



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Daniel José Ferreira Santos

CONTROLO DA QUALIDADE AO NÍVEL DE UMA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química, especialização em Controlo da Qualidade e Ambiente,
orientada pelo Professor Doutor Jorge Luís Gabriel Ferreira da Silva Costa Pereira
e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra.

Julho de 2020

Daniel José Ferreira Santos

CONTROLO DA QUALIDADE AO NÍVEL DE UMA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química, especialização
em Controlo da Qualidade e Ambiente e apresentada ao
Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

Jorge Luís Gabriel Ferreira da Silva Costa Pereira

Carla Cristina Albano Dias Paiva

julho de 2020

Universidade de Coimbra



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



*“Onde quer que você esteja,
esse é o ponto de partida”*

Kabir

Agradecimentos

Ao longo dos últimos cinco anos, muitos foram aqueles que contribuíram para o meu desenvolvimento a nível profissional, intelectual e pessoal. A essas pessoas, não poderia deixar de agradecer.

Primeiramente, ao Professor Doutor Jorge L.G.F.S. Costa Pereira pela oportunidade de realizar este trabalho sob a sua alçada, pelos inúmeros conhecimentos transmitidos, pela exímia orientação científica e pela enorme disponibilidade que sempre demonstrou ao longo deste projeto.

Em segundo, à Mestre Carla C.A. Dias Paiva por toda a amabilidade e simpatia com que me recebeu na FARMALABOR e pela orientação dada ao longo deste trabalho.

A todos os colegas de trabalho nos laboratórios da FARMALABOR pela excelente receção, apoio, compreensão e boa disposição ao longo dos últimos meses, com especial agradecimento à Olga Santos, Cidália Fernandes, Ana Gabriela Silva, Isabel Travasso e Diana Silva.

A todos os meus amigos de longa data, que me acompanham e apoiam sempre e me ajudam a ser uma melhor pessoa a todos os níveis, em especial ao Cláudio Gaspar, Mariana Alves e Gracinda Alfafar.

Um agradecimento muito especial à minha namorada Beatriz Rito por toda a paciência, coragem e força que sempre me deu e por todo o conforto e alegria com que me presenteou todos os dias dos últimos meses.

Por último, mas não menos importante, um grande obrigado a toda a minha família, em especial aos meus pais que me possibilitaram o culminar de um sonho com todo o esforço e sacrifício que tão bem valorizo.

Muito obrigado a todos!

Objetivos

Este projeto do mestrado em Química, especialização em Controlo da Qualidade e Ambiente, foi desenvolvido em pleno contexto laboral, num laboratório de controlo da qualidade de uma empresa farmacêutica, a FARMALABOR.

Os objetivos iniciais estavam relacionados com dois tipos de validação - validação de um método analítico para a quantificação da matéria prima *Stevia* através de HPLC-UV, em consonância com outro tipo de ensaios físico-químicos mais simples e validação do *software* Empower™ 3.

Por necessidade, foram surgindo outros objetivos entre os quais o desenvolvimento de um método alternativo para a determinação do teor de humidade da matéria prima em causa.

Resumo

O presente projeto foi desenvolvido com o intuito de validar um método analítico para a determinação de dois analitos distintos - Rebaudiosídeo A e Steviosídeo - em amostras da matéria prima *Stevia* através de HPLC-UV. Os parâmetros avaliados na validação deste método foram: identificação, especificidade e seletividade, linearidade, limiares e gama analítica, sensibilidade, precisão, exatidão e coerência. Verificaram-se ainda os parâmetros de adequabilidade do sistema. Os resultados obtidos remetem para o sucesso da validação do método analítico para a matéria prima em causa.

Neste trabalho validou-se e otimizou-se, também, o *software* Empower™ 3, com o objetivo de interligar em rede sistemas HPLC um processo de cálculo automatizado e robusto.

Foi ainda desenvolvida uma proposta de método de determinação do teor de humidade por FTIR alternativo ao processo comum por KF. Este método foi determinado através de processos de modelação por PLS e por correlação direta.

Palavras-chave:

Controlo da qualidade, Indústria Farmacêutica, validação de métodos analíticos, *Stevia*, Rebaudiosídeo A, Steviosídeo, HPLC, validação de *software*, teor de água, modelação multivariada.

Abstract

The present project aimed to validate an analytical method for the determination of two distinct analytes - Rebaudioside A and Stevioside - in samples of the *Stevia* raw material through HPLC-UV. Several parameters in the method validation were evaluated, namely: identification, specificity and selectivity, linearity, analytical limits and range, sensitivity, precision, accuracy and consistency. The system's suitability parameters were also verified. The obtained results refer to the successful validation of the analytical method.

In this work, the Empower™ 3 *software* was validated and optimized, in order to interconnect an automated and robust calculation network process of HPLC systems.

A proposal for a determination method of the moisture content by FTIR was also developed as an alternative to the common process by KF. This method was determined by PLS and direct correlation modeling processes.

Keywords:

Quality control, Pharmaceutical Industry, validation of analytical methods, *Stevia*, Rebaudioside A, Stevioside, HPLC, *software* validation, water content, multivariate modeling.

Preâmbulo

O presente trabalho foi realizado no âmbito da unidade curricular de Projeto Científico/Industrial, para a conclusão do Mestrado em Química, especialização em Controlo da Qualidade e Ambiente do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

O texto encontra-se organizado em cinco capítulos, sendo que no primeiro são abordados conceitos relativos à Indústria Farmacêutica, relacionados com a unidade industrial onde foi desenvolvido o projeto, incluindo a automatização de processos em laboratório e outros assuntos sobre a matéria prima estudada ao longo deste trabalho.

No segundo capítulo encontra-se toda a fundamentação necessária à compreensão dos estudos e testes realizados, bem como uma introdução estatística necessária relacionada com validação de métodos analíticos e modelação.

Já no terceiro capítulo estão descritos os materiais e procedimentos utilizados e adotados ao longo do trabalho experimental.

No capítulo seguinte encontram-se sistematizados alguns dos resultados mais relevantes obtidos ao longo do projeto industrial e a sua respetiva discussão e explicação, sempre que possível suportada nos fundamentos estatísticos e físico-químicos necessários.

Por fim, no quinto capítulo, estão redigidas as principais conclusões retiradas sobre os resultados obtidos, bem como a abordagem a possíveis perspetivas futuras.

Para facilitar a transferência da informação entre o *software* utilizado e os programas de cálculo (Octave/MatLab e Empower™ 3) a que se recorreu, optou-se por se convencionar a representação dos números reais com o ponto “.” a indicar o separador decimal em vez da vírgula “,”, como aceite na linguagem de escrita desta tese. Na indicação das estimativas obtidas, sempre que possível, são indicados os valores das estimativas central (média) e respetiva incerteza (desvio padrão ou erro padrão) obtidas, assumindo que a incerteza do parâmetro surge indicada entre parêntesis, enquanto o respetivo intervalo de confiança, estimado de forma a prever 95 % dos casos, surge associado ao símbolo “±” e envolvido entre parêntesis retos. Para simplificação da escrita em notação científica, optou-se por se usar o símbolo “e” como indicação de números exponenciais onde, por exemplo, $0.00025 = 2.5e - 4$. No caso de se estar a usar uma notação científica abreviada, a indicação da ordem de grandeza surge após o

termo de incerteza como, por exemplo, $1.30(0.16)e3$ é usado para exprimir o valor 1.30×10^3 com uma incerteza respetiva de 0.16×10^3 .

Nomenclatura

$(1 - \alpha)$	- nível de confiança do teste estatístico
$\%CV$	- coeficiente de variação (dispersão relativa indicada de modo percentual)
$\%H(KF)$	- teor de humidade percentual obtido por KF
$\%RE$	- erro relativo (desvio relativo percentual)
$\%RecX$	- taxa de recuperação
$\%RR_i$	- resposta relativa (indicada de forma percentual)
$\%Sim_i$	- similaridade percentual entre espectros
α	- nível de significância do teste (probabilidade aceite para erros do tipo I)
\bar{x}	- média
$\chi^2_{\alpha(ndf)}$	- valor crítico da distribuição do qui-quadrado referente ao nível de confiança α e a ndf graus de liberdade
ΔX	- desvio absoluto
λ	- comprimento de onda (nm)
σ^2	- variância
σ_x	- desvio padrão da variável x (estimativa paramétrica da dispersão)
\tilde{x}	- mediana (valor correspondente ao percentil 50)
$\varepsilon_{\lambda i}$	- absorbtividade molar da espécie i ao comprimento de onda λ
A_{λ}	- absorvância registada ao comprimento de onda λ

<i>AAD</i>	- desvio médio absoluto (do Inglês, Average Absolute Deviation)
<i>AIC</i>	- critério de informação de Akaike (do Inglês, Akaike Information Criterion)
<i>ANOVA</i>	- análise de variância (do Inglês, ANalysis Of VAriance)
b_0	- ordenada na origem de uma função
b_1	- declive de uma função
b_2	- coeficiente do termo quadrático de uma função
<i>BIC</i>	- critério informativo Bayesiano (do Inglês, Bayesian Information Criterion)
$F_{\alpha}^s(ndf1,ndf2)$	- valor crítico da distribuição de Fisher-Snedcor com simetria s (unilateral ou bilateral), referente ao nível de confiança α e a $ndf1$ e $ndf2$ graus de liberdade no numerador e denominador, respetivamente
F_S	- fator de simetria (medida da divergência de um sinal cromatográfico quanto à sua forma ideal)
H_0	- hipótese nula do teste estatístico
H_1	- hipótese alternativa do teste estatístico
$IC_{0.05}$	- intervalo de confiança a 95 %
M	- densidade de pontos no espectro
<i>MAD</i>	- desvio mediano absoluto (do Inglês, Median Absolute Deviation)
<i>MSFE</i>	- erro médio de ajuste (do Inglês, Mean Square Fitting Error)
<i>MSPE</i>	- erro médio de previsão (do Inglês, Mean Square Prediction Error)
N	- dimensão da amostra (número de amostras)
N_P	- número de pratos teóricos (medida da eficiência de uma coluna cromatográfica)
ndf	- número de graus de liberdade (do Inglês, number of degrees of freedom)
$p [H_0]$	- valor de prova (do Inglês, p-value)
P_{012}	- função polinomial quadrática

P_{01}	- função polinomial linear
R^2	- coeficiente de determinação (coeficiente de correlação quadrado)
R_{adj}^2	- coeficiente de determinação ajustado
R_T	- tempo de retenção (tempo necessário para ocorrer a eluição do analito desde o injetor até ao detetor)
Res_X	- resolução espectral entre as bandas 2870 e 2849.5 cm^{-1} (zona X) de um espectro de IR
Res_Y	- resolução espectral entre as bandas 1589 e 1583 cm^{-1} (zona Y) de um espectro de IR
RR_T	- tempo de retenção relativo
Rs	- resolução de um sinal cromatográfico
S/N	- razão sinal/ruído de um sinal cromatográfico
SS	- soma de quadrados (do Inglês, Sum of Squares)
$t_{\alpha(ndf)}^s$	- valor crítico da distribuição t-Student de simetria s (unilateral ou bilateral), referente ao nível de significância α e com ndf graus de liberdade
TV	- valor do teste (expressão numérica que permite avaliar a veracidade da hipótese nula)
V_0	- volume vazio ou volume morto (corresponde ao volume de eluente entre o injetor e o detetor)
X_1	- padrão de menor concentração usado na calibração
X_N	- padrão de maior concentração usado na calibração
X_{50}	- percentil 50 (corresponde à mediana)
X_{crit}	- valor crítico (limite máximo para a aceitação da hipótese nula através do valor do teste)
X_{LD}	- limite de deteção (menor concentração que pode ser detetada)

