condições de ajuste do modelo se consideradas mais adequadas foram efectuadas.

Na Tabela 8.15 são apresentadas as condições de ajuste do modelo PARAFAC consideradas mais adequadas na análise das matrizes obtidas com cada amostra analisada.

Como é possível verificar pela Tabela 8.15, as estimativas mais adequadas foram encontradas para a maioria das amostras com condições de ajuste diferentes das inicialmente consideradas. As outras condições de ajuste utilizadas foram, um número de componentes diferente, a restrição de unimodilidade na primeira, segunda ou na primeira e segunda dimensão, a restrição de ortogonalidade na primeira ou na primeira e segunda dimensão e a normalização da matriz na primeira dimensão.

Na quantificação das amostras de Diltiazem por reacção de ácido cítrico com anidrido acético, para a maioria das formulações farmacêuticas, as estimativas mais adequadas são encontradas com condições de ajuste do modelo idênticas na análise das amostras não fortificadas e fortificadas. As estimativas mais adequadas, excepto para a amostra fortificada DtapFo, são obtidas com um número de componentes entre três e cinco. Para as formulações Ba90re, Dt60co, Di120me e He120sr o mesmo tipo de condições de ajuste é considerado adequado na análise das amostras não fortificada e fortificada. Para as formulações Df60co, Dtap, Di60me e He60co as estimativas mais adequadas são obtidas unicamente com um número de componentes diferentes e sempre menor com as amostras fortificadas. Só para a formulação Al60co, são utilizadas outras condições de ajuste diferentes que não o número de componentes. Com esta formulação, as estimativas mais adequadas são obtidas com não negatividade nas três dimensões na análise dos dois tipos de amostras e, ainda para a amostra não fortificada, com normalização prévia da matriz na primeira dimensão.

Na quantificação das amostras de Verapamil por reacção de ácido malónico com anidrido acético, para a maioria das formulações farmacêuticas, as estimativas mais adequadas são encontradas com condições de ajuste do modelo diferentes na análise das amostras não fortificadas e fortificadas. As estimativas mais adequadas são obtidas com um número de componentes entre cinco e seis. Com todas as formulações o mesmo número de componentes é considerado adequado na obtenção das estimativas mais adequadas com os dois tipos de amostra. Para as formulações Isinj e Isret, condições de ajuste idênticas e, para as formulações Ve40ra, Is40co e Ishta, condições de ajuste diferentes, são consideradas adequadas na análise das amostras não fortificadas e fortificadas.

Na quantificação pelo modelo PARAFAC das amostras de Verapamil por reacção de ácido malónico com anidrido acético e, ao contrário do que acontece na quantificação pelo modelo PARAFAC das amostras de Diltiazem por reacção de ácido cítrico com anidrido acético, a restrição de ortogonalidade permite a obtenção de estimativas de concentração mais adequadas com algumas amostras.

Tabela 8.15 – Condições de ajuste do modelo PARAFAC utilizadas na análise das matrizes obtidas com as amostras não fortificadas e fortificadas de Diltiazem por reacção de ácido cítrico com anidrido acético e de Verapamil por reacção de ácido malónico com anidrido acético.

Matriz analisada	Condições de ajuste			Amostras analisadas
	Número de componentes	Restrições	Estimativas iniciais	
Amostras de Diltiazem obtidas por reacção de ácido cítrico com anidrido acético				
Excitação × emissão × concentração	Três	Não negatividade nas três dimensões	PARAFAC sem restrições	Di60meFo e Al60coFo
	Quatro			Di60me
	Cinco			He120sr e He120srFo
	Dois	Não negatividade nas três dimensões e unimodalidade na segunda dimensão		DtapFo
	Três			Dtap
	Cinco			Ba90re e Ba90reFo
	Três	Não negatividade nas três dimensões e unimodalidade na primeira e segunda dimensões		Df60coFo
	Quatro			Df60co
	Cinco			Dt60co e Dt60coFo
	Matriz normalizada na primeira dimensão			
Três	Não negatividade nas três dimensões	PARAFAC sem restrições	Al60co, Di120me e Di120meFo	
Quatro			He60coFo	
Cinco			He60co	

(Continua)

Tabela 8.15 (Continuação)

Matriz analisada	Condições de ajuste			Amostras analisadas
	Número de componentes	Restrições	Estimativas iniciais	
Amostras de Verapamil obtidas por reacção de ácido cítrico com anidrido acético				
Excitação × emissão × concentração	Cinco	Não negatividade nas três dimensões	PARAFAC sem restrições	Isinj, IsinjFo e Is40co
	Cinco	Não negatividade nas três dimensões e unimodalidade na primeira dimensão		IshtaFo
	Cinco	Não negatividade nas três dimensões e unimodalidade na primeira e segunda dimensões		Ve40raFo
	Seis	Não negatividade nas três dimensões e ortogonalidade na primeira e segunda dimensões		Isret e IsretFo
	Cinco	Não negatividade nas três dimensões e ortogonalidade na primeira dimensão		Ve40ra
	Cinco	Não negatividade nas três dimensões e ortogonalidade na primeira e segunda dimensões		Is40coFo
	Matriz normalizada na primeira dimensão			
Cinco	Não negatividade nas três dimensões	PARAFAC sem restrições	Ishta	

Na Tabela 8.16 são apresentados os resultados da análise pelo modelo PARAFAC das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas de Diltiazem por reacção do ácido cítrico com anidrido acético.

Para a maioria das amostras são obtidos ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.990. Para a maioria das formulações são encontrados com as amostras fortificadas ajustes lineares com coeficientes de correlação inferiores aos encontrados com as amostras não fortificadas. Para a maioria das amostras, são encontrados desvios padrão relativos de ordem de grandeza superior a 10 %. As exceções, são as amostras não fortificadas Dt60co, Dtap, Di120me e He60co e as amostras fortificadas He60coFo e He120srFo. Para as amostras com um ajuste com um coeficiente de correlação linear mais baixo (Di60me, Df60coFo, DtapFo e Di120meFo) são mesmo encontrados desvios padrão relativos superiores a 20 %.

É possível verificar pelas Tabelas 8.16 a) e b) que, para todas as amostras não fortificadas e fortificadas são encontradas recuperações próximas de 100 %. Para todas as formulações farmacêuticas são também encontradas recuperações de fortificação próximas de 100 %. As únicas exceções verificam-se, para a formulação Al60co com uma recuperação de fortificação inferior a 90 % e, para a formulação Ba90re com uma

recuperação de fortificação superior a 110 %. Para a maioria das análises efectuadas são obtidos testes de consistência do núcleo entre 60 e 90 %. Para as amostras não fortificadas Di60me e He60co são encontrados os valores de teste de consistência do núcleo mais baixos. Para a primeira amostra o ajuste do modelo com quatro componentes e para a segunda o ajuste do modelo com cinco componentes e pré processamento da matriz indicam alguma dificuldade no ajuste.

Para a maioria das amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas das dosagens estimadas por HPLC-UV. Para todas as amostras são encontrados erros de previsão inferiores a 10 %. Os erros de previsão encontrados variam desde 0.8 a 9 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Dt60co e o mais alto para a amostra Ba90re. Na avaliação da quantificação por este modelo com todas as amostras não fortificadas é obtido um valor de EPM de 4.226 %, de EPT de 5.931 % e de RMSEP de 5.843.

É de notar que, com condições de ajuste diferentes e com testes de consistência válidos, são obtidas para algumas amostras estimativas de dosagem mais próximas do esperado. É obtida uma estimativa de dosagem adequada, para a amostra Ba90re, sem restrição de unimodilidade na segunda dimensão, para a amostra He60co, com um número maior de componentes, sem processamento prévio de matriz e com aplicação de restrição de unimodilidade na primeira e na segunda dimensões e, para amostra He120sr, com aplicação de restrição de unimodilidade na primeira e na segunda dimensões.

Como seria de esperar atendendo ao já avaliado por análise preliminar são encontradas estimativas de concentração adequadas. Relativamente às estimativas obtidas por análise directa são também encontradas com a maioria das amostras melhores estimativas de concentração.

Tabela 8.16 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas de Diltiazem por reacção do ácido cítrico com anidrido acético obtidas pelo modelo PARAFAC.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Al60co	Df60co	Ba90re	Dt60co	Dtap
$C_{estimada}$ (ppm)	0.277 (0.048)	0.296 (0.041)	0.298 (0.044)	0.289 (0.026)	0.278 (0.021)
$C_{esperada}$ (ppm)	0.301	0.300	0.300	0.301	0.300
Recuperação (%)	92.268	98.470	99.053	95.932	92.693
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.104	0.085	0.092	0.054	0.045
$DOS_{estimada}$ (mg)	55.286	59.122	89.286	57.625	185.333
$DOS_{estimada}$ HPLC (mg)	54.645	57.019	81.617	57.184	198.360
EP (%)	1.173	3.688	9.396	0.771	6.567
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	100.000	98.755	99.325	99.417	98.425
$ssq_{resíduos}$	3.489	1.160×10^8	3.313×10^7	1.405×10^7	9.134×10^7
Iterações	118	122	2500 (máx.)	882	54
Corcondia (%)	56.223	79.930	78.430	85.428	73.731
$R_{Excitação}$	+0.962	+0.991	+0.998	+0.996	+0.975
$R_{Emissão}$	+0.997	+0.984	+0.649	+0.989	+0.987
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	0.256 (0.025)	0.266 (0.020)	0.267 (0.021)	0.263 (0.013)	0.258 (0.011)
b	0.922 (0.082)	0.899 (0.066)	0.896 (0.071)	0.910 (0.043)	0.927 (0.036)
$S_{y/x}$	0.032	0.025	0.027	0.016	0.014
R	0.9922	0.9947	0.9938	0.9978	0.9985

a) amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Di60me	Di120me	He60co	He120sr
$C_{estimada}$ (ppm)	0.273 (0.156)	0.306 (0.007)	0.279 (0.018)	0.268 (0.035)
$C_{esperada}$ (ppm)	0.301	0.301	0.301	0.301
Recuperação (%)	90.690	101.645	92.788	89.129
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.338	0.014	0.038	0.077
$DOS_{estimada}$ (mg)	54.509	122.161	55.682	106.907
$DOS_{estimada}$ HPLC (mg)	57.689	115.152	54.870	110.619
EP (%)	5.512	6.087	1.480	3.356
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	99.303	100.000	100.000	98.393
$ssq_{resíduos}$	3.817×10^7	2.639	0.825	1.572×10^8
Iterações	18	84	394	1040
Corcondia (%)	26.083	60.841	43.914	81.377
$R_{Excitação}$	+0.929	+0.954	+0.743	+0.917
$R_{Emissão}$	+0.981	+0.991	+0.937	+0.982
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)				
a	0.252 (0.080)	0.270 (0.003)	0.258 (0.008)	0.253 (0.019)
b	0.926 (0.271)	0.885 (0.011)	0.925 (0.031)	0.943 (0.063)
$S_{y/x}$	0.102	0.004	0.012	0.024
R	0.9240	0.9998	0.9989	0.9956

(Continua)

Tabela 8.16 (Continuação)

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Al60coFo	Df60coFo	Ba90reFo	Dt60coFo	DtapFo
$C_{\text{estimada total}}$ (ppm)	0.361 (0.052)	0.405 (0.101)	0.411 (0.072)	0.388 (0.070)	0.373 (0.111)
$C_{\text{esperada total}}$ (ppm)	0.402	0.401	0.401	0.402	0.402
Recuperação (%)	89.961	101.066	102.348	96.491	92.992
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.097	0.177	0.125	0.126	0.204
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	98.490	98.897	99.364	99.390	95.076
$SSQ_{\text{resíduos}}$	9.340×10^7	6.514×10^7	2.266×10^7	2.130×10^7	1.316×10^9
Iterações	132	86	2500 (máx.)	2170	2
Corcondia (%)	88.724	88.970	89.221	89.648	100.000
$R_{\text{Excitação}}$	+0.981	+0.959	+0.999	+0.829	+0.957
$R_{\text{Emissão}}$	+0.982	+0.977	+0.933	+0.930	+0.974
Fortificação ($C_{\text{estimada amostra fortificada}} - C_{\text{estimada amostra não fortificada}}$)					
C_{estimada} (ppm)	0.084	0.109	0.113	0.099	0.095
C_{esperada} (ppm)	0.100	0.100	0.100	0.100	0.101
Recuperação (%)	84.000	109.000	113.000	99.000	94.059
$\Delta = C_{\text{estimada}} - C_{\text{esperada}}$	-0.016	+0.009	+0.013	-0.001	-0.006
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	0.292 (0.020)	0.307 (0.034)	0.308 (0.024)	0.301 (0.025)	0.296 (0.042)
b	0.809 (0.028)	0.756 (0.116)	0.751 (0.081)	0.777 (0.085)	0.792 (0.140)
$S_{y/x}$	0.026	0.045	0.031	0.033	0.054
R	0.9931	0.9773	0.9886	0.9883	0.9702
b) amostras fortificadas (continuação)					
Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Di60meFo	Di120meFo	He60coFo	He120srFo	
$C_{\text{estimada total}}$ (ppm)	0.374 (0.039)	0.400 (0.226)	0.379 (0.012)	0.365 (0.019)	
$C_{\text{esperada total}}$ (ppm)	0.402	0.402	0.401	0.402	
Recuperação (%)	93.031	99.628	94.350	90.810	
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.072	0.399	0.022	0.035	
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	98.462	100.000	100.000	99.136	
$SSQ_{\text{resíduos}}$	2.819×10^8	5.136	0.799	4.879×10^7	
Iterações	74	210	360	168	
Corcondia (%)	78.112	64.340	62.278	63.866	
$R_{\text{Excitação}}$	+0.995	+0.954	+0.872	+0.987	
$R_{\text{Emissão}}$	+0.999	+0.995	+0.961	+0.980	
Fortificação ($C_{\text{estimada amostra fortificada}} - C_{\text{estimada amostra não fortificada}}$)					
C_{estimada} (ppm)	0.101	0.094	0.100	0.097	
C_{esperada} (ppm)	0.101	0.100	0.100	0.101	
Recuperação (%)	100.000	94.000	100.000	96.040	
$\Delta = C_{\text{estimada}} - C_{\text{esperada}}$	0	-0.006	0	-0.004	
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	0.297 (0.015)	0.302 (0.078)	0.298 (0.004)	0.294 (0.007)	
b	0.794 (0.015)	0.756 (0.261)	0.788 (0.015)	0.805 (0.025)	
$S_{y/x}$	0.019	0.101	0.006	0.010	
R	0.9961	0.8984	0.9996	0.9991	

* máx. – corresponde à indicação de que o número máximo de iterações definido no ajuste do modelo foi atingido; A dosagem é dada em massa de composto por comprimido; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

Na Tabela 8.17 são apresentados os resultados da análise pelo modelo PARAFAC das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas de Verapamil por reação do ácido malônico com anidrido acético.

Para a maioria das amostras são obtidos ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.990. As exceções verificam-se para as amostras não fortificadas Isinj, Is40co e fortificada Ve40raFo. Para a maioria das amostras, são encontrados desvios padrão relativos de ordem de grandeza superior a 10 %. As exceções são encontradas para as amostras não fortificadas Isret e Ishta e fortificada Is40co. Para as amostras com um coeficiente de correlação linear mais baixo são mesmo encontrados desvios padrão relativos superiores a 20 %.

É possível verificar pelas Tabelas 8.17 a) e b) que, para todas as amostras não fortificadas e fortificadas, são encontradas recuperações próximas de 100 %. Para todas as formulações farmacêuticas são também encontradas recuperações de fortificação próximas de 100 %. Para a maioria das análises efectuadas são obtidos testes de consistência do núcleo superiores a 90 %. A única exceção verifica-se para amostra Ishta com normalização da matriz na primeira dimensão o que indica alguma dificuldade no ajuste.

Para a maioria das amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas da dosagem estimada por HPLC-UV. Para todas as amostras são encontrados erros de previsão inferiores a 10 %. Os erros de previsão encontrados variam desde 0.03 a 6 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Is40co e o mais alto para a amostra Ve40ra. Na avaliação da quantificação por este modelo com todas as amostras não fortificadas é obtido um valor de EPM de 2.760 %, de EPT de 3.324 % e de RMSEP de 3.761.

É de notar ainda que, com condições de ajuste diferentes e com testes de consistência válidos, são obtidas estimativas de dosagem mais próxima do esperado para algumas amostras. É obtida uma estimativa de dosagem adequada, para a amostra Isinj, com unimodalidade na primeira dimensão, para a amostra Ishta, com matriz normalizada na primeira e segunda dimensões e, para a amostra Isret, com cinco componentes e matriz normalizada na primeira e segunda dimensões.

Como também seria de esperar atendendo ao já avaliado por análise preliminar são encontradas estimativas de concentração adequadas. Relativamente às estimativas obtidas

por análise directa são também encontradas com a maioria das amostras melhores estimativas de concentração.

Tabela 8.17 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas de Verapamil por reacção do ácido malónico com anidrido acético obtidas pelo modelo PARAFAC.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Ve40ra	Isinj	Is40co	Isret	Ishta
C_{estimada} (ppm)	0.276 (0.047)	0.287 (0.107)	0.281 (0.102)	0.272 (0.010)	0.286 (0.023)
C_{esperada} (ppm)	0.301	0.300	0.301	0.301	0.301
Recuperação (%)	91.982	95.717	93.432	90.555	95.300
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.101	0.227	0.218	0.021	0.049
DOS_{estimada} (mg)	36.730	4.783	37.373	108.634	228.415
$DOS_{\text{estimada HPLC}}$ (mg)	38.979	4.679	37.362	111.183	220.724
EP (%)	5.770	2.223	0.029	2.293	3.484
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	94.942	98.153	97.907	98.081	99.999
$SSQ_{\text{resíduos}}$	2.017×10^9	1.806×10^8	3.282×10^8	1.711×10^8	19.293
Iterações	406	1618	398	1814	390
Corcondia (%)	94.942	97.835	97.580	96.996	59.202
$R_{\text{Excitação}}$	+0.690	+0.786	+0.965	+0.933	+0.145
$R_{\text{Emissão}}$	+0.987	+0.984	+0.851	+0.953	+0.755
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	0.257 (0.024)	0.261 (0.053)	0.258 (0.052)	0.255 (0.005)	0.262 (0.012)
b	0.930 (0.082)	0.908 (0.178)	0.919 (0.174)	0.938 (0.017)	0.913 (0.039)
$S_{y/x}$	0.031	0.069	0.067	0.007	0.015
R	0.9924	0.9637	0.9660	0.9997	0.9982

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Ve40raFo	IsinjFo	Is40coFo	IsretFo	IshtaFo
C_{estimada} (ppm)	0.380 (0.108)	0.394 (0.067)	0.382 (0.005)	0.368 (0.062)	0.388 (0.061)
C_{esperada} (ppm)	0.403	0.401	0.401	0.402	0.403
Recuperação (%)	94.366	98.039	95.245	91.630	96.194
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.197	0.119	0.009	0.115	0.110
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	97.953	98.877	96.541	97.872	95.144
$SSQ_{\text{resíduos}}$	1.225×10^8	1.141×10^8	8.485×10^8	1.767×10^8	5.396×10^8
Iterações	1264	2500 (máx.)	20	604	556
Corcondia (%)	99.012	99.802	98.911	94.371	90.790
$R_{\text{Excitação}}$	+0.917	+0.514	+0.852	+0.838	+0.898
$R_{\text{Emissão}}$	+0.904	+0.881	+0.901	+0.801	+0.737
Fortificação ($C_{\text{estimada amostra fortificada}} - C_{\text{estimada amostra não fortificada}}$)					
C_{estimada} (ppm)	0.104	0.107	0.101	0.096	0.102
C_{esperada} (ppm)	0.101	0.101	0.101	0.101	0.102
Recuperação (%)	102.970	105.941	100.000	95.050	100.000
$\Delta = C_{\text{estimada}} - C_{\text{esperada}}$	+0.003	+0.006	0	-0.005	0
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	0.298 (0.040)	0.303 (0.023)	0.299 (0.002)	0.295 (0.024)	0.302 (0.022)
b	0.784 (0.133)	0.770 (0.029)	0.784 (0.006)	0.800 (0.079)	0.777 (0.074)
$S_{y/x}$	0.051	0.030	0.002	0.031	0.028
R	0.9722	0.9896	0.9999	0.9903	0.9910

* Ver rodapé da Tabela 8.16.