X_{LQ}	- limite de quantificação (menor concentração a partir da qual há rigor analítico para quantificar o analito)
X_{ref}	- valor de referência
ATR	- espectroscopia de infravermelho por reflectância total atenuada (do Inglês, Attenuated Total Reflection)
CF	- campos personalizados de cálculo (do Inglês, Custom Fields)
CRM	- material de referência certificado (do Inglês Certified Reference Material)
DAD	- detetor de matriz de díodos (do Inglês, Diode Array Detector)
DISS	- ensaio de dissolução
DOS	- ensaio de doseamento
FDA	- Administração dos Medicamentos e Alimentos (do Inglês, Food and Drug Administration)
FTIR	- Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (do Inglês, Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
GLP	- boas práticas laboratoriais (do Inglês, Good Laboratory Practices)
GMP	- boas práticas de fabrico (do Inglês, Good Manufacturing Practices)
GR	- ensaio de gastro-resistência
HPLC	- cromatografia líquida de alta eficiência (do Inglês, High Performance/Pressure Liquid Chromatography)
ICH	- Conferência Internacional de Harmonização (do Inglês, International Conference of Harmonization)
IMP	- ensaio de impurezas e substâncias relacionadas
IR	- espectroscopia de infravermelho (comprimentos de onda situados entre 800 nm - 1 mm)
ISO	- Organização Internacional para a Normalização (do Inglês, International Organization for Standardization)

IUPAC	- União Internacional de Química Pura e Aplicada (do Inglês, International Union of Pure and Applied Chemistry)
KF	- titulação de Karl Fischer (determinação do teor de água)
MOLS	- método de mínimos quadrados não ponderados (do Inglês, Method of Ordinary Least Squares)
MP	- matéria prima
MW	- peso molecular (do Inglês, Molecular Weight)
OLS	- método de estimativa por mínimos quadrados simples (do Inglês, Ordinary Least Squares)
PA	- produto acabado
PCA	- análise de componentes principais (do Inglês, Principal Component Analysis)
PCR	- regressão de componentes principais (do Inglês, Principal Component Regression)
PLS	- método de mínimos quadrados parciais (do Inglês, Partial Least Squares)
QSAR	- descrição quantitativa da relação estrutura - atividade química (do Inglês, Quantitative Structure - Activity Relationship)
QSPR	- descrição quantitativa da relação estrutura - propriedade química (do Inglês, Quantitative Structure - Property Relationship)
RebA	- Rebaudiosídeo A
SRM	- material padrão (do Inglês, Standard Reference Material)
Stev	- Steviosídeo
UC	- ensaio de uniformidade de conteúdo
USP	- Farmacopeia Americana (do Inglês, United States Pharmacopeia)
UV	- radiação eletromagnética de ultravioleta (com comprimentos de onda situados entre 200-380 nm)

- UV-Vis - espectroscopia de ultravioleta-visível
- Vis - radiação eletromagnética do visível (com comprimentos de onda situados entre 380-800 nm)
- WLS - método de estimativa por mínimos quadrados ponderados (do Inglês, Weighted Least Squares)

Conteúdo

1	Introdução	1
1.1	A FARMALABOR	2
1.2	Automatização de processos	5
1.2.1	<i>Software Empower™ 3</i>	6
1.3	Relevância dos adoçantes naturais	8
1.3.1	<i>Stevia rebaudiana</i>	9
2	Fundamentação	14
2.1	Metodologia analítica	14
2.1.1	Titulação de Karl Fischer	15
2.1.2	Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível	17
2.1.3	Espectroscopia de infravermelho	20
2.1.4	Cromatografia líquida de alta eficiência	23
2.1.4.1	Parâmetros cromatográficos	25
2.2	A Estatística no tratamento de dados	28
2.2.1	Estimadores e estimativas	28
2.2.1.1	Estimadores de posição	29
2.2.1.2	Estimadores de dispersão	30
2.2.2	Testes estatísticos	31
2.2.2.1	Hipóteses de trabalho	31
2.2.2.2	Distribuição <i>t</i> -Student	35
2.2.2.3	Distribuição de Fisher-Snedcor	36
2.2.2.4	Distribuição qui-quadrado	36
2.2.3	Testes mais frequentes	37
2.2.3.1	Teste de Grubbs	37

2.2.3.2	Teste <i>t</i> -emparelhado	38
2.2.3.3	Teste de Mandel	38
2.2.3.4	Teste de Cochran	38
2.2.3.5	Teste ANOVA	39
2.2.4	Intervalo de confiança	41
2.3	Análise multivariada	41
2.3.1	Modelação	42
2.3.1.1	Modelação explícita	43
2.3.1.2	Modelação implícita	45
2.3.2	Otimização de modelos	47
2.3.2.1	Coefficiente de determinação	48
2.3.2.2	Critério de Akaike	49
2.3.2.3	Critério Bayesiano	50
2.3.3	Validação de modelos	50
2.3.3.1	Estratégia <i>JackKnife</i>	51
2.4	Validação de métodos analíticos	53
2.4.1	Identificação	55
2.4.2	Especificidade e seletividade	55
2.4.3	Linearidade	56
2.4.4	Limiares analíticos	59
2.4.4.1	Limite de detecção	59
2.4.4.2	Limite de quantificação	60
2.4.5	Gama analítica	61
2.4.6	Sensibilidade	61
2.4.7	Precisão	62
2.4.8	Exatidão	62
2.4.9	Robustez	63
2.4.10	Coerência	64
2.5	<i>Software Empower™ 3</i>	64
2.5.1	Cálculos	65
2.5.1.1	Matéria prima	66
2.5.1.2	Produto acabado	66

2.5.2	Validação de folhas de cálculo	67
3	Parte experimental	69
3.1	Materiais	69
3.2	Reagentes	69
3.3	Soluções	70
3.3.1	Solução tampão acetato de amónio 2 mM ($pH = 4.3$)	71
3.3.2	Solução de diluição	71
3.3.3	Soluções padrão de Rebaudiosídeo A	71
3.3.4	Soluções padrão de Steviosídeo	71
3.3.5	Soluções amostra de <i>Stevia</i>	71
3.3.6	Fase móvel para equipamento cromatográfico	71
3.3.7	Soluções padrão de dicromato de potássio	72
3.3.8	Solução para verificação de pH	72
3.3.9	Solução para verificação de solubilidade	72
3.4	Equipamento e condições instrumentais	72
3.5	Procedimentos	73
3.5.1	Valor de pH	73
3.5.2	Solubilidade	73
3.5.3	Cinzas sulfúricas	74
3.5.4	Teor de água	74
3.5.5	Método analítico para <i>Stevia</i>	75
3.5.5.1	Ensaio de doseamento	76
3.5.5.2	Ensaio de impurezas	77
4	Resultados e discussão	78
4.1	Ensaio físico-químicos	78
4.1.1	Valor de pH	79
4.1.2	Teste de solubilidade	79
4.1.3	Cinzas sulfúricas	80
4.1.4	Teor de água	80
4.1.5	Verificação do estado da calibração	81
4.1.5.1	Equipamento de UV-Vis	82

4.1.5.2	Equipamento de IR	85
4.2	Validação do método analítico para <i>Stevia</i>	87
4.2.1	Caraterização espectroscópica	87
4.2.2	Identificação	88
4.2.3	Especificidade e seletividade	95
4.2.4	Linearidade	96
4.2.4.1	Homogeneidade da variância	96
4.2.4.2	Verificação da linearidade	96
4.2.4.3	Avaliação de valores discrepantes	99
4.2.5	Limiares e gama analítica	100
4.2.5.1	Significado estatístico dos parâmetros	100
4.2.5.2	Cálculo dos limiares analíticos	101
4.2.5.3	Gama analítica	101
4.2.6	Quantificação	102
4.2.7	Sensibilidade	106
4.2.8	Precisão	106
4.2.9	Exatidão	106
4.2.10	Coerência	107
4.2.11	Adequabilidade do sistema	108
4.3	Método alternativo de determinação do teor de água	109
4.3.1	Modelação implícita	111
4.3.2	Modelação explícita	115
4.3.2.1	Preditores detetados por PLS	116
4.3.2.2	Preditores detetados por correlação	118
4.3.2.3	Modelação multivariada	120
4.3.2.4	Seleção de modelos	124
4.3.2.5	Teste de parcimonia	126
4.3.2.6	Validação dos modelos	127
4.3.3	Deteção de desvios	128
4.3.4	Interpretação	130
4.4	Validação do <i>software</i> Empower™ 3	133

5 Conclusões	137
A Tabelas e figuras auxiliares	145
A.1 Tabelas	146
A.2 Figuras	147
B Programa Empower™ 3	149
B.1 Interface	149
B.2 Cálculos personalizados	152
B.3 Relatórios de Análise	154
B.4 Inquérito aos analistas	156

Capítulo 1

Introdução

O Mundo tem-se desenvolvido a um ritmo alucinante a vários níveis, nomeadamente nas matérias científicas e tecnológicas, permitindo inúmeras melhorias na qualidade de vida da população mundial: sistemas de saúde mais evoluídos, sistemas financeiros dinâmicos e seguros, maior e melhor conhecimento e informação. Todos estes fatores de melhoria contínua levaram a um grande aumento no número da população mundial e, conseqüentemente, da sua esperança média de vida, sendo cada vez mais necessário novos desafios que permitam manter a qualidade que se atingiu ou, em última análise, melhorá-la. Ao nível da qualidade relacionada com a saúde e bem-estar, a Indústria Farmacêutica é das que mais contribui, seja pelo desenvolvimento de novos produtos ou pela garantia de que estes são fabricados segundo normas e critérios de segurança e de qualidade tão apertados quanto possível, objetivando sempre a melhoria, a inovação e a qualidade de vida de toda a população.

O papel da Indústria Farmacêutica é de grande relevância na evolução e progressão da Humanidade, envolvendo várias áreas, desde a economia à saúde. É nesta última que se engloba a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, mais seletivos e poderosos, que aumenta a capacidade de resposta dos serviços de saúde, tornando-os mais eficazes e mais céleres. Os medicamentos por ela desenvolvidos constituem, assim, uma poderosa tecnologia da saúde, que tem um papel central na qualidade de vida das populações e no desempenho dos sistemas de saúde em termos globais.

1.1 A FARMALABOR

A MEDINFAR é um grupo farmacêutico de capital exclusivamente português, sediada em Lisboa. Fundado em 1970, este grupo é especializado em investigação e desenvolvimento de produtos farmacêuticos, dermocosméticos e suplementos alimentares, assim como na sua respetiva distribuição e comercialização. O Grupo MEDINFAR está presente em mais de 50 países e é, atualmente, a empresa líder em Portugal na categoria de Saúde do Consumidor e Dermatologia, ocupando ainda a terceira posição no *top 5* de empresas portuguesas da área. Possui inúmeros setores farmacêuticos assentes na melhoria contínua da qualidade dos produtos e serviços, tendo sempre como referência a satisfação das necessidades do cliente e a responsabilidade social, nomeadamente nas vertentes de ambiente e segurança. A unidade industrial do Grupo Medinfar é a FARMALABOR, sediada na zona industrial de Condeixa-a-Nova e com uma capacidade bruta anual de 50 milhões de unidades, repartidas entre formulações sólidas, líquidas e pastosas não estéreis.