8.4.2.2 – PARAFAC2

No ajuste pelo modelo PARAFAC2 foram utilizadas de uma forma geral as matrizes tridimensionais [emissão × excitação × concentração] ($40 \times 17 \times 4$) para o Diltiazem por reacção do ácido cítrico com anidrido acético e ($40 \times 37 \times 4$) para o Verapamil por reacção do ácido malónico com anidrido acético. As condições geralmente utilizadas para o ajuste foram a aplicação de restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD.

Solvente

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 8.18 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC2, de um a oito componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SVD na análise da matriz tridimensional do solvente etanol obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem e por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil.

Como se pode verificar na Tabela 8.18, por validação cruzada, as menores diferenças de ajuste entre o modelo segmentado e total foram encontradas nos modelos até quatro componentes, na análise matriz de etanol obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem e, até três componentes, na análise matriz de etanol obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil. Na análise dos dois tipos de matrizes de padrão só para os modelos de um e dois componentes foi encontrado um número de iterações baixo.

Na análise da matriz de etanol obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem para o modelo de quatro componentes associado a uma ainda baixa diferença de ajuste é obtida uma maior percentagem de ajuste do modelo.

Na análise da matriz de etanol obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil para o modelo de três componentes associada a uma ainda baixa diferença de ajuste é obtida uma menor percentagem de ajuste do modelo. Com uma percentagem de ajuste do modelo mais alta é para o modelo de cinco componentes que é obtida a menor diferença de ajuste.

Na análise da matriz de etanol obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem o modelo de quatro componentes parece ser o mais adequado. Na análise da matriz de etanol obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil o modelo de três componentes ou, apesar da maior diferença de ajuste do modelo mas com uma maior percentagem de ajuste do modelo, o modelo de cinco componentes parecem ser os mais adequados.

Tabela 8.18 – Validação cruzada do Modelo PARAFAC2, de 1 a 8 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] de etanol por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem e por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizado pelo Verapamil. São apresentados os ajustes obtidos na análise da matriz segmentada e na matriz total, diferença de ajustes e o número de iterações necessários.

	Número de componentes							
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete	Oito
Reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem								
Número de Iterações	2	1213	2000	2000	2000	2000	2000	2000
AjMS (%)	87.737	91.187	92.730	97.521	92.103	81.416	73.875	64.481
AjMT (%)	88.092	93.094	95.401	98.974	99.239	99.439	99.509	99.525
$\Delta_{AjMS-AjMT}$	-0.455	-1.907	-2.671	-1.453	-7.135	-18.024	-25.634	-35.044
Reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil								
Número de Iterações	2	116	2000	2000	2000	2000	2000	2000
AjMS (%)	67.977	86.812	94.427	76.568	81.026	58.455	70.704	30.005
AjMT (%)	68.023	86.982	94.937	96.512	97.536	98.227	98.797	99.130
$\Delta_{AjMS-AjMT}$	-0.045	-0.170	-0.510	-19.944	-16.510	-39.772	-28.094	-69.125

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 8.19 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC2 na análise da matriz tridimensional do solvente etanol obtida por reacção de ácido cítrico e anidrido acético catalizada pelo Diltiazem. Na Tabela 8.19 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas obtidas por SVD. Na Tabela 8.19 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC2, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como se pode ver na Tabela 8.19 a) e b) as estimativas de concentração mais próximas de zero são encontradas com os modelos da Tabela 8.19 b). A estimativa de concentração mais próxima de zero, com uma concentração estimada de -0.002 ppm, é encontrada com o modelo de três componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões na análise da matriz [concentração × emissão × excitação]. É também com o modelo de quatro

componentes e com as mesmas condições de ajuste que é encontrada a estimativa de valor positivo mais próxima de zero, com uma estimativa de 0.003 ppm. Os outros dois modelos apresentados na Tabela 8.19 b), na análise de outro tipo de matrizes e com estimativas iniciais diferentes, apresentam também estimativas de concentração positivas mas ligeiramente superiores à encontrada com o modelo de quatro componentes na análise da matriz [concentração × emissão × excitação].

De entre os modelos da Tabela 8.19 b), que apresentam estimativas de concentração adequadas, é com o modelo de quatro componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões na análise da matriz [concentração × emissão × excitação] que é obtida a maior percentagem de ajuste do modelo. Também são encontradas por este modelo estimativas adequadas do componente principal nas três dimensões.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado na análise da matriz tridimensional de etanol obtida por reacção de ácido cítrico e anidrido acético catalizada pelo Diltiazem é, o modelo de quatro componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [concentração × emissão × excitação].

Tabela 8.19 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC2 na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] do solvente etanol por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem com a) restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões

Número de componentes					
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
C_{estimada} (ppm)	0.043 (0.031)	0.013 (0.027)	0.023 (0.028)	0.024 (0.031)	0.045 (0.033)
Recuperação (%)	---	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.107	0.101	0.104	0.114	0.116
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	95.404	98.950	99.234	99.441	99.494
ssq_{resíduos}	2.510×10 ⁸	1.310×10 ⁷	6.981×10 ⁶	3.715×10 ⁶	3.042×10 ⁶
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.882- +0.667	+0.495- +0.326	+0.606- +0.337	+0.984- +0.969	+0.984- +0.969
R_{Emissão}	+0.879- +0.922	+0.665- +0.714	+0.563- +0.690	+0.991- +0.989	+0.991- +0.989
	+0.917	+0.920	+0.915	+0.979	+0.979
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.065 (0.041)	0.022 (0.042)	0.037 (0.042)	0.039 (0.046)	0.068 (0.045)
b	1.506 (0.139)	1.624 (0.142)	1.583 (0.142)	1.577 (0.156)	1.499 (0.151)
S_{y/x}	0.054	0.055	0.055	0.060	0.058
R	0.9916	0.9925	0.9920	0.9904	0.9900

b) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e outras avaliações

Outras avaliações				
	4 componentes (estimativas iniciais por números aleatórios)	4 componentes (matriz exc.×emi.×conc.)	3 componentes (matriz conc.×emi.×exc.)	4 componentes (matriz conc.×emi.×exc.)
C_{estimada} (ppm)	0.006 (0.029)	0.009 (0.031)	-0.002 (0.031)	0.003 (0.031)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.111	0.118	0.121	0.120
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	97.268	99.029	99.260	99.497
ssq_{resíduos}	8.868×10 ⁷	1.120×10 ⁷	6.511×10 ⁶	3.004×10 ⁶
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.650 - +0.924 +0.903 - +0.908	+0.996	+0.993	+0.992
R_{Emissão}	+0.934	+0.702 - +0.746 +0.707 - +0.771	+0.916 (máx.)	+0.932 (máx.)
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.011 (0.047)	0.015 (0.050)	-0.003 (0.052)	0.004 (0.051)
b	1.651 (0.158)	1.638 (0.167)	1.685 (0.176)	1.666 (0.173)
S_{y/x}	0.061	0.064	0.068	0.067
R	0.9910	0.9898	0.9893	0.9894

* Ver rodapé da Tabela 5.13.

Na Tabela 8.20 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC2 na análise da matriz tridimensional do solvente etanol obtida por reacção de ácido malónico e anidrido acético catalizada pelo Verapamil. Na Tabela 8.20 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas obtidas por SVD. Na Tabela 8.20 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC2, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

É possível verificar na Tabela 8.20 b), que a estimativa de concentração mais próxima de zero, com uma concentração de -0.005 ppm, é encontrada com o modelo de quatro componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e unimodalidade na primeira dimensão na análise da matriz [emissão × excitação × concentração].

A estimativa de concentração de valor positivo mais próxima de zero, com uma concentração de 0.006 ppm, é obtida com o modelo de três componentes e não negatividade na primeira e terceira dimensões na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] e, com o modelo de quatro componentes e não negatividade na primeira e terceira dimensões na análise da matriz [concentração × emissão × excitação]. Com o modelo de quatro componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões na análise da matriz [concentração × emissão × excitação] é encontrada uma percentagem de ajuste do modelo mais elevada, uma ligeiramente pior estimativa na dimensão do espectro de excitação e uma melhor estimativa do componente principal na dimensão do espectro de emissão e de concentração.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado na avaliação da matriz tridimensional de etanol obtida por reacção de ácido malónico com o anidrido acético catalizada pelo Verapamil é, o modelo de quatro componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [concentração × emissão × excitação].

Tabela 8.20 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC2 na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] do solvente etanol por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil com a) restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões

Número de componentes					
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
C_{estimada} (ppm)	0.006 (0.028)	0.041 (0.028)	0.067 (0.034)	0.067 (0.028)	0.038 (0.028)
Recuperação (%)	---	---	---	---	---
LD (3S_{v/x}/b)	0.109	0.097	0.112	0.093	0.098
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	94.868	96.513	97.575	98.232	98.779
ssq_{resíduos}	9.752×10 ⁸	4.501×10 ⁸	2.178×10 ⁸	1.158×10 ⁸	5.522×10 ⁷
Iterações	1817	1591	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.753- +0.624	+0.949- +0.813	+0.796- +0.595	+0.912- +0.692	+0.941- +0.647
R_{Emissão}	+0.800- +0.815	+0.930- +0.926	+0.799- +0.805	+0.903- +0.887	+0.935- +0.935
	+0.770	+0.941	+0.825	+0.910	+0.759
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.009 (0.047)	0.063 (0.038)	0.096 (0.041)	0.096 (0.034)	0.058 (0.039)
b	1.659 (0.157)	1.518 (0.128)	1.425 (0.138)	1.426 (0.115)	1.532 (0.130)
s_{y/x}	0.060	0.049	0.053	0.044	0.050
R	0.9911	0.9929	0.9907	0.9935	0.9928

b) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e outras avaliações

Outras avaliações				
	4 componentes (unimodalidade na primeira dimensão)	4 componentes (matriz conc.×emi.×exc.)	4 componentes (matriz conc.×emi.×exc. e estimativas iniciais por números aleatórios)	6 componentes (matriz exc.×emi.×conc.)
C_{estimada} (ppm)	-0.005 (0.038)	0.006 (0.026)	0.010 (0.061)	0.011 (0.032)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{v/x}/b)	0.150	0.099	0.111	0.121
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	96.501	99.397	99.334	98.169
ssq_{resíduos}	4.532×10 ⁸	1.349×10 ⁷	1.643×10 ⁷	1.242×10 ⁸
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.852 - +0.904 +0.776 - +0.751	+0.715	+0.471	+0.566
R_{Emissão}	+0.967	+0.987 (máx.)	+0.751 (máx.)	+0.672 - +0.662 +0.691 - +0.686
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	-0.009 (0.066)	0.009 (0.042)	0.016 (0.047)	0.018 (0.051)
b	1.700 (0.222)	1.660 (0.143)	1.642 (0.158)	1.637 (0.172)
s_{y/x}	0.085	0.055	0.061	0.066
R	0.9834	0.9927	0.9909	0.9892

* Ver rodapé da Tabela 5.13.

Estimativas do modelo mais adequado

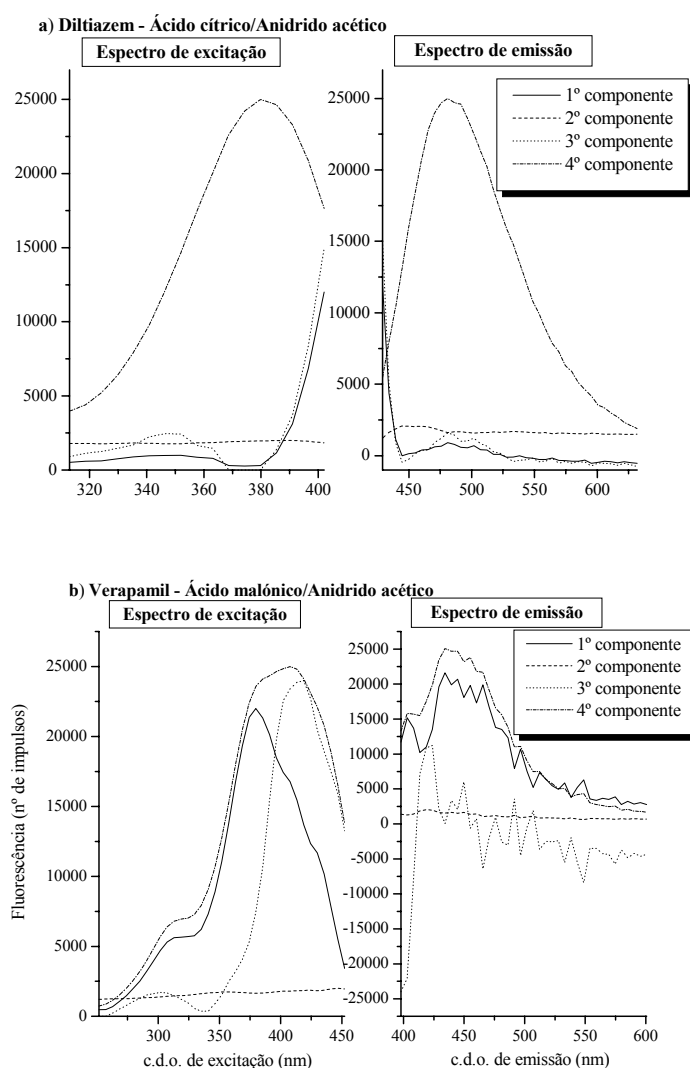


Fig. 8.10 – Espectros de excitação e de emissão estimados pelo modelo PARAFAC2 de 4 componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [concentração \times emissão \times excitação] do solvente etanol obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo a) Diltiazem e por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo b) Verapamil.

No ajuste da matriz de etanol, obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem, pelo modelo de PARAFAC2 de quatro componentes, o primeiro e terceiro componentes são a linha de base com início de fluorescência elevada, o segundo componente é a linha de base e o quarto componente é o composto principal.

No ajuste da matriz de etanol, obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil, pelo modelo de PARAFAC2 de quatro componentes, o

primeiro e terceiro componentes são o composto principal com máximo a c.d.o. diferentes considerados como composto secundário, o segundo componente é a linha de base e o quarto componente é o composto principal.

Padrão

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 8.21 são apresentados os resultados obtidos por validação cruzada do ajuste do modelo PARAFAC2, de um a oito componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SVD na análise da matriz tridimensional do padrão de Diltiazem 0.300 ppm obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético e Verapamil 0.303 ppm obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético.

Como é possível verificar na Tabela 8.21, por validação cruzada, as menores diferenças de ajuste foram encontradas nos modelos, até dois componentes, na análise matriz de padrão de Diltiazem obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético e, até três componentes, na análise matriz de padrão de Verapamil obtida reacção de ácido malónico com anidrido acético. Na análise dos dois tipos de matrizes de padrão, tal como na análise da matriz de etanol, só para os modelos de um e dois componentes se encontrou um número de iterações baixo.

Na análise da matriz de padrão de Diltiazem obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético, de entre os modelos com maiores percentagem de ajuste do modelo, é para o modelo de três componentes que é obtida a menor diferença de ajuste do modelo, enquanto que na análise da matriz de padrão de Verapamil obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético, aos modelos com maiores percentagens de ajuste do modelo estão associadas as mais elevadas diferenças de ajuste do modelo.

Na análise da matriz de padrão de Diltiazem obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético o modelo de dois componentes ou, apesar da maior diferença de ajuste do modelo mas com uma maior percentagem de ajuste do modelo, o modelo de três componentes parecem ser os mais adequados. Na análise da matriz de padrão de Verapamil obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético o modelo de três componentes parece ser o mais adequado.

Tabela 8.21 – Validação cruzada do Modelo PARAFAC2, de 1 a 8 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SVD na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] do padrão de Diltiazem 0.300 ppm por reação de ácido cítrico com anidrido acético e de Verapamil 0.303 ppm por reação de ácido malónico com anidrido acético. São apresentados os ajustes obtidos na análise da matriz segmentada e na matriz total, diferença de ajustes e o número de iterações necessários.

	Número de componentes							
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete	Oito
Reação de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem								
Número de Iterações	2	427	2000	2000	2000	2000	2000	2000
AjMS (%)	90.606	96.645	83.353	82.305	79.273	75.366	43.320	39.275
AjMT (%)	90.669	96.902	99.175	99.466	99.591	99.635	99.667	99.687
$\Delta_{AjMS-AjMT}$	-0.063	-0.257	-15.822	-17.161	-20.318	-24.269	-56.348	-60.412
Reação de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil								
Número de Iterações	2	296	2000	2000	2000	2000	2000	2000
AjMS (%)	69.333	88.357	95.667	46.697	33.244	31.167	48.297	11.170
AjMT (%)	69.360	88.451	96.046	97.679	98.346	98.659	99.044	99.229
$\Delta_{AjMS-AjMT}$	-0.027	-0.094	-0.379	-50.982	-65.111	-67.492	-50.747	-88.059

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 8.22 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC2 da matriz tridimensional do padrão de Diltiazem 0.300 ppm por reação de ácido cítrico com anidrido acético. Na Tabela 8.22 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas obtidas por SVD. Na Tabela 8.22 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC2, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Tal como se pode verificar na Tabela 8.22 a) e b), os modelos que apresentam as estimativas de concentração mais adequadas, com recuperações próximas de 100 %, são os modelos com as condições de ajuste apresentados na Tabela 8.22 b). A única exceção é encontrada, para o modelo de cinco componentes e não negatividade na primeira e terceira dimensões, com uma recuperação acima do esperado de 103 %.

A melhor estimativa de concentração, com uma concentração de 0.294 ppm, é obtida com o modelo de cinco componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC2 de cinco componentes sem restrições na análise da matriz [emissão × excitação × concentração]. Ainda, com uma estimativa de concentração de 0.282 ppm, é também obtida uma estimativa de concentração próxima à esperada para um modelo com as mesmas condições de ajuste na análise da matriz

[excitação × emissão × concentração]. Como previamente avaliado por validação cruzada são também obtidas com os modelos de três componentes apresentados na Tabela 8.22 b) estimativas de concentração próximas à esperada com concentrações de 0.272 e 0.277 ppm.

Os modelos de cinco componentes apresentam percentagens de ajuste do modelo ligeiramente superiores às obtidas com os modelos de três componentes. De entre os modelos de cinco componentes da Tabela 8.22 b), o modelo de cinco componentes na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] apresenta estimativas próximas do componente principal na dimensão do espectro de emissão e melhores estimativas do componente principal na dimensão do espectro de excitação e de concentração.

Apesar da pior estimativa na dimensão do espectro de excitação e de concentração, o modelo de cinco componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC2 de cinco componentes sem restrições na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] é considerado o mais adequado.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado na análise da matriz de padrão de Diltiazem 0.300 ppm obtida por reacção de ácido cítrico e anidrido acético é, o modelo de cinco componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC2 de cinco componentes sem restrições na análise da matriz [excitação × emissão × concentração].

Tabela 8.22 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC2 na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] de padrão de Diltiazem 0.300 ppm por reacção de ácido cítrico com anidrido acético com a) restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões

	Número de componentes				
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
C_{estimada} (ppm)	0.196 (0.048)	0.207 (0.045)	0.310 (0.052)	0.244 (0.044)	0.241 (0.052)
Recuperação (%)	65.204	68.769	103.082	81.355	80.377
LD (3S_{y/x}/b)	0.119	0.110	0.106	0.101	0.118
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	99.164	99.420	99.583	99.645	99.677
ssq_{resíduos}	6.711×10 ⁷	3.229×10 ⁷	1.670×10 ⁷	1.207×10 ⁷	1.002×10 ⁷
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.963- +0.935	+0.743- +0.622	+0.954- +0.966	+0.977- +0.984	+0.961- +0.950
	+0.967- +0.944	+0.650- +0.577	+0.977- +0.977	+0.991- +0.983	+0.962- +0.958
R_{Emissão}	+0.989	+0.995	+0.990	+0.980	+0.992
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.211 (0.033)	0.218 (0.030)	0.272 (0.024)	0.240 (0.026)	0.239 (0.030)
b	1.077 (0.111)	1.055 (0.100)	0.878 (0.081)	0.983 (0.086)	0.988 (0.101)
S_{y/x}	0.043	0.039	0.031	0.033	0.039
R	0.9896	0.9911	0.9916	0.9924	0.9897

b) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	3 componentes (estimativas iniciais por números aleatórios)	5 componentes (estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições)	3 componentes (matriz exc.×emi.×conc.)	5 componentes (matriz exc.×emi.×conc. e estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições)
C_{estimada} (ppm)	0.277 (0.013)	0.282 (0.025)	0.272 (0.048)	0.294 (0.051)
Recuperação (%)	92.284	93.992	90.499	97.971
LD (3S_{y/x}/b)	0.027	0.052	0.104	0.106
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.925	99.591	99.180	99.615
ssq_{resíduos}	1.108×10 ⁸	1.609×10 ⁷	6.456×10 ⁷	1.420×10 ⁷
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	1473	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.928 - +0.930	+0.984 - +0.897	+0.987	+0.706
	+0.961 - +0.987	+0.962 - +0.845		
R_{Emissão}	+0.992	+0.996	+0.989 - +0.990	+0.995 - +0.996
			+0.991 - +0.989	+0.994 - +0.994
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.257 (0.006)	0.260 (0.012)	0.254 (0.025)	0.265 (0.025)
b	0.928 (0.022)	0.920 (0.042)	0.936 (0.085)	0.901 (0.083)
S_{y/x}	0.008	0.016	0.033	0.032
R	0.9994	0.9980	0.9919	0.9916

* Ver rodapé da Tabela 4.6.

Na Tabela 8.23 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC2 na análise da matriz tridimensional do padrão de Verapamil 0.303 ppm por reacção de ácido malónico com anidrido acético. Na Tabela 8.23 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas obtidas por SVD. Na Tabela 8.23 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo PARAFAC2, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Tal como se pode verificar na Tabela 8.23 b) a melhor estimativa de concentração, com uma concentração de 0.298 ppm, é obtida com o modelo de seis componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas de PARAFAC2 de seis componentes sem restrições na análise da matriz [emissão × excitação × concentração]. Estimativas de concentração próximas são obtidas com o modelo de sete componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD na análise do mesmo tipo de matriz, com uma concentração de 0.292 ppm e, com o modelo de seis componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por números aleatórios na análise da matriz [concentração × excitação × emissão], com uma concentração de 0.294 ppm.

Relativamente ao modelo com a estimativa de concentração mais próxima do esperado, o modelo de seis componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por números aleatórios na análise da matriz [concentração × excitação × emissão], apresenta piores estimativas do componente principal nas três dimensões e, o modelo de sete componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD na análise do mesmo tipo de matriz, apresenta melhores estimativas na dimensão do espectro de excitação e ligeiramente piores estimativas na dimensão do espectro de emissão e de concentração. Uma percentagem de ajuste do modelo mais elevada é obtida com o modelo de seis componentes, não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por números aleatórios na análise da matriz [concentração × excitação × emissão].

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado na análise da matriz de padrão de Verapamil 0.303 ppm obtida por reacção de ácido malónico e anidrido acético é, o modelo de seis componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e

estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC2 seis componentes sem restrições na análise da matriz [emissão × excitação × concentração].

Tabela 8.23 – Estimativas de concentração obtidas por PARAFAC2 na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] de padrão de Verapamil 0.303 ppm por reacção de ácido malónico com anidrido acético com a) restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e estimativas iniciais por SVD e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões

	Número de componentes				
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
C_{estimada} (ppm)	0.319 (0.062)	0.245 (0.039)	0.232 (0.033)	0.328 (0.029)	0.292 (0.043)
Recuperação (%)	105.439	80.926	76.676	108.125	96.312
LD (3S_{y/x}/b)	0.125	0.090	0.077	0.057	0.090
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	95.894	97.619	98.306	98.628	99.035
SSQ_{resíduos}	1.104×10 ⁹	3.713×10 ⁸	1.879×10 ⁸	1.233×10 ⁸	6.095×10 ⁷
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	950
R_{Excitação}	+0.787- +0.715	+0.915- +0.871	+0.974- +0.901	+0.658- +0.689	+0.940- +0.943
R_{Emissão}	+0.677- +0.682	+0.810- +0.822	+0.822- +0.846	+0.665- +0.695	+0.922- +0.954
	+0.759	+0.990	+0.822	+0.877	+0.926
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.275 (0.028)	0.240 (0.022)	0.233 (0.020)	0.279 (0.013)	0.263 (0.021)
b	0.861 (0.093)	0.978 (0.075)	1.002 (0.067)	0.850 (0.042)	0.902 (0.069)
S_{y/x}	0.036	0.029	0.026	0.016	0.027
R	0.9886	0.9941	0.9956	0.9976	0.9941

b) com restrição de não negatividade na primeira e terceira dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	6 componentes (estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições)	6 componentes (matriz conc.×exc.×emi. e estimativas iniciais por números aleatórios)	5 componentes (matriz exc.×emi.×conc. e estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições)	6 componentes (matriz conc.×emi.×exc. e estimativas iniciais por números aleatórios)
C_{estimada} (ppm)	0.298 (0.040)	0.294 (0.027)	0.282 (0.028)	0.282 (0.081)
Recuperação (%)	98.494	96.919	93.210	92.992
LD (3S_{y/x}/b)	0.084	0.294	0.060	0.174
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.663	99.495	98.324	99.524
SSQ_{resíduos}	1.171×10 ⁸	1.670×10 ⁷	1.840×10 ⁸	1.486×10 ⁷
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	857	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.806 - +0.837	+0.793 (máx.)	+0.985	+0.464
R_{Emissão}	+0.820 - +0.852		+0.769 - +0.656	+0.445 (máx.)
	+0.968	+0.853	+0.499 - +0.553	
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.268 (0.019)	0.264 (0.013)	0.259 (0.014)	0.258 (0.041)
b	0.897 (0.064)	0.899 (0.043)	0.917 (0.047)	0.915 (0.137)
S_{y/x}	0.025	0.017	0.018	0.053
R	0.9949	0.9977	0.9974	0.9785

* Ver rodapé da Tabela 5.13.

Estimativas do modelo mais adequado

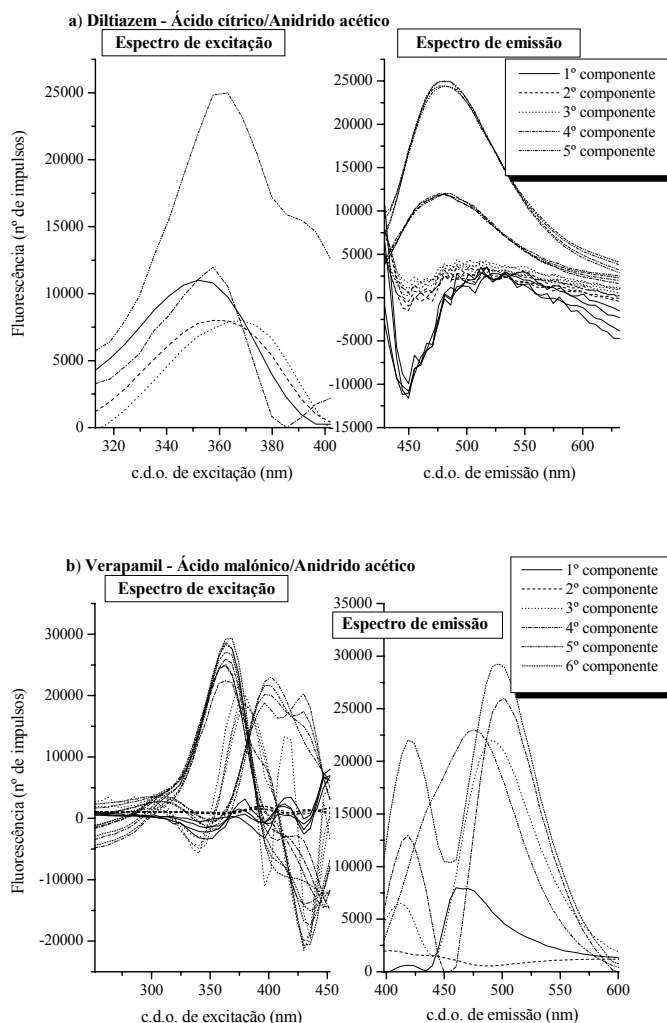


Fig. 8.11 – Espectros de excitação e de emissão estimados pelo modelo PARAFAC2 de 5 componentes e não negatividade na primeira e na terceira dimensões na análise da matriz [excitação × emissão × concentração] do padrão de a) Diltiazem 0.300 ppm por reacção de ácido cítrico com anidrido acético e pelo modelo de seis componentes e não negatividade na primeira e na terceira dimensões na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] do padrão de b) Verapamil 0.303 ppm por reacção de ácido malónico com anidrido acético. Em ambos os modelos as estimativas iniciais são por estimativas de um modelo PARAFAC2 sem restrições respectivamente de 5 e 6 componentes.

No ajuste da matriz de padrão de Diltiazem 0.300 ppm, obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético, pelo modelo de PARAFAC2 de cinco componentes, o primeiro, segundo, terceiro e quarto componentes são o composto principal com máximo a c.d.o. diferentes considerados como composto secundário e o quinto componente é o composto principal.

No ajuste da matriz de padrão de Verapamil 0.303 ppm, obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil, pelo modelo de PARAFAC2 de seis componentes, o primeiro componente é a linha de base com início de fluorescência elevada, o segundo componente é a linha de base, o terceiro, quarto e quinto componentes são o composto principal com máximo a c.d.o. diferentes considerados como composto secundário e o sexto componente é o composto principal.

Formulações Farmacêuticas

Para todas as formulações farmacêuticas foram analisadas matrizes [emissão × excitação × concentração] pelo modelo PARAFAC2 de cinco componentes, não negatividade na primeira e na terceira dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo PARAFAC2 de cinco componentes sem restrições. Análises com outras condições de ajuste do modelo se consideradas mais adequadas foram efectuadas.

Na Tabela 8.24 são apresentadas as condições de ajuste do modelo PARAFAC2 consideradas mais adequadas na análise das matrizes obtidas com cada amostra analisada. Como já referido, na análise pelo modelo PARAFAC2 das matrizes obtidas com as amostras não fortificadas e fortificadas de Diltiazem por reacção de ácido cítrico com anidrido acético e de Verapamil por reacção de ácido malónico com anidrido acético, e apesar de ser considerado na análise do padrão e do solvente, não se procedeu a avaliação com estimativas iniciais por números aleatórios.

Como é possível verificar na Tabela 8.24, para a maioria das amostras, as estimativas mais adequadas foram encontradas com condições de ajuste diferentes das inicialmente consideradas. As outras condições de ajuste utilizadas foram a análise de outro tipo de matrizes, um número de componentes entre três e quatro, restrição de ortogonalidade e estimativas iniciais por estimativas obtidas por SVD.

Tabela 8.24 – Condições de ajuste do modelo PARAFAC2 utilizadas na análise das matrizes obtidas com as amostras não fortificadas e fortificadas de Diltiazem por reacção de ácido cítrico com anidrido acético e de Verapamil por reacção de ácido malónico com anidrido acético.

Matriz analisada	Condições de ajuste			Amostras analisadas	
	Número de componentes	Restrições (1ª e 3ª dimensões)	Estimativas iniciais		
Amostras de Diltiazem obtidas por reacção de ácido cítrico com anidrido acético					
Emissão × excitação × concentração	Três	Não negatividade	SVD	Di120me	
	Quatro		PARAFAC2 sem restrições	Dtap, Di60me e He60coFo	
Concentração × excitação × emissão	Quatro		PARAFAC2 sem restrições	Ba90re, Df60co e Df60coFo	
	Três		PARAFAC2 sem restrições	Di120meFo	
Excitação × emissão × concentração	Quatro		SVD	He120sr e, Dt60co	
	Quatro		PARAFAC2 sem restrições	Ba90reFo, DtapFo, He120srFo, He60co e Al60co	
Concentração × emissão × excitação	Três		SVD	Dt60coFo	
	Quatro		PARAFAC2 sem restrições	Di60meFo	
Amostras de Verapamil obtidas por reacção de ácido malónico com anidrido acético					
Emissão × excitação × concentração	Quatro		Não negatividade na terceira e ortogonalidade na primeira dimensão	SVD	Is40coFo
	Quatro	Não negatividade	SVD	Ve40raFo, Ishta e IsretFo	
	Cinco		PARAFAC2 sem restrições	Ve40ra	
Concentração × excitação × emissão	Quatro	PARAFAC2 sem restrições	Isret		
Concentração × emissão × excitação	Quatro	SVD	Isinj e IsinjFo		
	Três	PARAFAC2 sem restrições	IshtaFo		
	Quatro		Is40co		

Na quantificação das amostras de Diltiazem, por reacção de ácido cítrico com anidrido acético e, de Verapamil, por reacção de ácido malónico com anidrido acético, as estimativas mais adequadas são encontradas para a maioria das formulações farmacêuticas com condições de ajuste do modelo diferentes na análise das amostras não fortificadas e fortificadas.

Na quantificação das amostras de Diltiazem por reacção de ácido cítrico com o anidrido acético só para a formulação Df60co as mesmas condições de ajuste permitem a obtenção de estimativas adequadas na análise da amostra não fortificada e fortificada. Com as restantes formulações farmacêuticas um tipo de matrizes diferente é utilizado na análise

das amostras não fortificadas e fortificadas. Além de um tipo de matrizes diferentes, para a formulação Di60me, é utilizado um número menor de componentes na análise da amostra fortificada e, para as formulações Al60co, Ba90re, Di120me e He120sr, são utilizadas estimativas iniciais diferentes na análise dos dois tipos de amostra.

Na quantificação das amostras de Verapamil por reacção de ácido malónico com o anidrido acético só para a formulação Isinj as mesmas condições de ajuste permitem a obtenção de estimativas adequadas na análise da amostra não fortificada e fortificada. Na análise das amostras não fortificadas e fortificadas são utilizados, com a formulação Ve40ra, um tipo de matrizes e estimativas iniciais diferentes, com a formulação Is40co, um tipo de matrizes, restrições e estimativas iniciais diferentes e, com a formulação Ishta, um tipo de matrizes, estimativas iniciais e um número de componentes diferente. Com a formulação Ishta é na análise da amostra fortificada que é também utilizado um número menor de componentes.

Apesar de, para muitas amostras as estimativas de concentração mais adequadas serem encontradas na análise de matrizes que modelam melhor desvios a trilinearidade, esse facto não permite tirar conclusões acerca de desvios possíveis a trilinearidade nem para as matrizes de Diltiazem obtidas por reacção de ácido cítrico com o anidrido acético nem para as matrizes Verapamil obtidas por reacção de ácido malónico com o anidrido acético.

Na Tabela 8.25 são apresentados os resultados da análise pelo modelo PARAFAC2 das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas de Diltiazem por reacção do ácido cítrico com anidrido acético.

Para a maioria das amostras são obtidos ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.990. As excepções são encontradas para a amostra não fortificada Di60me e fortificada Di120meFo com ajustes lineares com coeficientes de correlação linear mais baixos e para as amostras não fortificadas Al60co e Dt60co e fortificada DtapFo com ajustes lineares com coeficientes de correlação linear mais próximos aos encontrados com o resto das amostras. Para a maioria das amostras são encontrados desvios padrão relativos de ordem de grandeza superior a 10 %. Para as amostras com um ajuste linear com coeficientes de correlação linear mais baixos são mesmo encontrados desvios padrão relativos superiores a 20 %.

São obtidas para todas as amostras não fortificadas e fortificadas recuperações dentro do esperado. São ainda obtidas, para a maioria das formulações farmacêuticas recuperações de fortificação por volta de 100 %. A única excepção verifica-se para a formulação Di60me com uma recuperação de fortificação ligeiramente inferior a 90 %.

Para a maioria das amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas da dosagem estimada por HPLC-UV. São obtidos com todas as amostras não fortificadas erros de previsão inferiores 10 %. Os erros de previsão encontrados variam desde 0.1 a 3%. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra He120sr e o mais alto para a amostra Di60me. Na avaliação da quantificação por este modelo com todas as amostras não fortificadas é obtido um valor de EPM de 1.955 %, de EPT de 2.269 % e de RMSEP de 2.235.

É de referir ainda que, com a formulação Di60me, são obtidas uma estimativa de dosagem e uma recuperação de fortificação mais adequadas com um modelo de oito componentes, para a amostra não fortificada e, de sete componentes, para a fortificada, não negatividade e estimativas iniciais por PARAFAC2 sem restrições na análise da matriz [excitação × emissão × concentração]. Para as amostras Ba90re, Dtap e Di120me, com outras condições de ajuste do modelo, são também obtidas estimativas de dosagens adequadas e com uma percentagem de ajuste do modelo próxima às obtidas com os modelos apresentados.

São encontradas pelo modelo PARAFAC2 melhores estimativas de concentração do que as obtidas por análise directa e pelo modelo PARAFAC. Também recuperações de fortificação de uma forma geral mais adequadas são encontradas por este modelo.