A atividade industrial e comercial da FARMALABOR engloba o fabrico de produtos farmacêuticos, cosméticos e suplementos alimentares para um universo diversificado de clientes, tanto nacionais como internacionais. Além disso, produzem-se, embalam-se e entregam-se produtos e serviços de alta qualidade. Esta unidade fabril segue uma estratégia clara de crescimento, investindo e expandindo a sua carteira de clientes e parceiros de forma expressiva, apresentando-se como um fabricante moderno, dinâmico, altamente competitivo, dotado de tecnologias de ponta e que oferece serviços de referência.

A unidade industrial, onde este trabalho foi desenvolvido, encontra-se certificada pelas normas NP EN ISO 9001:2015 (Qualidade), NP EN ISO 14001:2015 (Ambiente) e NP EN ISO 45001:2019 (Segurança e Saúde no Trabalho). Nela existem vários departamentos que trabalham e cooperam diariamente em conjunto com vista à obtenção de resultados cada vez melhores e de progressão científica eminente. O organograma da figura 1.1 representa a ligação existente entre os diferentes departamentos.

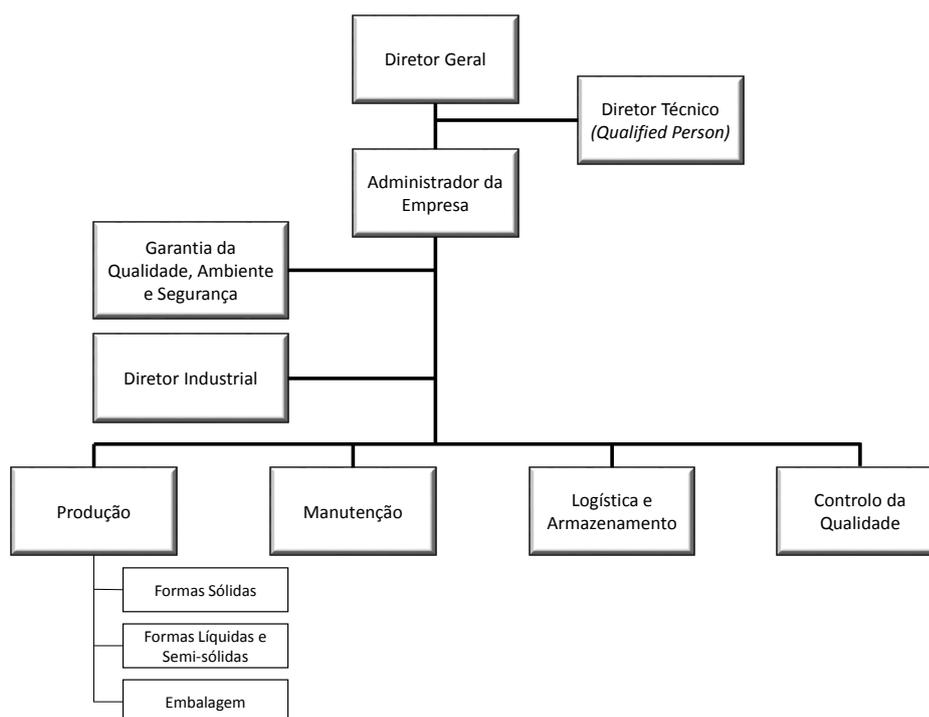


Figura 1.1: Organograma representativo da unidade industrial FARMALABOR pertencente ao Grupo MEDINFAR, situada na zona industrial de Condeixa-a-Nova.

O departamento de controlo da qualidade desta unidade industrial divide-se em dois laboratórios principais - laboratório físico-químico e laboratório microbiológico, tal como demonstra o organograma da figura 1.2. No primeiro existem várias salas onde se realizam as diversas atividades analíticas, nomeadamente: sala de físicos (onde decorrem grande parte dos ensaios físico-químicos de rotina¹), sala de químicos (onde se encontram a maioria dos materiais, reagentes e recipientes, bem como bancadas necessárias às tarefas mais básicas, como a preparação de soluções), sala de HPLC (onde se encontram equipamentos de cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC, respetivas colunas e fases móveis), sala de balanças (contém material de pesagem, balanças analíticas, exsiccadores e equipamento de titulação de Karl Fischer), sala de estufas, sala de *hottes* e ultrassons, sala de higienização de material e, por fim, sala de cálculo (dedicada à análise de dados, cálculos e elaboração de relatórios de análise); já no segundo são efetuadas as análises microbiológicas aos diversos fármacos. Existem, ainda, outras duas secções deslocalizadas: sala de material de acondicionamento (no armazém) e sala de controlo em processo (na produção).

¹Estes ensaios estão relacionados com a medição do valor de pH , medição da viscosidade, índice de refração e espectroscopia de ultravioleta-visível e de infravermelho.

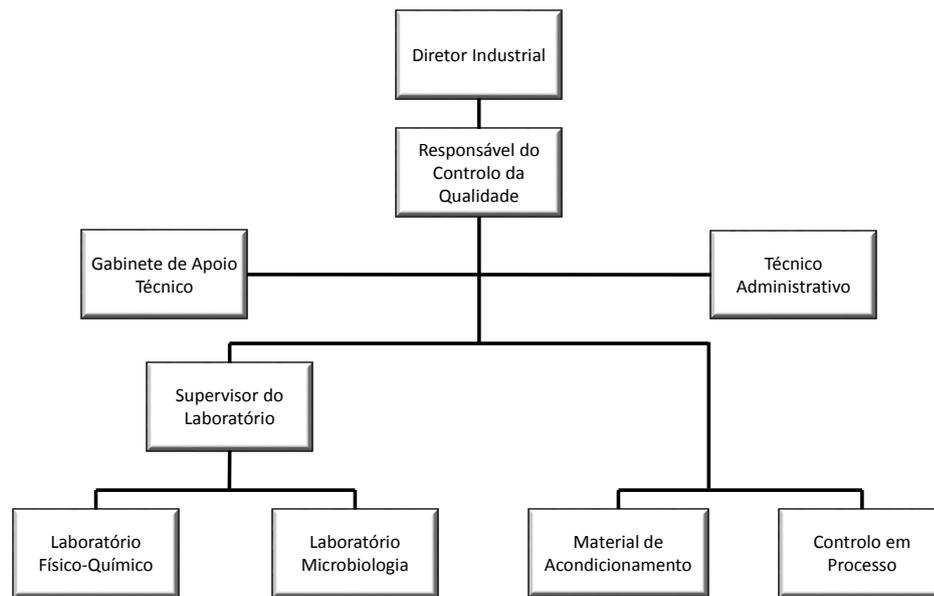


Figura 1.2: Organograma representativo do departamento de controlo da qualidade da unidade industrial da FARMALABOR.

Com base nos testes efetuados à matéria prima ou produto acabado, este departamento possui total autonomia e autoridade para aprovar ou reprová-lo um lote de um qualquer produto ou fármaco produzindo nesta unidade fabril. Para se ter a maior segurança possível numa tomada de decisão assertiva, o departamento de controlo da qualidade é responsável por diversas funções, desde realizar análises laboratoriais de acordo com monografia adequada (habitualmente fundamentada nas respetivas Farmacopeias) ou, na sua ausência, através de ações de validação interna da respetiva metodologia. Assim sendo, a este compete avaliar e testar todas as características físico-químicas e microbiológicas das matérias-primas e produto acabado; controlar a qualidade ao longo de todo o processo produtivo; inspecionar a realização da amostragem de acordo com os procedimentos padrão estabelecidos internamente; registar e preservar todos os testes, resultados analíticos, processos e métodos; verificar se cada lote produzido está de acordo com os critérios pré-estabelecidos; garantir a limpeza do espaço e do material usado nas determinações analíticas; efetuar testes de estabilidade temporal; investigar possíveis reclamações registadas por consumidores²; ou monitorizar matérias primas, embalagens, material de acondicionamento e produtos acabados.

²Através deste tipo de anomalia documentada, a empresa recebe informação do cliente e usa-a para entender e prevenir eventuais falhas, podendo deste modo minimizar as perdas associadas a cada anomalia reportada.

Além de tudo isto, o departamento de controlo da qualidade da FARMALABOR assenta em todos os pressupostos de boas práticas laboratoriais (GLP) e boas práticas de fabrico (GMP). A comprovação da qualidade laboratorial de produtos farmacêuticos avalia a respetiva conformidade, de acordo com as especificações e monografias estabelecidas e aprovadas, nomeadamente, a Farmacopeia Portuguesa, Europeia e/ou Americana. Assim, o departamento de controlo da qualidade apresenta uma vital importância, dado que é de onde saem as principais e decisivas respostas relativamente à qualidade de todo e qualquer fármaco produzido pela empresa.

1.2 Automatização de processos

O controlo da qualidade de uma Indústria Farmacêutica depende essencialmente de dois parâmetros para ter sucesso: rapidez e eficácia, tendo sempre como objetivo final garantir segurança no que se produz e afirmando categoricamente que o que se produziu se encontra dentro das normas e critérios previamente estabelecidos.

Atualmente vive-se numa época em que a tecnologia está em constante evolução, atingindo-se patamares de inovação nunca antes imaginados. Em todas as áreas, inúmeros processos considerados tradicionais têm sido substituídos por outros mais rápidos, seguros, precisos e eficientes, intimamente relacionados com o fenómeno de automatização crescente de processos, tanto na área farmacêutica como noutras indústrias. Este fenómeno de automatização na Indústria Farmacêutica revela-se, por exemplo, no controlo automatizado e integrado de equipamentos que registam e supervisionam toda a atividade laboratorial, desde a pesagem e preparação de soluções, suas diluições, respetiva amostragem e controlo de todo o equipamento analítico associado ao processo.

Durante o presente projeto tive a oportunidade de contactar e aprender a trabalhar com o *software* cromatográfico Empower™ 3, que permite controlar todo o procedimento analítico, desde a injeção automática dos padrões e amostras à integração automática de sinais reconhecidos e listagem de resultados, com a vantagem adicional da substituição das folhas de cálculo de Microsoft® Excel por novos relatórios de análise mais completos, seguros e robustos.

1.2.1 *Software Empower™ 3*

O Empower™ 3 é um *software* desenvolvido pela Waters® Corporation para análise de dados cromatográficos de uma forma simples, rápida e direta, maximizando a eficiência do laboratório.

As principais capacidades desta interface prendem-se com a rápida elaboração de relatórios de análise com dados personalizados, o cálculo de parâmetros através de “campos personalizados” (CF), a fácil gestão de dados e a assistência técnica *online* rápida e intuitiva. É assente em diretrizes de segurança muito rigorosas, possibilitando sempre o rastreamento para efeitos de auditoria («*Audit Trails*») e impedindo alguns utilizadores de eliminarem ou alterarem dados ou métodos. O Empower™ 3 apresenta a possibilidade de análise para um vasto leque de sistemas, desde cromatografia líquida a cromatografia gasosa, e com diferentes detetores, como ultravioleta-visível (UV-Vis), matriz de díodos (DAD), índice de refração ou de massas.

Na sub-secção B.1 encontram-se mais informações sobre a interface deste programa e o seu modo de funcionamento.

Este *software* apresenta, no entanto, uma linguagem específica, pelo que é da máxima importância perceber alguns desses conceitos, nomeadamente:

1. **Projeto** («*Project*») – arquivo “mãe”, onde se encontram todos os dados e métodos que dizem respeito a esse produto ou matéria prima em concreto;
2. **Sequência** («*Sample Set*») – sequência de análise, onde se introduzem os dados das amostras a analisar (pesos, diluições, etc.) e todos os parâmetros necessários à análise (tempo, volume de injeção, entre outros);
3. **Método instrumental** («*Instrument Method*») – conjunto de condições cromatográficas do equipamento, tais como o tipo de detetor, comprimento de onda, pressão e temperatura;
4. **Método de processamento** («*Processing Method*») – método pelo qual o cromatograma resultante da corrida vai ser analisado; é aqui que estão todos os parâmetros fundamentais à análise do analito em causa, desde a identificação do sinal à sua integração e posterior quantificação;
5. **Relatório de análise** («*Report Method*») – documento que compila todos os dados processados nas amostras analisadas, indicando se os resultados se encontram dentro

dos critérios definidos como aceitáveis;

6. **Método geral** («*Method Set*») – conjunto das condições instrumentais («*Instrument Method*»), de processamento («*Processing Method*») e do relatório final («*Report Method*»);
7. **Sequência de resultados** («*Result Set*») – resultados gerados por uma determinada sequência após processamento, agrupados por conjuntos de resultados.

Ao nível do laboratório onde o equipamento e *software* estão instalados e em execução, existem três tipos de utilizador no Empower™ 3: analista, supervisor e administrador, sendo que cada tipo de utilizador tem acessibilidades distintas aos conteúdos do *software*, tal como mostra a tabela 1.1, onde “*N*” representa uma competência não funcional e “*S*” uma competência possível de ser executada por esse tipo de utilizador.

Tabela 1.1: Tipos de utilizador e respetivas funções permitidas pelo *software* Empower™ 3.

		Analista	Supervisor	Administrador
Projeto	Criar	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Copiar	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Renomear	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Eliminar	<i>N</i>	<i>N</i>	<i>S</i>
Sequência	Criar	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Copiar	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Alterar	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Eliminar	<i>N</i>	<i>N</i>	<i>S</i>
Método instrumental	Criar	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Copiar	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Alterar	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Eliminar	<i>N</i>	<i>N</i>	<i>S</i>
Método de processamento	Criar	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Copiar	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Alterar	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Eliminar	<i>N</i>	<i>N</i>	<i>S</i>
Relatório de análise	Criar	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Copiar	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Alterar	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Eliminar	<i>N</i>	<i>N</i>	<i>S</i>
Método geral	Criar	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Copiar	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Alterar	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	Eliminar	<i>N</i>	<i>N</i>	<i>S</i>
Criar campos personalizados de cálculo		<i>N</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
Aceder a rastreios de auditoria		<i>N</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
Renomear métodos		<i>N</i>	<i>N</i>	<i>N</i>

Qualquer analista só deve ter acesso ao que se entende como essencial à rotina diária. Todas as restantes ações são confinadas aos supervisores, que têm como função o desenvolvimento e a otimização do *software*, bem como o poder de confirmar os dados e metodologias aplicadas a determinado conjunto de dados, assegurando a confiança dos resultados reportados pelos analistas sempre que necessário. Por fim, os utilizadores do tipo administrador conseguem monitorizar todas e quaisquer ações dos restantes utilizadores, conseguindo, inclusivamente, eliminar métodos quando justificável (se se tornam obsoletos ou se foram mal criados por algum erro do utilizador, por exemplo). A única opção que não é possível realizar por nenhum utilizador é a alteração do nome dos métodos (exceção feita ao representante da empresa, que tem essa opção).

O Empower™ 3 apresenta inúmeras ferramentas que facilitam o dia-a-dia num laboratório através do seu cálculo rápido e inteligente, permitindo uma maior segurança ao utilizador e, por consequência, nos resultados reportados.

1.3 Relevância dos adoçantes naturais

Por um lado, certas formulações líquidas (soluções orais e xaropes) ou sólidas (como pastilhas mastigáveis) apresentam um sabor desagradável e podem influenciar o paciente a querer tomar ou não determinado medicamento ou levar à procura de um outro que tenha o mesmo efeito com um sabor mais agradável, enquanto por outro lado, o uso indiscriminado de alguns adoçantes apresenta diversos problemas de saúde associados, como o aumento de peso, a diabetes, risco cardíaco agravado ou risco de desenvolvimento de doença degenerativa que levantam muitas restrições ao seu uso. Daqui resulta que é essencial a adição de produtos edulcorantes de baixo risco para a saúde e com elevado poder adoçante na composição dos fármacos para administração oral.[1, 2]

O edulcorante mais usado pela Indústria Farmacêutica é a sacarose, seguindo-se a sacarina sódica, o ciclamato de sódio, o aspartame e o sorbitol.[1] No entanto, a sacarose, apesar de também poder atuar como antioxidante, não pode ser ingerida por indivíduos diabéticos, o que limita cada vez mais a sua utilização, dado que esta é uma das doenças com cada vez mais predominância em todo o mundo; já os restantes adoçantes largamente usados podem ser responsáveis por problemas de saúde como acidose tubular renal, eczema, prurido, dermatite

ou diarreia.[3, 4] Além do mais, a sacarose também pode ajudar no aparecimento de cáries dentárias, principalmente em crianças e adolescentes.[5]

Torna-se, portanto, vital a existência de alternativas aos edulcorantes habitualmente usados, sendo estes cada vez mais substituídos por adoçantes naturais, como a *Stevia*. A importância deste tipo de compostos para a Indústria Farmacêutica prende-se essencialmente com o facto de se conseguirem substituir os açúcares habituais por açúcares mais saudáveis e que possam transformar todos os medicamentos utilizáveis por todas as pessoas, mesmo as que apresentam condições médicas adversas, como a diabetes. Além do mais, sendo um produto natural, são muito menos dispendiosos e mais sustentáveis.

Em 2008 foi aprovada uma norma pela Administração dos Medicamentos e Alimentos (FDA) que permite o uso de adoçantes naturais para uso comercial e industrial.

1.3.1 *Stevia rebaudiana*

Stevia rebaudiana é um género de planta nativa das regiões subtropicais e tropicais da América do Sul e Central. Existem cerca de 407 espécies distintas de *Stevia*, sendo a espécie *Stevia rebaudiana* Bertoni a que possui maior potencial adoçante devido ao seu alto teor de diterpenos glicosídeos denominados Steviosídeo, Rebaudiosídeo A, C e D e Dulcosídeo A.[6, 7] A figura 1.3 representa (A) uma imagem real da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni e (B) a sua classificação taxonómica.[8]

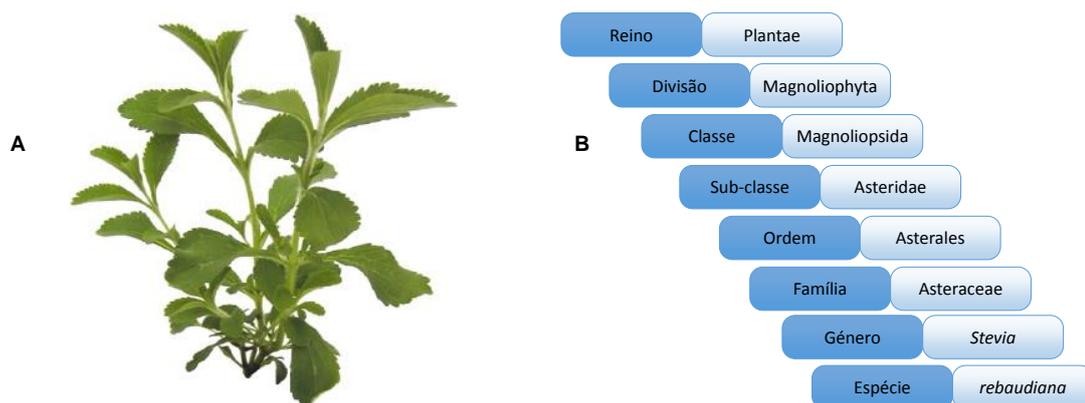


Figura 1.3: (A) Representação real (adaptação de [8]) e (B) classificação taxonómica da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni.

A tabela 1.2 apresenta a percentagem de cada um destes componentes nas folhas desta planta. Rebaudiosídeo A (RebA) e Steviosídeo (Stev) são os componentes que apresentam

maior capacidade adoçante quando comparados com a glicose e não têm influência nos valores da glicemia, podendo ser ingeridos por indivíduos diabéticos.[9, 10]

Tabela 1.2: Conteúdo de glicosídeos nas folhas da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni em termos percentuais de quantidade, relacionando a capacidade adoçante (em vezes) quando comparado com a glicose. (adaptado de [7])

Componente	Quantidade (%)	Capacidade adoçante
Steviosídeo	5.8 – 9.1	150 – 250
Rebaudiosídeo A	1.8 – 3.8	200 – 300
Rebaudiosídeo C	0.6 – 1.3	30
Rebaudiosídeo D	ND	221
Dulcosídeo A	0.3	30

ND - Não Detetado

Este género de planta possui elevado interesse nutritivo: para além de apresentar baixo teor de gorduras, tal como demonstra a tabela 1.3, *Stevia rebaudiana* Bertoni possui um bom teor proteico e é também rica em elementos minerais essenciais ao organismo humano, como o potássio, cálcio, magnésio e fósforo, e uma fonte de vitaminas, como a niacina, a tiamina ou o ácido ascórbico.[9, 10]

Tabela 1.3: Constituição aproximada das folhas da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni. (adaptado de [7])

Componente	Quantidade (%)
Proteínas	4.45 – 10.73
Gorduras	4.18 – 6.13
Hidratos de carbono	63.10 – 73.99
Cinzas	4.65 – 12.06
Fibras	4.35 – 5.26
Açúcares redutores	4.5 – 5.3

A molécula de ReBA (*[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl] 13-[5-hydroxy-6-(hydroxy-methyl)-3,4-bis[[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]oxan-2-yl]oxy-5,9-dimethyl-14-methylidenetetracyclo[11.2.1.01,10.04,9]hexadecane-5-carboxylate*) é uma forma ultrapurificada de *Stevia* que pertence ao grupo dos açúcares e tem um elevado peso molecular (MW) de 967.01 g mol⁻¹. Já a molécula de Stev (*13-[(2-O-β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl)oxy]-ent-kUAr-16-en-19-oic acid β-D-glucopyranosyl ester*) é o maior constituinte de todos os glicosídeos de *Stevia rebaudiana* Bertoni e tem um peso molecular de

804.87 g mol⁻¹. [3] As características físico-químicas destas moléculas encontram-se resumidas na tabela 1.4.

Tabela 1.4: Características físico-químicas das moléculas de Rebaudiosídeo A e Steviosídeo, principais componentes de *Stevia rebaudiana* Bertoni. A solubilidade diz respeito a uma mistura $H_2O:ACN$ (50 : 50, % V/V).

Característica	Rebaudiosídeo A	Steviosídeo
Fórmula química	$C_{44}H_{70}O_{23}$	$C_{38}H_{60}O_{18}$
MW (g mol ⁻¹)	967.01	804.87
#CAS	58543-16-1	57817-89-7
Aspeto	Pó branco, sólido cristalino	
Odor	Sem odor característico	
<i>pH</i> *	4.5 – 7.0	
Ponto de fusão (°C)	242 - 244	198
Solubilidade	Muito solúvel	Ligeiramente solúvel

*em solução aquosa

Ambas as moléculas são glicosídeos de steviol e, por isso, apresentam uma estrutura química muito semelhante, variando apenas na substituição do átomo de hidrogénio do grupo carboxílico por xilose (Rebaudiosídeo A) ou por glucose (Steviosídeo). Na figura 1.4 encontra-se representada a molécula geral para este tipo de glicosídeos e os diferentes grupos R_1 (ligado ao carbono 19) e R_2 (ligado ao carbono 13) para cada um dos componentes de *Stevia rebaudiana* Bertoni, que permite distingui-los enquanto diferentes substâncias.