Tabela 8.25 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas de Diltiazem por reacção do ácido cítrico com anidrido acético obtidas pelo modelo PARAFAC2.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Al60co	Df60co	Ba90re	Dt60co	Dtap
C_{estimada} (ppm)	0.269 (0.058)	0.293 (0.037)	0.280 (0.024)	0.285 (0.069)	0.290 (0.024)
C_{esperada} (ppm)	0.301	0.300	0.300	0.301	0.300
Recuperação (%)	89.362	97.583	93.155	94.666	96.743
LD (3S_{y/x}/b)	0.127	0.076	0.051	0.146	0.049
DOS_{estimada} (mg)	53.689	58.523	83.893	56.828	193.333
DOS_{estimada} HPLC (mg)	54.645	57.019	81.617	57.184	198.360
EP (%)	1.750	2.638	2.789	0.623	2.534
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	99.408	99.053	99.443	99.713	99.310
ssq_{resíduos}	1.637×10 ⁷	6.715×10 ⁷	1.575×10 ⁷	3.395×10 ⁶	1.751×10 ⁷
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.959	+0.983+0.928	+0.848+0.944	+0.996(máx.)	+0.863+0.952
R_{Emissão}	+0.897+0.952	+0.987+0.965	+0.930+0.904	+0.998	+0.916+0.963
	+0.933+0.949	+0.961	+0.978		+0.987
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.253 (0.031)	0.265 (0.018)	0.259 (0.012)	0.260 (0.034)	0.263 (0.012)
b	0.941 (0.103)	0.903 (0.060)	0.924 (0.041)	0.914 (0.116)	0.908 (0.039)
S_{y/x}	0.040	0.023	0.016	0.045	0.015
R	0.9881	0.9957	0.9981	0.9844	0.9982

a) amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Di60me	Di120me	He60co	He120sr
C_{estimada} (ppm)	0.279 (0.124)	0.282 (0.015)	0.279 (0.022)	0.277 (0.029)
C_{esperada} (ppm)	0.301	0.301	0.301	0.301
Recuperação (%)	92.858	93.783	92.841	92.199
LD (3S_{y/x}/b)	0.266	0.033	0.048	0.062
DOS_{estimada} (mg)	55.707	112.580	55.682	110.497
DOS_{estimada} HPLC (mg)	57.689	115.152	54.870	110.619
EP (%)	3.436	2.234	1.480	0.110
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	99.443	98.800	99.188	99.545
ssq_{resíduos}	2.434×10 ⁷	7.575×10 ⁷	3.010×10 ⁷	1.261×10 ⁷
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	1520
R_{Excitação}	+0.157 - +0.380	+0.764 - +0.741	+0.948	+1.000 (máx.)
R_{Emissão}	+0.571 - +0.481	+0.625 - +0.648	+0.514 - +0.656	+0.999
	+0.995	+0.992	+0.728 - +0.712	
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	0.256 (0.063)	0.260 (0.008)	0.258 (0.011)	0.257 (0.015)
b	0.920 (0.211)	0.921 (0.026)	0.925 (0.038)	0.921 (0.049)
S_{y/x}	0.081	0.010	0.015	0.019
R	0.9510	0.9992	0.9983	0.9972

(Continua)

Tabela 8.25 (Continuação)

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Al60coFo	Df60coFo	Ba90reFo	Dt60coFo	DtapFo
$C_{\text{estimada total}}$ (ppm)	0.367 (0.053)	0.384 (0.062)	0.377 (0.032)	0.387 (0.064)	0.383 (0.086)
$C_{\text{esperada total}}$ (ppm)	0.402	0.401	0.401	0.402	0.402
Recuperação (%)	91.467	95.681	93.948	96.228	95.402
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.099	0.112	0.059	0.115	0.155
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	99.817	99.489	99.385	99.502	99.368
$SSQ_{\text{resíduos}}$	1.370×10^6	1.397×10^7	2.123×10^7	1.424×10^7	2.170×10^7
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
$R_{\text{Excitação}}$	+0.986	+0.999+0.995 +0.999+0.996	+0.972	+0.995	+0.963
$R_{\text{Emissão}}$	+0.993(máx.)	+0.979	+0.810+0.839 +0.899+0.839	+0.992+0.987 +0.990+0.990	+0.878+0.890 +0.914+0.882
Fortificação ($C_{\text{estimada amostra fortificada}} - C_{\text{estimada amostra não fortificada}}$)					
C_{estimada} (ppm)	0.098	0.091	0.097	0.102	0.093
C_{esperada} (ppm)	0.100	0.100	0.100	0.100	0.101
Recuperação (%)	98.000	91.000	97.000	102.000	92.079
$\Delta = C_{\text{estimada}} - C_{\text{esperada}}$	-0.002	-0.009	-0.003	+0.002	-0.008
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	0.294 (0.020)	0.300 (0.022)	0.298 (0.012)	0.301 (0.023)	0.300 (0.031)
b	0.801 (0.068)	0.781 (0.076)	0.790 (0.040)	0.778 (0.077)	0.783 (0.105)
$S_{y/x}$	0.026	0.029	0.015	0.030	0.041
R	0.9928	0.9907	0.9974	0.9903	0.9824
b) amostras fortificadas (continuação)					
Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Di60meFo	Di120meFo	He60coFo	He120srFo	
$C_{\text{estimada total}}$ (ppm)	0.368 (0.048)	0.383 (0.223)	0.398 (0.014)	0.378 (0.019)	
$C_{\text{esperada total}}$ (ppm)	0.402	0.402	0.401	0.402	
Recuperação (%)	91.660	95.506	99.079	94.105	
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.089	0.404	0.024	0.035	
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	99.224	99.339	99.404	98.950	
$SSQ_{\text{resíduos}}$	7.174×10^7	1.765×10^7	1.815×10^7	7.210×10^7	
Iterações	270	1849	2000 (máx.)	2000 (máx.)	
$R_{\text{Excitação}}$	+0.999	+0.989 (máx.)	+0.935 - +0.935 +0.932 - +0.939	+0.998	
$R_{\text{Emissão}}$	+0.997 (máx.)	+0.998	+0.983	-0.019 - +0.069 - 0.080 - +0.108	
Fortificação ($C_{\text{estimada amostra fortificada}} - C_{\text{estimada amostra não fortificada}}$)					
C_{estimada} (ppm)	0.089	0.101	0.119	0.101	
C_{esperada} (ppm)	0.101	0.100	0.100	0.101	
Recuperação (%)	88.119	101.000	119.000	100.000	
$\Delta = C_{\text{estimada}} - C_{\text{esperada}}$	-0.012	+0.001	+0.019	0	
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	0.295 (0.018)	0.297 (0.080)	0.305 (0.005)	0.298 (0.007)	
b	0.800 (0.062)	0.774 (0.271)	0.766 (0.016)	0.789 (0.024)	
$S_{y/x}$	0.024	0.104	0.006	0.009	
R	0.9941	0.8964	0.9996	0.9991	

* máx. – corresponde à indicação de que o número máximo de iterações definido no ajuste do modelo foi atingido ou de que o coeficiente de correlação linear apresentado corresponde ao calculado com a estimativa do espectro de excitação ou de emissão respectivamente ao c.d.o. de emissão ou de excitação de fluorescência máxima; A dosagem é dada em massa de composto por comprimido; Os valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da concentração estimada e de cada um dos parâmetros da calibração avaliados.

Na Tabela 8.26 são apresentados os resultados da análise pelo modelo PARAFAC2 das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas de Verapamil por reacção do ácido malónico com anidrido acético.

Para metade das amostras são obtidos ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.990. De entre as amostras com ajustes lineares com coeficientes de correlação linear menores, a amostra não fortificada Is40co e fortificadas Ve40raFo e IsinjFo, apresentam os ajustes lineares com coeficientes de correlação linear mais baixos e, as amostras não fortificadas Isinj e Ishta, apresentam os ajustes lineares com coeficientes de correlação linear mais próximos aos encontrados com o resto das amostras. Para a maioria das amostras são encontrados desvios padrão relativos de ordem de grandeza superior a 10 %. Para as amostras com um ajuste linear com coeficientes de correlação linear mais baixo são mesmo encontrados desvios padrão relativos de ordem de grandeza igual ou superior a 20 %.

Recuperações dentro do esperado são obtidas para todas as amostras não fortificadas e fortificadas. Recuperações de fortificação por volta de 100 % são também obtidas para todas as formulações farmacêuticas.

Para a maioria das amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas da dosagem estimada por HPLC-UV. Para todas as amostras não fortificadas são encontrados erros de previsão inferiores a 10 %. Os erros de previsão encontrados variam desde 0.4 a 4 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Is40co e o mais alto para a amostra Isret. Na avaliação da quantificação por este modelo com todas as amostras não fortificadas é obtido um valor EPM de 1.662 %, de EPT de 2.000 % e de RMSEP de 2.263.

É de referir ainda que, só para a formulação Isinj, com outras condições de ajuste e com uma percentagem de ajuste do modelo mais baixa, é encontrada uma estimativa de dosagem mais próxima da esperada.

São encontradas pelo modelo PARAFAC2 melhores estimativas de concentração do que as obtidas por análise directa e pelo modelo PARAFAC. São também encontradas por este modelo recuperações de fortificação mais adequadas do que as obtidas por análise directa e próximas às obtidas pelo modelo PARAFAC.

Tabela 8.26 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas de Verapamil por reacção do ácido malónico com anidrido acético obtidas pelo modelo PARAFAC2.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Ve40ra	Isinj	Is40co	Isret	Ishta
C_{estimada} (ppm)	0.298 (0.047)	0.284 (0.070)	0.282 (0.095)	0.290 (0.007)	0.274 (0.038)
C_{esperada} (ppm)	0.301	0.300	0.301	0.301	0.301
Recuperação (%)	99.009	94.702	93.834	96.451	91.019
LD (3S_{y/x}/b)	0.097	0.149	0.201	0.015	0.081
DOS_{estimada} (mg)	39.658	4.733	37.506	115.823	218.831
DOS_{estimada} HPLC (mg)	38.979	4.679	37.362	111.183	220.724
EP (%)	1.742	1.154	0.385	4.173	0.858
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	97.975	99.694	99.598	97.321	97.446
ssq_{resíduos}	3.233×10 ⁸	4.959×10 ⁶	1.212×10 ⁸	3.333×10 ⁸	1.894×10 ⁸
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)
R_{Excitação}	+0.992-+0.998	+0.935	+0.984	+0.670-+0.638	+0.825-+0.812
R_{Emissão}	+0.972-+0.968	+0.982(máx.)	+0.997(máx.)	+0.611-+0.563	+0.841-+0.838
R_{Emissão}	+0.940	+0.982(máx.)	+0.997(máx.)	+0.996	+0.980
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.267 (0.022)	0.260 (0.035)	0.259 (0.047)	0.264 (0.003)	0.255 (0.019)
b	0.897 (0.075)	0.914 (0.118)	0.918 (0.160)	0.910 (0.011)	0.933 (0.066)
S_{y/x}	0.029	0.045	0.062	0.004	0.025
R	0.9930	0.9838	0.9708	0.9998	0.9951

b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Ve40raFo	IsinjFo	Is40coFo	IsretFo	IshtaFo
C_{estimada} (ppm)	0.394 (0.106)	0.387 (0.120)	0.373 (0.006)	0.381 (0.063)	0.377 (0.076)
C_{esperada} (ppm)	0.403	0.401	0.401	0.402	0.403
Recuperação (%)	97.761	96.327	92.949	94.688	93.258
LD (3S_{y/x}/b)	0.189	0.217	0.011	0.115	0.138
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	97.754	99.727	97.870	99.461	99.224
ssq_{resíduos}	1.475×10 ⁸	6.724×10 ⁶	3.219×10 ⁸	1.135×10 ⁷	1.376×10 ⁷
Iterações	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	2000 (máx.)	171
R_{Excitação}	+0.697-+0.691	+0.979	+0.921-+0.906	+0.959(máx.)	+0.969
R_{Emissão}	+0.717-+0.706	+0.979	+0.902-+0.915	+0.959(máx.)	+0.969
R_{Emissão}	+0.783	+1.000(máx.)	+0.946	+0.958	+1.000(máx.)
Fortificação (C_{estimada amostra fortificada} - C_{estimada amostra não fortificada})					
C_{estimada} (ppm)	0.096	0.103	0.091	0.091	0.103
C_{esperada} (ppm)	0.101	0.101	0.101	0.101	0.102
Recuperação (%)	95.050	101.980	90.099	90.099	100.980
Δ = C_{estimada} - C_{esperada}	-0.005	+0.002	-0.010	-0.010	+0.001
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	0.303 (0.037)	0.300 (0.043)	0.296 (0.002)	0.299 (0.023)	0.298 (0.028)
b	0.769 (0.125)	0.776 (0.145)	0.795 (0.008)	0.785 (0.078)	0.791 (0.095)
S_{y/x}	0.048	0.056	0.003	0.030	0.036
R	0.9744	0.9667	0.9999	0.9902	0.9859

* Ver rodapé da Tabela 7.17.

8.4.2.3 – MCR-ALS

No ajuste pelo modelo MCR-ALS foram utilizadas de uma forma geral a matriz bidimensional [(concentração × excitação) × emissão] (68 × 40) para o Diltiazem por reacção do ácido cítrico com anidrido acético e (148 × 40) para o Verapamil por reacção do ácido malónico com anidrido acético. As condições geralmente utilizadas para o ajuste foram a aplicação de restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições.

Solvente

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 8.27 são apresentados os valores de perda de ajuste do modelo MCR-ALS e do número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS de um a oito componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada do solvente etanol obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem e por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil.

É possível verificar na Tabela 8.27 que, na análise matriz de etanol obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem, foram encontrados os valores mais baixos de perda de ajuste de MCR vs. PCA para os modelos de um a três componentes, os valores mais baixos de perda ajuste de MCR vs Exp. a partir do modelo de quatro componentes e, o número menor de iterações foi obtido para o modelo de três componentes. Na análise da matriz de etanol obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil, o valor mais baixo de perda de ajuste de MCR vs. PCA, excepto para o modelo de um componente, foi obtido para o modelo de dois componentes, os valores mais baixos de perda ajuste de MCR vs Exp. foram encontrados a partir do modelo de cinco componentes e, excepto o modelo de oito componentes, o número menor de iterações foi obtido para o modelo de três componentes.

Foram obtidos valores de perda de ajuste de MCR vs. PCA próximos, na análise da matriz de etanol obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem, para os modelos entre quatro e oito componentes e, na análise da matriz de

etanol obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil, para os modelos entre dois e seis componentes. Para os dois compostos são encontradas menores diminuições de perda de ajuste de MCR vs Exp. a partir do modelo de cinco componentes.

Atendendo ao menor número de iterações e à relativamente baixa perda de ajuste de MCR vs. PCA, na análise da matriz de etanol obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem e por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil, o modelo de três componentes parece ser o mais adequado. No entanto atendendo aos valores mais baixos de perda ajuste de MCR vs Exp. é possível que modelos com um número maior de componentes possam também ser considerados adequados na análise da matriz de etanol.

Tabela 8.27 – Perda de ajuste de MCR-ALS vs. PCA, de MCR-ALS vs. experimental e número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS, de 1 a 8 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão] do solvente etanol por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem e por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizado pelo Verapamil.

	Número de componentes							
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete	Oito
Reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem								
Número de Iterações	38	11	2	33	23	40	19	3
LOF_{MCR vs. PCA}(×10⁻¹⁴)	2.204	2.597	2.796	3.453	3.578	3.494	3.362	3.675
LOF_{MCR vs Exp}	6.789	6.789	4.546	1.003	0.666	0.534	0.466	0.423
Reacção de ácido cítrico com anidrido malónico catalizada pelo Verapamil								
Número de Iterações	24	44	3	8	11	88	6	2
LOF_{MCR vs. PCA}(×10⁻¹⁴)	2.437	3.115	3.701	3.793	3.735	3.775	4.177	4.194
LOF_{MCR vs Exp}	31.973	13.016	5.033	3.452	2.367	1.736	1.164	0.828

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 8.28 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo MCR-ALS na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada do solvente etanol obtida por reacção de ácido cítrico e anidrido acético catalizada pelo Diltiazem. Na Tabela 8.28 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições. Na Tabela 8.28 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo MCR-ALS, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como se pode verificar pela Tabela 8.28 b), as estimativas de concentração mais próximas de zero, com uma concentração de 0.001 ppm, são obtidas com os modelos de

cinco e seis componentes, não negatividade e unimodilidade no componente principal e secundário nas duas dimensões na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação]. O modelo de seis componentes, relativamente ao modelo de cinco componentes, apresenta uma maior percentagem de ajuste do modelo, uma menor perda de ajuste de MCR vs. PCA, maior diferença de perdas de ajuste, maior número de iterações e estimativas do componente principal próximas nas três dimensões.

Na Tabela 8.28 a) pode também ver-se que é obtida uma estimativa de concentração próxima, com uma concentração de 0.002 ppm, com o modelo de seis componentes e não negatividade nas duas dimensões na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão]. Com este modelo, e relativamente aos outros dois modelos indicados anteriormente, é obtida uma maior percentagem de ajuste do modelo, uma menor perda de ajuste de MCR vs. PCA e melhores estimativas do componente principal na dimensão do espectro de emissão e de concentração associadas a uma maior diferença de perdas de ajuste, um maior número de iterações e piores estimativas na dimensão do espectro de excitação.

Atendendo à melhor estimativa de concentração e percentagem de ajuste do modelo alta, o modelo considerado mais adequado é o modelo de seis componentes, não negatividade nas duas dimensões e unimodilidade no componente principal e secundário nas duas dimensões na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação].

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado na análise da matriz de etanol obtida por reacção de ácido cítrico e anidrido acético catalizada pelo Diltiazem é, o modelo de seis componentes, não negatividade nas duas dimensões, unimodilidade no componente principal e secundário nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo MCR-ALS de seis componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação].

Tabela 8.28 – Estimativas de concentração obtidas por MCR-ALS na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão] do solvente etanol por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem com a) tridimensionalidade, restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por MCR-ALS sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade nas duas dimensões

Número de componentes					
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
C_{estimada} (ppm)	0.023 (0.030)	0.007 (0.029)	0.010 (0.010)	0.002 (0.030)	-0.004(0.028)
Recuperação (%)	---	---	---	---	---
LD (3S_{v/x}/b)	0.111	0.110	0.103	0.117	0.111
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	95.454	98.993	99.138	99.341	99.432
SSQ_{resíduos}	2.456×10 ⁸	1.204×10 ⁷	8.830×10 ⁶	5.164×10 ⁶	3.832×10 ⁶
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	2.694×10 ⁻⁴	0.086	0.547	0.387	0.325
Δ_{LOFMCR} (PCA - Exp.)	-4.546	-0.921	-0.315	-0.272	-0.243
R_{Excitação}	+0.953- +0.769	+0.984- +0.887	+0.918- +0.869	+0.837- +0.739	+0.684- +0.746
R_{Emissão}	+0.98 - +0.985	+0.987- +0.990	+0.952- +0.960	+0.964- +0.963	+0.948- +0.963
	+0.941	+0.922	+0.935	+0.943	+0.944
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	3918.770 (4882.992)	1107.685 (4586.772)	1638.728 (4453.870)	364.434 (5235.965)	-739.252 (5030.478)
b	170566.366 (16451.854)	161671.754 (15453.825)	168002.000 (15006.049)	173698.530 (17641.098)	175818.247 (16948.768)
S_{y/x}	6338.731	5954.201	5781.677	6796.935	6530.187
R	0.9908	0.9910	0.9921	0.9898	0.9908

b) com restrição de não negatividade nas duas dimensões e outras avaliações

Outras avaliações				
	5 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc.)	5 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc. e unimodilidade no componente secundário na primeira dimensão)	5 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc. e unimodilidade no componente principal e secundário nas duas dimensões)	6 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc. e unimodilidade no componente principal e secundário nas duas dimensões)
C_{estimada} (ppm)	0.005 (0.032)	0.003 (0.031)	0.001 (0.031)	0.001 (0.031)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{v/x}/b)	0.122	0.121	0.122	0.122
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	99.358	97.953	97.978	99.055
SSQ_{resíduos}	4.895×10 ⁶	4.977×10 ⁷	4.859×10 ⁷	1.061×10 ⁷
Iterações	50 (máx.)	21	20	33
LOF_{MCR vs. PCA}	0.159	1.960	1.933	0.818
Δ_{LOFMCR} (PCA - Exp.)	-0.483	-0.086	-0.089	-0.127
R_{Excitação}	+0.985	+0.981	+0.983	+0.982
R_{Emissão}	+0.908 - +0.875	+0.915 - +0.905	+0.908 - +0.908	+0.908 - +0.908
	+0.885 - +0.901	+0.901 - +0.912	+0.903 - +0.914	+0.903 - +0.914
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	581.576 (3798.503)	308.182 (3794.505)	113.267 (3850.350)	113.267 (3850.350)
b	12617.650 (12797.977)	121801.422 (12784.508)	122766.102 (12972.662)	122766.102 (12972.662)
S_{y/x}	4930.930	4925.740	4998.234	4998.234
R	0.9891	0.9892	0.9890	0.9890

* Ver rodapé da Tabela 4.6.

Na Tabela 8.29 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo MCR-ALS na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada do solvente etanol obtida por reação de ácido malónico e anidrido acético catalizada pelo Verapamil. Na Tabela 8.29 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições. Na Tabela 8.29 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo MCR-ALS, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como se pode verificar na Tabela 8.29 a) e b) as melhores estimativas de concentração são obtidas com os modelos apresentados na Tabela 8.29 b). De entre estes modelos, o modelo com a estimativa mais próxima do esperado, com uma concentração de 0.002 ppm, é o modelo de cinco componentes, não negatividade nas duas dimensões, unimodalidade no componente principal e secundário nas duas dimensões e trilinearidade no componente principal na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação]. Com os outros três modelos apresentados na Tabela 8.29 b) são obtidas estimativas de concentração entre 0.008 e 0.011 ppm.

Apesar de apresentar a estimativa de concentração mais elevada, com uma concentração de 0.011 ppm, o modelo de cinco componentes, não negatividade nas duas dimensões e trilinearidade no componente principal e secundário na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação] é o que apresenta a percentagem de ajuste do modelo mais elevada assim como as melhores estimativas do componente principal nas três dimensões. Com os outros três modelos são encontradas percentagens de ajuste do modelo próximas entre si. Atendendo à melhor estimativa de concentração, e apesar da percentagem de ajuste do modelo ligeiramente mais baixa, o modelo considerado mais adequado é o modelo de cinco componentes, não negatividade nas duas dimensões, unimodalidade no componente principal e secundário nas duas dimensões e trilinearidade do componente principal na primeira dimensão na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação].