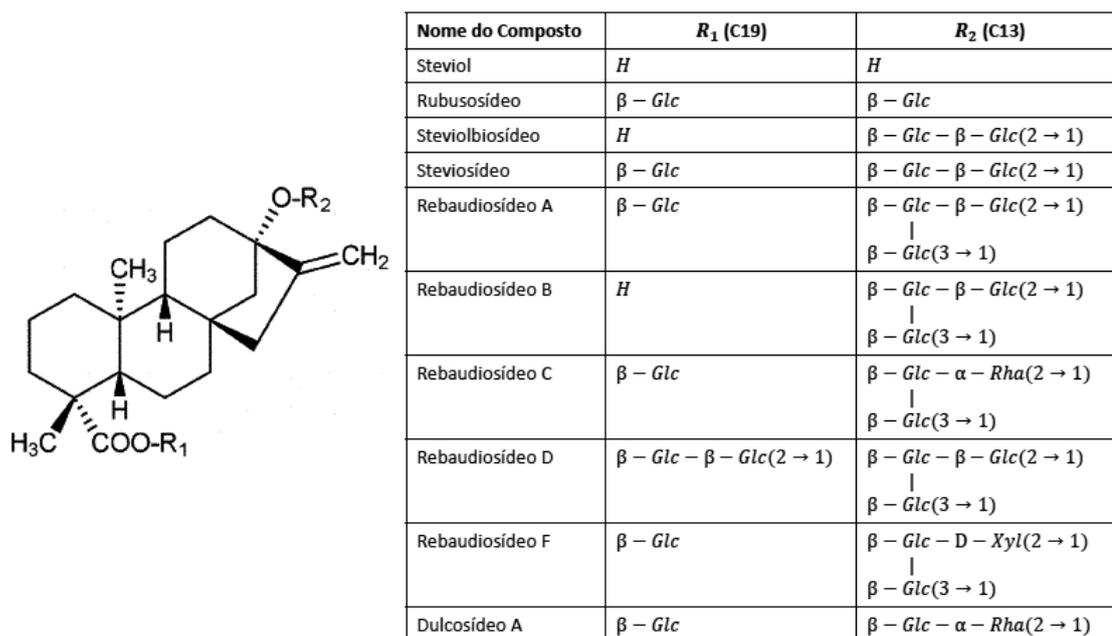


Figura 1.4: Estrutura química geral das moléculas constituintes de *Stevia rebaudiana* Bertoni. No quadro encontram-se esquematizados todos os ligandos R_1 e R_2 dos constituintes da planta, onde Glc representa a molécula de glucose, Rha a molécula de ramnose e Xyl a molécula de Xilose.

As moléculas de β -glucose, D-xilose e α -ramnose são monossacarídeos do tipo glicosídeo (com seis carbonos), cuja estrutura mais estável corresponde a uma forma cíclica em anel de seis átomos, tal como mostra a figura 1.5.

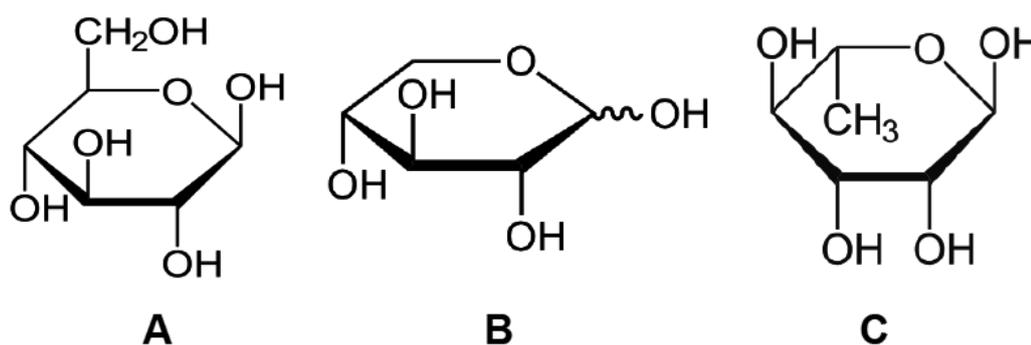


Figura 1.5: Estruturas químicas dos monossacarídeos (A) β -glucose, (B) D-xilose e (C) α -ramnose.

A ciclização do monossacarídeo resulta da interação de um grupo hidroxilo (-OH) com o grupo carbonilo (C=O) ocorrendo o fecho da cadeia. A estrutura assim formada “bloqueia” o grupo álcool do carbono seguinte num plano superior ou inferior ao do anel formado, confe-

rindo uma determinada estrutura ao monosacarídeo - se o grupo hidroxilo (-OH) se encontrar abaixo do anel diz-se que a molécula está na sua forma alfa (α), enquanto que se se encontrar acima do anel se diz que a molécula se encontra na sua forma beta (β). Por outro lado, a quiralidade do carbono alfa (carbono adjacente ao grupo funcional) numa molécula confere atividade ótica³, indicada através dos prefixos D - se desvia a luz polarizada no sentido positivo - e L - caso desvie a luz polarizada no sentido negativo.[11] Daí que os glicosídeos **A** e **C** representados na figura 1.5 sejam do tipo β e α , respetivamente, e o glicosídeo **B** seja do tipo D.

Além disso, as moléculas representadas na figura 1.5 diferem no ligando que têm no quinto carbono: a β -glucose tem um grupo hidroximetil (-CH₂OH), a D-xilose apresenta ligado hidrogénio e a α -ramnose tem um grupo metil (-CH₃).

³A atividade ótica é uma propriedade que determinados compostos químicos apresentam e que consiste no desvio do plano da luz polarizada, tanto no estado sólido como em solução. Esse desvio tem um valor característico para cada composto (ângulo de desvio).

Capítulo 2

Fundamentação

Neste capítulo efetua-se uma breve sùmula de conhecimentos e conceitos fundamentais à sistematização e racionalização de toda a informação experimental contida neste trabalho. Começa-se por fundamentos relacionados com a prática experimental, passando ao tratamento de dados e finalizando com a parte da validação de métodos analíticos e desenvolvimento de estratégias para controlo de qualidade avançado.

2.1 Metodologia analítica

A utilização de várias metodologias com diferentes princípios na análise de um mesmo analito pode levar a uma maior confiança nos resultados. Aliás, muitas metodologias podem ter o mesmo objetivo e reforçam a coerência dos valores obtidos.

Além de métodos mais físico-químicos, como a leitura de pH , a determinação de cinzas sulfúricas ou testes de solubilidade, as técnicas analíticas são muito requisitadas na Indústria Farmacêutica, apesar de, muitas vezes, serem mais dispendiosas.[12]

Devido à polaridade dos compostos utilizados e à presença da humidade no ambiente de trabalho, um dos grandes interferentes é a água, que pode ser simplesmente adsorvida à molécula em estudo, alterando o verdadeiro teor do analito no sólido ou em solução.[12] Deste modo, a titulação de Karl Fischer (KF) é referenciada como a técnica mais adequada para determinação do teor de água numa molécula, ainda que se possam usar outras metodologias, como a perda por secagem.

A separação analítica de componentes por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a mais comum, não só pela sua elevada eficiência, mas também pela robustez, fiabilidade,

rapidez do ensaio e respetiva automatização. Serve não só para identificação de um determinado composto, como também para quantificação simultânea de diversos analitos, enquanto que outras são mais limitadas nesse aspeto ou não são tão sensíveis e/ou precisas, como o Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) ou a espectrofotometria de Ultravioleta-Visível (UV-Vis).[13]

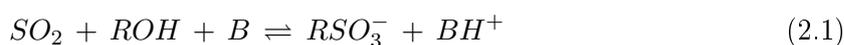
2.1.1 Titulação de Karl Fischer

Muitos compostos usados na Indústria Farmacêutica são hidratados ou têm a capacidade de adsorver água, pelo que é fundamental determinar esse teor.[12] Define-se o teor de água como um indicador da quantidade de água presente numa dada amostra, expresso em percentagem.

O teor de água numa amostra é um parâmetro que se deve ter em atenção, uma vez que, através da gravimetria ou volumetria, afeta a concentração final de um analito a quantificar. De uma forma genérica, quanto maior o conteúdo de água numa amostra, tanto menor será a concentração do analito em causa.[14] Assim sendo, esta determinação é imprescindível e exigida pela Farmacopeia Portuguesa e pela Farmacopeia Europeia para determinados compostos, tendo-se que cumprir os critérios de aceitação estabelecidos nestas monografias para cada analito aí especificado.

Há vários métodos rigorosos para determinar o teor de humidade - são exemplos a perda de massa por secagem, a titulação de Karl Fischer (KF), a Cromatografia Gasosa e técnicas de Infravermelho próximo. No entanto, de acordo com as Farmacopeias Portuguesa, Europeia e Americana, o método mais rigoroso e mais usado para analitos hidratados é a KF.

A titulação de Karl Fischer baseia-se num doseamento volumétrico onde ocorre uma reação de oxidação-redução, nomeadamente a oxidação do dióxido de enxofre (SO_2) pelo iodo (I_2) com o consumo de água (H_2O), tal como demonstram as equações químicas 2.1 e 2.2,



onde B representa uma base orgânica, inicialmente a piridina.[15]

O mecanismo da reação envolve a estabilização do dióxido de enxofre por formação de um aducto com um álcool, equação 2.1, levando à formação de um alquilsulfito que é posteriormente oxidado pelo iodo, na presença de água, equação 2.2. Além de ter um papel importante na estabilização do redutor, o álcool (ROH) é essencial para preservar a estequiometria desta reação (1:1). Em relação à base envolvida no processo (*B*), existe um conjunto apreciável de alternativas químicas, contudo, apesar da sua volatilidade e odor, a piridina tem sido a candidata mais utilizada. Mais recentemente, com a entrada em vigor de diversa legislação de proteção ambiental, este método foi revisto e a piridina foi substituída pelo imidazol, que apresenta menores riscos para o operador e produz menor impacto ambiental. O ponto termo da determinação volumétrica ocorre quando toda a água presente no meio reacional é consumida, sendo a reação 2.2 impedida, o que resulta no desenvolvimento de uma cor amarelo-acastanhada resultante do excesso de titulante¹. [15]

A humidade por KF (%*H(KF)*) é calculada com base na concentração de I₂ no reagente de Karl Fischer (ou seja, o título) e na quantidade desse reagente que é consumida, tal como demonstra a equação 2.3, onde *V*₁ representa o volume de titulante gasto (mL), *C*_{KF} representa o título (mg mL⁻¹) e *m* a massa de amostra introduzida (g).

$$\%H(KF) = 0.1 \times \left(\frac{V_1 \times C_{KF}}{m} \right) \quad (2.3)$$

O método de KF apresenta duas variantes quanto à forma como o titulante é adicionado ao meio de reação - pode ser por via volumétrica ou por via coulométrica. No primeiro caso, o iodo é adicionado mecanicamente ao meio reacional e o teor de água é quantificado com base no volume de reagente KF consumido; no segundo caso o iodo é gerado «*in situ*» por via eletroquímica² durante a titulação e a humidade é quantificada a partir da carga total utilizada durante a eletrólise³. [16] Outro fator a ter em conta é a gama analítica de cada um destes métodos - o KF por volumetria permite quantificar com rigor teores de humidade numa gama muito ampla até valores mais elevados, situados no intervalo [0.01 a 100] %, enquanto que o método coulométrico, sendo um método instrumental, é mais vocacionado para valores

¹A cor desenvolvida no meio deve-se à formação do complexo *I*₃⁻ que apresenta uma coloração amarelo-acastanhada.

²A reação de oxidação decorre na superfície de um ânodo de platina capaz de converter o iodeto (*I*⁻) em iodo (*I*₂).

³Nesta conversão, considera-se que 1 mg de água corresponde à carga de total de 10.72 Coulomb.

mais baixos, com uma estreita gama analítica situada entre [0.0001 e 5] %.

A determinação de humidade por KF apresenta a vantagem de ser rápida (entre 1 a 3 minutos, geralmente), além de ser seletiva apenas para moléculas de água e bastante fiável, dado que têm de se cumprir critérios de aceitação rigorosos ($\sigma_x \leq 0.50 \text{ mg mL}^{-1}$). Outro grande ponto a favor desta metodologia é o facto de ser possível usar amostras em qualquer estado físico.

2.1.2 Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível

A espectrofotometria é uma das técnicas analíticas mais utilizadas e mais importantes em Química. Através desta técnica, é possível detetar a presença e quantificar compostos, geralmente em solução, de uma forma conservadora⁴ e não invasiva⁵.

O princípio físico-químico relacionado com este tipo de técnica está relacionado com a capacidade que algumas moléculas têm para absorver tipos de radiação de uma forma mais ou menos seletiva. Quando uma solução de amostra é atravessada por um feixe de luz monocromática, parte desta radiação é absorvida pelo analito, enquanto que a restante é transmitida.[17]

A absorção de energia na região do ultravioleta e visível está intimamente relacionada com transições eletrónicas das espécies absorventes. No caso destas serem moléculas ou espécies coordenadas em solução, estas transições estão também associadas a outras alterações moleculares, do tipo vibracional, rotacional e translacional, resultando em espectros com banda alargada devido à sobreposição e conjugação de diferentes tipos de transições.[17]

O espectrofotómetro é um equipamento usado para medir a capacidade de absorção de radiação de uma amostra em condições bem definidas. Para que a radiação incidente na amostra tenha características de luz monocromática, a radiação emitida pela fonte deve ser dispersa de forma a permitir seleccionar um determinado comprimento de onda através do monocromador. Dado que esta técnica envolve o uso de radiação nas regiões do ultravioleta (UV) e visível (Vis), recorre-se geralmente a duas fontes contínuas como por exemplo, lâmpadas de descarga elétrica de alta pressão de hidrogénio/deutério para a região do UV (elevada potência emitida na região 200 – 340 nm) e a lâmpada de tungsténio para a região do visível (elevada potência de emissão na região 340 – 800 nm).[17, 18]

⁴Em certas situações analíticas, não há necessidade de adicionar reagentes ao meio já que a deteção se processa diretamente e, deste modo, o analito preserva a sua entidade química.

⁵Alguns sistemas analíticos *online* estão implementados de forma a permitir o fluido circular sem ser necessário efetuar amostragem.

A figura 2.1.2 representa esquematicamente o funcionamento de um espectrofotômetro de UV-Vis.

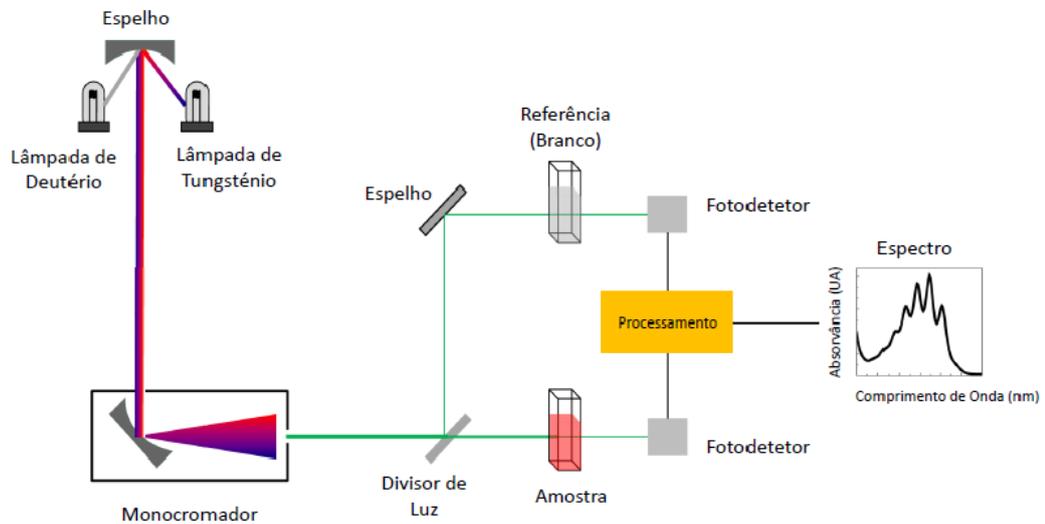


Figura 2.1: Esquema representativo de um espectrofotômetro de Ultravioleta-Visível, desde a emissão de um feixe de luz monocromática até à obtenção do espectro final.

Utilizando radiação monocromática, a absorvância de uma solução (A_λ) corresponde ao quociente do inverso da transmitância (T_λ), avaliada sob a forma logaritmizada, como se indica na seguinte equação,

$$A_\lambda = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = -\log(T_\lambda) \quad (2.4)$$

onde I_0 e I representam a intensidade da luz incidente e transmitida a um determinado comprimento de onda (λ), de acordo com o indicado na figura 2.2.

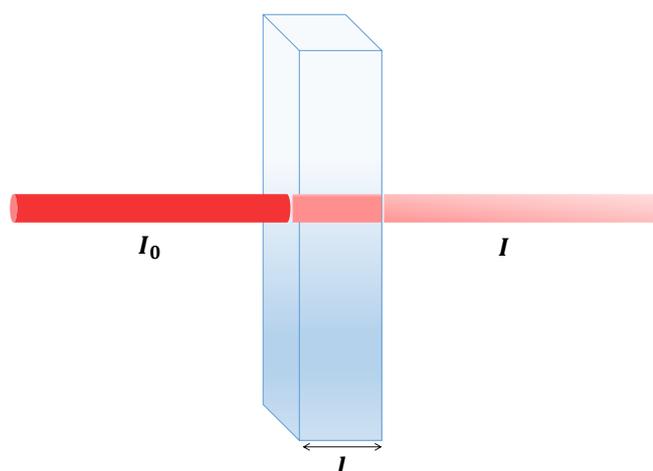


Figura 2.2: Esquema representativo da radiação monocromática incidente na amostra (I_0) e transmitida (I) através de uma célula (*cuvette*) de percurso óptico l .

A Lei de Beer-Lambert (equação 2.5), permite relacionar a absorvância registrada a um determinado comprimento de onda (A_λ) com o teor de uma espécie em solução (c_i) através de,

$$A_\lambda = \varepsilon_{\lambda i} \cdot c_i \cdot l \quad (2.5)$$

sendo $\varepsilon_{\lambda i}$ o coeficiente de absorbtividade molar⁶ e l o percurso óptico percorrido pelo feixe ao longo da amostra que, na prática, consiste na largura da célula espectrofotométrica que é atravessada pelo feixe de radiação.[19]

Algumas das principais vantagens da espectrofotometria de UV-Vis são a precisão, reprodutibilidade e simplicidade operacional desta metodologia; em contrapartida, o tempo de análise e de preparação do equipamento para que se possam realizar as análises pode representar um entrave quando comparado com outras técnicas de análise química.

Para verificar a rastreabilidade deste equipamento em laboratório é frequente usar materiais de referência certificados (CRM) ou soluções padrão (SRM) para efetuar a verificação da exatidão, tanto em termos da sintonia do comprimento de onda selecionado como na absorvância medida. Um exemplo de SRM para a região UV consiste na análise de soluções

⁶Este coeficiente é específico de cada substância, a um determinado comprimento de onda, mas também pode depender de outros fatores tais como o tipo de solvente e restante composição do meio.

padrão de dicromato de potássio acidificado, sendo que na gama do ultravioleta os espectros destas soluções possuem máximos característicos a 257 e 350 nm e mínimos a 235 e 313 nm, atingindo-se uma zona de estabilização (“plateau”) a 430 nm, usada para determinar a precisão fotométrica na faixa do visível (ver figura 2.3).[20]

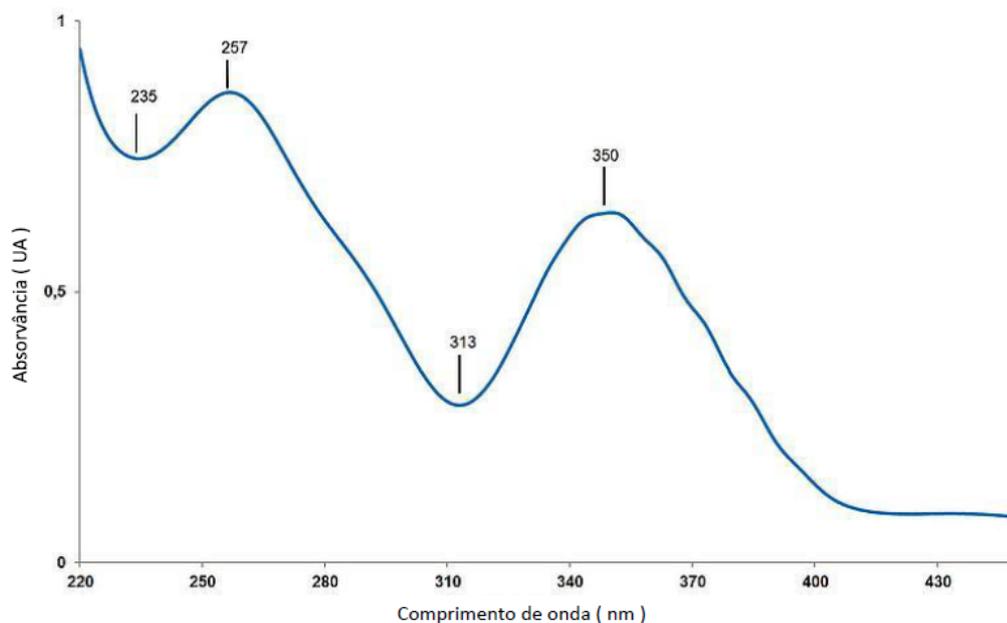


Figura 2.3: Espectro característico de uma solução de dicromato de potássio 60 mg L^{-1} obtido com uma fenda de 2 nm (adaptado de [21]).

2.1.3 Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia de infravermelho (IR) envolve o uso de radiação eletromagnética de menor energia que a da região do visível, apenas capaz de promover transições vibracionais ao nível molecular e que, devido à sua complexidade, não conduz, em geral, a condições favoráveis à quantificação⁷. Dado que as moléculas são heteronucleares, compostas por diferentes tipos de ligações químicas e que cada uma destas possui frequências de vibração específicas que podem surgir de modo quase individualizado ou de modo conjugado, o espectro resultante é como que uma “impressão digital” que contém informação estrutural muito relevante. Apesar de não ter grande cariz quantitativo, este tipo de espectroscopia mais informativa tem sido mais vocacionada para identificar compostos ou verificar a conformidade na composição de

⁷A maior dificuldade está relacionada com a falta de linearidade da resposta analítica em relação ao teor do analito.

misturas.[22]

Neste caso, a absorção de radiação IR (números de onda situados entre $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$) ocorre quando essa energia corresponde a um possível incremento de estado vibracional molecular, promovendo a sua passagem a um estado de energia mais elevado. Em termos experimentais, apenas são detetáveis transições vibracionais associadas a alterações do momento dipolar. Por este facto se diz que moléculas simples e simétricas não absorvem no IR, como, por exemplo, as moléculas de hidrogénio (H_2), cloro (Cl_2) ou oxigénio (O_2).