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado na análise da matriz de etanol obtida por reação de ácido malónico e anidrido acético catalizada pelo Verapamil é, o modelo de cinco componentes, não negatividade nas duas dimensões, unimodalidade no componente principal e secundário nas duas dimensões, trilinearidade no componente principal e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS de cinco componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação].

Tabela 8.29 – Estimativas de concentração obtidas por MCR-ALS na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão] do solvente etanol por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil com a) tridimensionalidade, restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por MCR-ALS sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade nas duas dimensões

Número de componentes					
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
C_{estimada} (ppm)	0.084 (0.035)	0.083 (0.033)	0.082 (0.036)	0.048 (0.031)	0.049 (0.030)
Recuperação (%)	---	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.109	0.104	0.113	0.107	0.105
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	94.506	96.372	97.117	97.664	98.277
SSQ_{resíduos}	1.118×10 ⁹	4.875×10 ⁸	3.078×10 ⁸	2.021×10 ⁸	1.099×10 ⁸
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	2.240	1.143	1.721	1.646	1.267
Δ_{LOFMCR} (PCA – Exp.)	-3.254	-2.485	-1.162	-0.690	-0.456
R_{Excitação}	+0.968- +0.979	+0.910- +0.956	+0.953- +0.870	+0.936- +0.922	+0.324- +0.162
R_{Emissão}	+0.896- +0.877	+0.867- +0.848	+0.847- +0.915	+0.934- +0.926	+0.478- +0.488
R_{Emissão}	+0.971	+0.977	+0.982	+0.998	+0.989
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	14296.626 (4761.001)	13374.228 (4296.243)	12990.494 (4584.427)	8742.625 (5028.458)	8909.575 (4900.103)
b	169572.574 (16085.836)	160426.296 (14515.575)	157778.864 (15489.254)	183734.399 (16989.487)	182278.795 (16555.818)
S_{y/x}	6181.694	5578.238	5952.437	6528.96	6362.047
R	0.9911	0.9919	0.9905	0.9916	0.9919

b) com restrição de não negatividade nas duas dimensões e outras avaliações

Outras avaliações				
	3 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc.)	5 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc. e trilinearidade no componente principal)	5 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc. e trilinearidade no componente principal e no componente secundário)	5 componentes (matriz (conc.×emi.) ×exc., unimodilidade no componente principal e secundário nas duas dimensões e trilinearidade no componente principal)
C_{estimada} (ppm)	0.008 (0.030)	0.009 (0.039)	0.011 (0.026)	0.002 (0.037)
Recuperação (%)	---	---	---	---
LD (3S_{y/x}/b)	0.115	0.148	0.098	0.145
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	94.235	93.972	95.036	93.935
SSQ_{resíduos}	1.231×10 ⁹	1.346×10 ⁹	9.123×10 ⁸	1.362×10 ⁹
Iterações	50 (máx.)	3	39	9
LOF_{MCR vs. PCA}	1.773	6.288	4.438	5.620
Δ_{LOFMCR} (PCA – Exp.)	-3.992	-0.454	-0.526	-0.449
R_{Excitação}	+0.799	+0.784	+0.907	+0.829
R_{Emissão}	+0.875 - +0.956	+0.823 - +0.823	+0.890 - +0.890	+0.781 - +0.781
R_{Emissão}	+0.836 - +0.810	+0.823 - +0.823	+0.890 - +0.890	+0.781 - +0.781
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	1074.543 (3982.153)	930.038 (4039.413)	1075.703 (2465.803)	182.776 (4360.283)
b	134997.587 (13454.370)	106379.811 (13647.831)	98084.760 (8328.695)	117005.391 (14731.944)
S_{y/x}	5170.408	5244.639	3200.720	5661.178
R	0.9902	0.9839	0.9929	0.9845

* Ver rodapé da Tabela 4.6.

Estimativas do modelo mais adequado

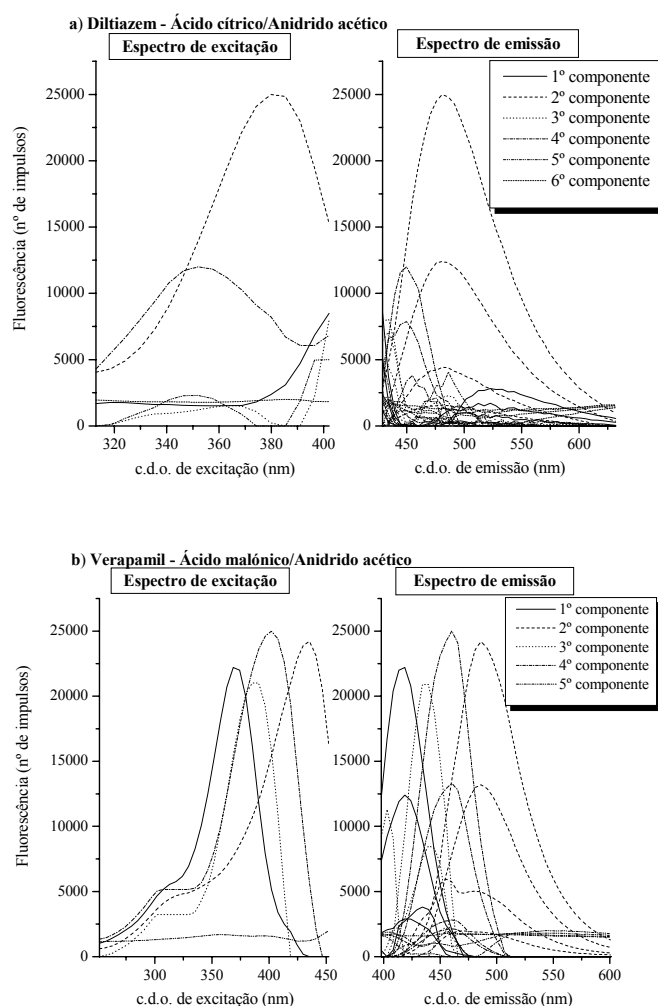


Fig. 8.12 – Espectros de excitação e de emissão estimados pelo modelo MCR-ALS de seis componentes na análise da matriz do solvente etanol obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo a) Diltiazem e de cinco componentes na análise da matriz do solvente etanol obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo b) Verapamil. Em ambos os modelos é aplicada a restrição de não negatividade nas duas dimensões, unimodalidade no componente principal e secundário nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de MCR-ALS sem restrições respectivamente de 6 e 5 componentes na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação]. Com o padrão de Verapamil é aplicada a restrição de trilinearidade no componente principal.

No ajuste da matriz de etanol, obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem, pelo modelo de MCR-ALS de seis componentes, o primeiro, terceiro e quinto componentes são a linha de base com início de fluorescência elevada, o segundo componente é o composto principal, o quarto componente é o composto principal

com máximo a c.d.o. diferente considerado como composto secundário e o sexto componente é a linha de base.

No ajuste da matriz de etanol, obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil, pelo modelo de MCR-ALS de cinco componentes, o primeiro, segundo e terceiro componentes são o composto principal com máximo a c.d.o. diferentes considerados como composto secundário, o quarto componente é o composto principal e o quinto componente é a linha de base.

Padrão

Parâmetros de erro dos modelos

Na Tabela 8.30 são apresentados os valores de perda de ajuste do modelo MCR-ALS e do número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS de um a oito componentes, sem restrições e com estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada [(concentração × excitação) × emissão] do padrão de Diltiazem 0.300 ppm obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético e Verapamil 0.303 ppm obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético.

É possível verificar na Tabela 8.30 que, na análise matriz de padrão de Diltiazem obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético, foram encontrados os valores mais baixos de perda de ajuste de MCR vs. PCA para os modelos de um a três componentes, os valores mais baixos de perda ajuste de MCR vs Exp. a partir do modelo de cinco componentes e o menor número de iterações foi obtido para o modelo de cinco componentes. Na análise da matriz de padrão de Verapamil obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético, foram encontrados os valores mais baixos de perda de ajuste de MCR vs. PCA para os modelos de um e dois componentes, os valores mais baixos de perda ajuste de MCR vs Exp. a partir do modelo de seis componentes e um número menor de iterações foi obtido para os modelos de um, dois, cinco sete e oito componentes. Para os dois compostos foram encontradas menores diminuições de perda de ajuste de MCR vs Exp. a partir do modelo de cinco componentes.

Atendendo ao menor número de iterações e às menores diminuições de perda de ajuste de MCR vs Exp. na análise da matriz de padrão, de Diltiazem obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem e de Verapamil por reacção de ácido

malônico com anidrido acético, o modelo de cinco componentes parece ser o mais adequado.

Tabela 8.30 – Perda de ajuste de MCR-ALS vs. PCA, de MCR-ALS vs. experimental e número de iterações obtidos pelo modelo MCR-ALS, de 1 a 8 componentes, sem restrições e estimativas iniciais por SIMPLISMA na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão] do padrão de Diltiazem 0.300 ppm por reação de ácido cítrico com anidrido acético e de Verapamil 0.303 ppm por reação de ácido malônico com anidrido acético.

	Número de componentes							
	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete	Oito
Reação de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem								
Número de Iterações	35	27	11	11	4	10	19	41
LOF _{MCR vs. PCA} (×10 ⁻¹⁴)	2.258	2.486	2.523	3.539	3.427	3.076	3.659	2.955
LOF _{MCR vs Exp}	9.331	3.093	0.816	0.517	0.369	0.341	0.312	0.263
Reação de ácido cítrico com anidrido malônico catalizada pelo Verapamil								
Número de Iterações	2	9	26	33	8	12	7	5
LOF _{MCR vs. PCA} (×10 ⁻¹⁴)	2.485	3.133	3.549	3.495	6.665	3.744	4.161	4.812
LOF _{MCR vs Exp}	30.640	11.464	3.915	2.296	1.631	1.299	0.887	0.692

Avaliação das estimativas dos modelos

Na Tabela 8.31 são apresentados os resultados obtidos pelo modelo MCR-ALS na análise da matriz bidimensional de coluna aumentada de Diltiazem 0.300 ppm por reação de ácido cítrico com anidrido acético. Na Tabela 8.31 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições. Na Tabela 8.31 b) são apresentados outros resultados obtidos, pelo modelo MCR-ALS, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como é possível verificar na Tabela 8.31 a) e b), as estimativa de concentração mais próxima da concentração esperada, com uma concentração de 0.282 ppm, são obtidas para o modelo de quatro componentes e não negatividade nas duas dimensões e, para o modelo com condições de ajuste iguais e ainda com a aplicação da restrição de unimodilidade no componente secundário na primeira dimensão na análise em ambos os modelos da matriz [(concentração × excitação) × emissão]. Além destes dois modelos, a estimativa de concentração mais próxima, com uma concentração de 0.281 ppm, é obtida para o modelo de três componentes, não negatividade nas duas dimensões e trilinearidade no componente secundário na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão].

De entre os modelos de quatro componentes e, apresentado estimativas e características do modelo iguais, o modelo de quatro componentes e não negatividade nas duas dimensões

sem aplicação da restrição de unimodalidade, é considerado o mais adequado. Relativamente ao modelo de quatro componentes e não negatividade nas duas dimensões, o modelo de três componentes, não negatividade nas duas dimensões e restrição de trilinearidade no componente secundário apresenta um menor número de iterações, uma melhor estimativa do componente principal na dimensão da concentração e uma menor diferença de perdas de ajuste. Com uma estimativa mais próxima do esperado, e apesar da pior estimativa na dimensão de concentração e maior número de iterações, o modelo considerado mais adequado é o modelo de quatro componentes e não negatividade nas duas dimensões na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão].

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado na análise da matriz de padrão de Diltiazem obtida por reacção de ácido cítrico e anidrido acético é, o modelo de quatro componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas do modelo MCR-ALS de quatro componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão].

Tabela 8.31 – Estimativas de concentração obtidas por MCR-ALS na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão] do padrão de Diltiazem 0.300 ppm por reacção de ácido cítrico com anidrido acético com a) tridimensionalidade, restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por MCR-ALS sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade nas duas dimensões

	Número de componentes				
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
C_{estimada} (ppm)	0.271 (0.050)	0.282 (0.058)	0.252 (0.045)	0.102 (0.039)	0.156 (0.019)
Recuperação (%)	90.264	94.009	83.985	34.021	51.917
LD (3S_{y/x}/b)	0.109	0.123	0.102	0.118	0.053
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	99.184	99.446	99.548	99.555	99.623
SSQ_{resíduos}	6.398×10 ⁷	2.950×10 ⁷	1.957×10 ⁷	1.900×10 ⁷	1.366×10 ⁷
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	0.039	0.201	0.260	0.286	0.213
Δ_{LOFMCR} (PCA – Exp.)	-0.778	-0.354	-0.192	-0.159	-0.165
R_{Excitação}	+0.940- +0.919	+0.943- +0.912	+0.917- +0.905	+0.653- +0.763	+0.698- +0.778
R_{Emissão}	+0.924- +0.924	+0.925- +0.918	+0.904- +0.894	+0.807- +0.860	+0.835- +0.864
R_{Emissão}	+0.981	+0.990	+0.992	+1.000	+1.000
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	63208.855 (6536.912)	66492.562 (7457.543)	62177.928 (6431.283)	33864.244 (10045.211)	47744.976 (4134.220)
b	233124.342 (22024.270)	235466.293 (25126.072)	246466.063 (21668.380)	331356.596 (33844.487)	306140.769 (13929.081)
S_{y/x}	8485.726	9680.819	8348.605	13039.935	5366.732
R	0.9912	0.9888	0.9924	0.9897	0.9979

b) com restrição de não negatividade nas duas dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	3 componentes (trilinearidade no componente secundário)	4 componentes (trilinearidade no componente secundário)	4 componentes (unimodilidade no componente secundário na primeira dimensão)	4 componentes (unimodilidade no componente secundário na primeira dimensão e trilinearidade no componente secundário)
C_{estimada} (ppm)	0.281 (0.051)	0.272 (0.054)	0.282 (0.058)	0.272 (0.054)
Recuperação (%)	93.424	90.696	94.009	90.696
LD (3S_{y/x}/b)	0.108	0.117	0.123	0.117
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.675	98.854	99.446	98.854
SSQ_{resíduos}	1.684×10 ⁸	1.262×10 ⁸	2.950×10 ⁷	1.262×10 ⁸
Iterações	36	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	1.044	1.023	0.201	1.023
Δ_{LOFMCR} (PCA – Exp.)	-0.281	-0.123	-0.354	-0.123
R_{Excitação}	+0.926 - +0.904	+0.947 - +0.927	+0.943 - +0.912	+0.947 - +0.927
R_{Emissão}	+0.910 - +0.910	+0.929 - +0.929	+0.925 - +0.918	+0.929 - +0.929
R_{Emissão}	+0.984	+0.981	+0.990	+0.981
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	66034.192 (6544.027)	63596.166 (7036.286)	66492.566 (7457.543)	63596.166 (7036.286)
b	235305.188 (22048.243)	233435.201 (23706.767)	235466.293 (25126.072)	233435.201 (23706.767)
S_{y/x}	8494.962	9133.975	9680.819	9133.975
R	0.9913	0.9898	0.9888	0.9898

* Ver rodapé da Tabela 4.6.

Na Tabela 8.32 são apresentados os resultados obtidos por análise pelo modelo MCR-ALS da matriz bidimensional de coluna aumentada [(concentração × excitação) × emissão] do padrão de Verapamil 0.303 ppm por reacção de ácido malónico com anidrido acético. Na Tabela 8.32 a) são apresentados os resultados obtidos com três a sete componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS sem restrições. Na Tabela 8.32 b) são apresentados outros resultados obtidos, por análise pelo modelo MCR-ALS, em que é encontrada uma estimativa de concentração próxima da esperada.

Como é possível verificar na Tabela 8.32 b), a estimativa de concentração mais próxima do esperado, com uma concentração de 0.303 ppm, é obtida com o modelo de quatro componentes e não negatividade nas duas dimensões na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação]. Estimativas próximas à encontrada por este modelo, são obtidas com os outros modelos de quatro e cinco componentes na análise do mesmo tipo de matriz apresentados na Tabela 8.32 b). É também encontrada uma estimativa próxima da esperada com o modelo de seis componentes apresentado na Tabela 8.32 a).

Os modelos com cinco componentes que apresentam uma estimativa de concentração adequada, são os que apresentam uma maior percentagem de ajuste do modelo próxima à encontrada com o modelo de seis componentes. De entre os modelos de cinco componentes, o modelo que apresenta a estimativa de concentração mais próxima do esperado, com uma concentração de 0.302 ppm, apresenta uma maior percentagem de ajuste do modelo, uma menor diferença de perdas de ajuste, ligeiramente maior perda de ajuste de ajuste de MCR vs. PCA, estimativas do componente principal piores na dimensão do espectro de excitação e melhores na dimensão do espectro de emissão e próximas na dimensão de concentração. Apesar da ligeiramente pior estimativa de concentração, mas atendendo à avaliação prévia e maior percentagem de ajuste do modelo, este modelo é considerado o mais adequado.

Atendendo aos critérios considerados, o modelo mais adequado na análise da matriz de padrão de Verapamil obtida por reacção de ácido malónico e anidrido acético é, o modelo de cinco componentes, não negatividade nas duas dimensões, unimodalidade no componente secundário na primeira dimensão e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS de cinco componentes sem restrições na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação].

Tabela 8.32 – Estimativas de concentração obtidas por MCR-ALS na análise da matriz [(Concentração × excitação) × emissão] do padrão de Verapamil 0.303 ppm por reacção de ácido malónico com anidrido acético com a) tridimensionalidade, restrição de não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por MCR-ALS sem restrições e b) o mesmo que em a) e outras avaliações.*

a) com restrição de não negatividade nas duas dimensões

	Número de componentes				
	Três	Quatro	Cinco	Seis	Sete
C_{estimada} (ppm)	0.215 (0.058)	0.236 (0.066)	0.236 (0.069)	0.300 (0.074)	0.327 (0.087)
Recuperação (%)	70.818	77.877	77.954	99.062	107.948
LD (3S_{y/x}/b)	0.140	0.153	0.160	0.153	0.173
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	95.565	97.510	98.130	98.365	98.785
ssq_{resíduos}	1.289×10 ⁹	4.061×10 ⁸	2.291×10 ⁸	1.752×10 ⁸	9.678×10 ⁷
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	2.109	0.988	0.916	0.992	0.832
Δ_{LOFMCR} (PCA – Exp.)	-2.326	-1.501	-0.954	-0.644	-1.383
R_{Excitação}	+0.886- +0.892	+0.919- +0.884	+0.862- +0.810	+0.817- +0.786	+0.839- +0.800
	+0.850- +0.879	+0.809- +0.831	+0.738- +0.766	+0.738- +0.782	+0.740- +0.779
R_{Emissão}	+0.981	+0.942	+0.958	+0.961	+0.967
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	28146.267 (4726.406)	26759.128 (4451.661)	27019.872 (4692.003)	33514.519 (4384.203)	36428.289 (4939.207)
b	131179.445 (15821.179)	113395.407 (14901.496)	114403.412 (15706.016)	111665.282 (14675.685)	111373.643 (16533.509)
S_{y/x}	6136.884	5780.121	6092.168	5692.526	6412.828
R	0.9858	0.9832	0.9817	0.9832	0.9787

b) com restrição de não negatividade nas duas dimensões e outras avaliações

	Outras avaliações			
	4 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc.)	4 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc. e unimodilidade no componente secundário na primeira dimensão)	5 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc.)	5 componentes (matriz (conc.×emi.)×exc. e unimodilidade no componente secundário na primeira dimensão)
C_{estimada} (ppm)	0.303 (0.029)	0.305 (0.029)	0.299 (0.027)	0.302 (0.028)
Recuperação (%)	99.955	100.820	98.694	99.811
LD (3S_{y/x}/b)	0.059	0.060	0.057	0.059
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	97.385	97.364	98.259	98.267
ssq_{resíduos}	4.478×10 ⁸	4.554×10 ⁸	1.985×10 ⁸	1.968×10 ⁹
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	0.654	0.744	0.740	0.723
Δ_{LOFMCR} (PCA – Exp.)	-1.961	-1.893	-1.001	-1.010
R_{Excitação}	+0.877	+0.829	+0.874	+0.863
	+0.776 - +0.700	+0.779 - +0.707	+0.795 - +0.702	+0.800 - +0.708
R_{Emissão}	+0.618 - +0.643	+0.631 - +0.653	+0.638 - +0.657	+0.642 - +0.663
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	36976.857 (1847.581)	36233.771 (1831.317)	37212.006 (1811.194)	36853.886 (1833.240)
b	122100.240 (6184.595)	118610.800 (6130.153)	124446.300 (6062.793)	121860.269 (6136.590)
S_{y/x}	2399.057	2377.693	2351.902	2380.517
R	0.9974	0.9973	0.9976	0.9975

* Ver rodapé da Tabela 4.6.

Estimativas do modelo mais adequado

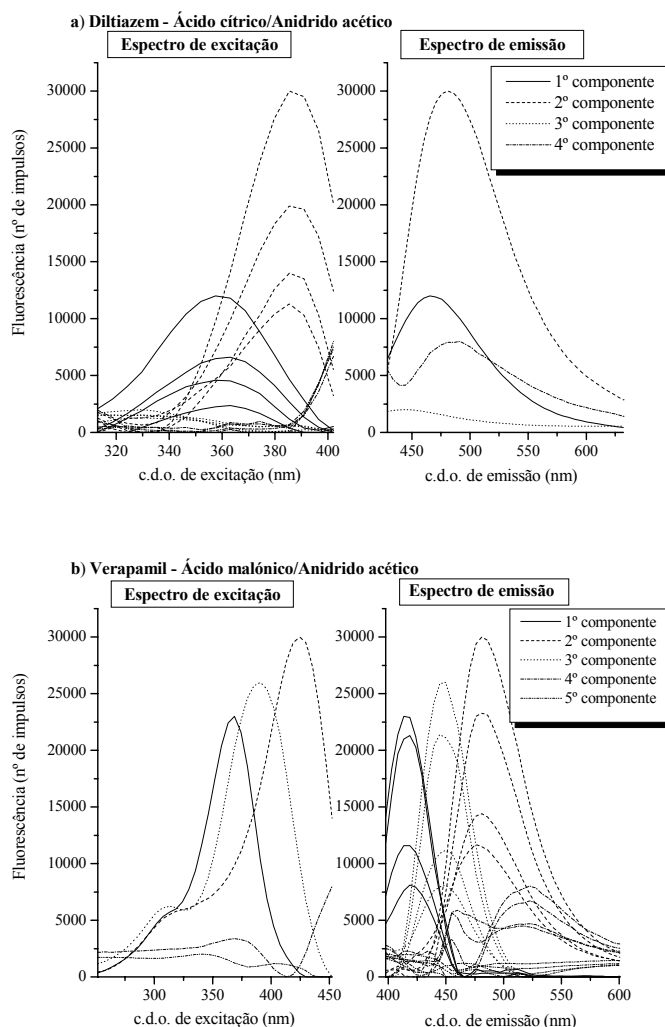


Fig. 8.13 – Espectros de excitação e de emissão estimados pelo modelo MCR-ALS de 4 componentes na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão] do padrão de a) Diltiazem 0.300 ppm por reacção de ácido cítrico com anidrido acético e de 5 componentes e unimodalidade no componente secundário na primeira dimensão na análise da matriz [(concentração × emissão) × excitação] do padrão de b) Verapamil 0.303 ppm por reacção de ácido malónico com anidrido acético. Em ambos os modelos é aplicada a restrição de não negatividade nas duas dimensões e as estimativas iniciais são por estimativas de MCR-ALS sem restrições respectivamente de 4 e 5 componentes.

No ajuste da matriz de padrão de Diltiazem 0.300 ppm, obtida por reacção de ácido cítrico com anidrido acético, pelo modelo de MCR-ALS de quatro componentes, o primeiro componente é o composto principal com máximo a c.d.o. diferente considerado como composto secundário, o segundo componente é o composto principal, o terceiro

componente é a linha de base e o quarto componente é a linha de base com início de fluorescência elevada.

No ajuste da matriz de padrão de Verapamil 0.303 ppm, obtida por reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil, pelo modelo de MCR-ALS de cinco componentes, o primeiro e terceiro componentes são o composto principal com máximo a c.d.o. diferentes considerados como composto secundário, o segundo componente é o composto principal, o quarto componente é a linha de base com início de fluorescência elevada e o quinto componente é a linha de base.

Formulações Farmacêuticas

Para todas as formulações farmacêuticas foram analisadas as matrizes [(concentração × emissão) × excitação] pelo modelo MCR-ALS de cinco componentes, não negatividade nas duas dimensões e estimativas iniciais por estimativas de um modelo MCR-ALS de cinco componentes sem restrições. Análises com outras condições de ajuste do modelo se consideradas mais adequadas foram efectuadas.

Na Tabela 8.33 são apresentadas as condições de ajuste do modelo MCR-ALS consideradas mais adequadas na análise das matrizes obtidas com cada amostra analisada.

Como é possível verificar na Tabela 8.33, com excepção da amostra He120sr, para todas as amostras as estimativas mais adequadas foram encontradas com condições de ajuste diferentes das inicialmente consideradas. Com algumas amostras as estimativas mais adequadas foram obtidas na análise de matrizes [(concentração × excitação) × emissão], com um número de componentes entre três e seis e, além da restrição de não negatividade foi também aplicada a restrição de trilinearidade, a de unimodilidade ou as duas restrições simultaneamente.

Na quantificação das amostras de Diltiazem por reacção de ácido cítrico com anidrido acético e de Verapamil por reacção de ácido malónico com anidrido acético, as estimativas mais adequadas são encontradas para a maioria das formulações farmacêuticas com condições de ajuste do modelo idênticas na análise das amostras não fortificadas e fortificadas. As excepções verificam-se para as formulações He120sr e Isinj, em que um número menor de componentes é utilizado na análise das amostras fortificadas e, para as

formulações Df60co, Dtap e Ishta, em que um tipo de matriz diferente é utilizado na análise das amostras não fortificadas e fortificadas.

Tabela 8.33 – Condições de ajuste do modelo MCR-ALS utilizadas na análise das matrizes obtidas com as amostras não fortificadas e fortificadas de Diltiazem por reacção de ácido cítrico com anidrido acético e de Verapamil por reacção de ácido malónico com anidrido acético.

Matriz analisada	Condições de ajuste			Amostras analisadas
	Número de componentes	Restrições (duas dimensões)	Estimativas iniciais	
Amostras de Diltiazem obtidas por reacção de ácido cítrico com anidrido acético				
(Concentração × excitação) × emissão	Seis	Não negatividade	MCR-ALS sem restrições	Df60coFo
	Três	Não negatividade e trilinearidade no composto principal		Al60co e Al60coFo
	Três	Não negatividade e trilinearidade no composto principal e secundário		DtapFo
(Concentração × emissão) × excitação	Quatro	Não negatividade		He120srFo
	Cinco			He120sr
	Seis			Df60co
	Quatro	Não negatividade e trilinearidade no composto principal		Dt60co e Dt60coFo
	Cinco			Di60me e Di60meFo
	Três	Não negatividade e trilinearidade no composto principal e secundário		Dtap
	Cinco	Não negatividade e unimodilidade no composto principal e secundário nas duas dimensões		Di120me e Di120meFo
Seis	Ba90re e Ba90reFo			
Quatro	Não negatividade, unimodilidade no composto principal e secundário nas duas dimensões e trilinearidade no composto principal	He60co e He60coFo		
Amostras de Verapamil obtidas por reacção de ácido malónico com anidrido acético				
(Concentração × excitação) × emissão	Seis	Não negatividade	MCR-ALS sem restrições	Ishta
(Concentração × emissão) × excitação	Três	Não negatividade		IsinjFo
	Quatro			Isinj
	Seis			Is40co, Is40coFo e IshtaFo
	Quatro	Não negatividade e trilinearidade no composto principal e secundário		Isret e IsretFo
Cinco	Não negatividade e unimodilidade no composto principal e secundário nas duas dimensões	Ve40ra e Ve40raFo		

Na Tabela 8.34 são apresentados os resultados da análise pelo modelo MCR-ALS das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas de Diltiazem por reacção do ácido cítrico com anidrido acético.

Para a maioria das amostras são obtidos ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou superior a 0.990. Valores de coeficientes de correlação linear inferiores, são encontrados para as amostra não fortificada Di60me, Ba90re e fortificadas Ba90reFo, DtapFo e Df60coFo. Para a maioria das amostras são encontrados desvios padrão relativos de ordem de grandeza superior a 10 %. Para as amostras com um ajuste linear com coeficientes de correlação linear mais baixo são mesmo encontrados desvios padrão relativos de ordem de grandeza igual ou superior a 20%.

Para todas as amostras fortificadas e não fortificadas são obtidas recuperações de concentração total dentro do esperado. São também obtidas para a maioria das formulações farmacêuticas recuperações de fortificação por volta de 100 %. A única exceção verifica-se para a formulação Ba90re com uma recuperação de fortificação ligeiramente superior a 110 %.

Para a maioria das amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas das dosagens estimadas por HPLC-UV. São encontrados para todas as amostras não fortificadas erros de previsão inferiores a 10 %. Os erros de previsão encontrados variam desde 0.2 a 8 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Dtap e o mais alto para a amostra Ba90re. Na avaliação da quantificação por este modelo com todas as amostras não fortificadas é obtido um valor de EPM de 2.713 %, de EPT de 3.011 % e de RMSEP de 2.966.

É de referir ainda que, com condições de ajuste diferentes, são encontradas estimativas de dosagem mais próximas, para as amostras He120sr e Df60co com uma percentagem de ajuste do modelo menor e, para as amostras Dt60co e Al60co com uma percentagem de ajuste do modelo próxima.

São encontradas pelo modelo MCR-ALS, melhores estimativas de concentração do que as obtidas por análise directa e pelo modelo PARAFAC e, ligeiramente piores estimativas do que as obtidas pelo modelo PARAFAC2. São também encontradas por este modelo recuperações de fortificação de uma forma geral mais adequadas do que as obtidas por análise directa e pelos modelos PARAFAC e PARAFAC2.

Tabela 8.34 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas de Diltiazem por reacção de ácido cítrico com anidrido acético obtidas pelo modelo MCR-ALS.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Al60co	Df60co	Ba90re	Dt60co	Dtap
C_{estimada} (ppm)	0.270 (0.051)	0.294 (0.054)	0.295 (0.065)	0.281 (0.035)	0.298 (0.022)
C_{esperada} (ppm)	0.301	0.300	0.300	0.301	0.300
Recuperação (%)	89.825	97.949	98.209	93.299	99.390
LD (3S_{y/x}/b)	0.111	0.113	0.135	0.075	0.046
DOS_{estimada} (mg)	53.888	58.723	88.387	56.030	198.667
DOS_{estimada} HPLC(mg)	54.645	57.019	81.617	57.184	198.360
EP (%)	1.385	2.989	8.295	2.018	0.155
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	98.585	99.556	99.329	98.843	97.988
SSQ_{resíduos}	9.346×10 ⁷	1.475×10 ⁷	2.283×10 ⁷	5.535×10 ⁷	1.490×10 ⁸
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	13	50 (máx.)	48
LOF_{MCR vs. PCA}	0.573	0.277	0.565	1.057	1.675
Δ_{LOFMCR} (PCA – Exp.)	-0.843	-0.167	-0.105	-0.100	-0.337
R_{Excitação}	+0.976	+0.997	+0.997	+0.992	+0.979
R_{Emissão}	+0.992-+0.992	+0.946-+0.951	+0.906-+0.956	+0.967-+0.967	+0.991-+0.991
	+0.992-+0.992	+0.976-+0.951	+0.949-+0.917	+0.967-+0.967	+0.991-+0.991
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	37118.121 (3935.718)	50309.188 (4944.886)	41234.981 (4839.687)	33675.325 (2307.981)	33549.455 (1342.071)
b	137466.803 (13260.283)	170984.377 (16660.388)	139778.197 (16305.951)	119949.622 (7776.085)	112517.361 (4521.726)
S_{y/x}	5109.051	6419.077	6282.516	2996.046	1742.175
R	0.9908	0.9906	0.9867	0.9958	0.9984

a) amostras não fortificadas (continuação)

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas			
	Di60me	Di120me	He60co	He120sr
C_{estimada} (ppm)	0.296 (0.110)	0.280 (0.022)	0.273 (0.024)	0.287 (0.046)
C_{esperada} (ppm)	0.301	0.301	0.301	0.301
Recuperação (%)	98.579	93.278	90.916	95.467
LD (3S_{y/x}/b)	0.228	0.047	0.053	0.097
DOS_{estimada} (mg)	59.101	111.782	54.484	114.487
DOS_{estimada} HPLC(mg)	57.689	115.152	54.870	110.619
EP (%)	2.448	2.927	0.704	3.497
Avaliação do modelo				
Ajuste (%)	98.593	99.111	98.943	98.755
SSQ_{resíduos}	1.556×10 ⁸	4.162×10 ⁷	5.095×10 ⁷	9.433×10 ⁷
Iterações	43	16	50 (máx.)	50 (máx.)
LOF_{MCR vs. PCA}	1.368	0.785	0.847	0.529
Δ_{LOFMCR} (PCA – Exp.)	-0.040	-0.104	-0.210	-0.716
R_{Excitação}	+0.990	+1.000	+0.887 - +0.887	+0.997
R_{Emissão}	+0.990 - +0.990	+0.898 - +0.915	+0.887 - +0.887	+0.928 - +0.580
	+0.990 - +0.990	+0.874 - +0.883	+0.962	+0.898 - +0.922
Calibração (y = bx + a, m = 4)				
a	38850.417 (7707.802)	37936.635 (1639.151)	40087.150 (1985.768)	39480.047 (3410.552)
b	131101.212 (25982.741)	135303.223 (5522.655)	146664.379 (6690.481)	137472.666 (11490.888)
S_{y/x}	9972.032	2127.822	2577.774	4427.322
R	0.9632	0.9983	0.9979	0.9931

(Continua)

Tabela 8.34 (Continuação) - b) amostras fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Al60coFo	Df60coFo	Ba90reFo	Dt60coFo	DtapFo
C_{estimada} total (ppm)	0.364 (0.047)	0.389 (0.094)	0.410 (0.131)	0.375 (0.059)	0.394 (0.108)
C_{esperada} total (ppm)	0.402	0.401	0.401	0.402	0.402
Recuperação (%)	90.764	96.962	102.270	93.244	98.168
LD (3S_{y/x}/b)	0.087	0.168	0.228	0.107	0.193
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	98.616	99.581	99.527	98.764	97.546
SSQ_{resíduos}	7.853×10 ⁷	9.407×10 ⁶	1.253×10 ⁷	3.754×10 ⁷	3.269×10 ⁸
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	19	50 (máx.)	41
LOF_{MCR vs. PCA}	0.855	0.182	0.315	1.138	1.923
Δ_{LOFMCR (PCA - Exp.)}	-0.530	-0.267	-0.158	-0.098	-0.531
R_{Excitação}	+0.990	+0.838-+0.850	+0.999	+0.989	+0.937-+0.937
R_{Emissão}	+0.971-+0.971	+0.841-+0.913	+0.991-+0.956	+0.890-+0.890	+0.937-+0.937
	+0.971-+0.971	+0.995	+0.988-+0.982	+0.890-+0.890	+0.978
Fortificação (C_{estimada} amostra fortificada - C_{estimada} amostra não fortificada)					
C_{estimada} (ppm)	0.094	0.095	0.115	0.094	0.096
C_{esperada} (ppm)	0.100	0.100	0.100	0.100	0.101
Recuperação (%)	94.000	95.000	115.000	94.000	95.050
Δ = C_{estimada} - C_{esperada}	-0.006	-0.005	+0.015	-0.006	-0.005
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	39202.357 (2413.793)	53034.012 (5888.755)	50231.911 (7153.178)	40678.475 (2992.696)	55227.018 (6941.021)
b	107601.722 (8132.590)	136332.379 (19840.489)	122424.991 (24100.602)	108599.916 (10083.040)	140083.624 (23385.799)
S_{y/x}	3133.404	7644.337	9285.715	3884.892	9010.309
R	0.9943	0.9795	0.9634	0.9915	0.9732
b) amostras fortificadas (continuação)					
Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Di60meFo	Di120meFo	He60coFo	He120srFo	
C_{estimada} total (ppm)	0.395 (0.052)	0.379 (0.216)	0.374 (0.017)	0.388 (0.048)	
C_{esperada} total (ppm)	0.402	0.402	0.401	0.402	
Recuperação (%)	98.326	94.335	93.237	96.553	
LD (3S_{y/x}/b)	0.092	0.394	0.030	0.087	
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	97.782	98.661	98.278	98.735	
SSQ_{resíduos}	5.866×10 ⁸	7.231×10 ⁷	1.516×10 ⁸	1.046×10 ⁸	
Iterações	50 (máx.)	14	50 (máx.)	22	
LOF_{MCR vs. PCA}	2.185	1.468	1.630	0.863	
Δ_{LOFMCR (PCA - Exp.)}	-0.035	-0.078	-0.092	-0.402	
R_{Excitação}	+0.999	+0.976	+0.921 - +0.921	+0.996	
R_{Emissão}	+0.979 - +0.979	+0.709 - +0.752	+0.921 - +0.921	+0.927 - +0.929	
	+0.979 - +0.979	+0.702 - +0.649	+0.985	+0.843 - +0.928	
Fortificação (C_{estimada} amostra fortificada - C_{estimada} amostra não fortificada)					
C_{estimada} (ppm)	0.099	0.099	0.101	0.101	
C_{esperada} (ppm)	0.101	0.100	0.100	0.101	
Recuperação (%)	98.020	99.000	101.000	100.000	
Δ = C_{estimada} - C_{esperada}	-0.002	-0.001	+0.001	0	
Calibração (y = bx + a, m = 4)					
a	72070.764 (4297.544)	29866.610 (7988.595)	53817.178 (119.804)	49761.958 (2861.032)	
b	182423.871 (14479.355)	29866.610 (26915.301)	143785.472 (3772.861)	128169.433 (9644.443)	
S_{y/x}	5578.747	10370.190	1453.645	3714.426	
R	0.9938	0.9006	0.9993	0.9944	

* Ver rodapé da Tabela 6.26.

Na Tabela 8.35 são apresentados os resultados da análise pelo modelo MCR-ALS das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas de Verapamil por reacção do ácido malónico com anidrido acético.

Para a maioria das amostras são obtidos ajustes lineares com coeficientes de correlação linear de ordem de grandeza igual ou inferior a 0.990. As únicas excepções, verificam-se para a amostra não fortificada Ve40ra e fortificada IshtaFo. Para todas as amostras, são obtidos desvios padrão relativos superiores a 10 %. Para as amostras Isinj, Is40co, Ve40raFo, IsinjFo e IsretFo com um ajuste linear com coeficientes de correlação linear mais baixo avaliado, são mesmo encontrados desvios padrão relativos de ordem de grandeza igual ou superior a 20 %.

Para todas as amostras fortificadas e não fortificadas são obtidas recuperações próximas de 100 %. Para todas as formulações são também obtidas recuperações de fortificação por volta de 100 %.

Para a maioria das amostras não fortificadas são obtidas dosagens estimadas próximas das dosagens estimadas por HPLC-UV. Para todas as amostras não fortificadas são encontrados erros de previsão inferiores a 10 %. Os erros de previsão encontrados variam desde 0.5 a 3 %. O erro de previsão mais baixo é obtido para a amostra Ishta e o mais alto para a amostra Isinj. Na avaliação da quantificação por este modelo com todas as amostras não fortificadas é obtido um valor de EPM de 1.627 %, de EPT de 0.995 % e de RMSEP de 1.126.

É de referir ainda que, com condições de ajuste diferentes, são obtidas estimativas de dosagem mais próximas para a formulação Isinj, com uma percentagem de ajuste do modelo menor e, para as formulações Ve40ra e Isret, com uma percentagem de ajuste do modelo próxima.