Contrariamente à espectroscopia de UV-Vis em que os espectros são apresentados sob a forma de absorvância em função do comprimento de onda, na espectroscopia de IR convencionou-se representar a transmitância ($\%T$) em função do número de onda (inverso do comprimento de onda, expresso em cm^{-1}). Na figura 2.4 mostra-se um exemplo de mapeamento que permite a identificação e classificação dos modos vibracionais que são fáceis de atribuir e permitem identificar uma molécula através desta metodologia espectroscópica.

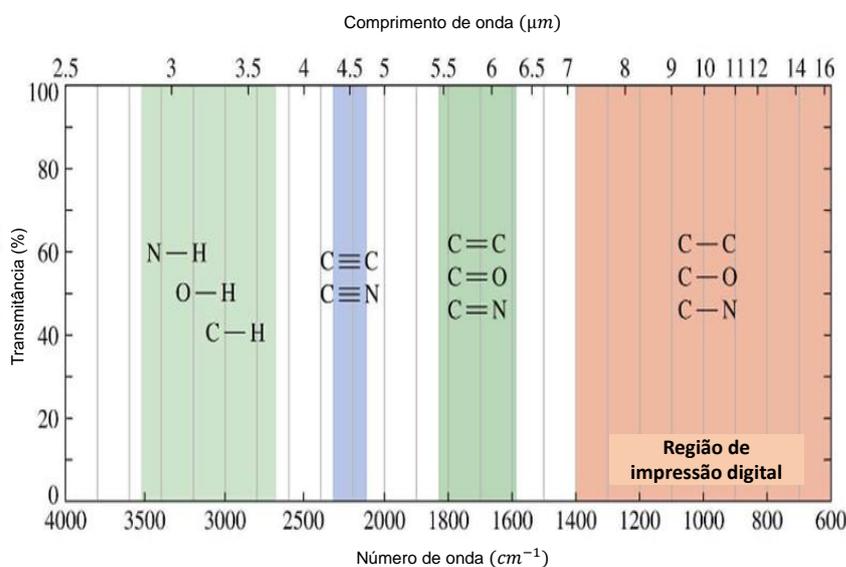


Figura 2.4: Representação esquemática dos comprimentos de onda específicos de cada ligação química. A região de impressão digital - $1400 - 600 \text{ cm}^{-1}$ - corresponde a deformações angulares (baixa energia), enquanto que a região compreendida entre $3500 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ diz respeito a vibrações de alongamento simétrico ou assimétrico, de maior energia. (adaptado de [22])

Existem vários tipos de metodologias associadas à técnica de IR. O infravermelho dispersivo irradia sequencialmente a amostra com diferentes comprimentos de onda individuais,

enquanto o infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) recolhe todos os dados espectrais em modo contínuo, isto é, o feixe que incide sobre a amostra resulta da sobreposição (interferência) de dois feixes similares desfasados no espaço por um espelho de posição móvel (interferometria).[23, 24] Enquanto que no primeiro caso a metodologia é similar à usada em UV-Vis, neste segundo caso produz-se um sinal que requer processamento pela transformada de Fourier⁸ de modo a se conseguir gerar o espectro de IR. A figura 2.5 representa esquematicamente a técnica de IR.

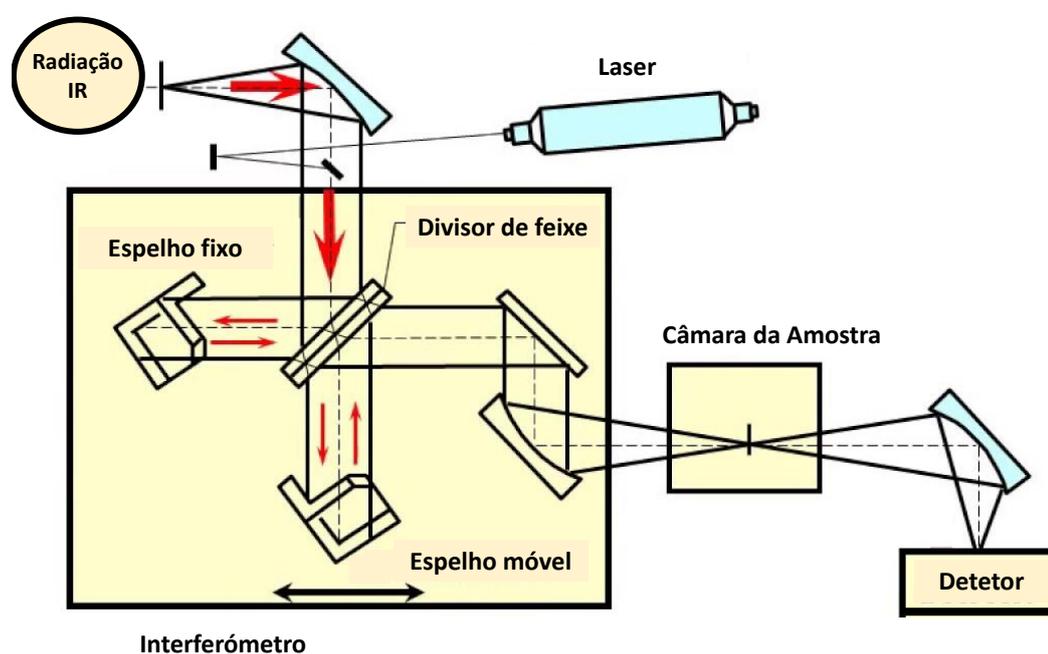


Figura 2.5: Representação esquemática do funcionamento geral de um espectrómetro de infravermelho, IR. A radiação é fornecida por uma fonte de luz (radiação IR), atravessando depois os espelhos até chegar à câmara onde se encontra a amostra. É aqui que a radiação incide nos analitos de interesse e, posteriormente, segue para o detector. (adaptado de [23])

Devido à sua capacidade para evidenciar vestígios de água e outros contaminantes, esta espectroscopia tem sido muito usada na verificação da conformidade de reagentes, matérias primas e de produto acabado, tanto no estado líquido como no estado sólido. Para este último caso em concreto, existem células especiais para efetuar a espectroscopia IR de reflectância total atenuada (ATR) como técnica de medição de espectros FTIR, onde a luz infravermelha

⁸A transformada de Fourier permite a modelação matemática de um sinal no tempo para converter para o sinal no domínio da frequência.

atravessa um cristal (de diamante, seleneto de zinco ou seleneto de germânio) e interage com a amostra, que é compactada no cristal.[24]

As principais vantagens da FTIR perante outras metodologias de IR prendem-se essencialmente com a rapidez da aquisição dos dados, a elevada precisão e a melhoria significativa da razão sinal/ruído.[24] Por outro lado, devido à grande sensibilidade desta técnica, os espectros podem ser facilmente influenciados pela atmosfera que está presente em todo o percurso ótico do sistema bem como pela temperatura da amostra, sendo também necessário controlar rigorosamente essas condições experimentais.

Uma forma de verificação do estado de calibração do equipamento de IR é através da leitura de um padrão de matriz conhecida, comparando-se as bandas em determinados números de onda entre esse padrão original e um outro ao longo do tempo. Os padrões deste tipo mais utilizados são de poliestireno, um homopolímero resultante da polimerização do monómero de estireno. Segundo as monografias⁹, a verificação da calibração do equipamento de IR com um padrão secundário de poliestireno deve obedecer a três critérios: (a) semelhança de bandas específicas (3060.0, 2849.5, 1942.9, 1601.2, 1583.0, 1154.5 e 1028.3 cm^{-1} , com uma variação máxima aceitável de 1 cm^{-1}), (b) comparação de leituras (semelhança mínima de 90 %, isto é, $\%Sim > 90 \%$), e (c) poder de resolução de bandas específicas (Res_X - entre 2870 e 2849.5 cm^{-1} - superior a 18; e Res_Y - entre 1589 e 1583 cm^{-1} - superior a 10, ver figura A.1 em anexos para maior detalhe).

2.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é um método de separação e distribuição dos compostos de uma mistura entre duas fases, a fase móvel e a fase estacionária, dentro da coluna de separação. A fase móvel é composta pelo eluente (fluido líquido) onde são injetadas as amostras e é impulsionado para atravessar a coluna de separação em direção ao detetor (figura 2.6). A fase estacionária consiste num suporte polimérico sólido revestido por diferentes compostos conforme a maior ou menor polaridade que se lhe pretende conferir. Este sólido está confinado ao interior da coluna e deixa a fase móvel permear através da sua reduzida porosidade. A separação dos diferentes analitos presentes na mistura injetada é promovida pela elevada superfície de contacto da fase estacionária com o eluente e pelo tempo de contacto entre as duas fases ao longo da sua eluição através da coluna - a resolução

⁹Os critérios de verificação da calibração do equipamento de IR encontram-se de acordo com o descrito pelas Farmacopeias Europeia e Portuguesa.

analítica decorre da diferente afinidade que cada analito tem entre manter-se dissolvido na fase móvel ou adsorver à superfície da fase estacionária (partilha superficial). Após a eluição da coluna, os analitos separados são sequencialmente detetados por um detetor localizado à saída da coluna cromatográfica.[25]

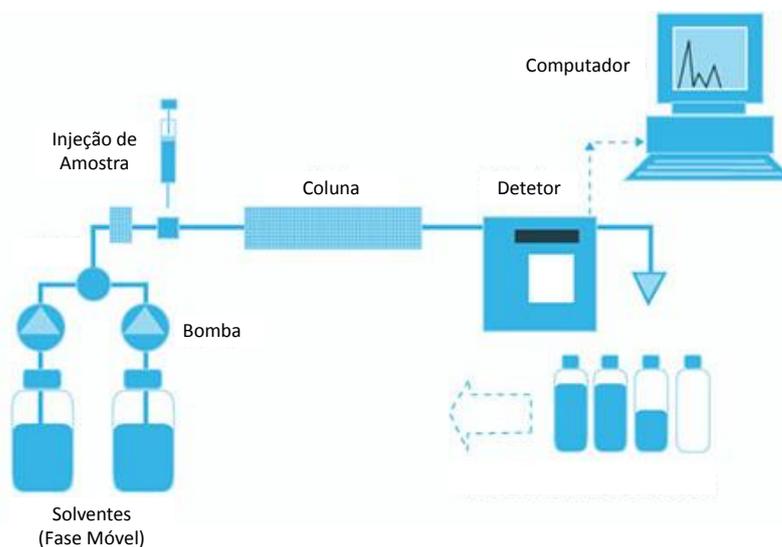


Figura 2.6: Representação esquemática de um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC. Os solventes (fase móvel) arrastam os analitos pela coluna cromatográfica após a injeção da amostra no equipamento, com o objetivo destes chegarem até ao detetor. Quando a corrida acaba, os sinais são detetados por um programa cromatográfico que permite identificar, integrar e quantificar os analitos.

O sucesso analítico da técnica HPLC resulta da combinação de uma boa separação, através da escolha adequada do eluente e respetiva coluna cromatográfica, com a correta escolha de um detetor, universal ou mais seletivo, com diferentes sensibilidades, que permita a eficiente deteção dos analitos a diferentes níveis de concentração. Para contrariar o atrito da fase móvel através da coluna, todo o processo é realizado em condições de alta pressão (60 – 70 bar), de forma a reduzir o tempo de análise e permitir obter sinais de fácil integração.