São encontradas pelo modelo MCR-ALS melhores estimativas de concentração do que as obtidas por análise directa e pelos modelos PARAFAC e PARAFAC2. São também encontradas por este modelo recuperações de fortificação mais adequadas do que as obtidas por análise directa e próximas às obtidas pelo modelo PARAFAC e PARAFAC2.

Tabela 8.35 – Estimativas de concentração das amostras a) não fortificadas e b) fortificadas de Verapamil por reacção do ácido malónico com anidrido acético obtidas pelo modelo MCR-ALS.*

a) amostras não fortificadas

Parâmetros avaliados	Amostras analisadas				
	Ve40ra	Isinj	Is40co	Isret	Ishta
$C_{estimada}$ (ppm)	0.288 (0.046)	0.290 (0.109)	0.283 (0.084)	0.273 (0.029)	0.275 (0.032)
$C_{esperada}$ (ppm)	0.301	0.300	0.301	0.301	0.301
Recuperação (%)	95.730	96.737	94.022	90.990	91.671
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.098	0.230	0.179	0.063	0.069
$DOS_{estimada}$ (mg)	38.327	4.833	37.639	109.034	219.630
$DOS_{estimada}$ HPLC (mg)	38.979	4.679	37.362	111.183	220.724
EP (%)	1.673	3.291	0.741	1.933	0.496
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	97.077	97.654	99.116	96.455	98.005
$ssq_{residuos}$	6.737×10^8	2.911×10^8	5.853×10^7	5.839×10^8	1.155×10^8
Iterações	6	50 (máx.)	50 (máx.)	31	50 (máx.)
LOF_{MCR} vs. PCA	2.195	0.608	0.560	2.155	1.209
Δ_{LOFMCR} (PCA – Exp.)	-0.728	-1.737	-0.324	-1.391	-0.786
$R_{Excitação}$	+0.892	+0.804	+0.886	+0.948	+0.800-+0.894
$R_{Emissão}$	+0.656-+0.824	+0.783-+0.759	+0.746-+0.786	+0.921-+0.921	+0.813-+0.784
	+0.593-+0.597	+0.798-+0.799	+0.786-+0.757	+0.921-+0.921	+0.984
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	40733.387 (3552.390)	31185.048 (6341.136)	37815.609 (6151.874)	25815.391 (1524.725)	27927.369 (1807.442)
b	141566.486 (12002.343)	107457.618 (21354.464)	133733.360 (20785.135)	94414.821 (5151.538)	101379.631 (6086.758)
$S_{y/x}$	4612.244	8232.923	7987.601	1979.626	2346.453
R	0.9929	0.9627	0.9767	0.9970	0.9964
b) amostras fortificadas					
Parâmetros avaliados	Amostras fortificadas analisadas				
	Ve40raFo	IsinjFo	Is40coFo	IsretFo	IshtaFo
$C_{estimada}$ (ppm)	0.385 (0.117)	0.387 (0.101)	0.387 (0.087)	0.371 (0.071)	0.383 (0.062)
$C_{esperada}$ (ppm)	0.403	0.401	0.401	0.402	0.403
Recuperação (%)	95.544	96.313	96.481	92.283	94.752
LD ($3S_{y/x}/b$)	0.212	0.181	0.157	0.131	0.113
Avaliação do modelo					
Ajuste (%)	98.625	96.047	98.795	97.051	97.420
$ssq_{residuos}$	5.527×10^7	1.413×10^9	1.030×10^8	3.394×10^8	1.523×10^8
Iterações	50 (máx.)	50 (máx.)	50 (máx.)	30	47
LOF_{MCR} vs. PCA	0.505	1.885	0.862	1.936	1.784
Δ_{LOFMCR} (PCA – Exp.)	-0.870	-3.068	-0.343	-1.013	-0.796
$R_{Excitação}$	+0.884	+0.953	+0.986	+0.872	+0.817
$R_{Emissão}$	+0.848-+0.843	+0.926-+0.929	+0.812-+0.849	+0.670-+0.670	+0.622-+0.636
	+0.817-+0.823	+0.927-+0.935	+0.855-+0.801	+0.670-+0.670	+0.652-+0.664
Fortificação ($C_{estimada}$ amostra fortificada – $C_{estimada}$ amostra não fortificada)					
$C_{estimada}$ (ppm)	0.097	0.097	0.104	0.098	0.108
$C_{esperada}$ (ppm)	0.101	0.101	0.101	0.101	0.102
Recuperação (%)	96.040	96.040	102.970	97.030	105.882
$\Delta = C_{estimada} - C_{esperada}$	-0.004	-0.004	+0.003	-0.003	+0.006
Calibração ($y = bx + a$, $m = 4$)					
a	28814.614 (4076.979)	42508.947 (5114.981)	41695.319 (4351.469)	31577.698 (2873.683)	17844.044 (1351.635)
b	74877.745 (13729.669)	109956.181 (17225.255)	107788.468 (14654.045)	85141.121 (9677.440)	46748.348 (4566.726)
$S_{y/x}$	5293.305	6641.005	5949.519	3731.029	1754.895
R	0.9680	0.9763	0.9820	0.9873	0.9906

* Ver rodapé da Tabela 7.23.

8.4.2.4 – Avaliação global

Na Fig. 8.14 são apresentadas as representações gráficas das percentagens de ajuste obtidas com os modelos de análise multivariada na análise: das matrizes de etanol e de padrão de Diltiazem 0.300 ppm obtidas por reacção de ácido cítrico e anidrido acético; das matrizes de etanol e de padrão de Verapamil 0.303 ppm obtidas por reacção de ácido malónico e anidrido acético em função do número de componentes.

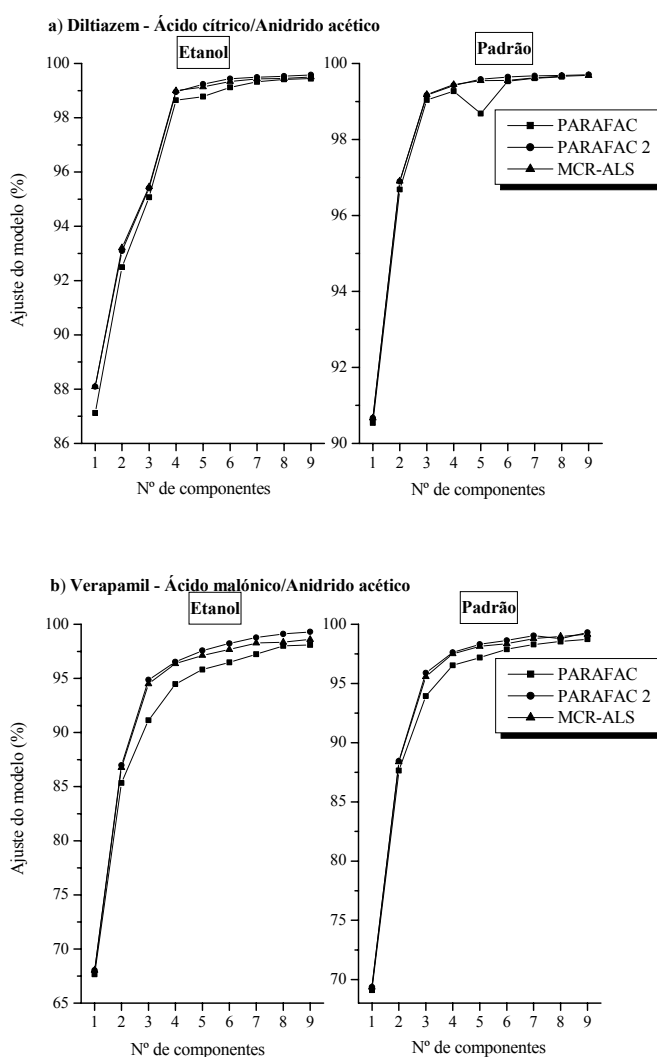


Fig. 8.14 – Gráfico dos valores de percentagem de ajuste dos modelos PARAFAC obtidos na análise da matriz [excitação × emissão × concentração], PARAFAC2 na análise da matriz [emissão × excitação × concentração] e MCR-ALS na análise da matriz [(concentração × excitação) × emissão] do solvente etanol e padrão. Matrizes de etanol e de padrão Diltiazem 0.300 ppm obtidas por a) reacção de ácido cítrico e anidrido acético e matrizes de etanol e padrão de Verapamil 0.301 ppm obtidas por b) reacção de ácido malónico e anidrido acético. Ajustes dos modelos obtidos com não negatividade em todas as dimensões para os modelos PARAFAC e MCR-ALS e na primeira e terceira dimensões para o modelo PARAFAC2.

Como se pode verificar na Fig. 8.14, na análise das matrizes de etanol e padrão de Diltiazem, obtidas por reação de ácido cítrico com anidrido acético e, de Verapamil obtidas por reação de ácido malónico com anidrido acético, são encontradas para os modelos PARAFAC2 e MCR-ALS percentagens de ajuste do modelo, de uma forma geral, mais próximas e ligeiramente superiores às encontradas com o modelo PARAFAC. A maior percentagem de ajuste do modelo obtida pelos modelos PARAFAC2 e MCR-ALS, relativamente ao modelo PARAFAC, para todos os números de componentes é mais notória para as matrizes de Verapamil obtidas por reação de ácido malónico com anidrido acético.

Na análise da matriz de etanol e de padrão de cada um dos compostos são também obtidos resultados ligeiramente diferentes na comparação das percentagens de ajuste do modelo obtidas com os três modelos. Para os dois compostos na análise da matriz de etanol verifica-se uma maior diferença nas percentagens de ajuste do modelo entre os modelos PARAFAC2 e MCR-ALS e o modelo PARAFAC.

Por reação de ácido cítrico com anidrido acético, tanto na análise da matriz de etanol como na de padrão, verifica-se uma maior proximidade na percentagem de ajuste do modelo obtida pelos três modelos entre um e três e entre seis e nove componentes. Para quatro e cinco componentes verifica-se uma maior diferença na percentagem de ajuste do modelo, mais notória para a matriz de padrão, entre os modelos PARAFAC2 e MCR-ALS e o modelo PARAFAC. Também, tanto na análise da matriz de etanol como na de padrão, verificam-se percentagens de ajuste do modelo superiores, entre um e quatro componentes, para o modelo MCR-ALS e, entre cinco e nove componentes, para o modelo PARAFAC2. Uma maior proximidade nas percentagens de ajuste entre os modelos PARAFAC e MCR-ALS, é encontrada para a matriz de etanol, para um número de componentes entre sete e nove e, para a matriz de padrão, para um número de componentes entre seis e nove.

Por reação de ácido malónico com o anidrido acético são encontradas maiores percentagens de ajuste do modelo na análise da matriz de etanol para todos os componentes com o modelo PARAFAC2. Uma maior proximidade nas percentagens de ajuste do modelo obtidas com os modelos PARAFAC2 e MCR-ALS é encontrada até quatro componentes. Na análise da matriz de padrão, são de uma forma geral obtidas para todos os componentes pelos modelos PARAFAC2 e MCR-ALS percentagens de ajuste do modelo mais próximas.

Atendendo à avaliação com os dois tipos de matrizes, apesar da estrutura trilinear dos dados, é esperado algum desvio a trilinearidade e os modelos mais adequados parecem ser os dois modelos que não assumem a estrutura trilinear dos dados.

Na Fig. 8.15 e 8.16 são apresentadas as representações gráficas dos coeficientes de correlação linear das estimativas do componente principal na dimensão do espectro de excitação, de emissão e concentração obtidos com os três modelos na análise de cada uma das amostras não fortificadas e os verificados experimentalmente. Para representação gráfica, se mais que um espectro de excitação ou de emissão é estimado, com o modelo MCR-ALS é considerado o primeiro espectro estimado e com o modelo PARAFAC2 o primeiro espectro de excitação ou emissão estimado ou o espectro de excitação ou emissão estimado ao c.d.o. respectivamente de emissão ou excitação de fluorescência máxima. Na Fig. 8.15 é apresentada a representação gráfica dos valores de coeficiente de correlação linear obtidos para as amostras de Diltiazem por reacção de ácido cítrico e anidrido acético e na Fig. 8.16 é apresentada a representação gráfica dos valores de coeficiente de correlação linear obtidos para as amostras de Verapamil por reacção de ácido malónico e anidrido acético.

Como se pode verificar pelas Fig. 8.15 e 8.16, da avaliação dos coeficientes de correlação linear do componente principal nas três dimensões são encontrados resultados diferentes na análise das amostras de Diltiazem por reacção de ácido cítrico com anidrido acético e na análise das amostras de Verapamil por reacção de ácido malónico com anidrido acético.

Na análise das amostras de Diltiazem por reacção de ácido cítrico com anidrido acético (Fig. 8.15), não é claro que um modelo apresente as melhores estimativas nas três dimensões. De uma forma geral são encontradas melhores estimativas na dimensão do espectro de excitação e de emissão pelo modelo MCR-ALS e na dimensão da concentração pelo modelo PARAFAC. Na dimensão do espectro de excitação, são obtidas pelo modelo PARAFAC estimativas próximas às obtidas com o modelo MCR-ALS. Uma maior proximidade nas estimativas obtidas nesta dimensão com os três modelos é encontrada para as amostras Al60co, Df60co, Dt60co e Dtap. Na dimensão do espectro de emissão, excepto para o modelo PARAFAC com a amostra Be90re e para o modelo PARAFAC2 com a amostra He60co, são obtidas pelos modelos PARAFAC e PARAFAC2 estimativas

próximas às obtidas com o modelo MCR-ALS. Uma maior proximidade nas estimativas obtidas nesta dimensão com os três modelos é encontrada com as amostras Dtap e Di60me. Na dimensão de concentração, como já referido, e excepto para a amostra Di60me, são obtidas melhores estimativas com o modelo PARAFAC. No entanto, tal como na dimensão do espectro de emissão com os outros dois modelos são obtidas estimativas próximas. Uma maior proximidade nas estimativas obtidas nesta dimensão com os três modelos é encontrada com as amostras Dtap, Di120me e He60co.

Na análise das amostras de Verapamil por reacção de ácido malónico com anidrido acético (Fig. 8.16) o modelo PARAFAC2 é o que apresenta de uma forma geral as melhores estimativas nas três dimensões. Na dimensão do espectro de excitação, são obtidas pelo modelo MCR-ALS estimativas próximas às obtidas com o modelo PARAFAC2. Na dimensão do espectro de emissão, só para a amostra Ve40ra é obtida pelo modelo PARAFAC uma melhor estimativa. Na dimensão de concentração, as estimativas mais próximas são obtidas pelo modelo MCR-ALS. Uma maior proximidade nas estimativas obtidas nesta dimensão com os três modelos é encontrada com as amostras Ve40ra, Isret e Ishta.

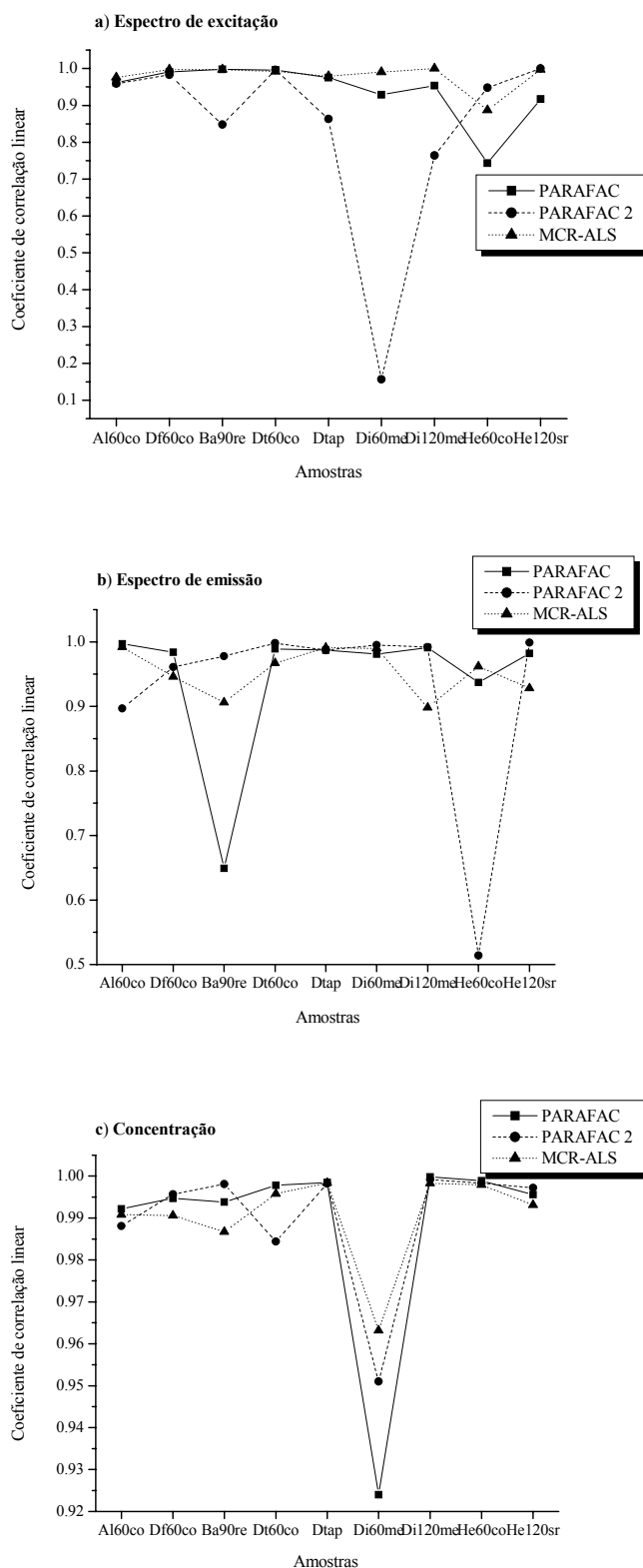


Fig. 8.15 – Comparação dos coeficientes de correlação linear do componente principal entre os espectros de excitação a), espectros de emissão b) e concentração c) estimados na análise das amostras não fortificadas de Diltiazem por reacção de ácido cítrico e anidrido acético e os obtidos experimentalmente.

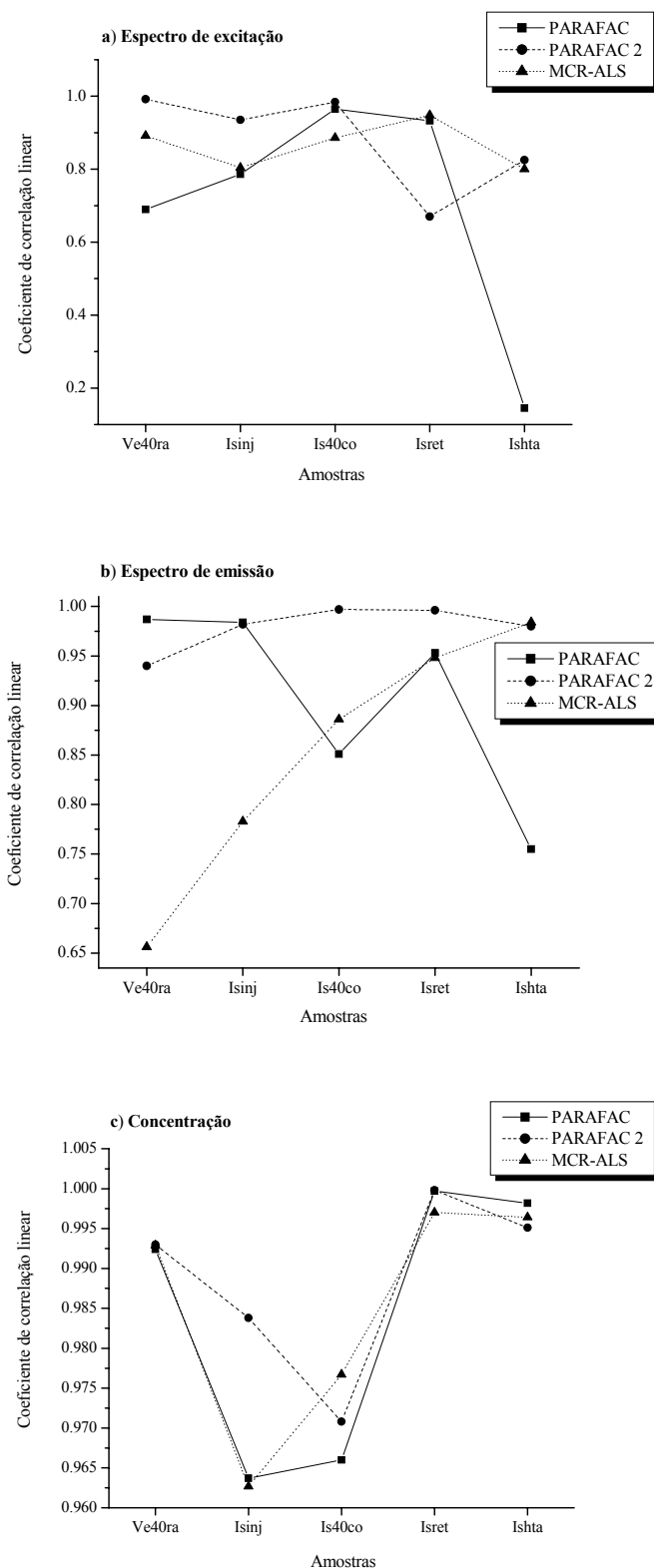


Fig. 8.16 – Comparação dos coeficientes de correlação linear do componente principal entre os espectros de excitação a), espectros de emissão b) e concentração c) estimados na análise das amostras não fortificadas de Verapamil por reacção de ácido malónico e anidrido acético e os obtidos experimentalmente.

Na Fig. 8.17 e 8.18 são apresentadas as representações gráficas das recuperações e dos valores de erro de previsão obtidos na análise das amostras não fortificadas com os três modelos. As recuperações e erros de previsão obtidos por análise directa são também representados. Na Fig. 8.17 é apresentada a representação gráfica das recuperações e dos valores de erro de previsão obtidos para as amostras de Diltiazem por reacção de ácido cítrico e anidrido acético e na Fig. 8.18 é apresentada a representação gráfica dos valores das recuperações e dos valores de erro de previsão para as amostras de Verapamil por reacção de ácido malónico e anidrido acético.

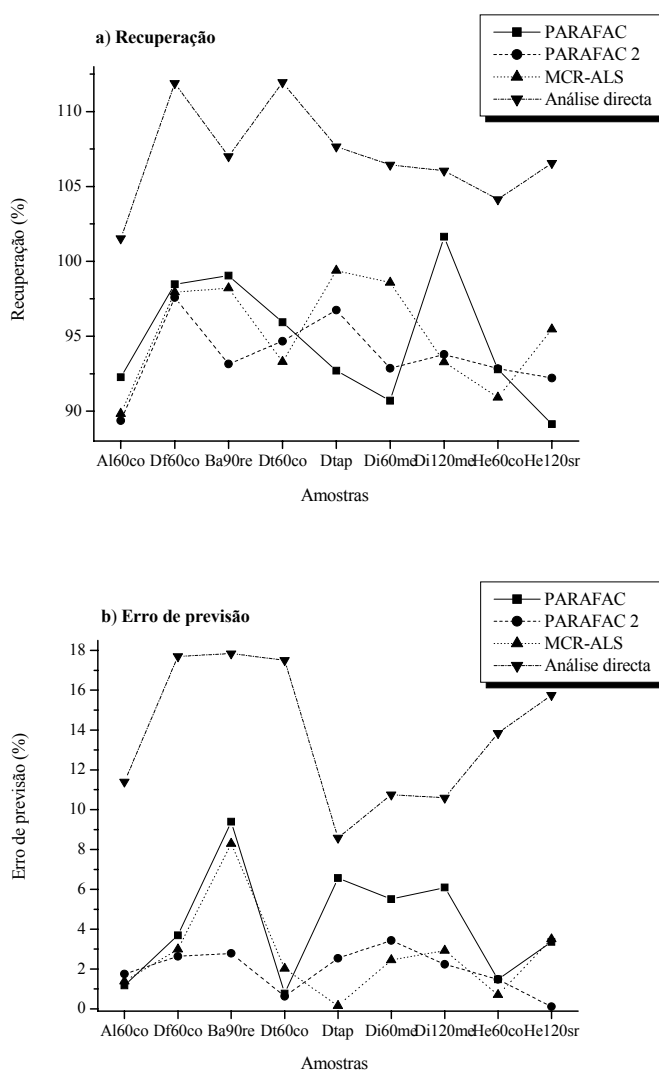


Fig. 8.17 – Comparação da recuperação a) e erros de previsão b) obtidos com cada amostra não fortificada de Diltiazem por reacção de ácido cítrico e anidrido acético por análise directa e pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS.

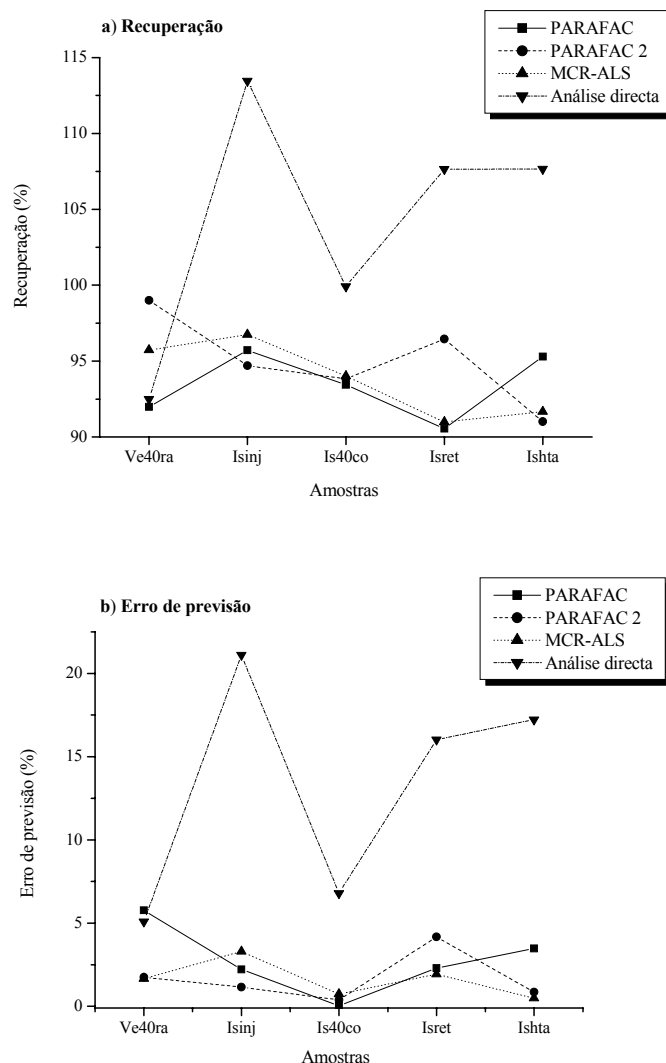


Fig. 8.18 – Comparação da recuperação a) e erros de previsão b) obtidos com cada amostra não fortificada de Verapamil por reacção de ácido malónico e anidrido acético por análise directa e pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS.

Como se pode ver nas Fig. 8.17 e 8.18 são encontrados por análise directa, quer para as amostras de Diltiazem obtidas por reacção de ácido cítrico com anidrido acético quer para as amostras de Verapamil obtidas por reacção de ácido malónico com anidrido acético, recuperações e erros de previsão mais altos. A única excepção, verifica-se para a amostra Ve40ra com uma recuperação e um erro de previsão próximos aos obtidos com os três modelos. De uma forma geral, tanto para as amostras de Diltiazem como para as amostras de Verapamil com os três modelos, são encontradas para todas as amostras recuperações próximas.

Na análise das amostras de Diltiazem por reacção de ácido cítrico com anidrido acético os menores erros de previsão são de uma forma geral encontrados para a maioria das amostras com o modelo PARAFAC2. Os erros de previsão mais próximos a estes são encontrados com o modelo MCR-ALS.

Na análise das amostras de Verapamil por reacção de ácido malónico com anidrido acético os menores erros de previsão são de uma forma geral encontrados para a maioria das amostras com o modelo MCR-ALS. Os erros de previsão mais próximos a estes são encontrados com o modelo PARAFAC2.

Na Tabela 8.36, são apresentados os valores de EPT, RMSEP, EPM e LDM obtidos com o conjunto das amostras não fortificadas analisadas por análise directa e pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS. Para os modelos de análise multivariada, é também apresentado o valor de AjMM.

Tabela 8.36 – Valores de EPM, EPT, RMSEP, LDM e AjMM obtidos com todas as amostras não fortificadas.

Modelo	Parâmetros avaliados				
	EPT (%)	RMSEP	EPM (%)	LDM (ppm)	AjMM (%)
Reacção de ácido cítrico com anidrido acético catalizada pelo Diltiazem					
Análise directa	12.152	11.971	13.776	0.065	----
PARAFAC	5.931	5.843	4.226	0.094	99.291
PARAFAC2	2.269	2.235	1.955	0.095	99.323
MCR-ALS	3.011	2.966	2.713	0.101	98.856
Reacção de ácido malónico com anidrido acético catalizada pelo Verapamil					
Análise directa	16.656	18.846	13.251	0.139	----
PARAFAC	3.324	3.761	2.760	0.123	97.816
PARAFAC2	2.000	2.263	1.662	0.109	98.407
MCR-ALS	0.995	1.126	1.627	0.128	97.661

Quer para as amostras de Diltiazem por reacção de ácido cítrico com anidrido acético quer para as amostras de Verapamil por reacção de ácido malónico com anidrido acético são encontrados pelos modelos PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS valores de EPT, RMSEP e EPM bastante inferiores aos obtidos por análise directa. Para as amostras dos dois compostos são também encontrados valores de AjMM próximos com os três modelos. Ainda, para as amostras dos dois compostos, e relativamente ao encontrado pelo modelo PARAFAC, são encontrados pelos modelos PARAFAC2 e MCR-ALS valores inferiores de EPT, RMSEP e EPM.

Para as amostras de Diltiazem por reacção de ácido cítrico com anidrido acético são encontrados pelo modelo PARAFAC2 valores de EPT, RMSEP, EPM e LDM mais baixos do que os obtidos com o modelo MCR-ALS.

Para as amostras de Verapamil por reacção de ácido malónico com anidrido acético são encontrados pelo modelo MCR-ALS valores de EPT e RMSEP menores e de EPM e LDM valores próximos aos obtidos com o modelo PARAFAC2.

Atendendo a todos os critérios avaliados as estimativas de concentração mais adequadas, das amostras de Diltiazem por reacção de ácido cítrico com anidrido acético são obtidas com o modelo PARAFAC2 e, das amostras de Verapamil por reacção de ácido malónico com anidrido acético são obtidas com o modelo MCR-ALS. Estimativas de concentração, de uma forma geral adequadas, são também obtidas com o modelo MCR-ALS para as amostras de Diltiazem e com o modelo PARAFAC2 para as amostras de Verapamil. É no entanto de realçar que, para as amostras de Diltiazem por reacção de ácido cítrico com anidrido acético são encontradas estimativas adequadas nas três dimensões com o modelo PARAFAC e, para as amostras de Verapamil é com o modelo PARAFAC2 que de uma forma geral são obtidas melhores estimativas nas três dimensões.

8.5. Referências

- [1] – Mazzo, D. J., Obetz, C. L. e Shuster, J., Diltiazem hydrochloride, in *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, Vol. 23*. Academic Press, New York, 1994, pp. 53 – 98.
- [2] – Chang, Z. L., Verapamil, in *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, Vol. 17*. Academic Press, New York, 1988, pp. 646 – 674.
- [3] – Feigl, F., *Spot tests in organic analysis*, 7ª edição, Elsevier, Amesterdão (1966)
- [4] – Sass, S., Kaufman, J. J., Cardenas, A. A. e Martin, J. J., Colorimetric estimation of tertiary and quaternary amines. *Analytical Chemistry* **30** (1958) 529 – 531.
- [5] – Karawya, M. S., Sharaf, A. A. e Diab, A. M., Colorimetric assay of Reserpine in formulations and biological fluids. *Journal of AOAC* **59** (1976) 795 – 798.
- [6] – Gazy, A. A., Mahgoub, H., El-Yazbi, F. A., Al-Syed, M. A. e Youssef, R. M., Determination of some histamine H₁-receptor antagonists in dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **30** (2002) 859 – 867.
- [7] – Thomas, A. D., Spectrophotometric determination of some drugs containing a tertiary amine group. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **28** (1976) 838 – 839.
- [8] – Thomas, A. D., Spectrophotofluorometric determination of some alkaloids containing a tertiary amine group. *Talanta* **22** (1975) 865 – 869.
- [9] – Emmanuel, J. e Vieira, A. J., Sensitive colorimetric assay of Verapamil hydrochloride in pharmaceutical dosage forms. *The Eastern Pharmacist* **29** (1986) 145 – 146.



9. CONCLUSÃO

Nesta dissertação foram desenvolvidas com sucesso diversas metodologias de quantificação dos antihipertensores Nifedipina, Diltiazem e Verapamil em formulações farmacêuticas.

Estas metodologias têm uma componente experimental e uma componente quimiométrica. Do ponto de vista experimental, as contribuições mais originais focaram o desenvolvimento e optimização de métodos espectrofotométricos de UV-Vis e fluorescência com reacções de derivatização.

Foram estudadas as seguintes reacções de derivatização: (i) hidrólise alcalina de Nifedipina; (ii) redução de Nifedipina e reacção com OPA; (iii) reacção de Diltiazem com a hidroxilamina; (iv) catálise da reacção de condensação de ácidos orgânicos dicarboxílicos com anidrido acético catalisada pelo Diltiazem ou Verapamil. Estas reacções foram optimizadas utilizando uma estratégia de planeamento experimental com o objectivo de aumentar a sensibilidade à detecção dos antihipertensores.

As metodologias de quantificação de Nifedipina em formulações farmacêuticas foram as seguintes: (i) hidrólise alcalina com medição espectrofotométrica de UV-Vis; (ii) redução e reacção com OPA com medição espectrofotométrica de fluorescência. Na Tabela 9.1 apresenta-se um resumo das características das metodologias. Dos dois métodos optimizados a hidrólise alcalina é o de mais fácil e rápida execução, e o que necessita de

menores exigências laboratoriais (reagentes e equipamento). No entanto, este método é menos sensível e apresenta menores limites de detecção do que a redução e reação com OPA. Contudo, no que diz respeito à quantificação de Nifedipina em formulações farmacêuticas ambos os métodos poderão ser utilizados.

Tabela 9.1 – Resumo de algumas características experimentais dos métodos otimizados.

Metodologia	Solvente	Limite de Detecção (ppm)	Sensibilidade (int.ppm ⁻¹)	Gama linear de resposta (ppm)
Nifedipina				
Hidrólise alcalina	DMSO	1.331-1.627	0.030	5-25
Redução e reação com OPA	Etanol	0.097-0.478	5180	0.5-10
Diltiazem				
Reação com hidroxilamina	Metanol	9.906-9.943	0.002	100-500
Condensação do ácido cítrico	Etanol	0.065-0.104	56766	0.05-1
Condensação do ácido malônico	Etanol	0.058-0.219	62444	0.05-1
Verapamil				
Análise de fluorescência	Metanol	0.095-1.305	4007	0.1-15
Condensação do ácido cítrico	Etanol	0.093-0.117	62040	0.05-1
Condensação do ácido malônico	Etanol	0.029-0.114	63156	0.05-1

As metodologias de quantificação de Diltiazem em formulações farmacêuticas foram as seguintes: (i) reação com hidroxilamina com medição espectrofotométrica de UV-Vis; e, condensação dos ácidos cítrico (ii) ou malônico (iii) com o anidrido acético com medição espectrofotométrica de fluorescência. Na Tabela 9.1 apresenta-se um resumo das características das metodologias. Dos três métodos estudados, a reação com hidroxilamina é o de mais fácil e rápida execução, e o que necessita de menores exigências laboratoriais (reagentes e equipamento). No entanto, este método é muito menos sensível e apresenta muito menores limites de detecção do que os outros dois métodos. Por outro lado, os métodos baseados na condensação dos ácidos orgânicos são mais trabalhosos do ponto de vista laboratorial mas apresentam limites de detecção inferior e sensibilidades muito superiores.

As metodologias de quantificação de Verapamil em formulações farmacêuticas foram as seguintes: (i) medição da fluorescência; e condensação dos ácidos cítrico (ii) ou malônico (iii) com o anidrido acético com medição espectrofotométrica de fluorescência. Na Tabela 9.1 apresenta-se um resumo das características dos métodos. Dos três métodos otimizados, a medição da fluorescência do Verapamil é o de mais fácil e rápida execução. No entanto, este apresenta limites de detecção maiores e sensibilidades algo menores do

que os métodos com derivatização. De uma maneira geral, os métodos com derivatização deverão ser utilizados quando existirem excipientes na formulação farmacêutica que sejam interferentes.

Do ponto de vista quimiométrico, foram avaliados modelos de calibração multivariados, nomeadamente PARAFAC, PARAFAC2 e MCR-ALS. O modelo PARAFAC mostrou-se particularmente adequado à análise de estruturas de dados trilineares, como foi observado no estudo de matrizes MEE de analitos fluorescentes. Os modelos PARAFAC2 e MCR-ALS mostraram-se de aplicação mais geral permitindo modelar desvios da trilinearidade existentes na estrutura de dados, com origem em fenómenos químicos (reações químicas laterais) ou físicos (dispersão de luz e impossibilidade de sincronizar rigorosamente as variáveis experimentais correspondentes às dimensões na matriz de dados).

Nas metodologias desenvolvidas, e para muitas das amostras estudadas, o modelo PARAFAC2 permite obter estimativas ligeiramente melhores do que o modelo MCR-ALS. No entanto, nalguns casos de maiores desvios da trilinearidade, o modelo MCR-ALS pode originar soluções mais razoáveis.

Tabela 9.2 – Resumo de algumas características quimiométricas dos métodos otimizados.

Metodologia	Modelo	AjMM	EPT (%)	RMSEP
Nifedipina				
Hidrólise alcalina	MCR-ALS	97.655	6.965	1.162
Redução e reacção com OPA	PARAFAC2	98.658	5.993	1.000
Diltiazem				
Reacção com hidroxilamina	PARAFAC2	99.301	1.542	1.519
Condensação do ácido cítrico	PARAFAC2	99.323	2.269	2.235
Verapamil				
Análise de fluorescência	PARAFAC	97.217	1.113	1.259
Condensação do ácido malónico	MCR-ALS	97.661	0.995	1.126

Na Tabela 9.2 mostram-se algumas características dos modelos de calibração considerados mais adequados para cada uma das metodologias desenvolvidas. Com base nos parâmetros EPT e RMSEP, que traduzem a qualidade global das estimativas dos três antihipertensores em todas as formulações farmacêuticas estudadas, conclui-se que todas as metodologias desenvolvidas permitem obter boas estimativas. Ou seja, todas as estimativas das dosagens das formulações farmacêuticas estudadas apresentam um erro inferior a 10 % relativamente ao valor obtido por um método cromatográfico de referência.

O passo seguinte para o desenvolvimento das metodologias desenvolvidas no âmbito desta Tese, seria a sua aplicação à quantificação de antihipertensores em amostras biológicas. Alguns estudos preliminares foram realizados com amostras de soro humano sintético e real e revelaram que este problema não é de extrapolação directa dos resultados obtidos e descritos nesta Dissertação. De facto, outros problemas poderão existir no estudo de amostras biológicas, como exemplo interações químicas entre os fármacos e substâncias biológicas e sinais de fundos extraordinariamente complexos. No entanto, a resolução deste problema, parece passar pelo desenvolvimento de novas metodologias segundo estratégias semelhantes às utilizadas nesta Tese, nomeadamente na utilização de técnicas espectrofotométricas muito sensíveis, como a fluorescência molecular, metodologias quimiométricas para compensar sinais de fundo, e novas reacções de derivatização que desloquem o sinal analítico para o infravermelho próximo.