Dependendo do tipo de analitos que se pretende estudar assim deve ser escolhido o detetor mais adequado. Em HPLC há uma grande diversidade de detetores a usar, sendo os mais usuais o detetor UV-Vis, matriz de díodos (DAD), detetor de fluorescência, detetor de massa, de índice de refração, eletroquímico ou condutimétrico.

Deste modo, a técnica de HPLC é muito eficiente na identificação e quantificação de conjuntos de analitos em amostras complexas, através da área do pico correspondente e do tempo de retenção característico de cada composto.

2.1.4.1 Parâmetros cromatográficos

Um cromatograma é uma representação do sinal detetado pelo equipamento (resposta) ao longo do tempo, como exemplificado na figura 2.7.

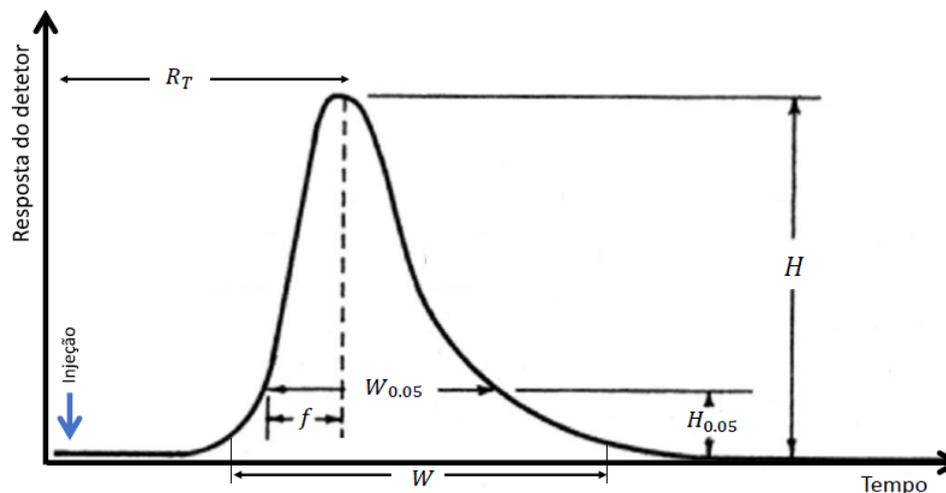


Figura 2.7: Esquema simplificado do perfil de eluição cromatográfica de uma espécie detetada em separado, onde R_T representa o tempo de retenção, W a largura do sinal, H a altura do sinal, $H_{0.05}$ a altura do sinal cromatográfico a 5 %, $W_{0.05}$ a largura do sinal cromatográfico a 5 % da sua altura e f o intervalo temporal do sinal cromatográfico da linha central ao início do sinal.

A partir desta representação gráfica (figura 2.7), é possível extrair uma série de parâmetros fundamentais para comprovar a veracidade, especificidade e sensibilidade da análise efetuada. [13, 25] Torna-se, portanto, necessário definir alguns desses parâmetros, nomeadamente:

1. Volume vazio (V_0) - corresponde ao volume da fase móvel numa coluna, ou seja, numa situação ideal, corresponde ao volume de eluente que tem de passar pela coluna até chegar ao detetor.
2. Tempo de retenção (R_T) - medida do tempo necessário para uma solução passar através de uma coluna cromatográfica e corresponde ao tempo desde a injeção dessa solução até à deteção do analito. Este parâmetro é fulcral na identificação de um analito de interesse e pode variar de acordo com as condições instrumentais.[26, 27]
3. Tempo de retenção relativo (RR_T) - define o tempo de retenção de um dado analito tendo em conta o seu tempo de retenção no padrão, ou seja, é o quociente entre o tempo de retenção obtido na amostra e o tempo de retenção obtido no padrão.

4. Número de pratos teóricos (N_P) - representa uma medida do desempenho da coluna cromatográfica, calculado através da equação 2.6, onde H representa a altura do sinal e A a área desse mesmo sinal.[27] Segundo a ICH, considera-se um bom desempenho da coluna se $N_P \geq 2000$.

$$N_P = 2\pi \cdot \left(\frac{R_T \cdot H}{A} \right)^2 \quad (2.6)$$

5. Fator de simetria (F_S) - representa a medida de divergência de um sinal cromatográfico relativamente à sua forma ideal, onde $F_S = 1$ e o sinal assume uma curva perfeitamente Gaussiana. Pode ser calculado através da equação 2.7, onde $W_{0.05}$ representa a largura do sinal à altura de 5 % e f o espaço temporal do sinal cromatográfico da linha central ao início do sinal à altura de 5 % da altura total.[27, 28]

$$F_S = \frac{W_{0.05}}{2 \cdot f} \quad (2.7)$$

6. Resolução (R_s) - medida da separação de dois sinais cromatográficos, calculada pela equação 2.8. Este parâmetro depende em larga medida da seletividade e da eficiência da coluna cromatográfica usada na análise, uma vez que quanto maior a eficiência da coluna mais afastados estarão os sinais cromatográficos, aumentando a seletividade e afinando-os, tal como demonstra a figura 2.8. De acordo com a Farmacopeia Europeia, a resolução deve ser superior a cinco unidades para ensaios de doseamento e superior a dez unidades para ensaios de impurezas.[27, 28]

$$R_s = \frac{R_{T_2} - R_{T_1}}{0.5 \cdot (W_1 + W_2)} \quad (2.8)$$

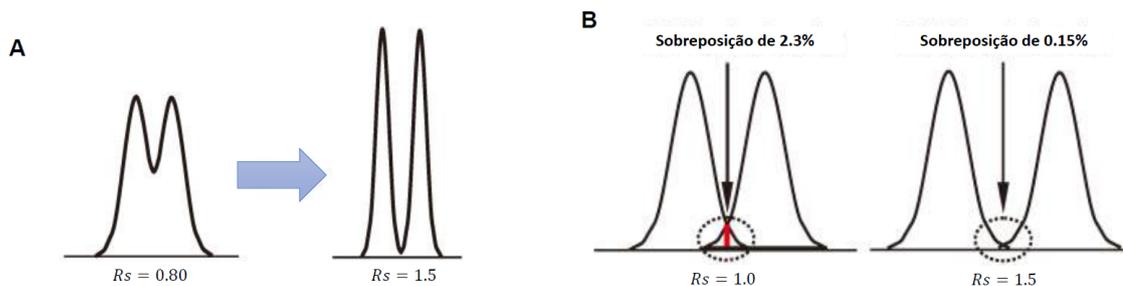


Figura 2.8: Influência da largura dos sinais (W_i) e respetivo afastamento ($R_{T_2} - R_{T_1}$) na resolução dos sinais cromatográficos: em (A) exemplifica-se o efeito da largura do sinal detetado (assumindo constância nos tempos de retenção) e em (B) a influência da proximidade dos sinais (assumindo que as suas larguras se mantêm constantes) na sobreposição destes e seu reflexo na resolução dos sinais.

7. Razão sinal/ruído (S/N) - mede a precisão da quantificação e pode ser verificada por inspeção visual (figura 2.9) ou calculada através da equação 2.9, onde H representa a altura do sinal cromatográfico e h a altura do ruído existente no cromatograma.[29]

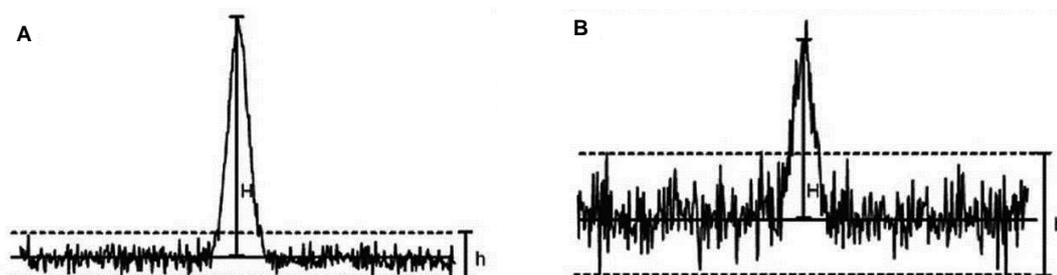


Figura 2.9: Registos exemplificativos de como se efetua a avaliação da relação sinal/ruído no caso de sinais do tipo cromatográfico: em (A) representa-se uma situação onde o sinal é muito superior em relação ao ruído (boa relação sinal/ruído) e em (B) uma situação onde a amplitude do sinal se aproxima da amplitude do ruído (má relação sinal/ruído).

$$S/N = \frac{2 \cdot H}{h} \quad (2.9)$$

Na falta de outro modo de estimativa analítico, a relação sinal/ruído também pode ser usada para definir os limiares analíticos com base nesta característica instrumental.[29]

2.2 A Estatística no tratamento de dados

A Estatística é definida como o conjunto de procedimentos e métodos matemáticos que permitem avaliar um determinado conjunto de dados e extrair dele conclusões quantitativamente suportadas, voltada para a aprendizagem não heurística. É uma disciplina fundamental em qualquer área e, por isso, universal.

Tanto na ciência como na tecnologia em geral, a experimentação e os respetivos valores obtidos são determinantes para a racionalização do evento em causa que se encontra em estudo. Sem o suporte quantitativo e adequado do correto tratamento estatístico, a simples verificação ou confirmação de resultados torna-se insustentável, dando aso a conclusões erradas e não fundamentadas, incompatíveis com os pressupostos científicos correntes.[30] É, portanto, fundamental existir uma boa articulação entre o controlo da qualidade e a estatística.

2.2.1 Estimadores e estimativas

Na experimentação recorre-se a medidas que estão sempre sujeitas, pelo menos, a erros aleatórios e de medição. Para minimizar o efeito aleatório é necessário replicar a medida, obtendo-se uma amostra populacional de dimensão diversa. Com base nesta amostra, é necessário inferir propriedades que possam ser traduzidas através de um valor numérico. Os estimadores são grandezas que permitem obter informação (caraterizar e quantificar) sobre um evento ou população através da análise estatística de uma amostra representativa.

Os estimadores podem ser classificados de acordo com o modo de cálculo, a robustez, a representatividade ou a propriedade estimada. As características desejadas para os estimadores prendem-se com o facto de serem: corretos (conduzirem a valores não tendenciosos), auto-suficientes (permitem uma estimativa direta e independente), eficientes (devem ser mais precisos quanto possível), coerentes (a estimativa deve convergir para o valor real) e robustos (insensíveis a valores discrepantes, vulgarmente designados por “*outliers*”).[31, 32]

Quanto ao modo de cálculo, os estimadores podem ser paramétricos ou não paramétricos. Os primeiros são calculados através de expressões numéricas e dependem do tipo de distribuição considerada, sendo que não requerem uma grande dimensão de amostra e, por isso, são mais sensíveis a valores discrepantes.[33] Por outro lado, os estimadores não paramétricos recorrem a formas simplificadas de cálculo, são independentes do tipo de distribuição em causa e mais robustos, mas, geralmente, requerem um elevado número de valores.

Já quanto à robustez, os estimadores são subdivididos em robustos se são insensíveis a uma sub-população de valores discrepantes ou não robustos quando são sensíveis a *outliers*, muito devido ao modo de cálculo.[32, 33] A mediana é um exemplo prático de um estimador extremamente robusto, enquanto a média é um exemplo de estimador não robusto.

Relativamente à representatividade, os estimadores classificam-se como ponderados ou não ponderados, sendo que no segundo caso todos os elementos estão representados com igual peso (por exemplo, abordagem por mínimos quadrados simples – OLS), enquanto no caso ponderado os elementos adquirem diferente importância na estimativa consoante o peso atribuído (por exemplo, método de mínimos quadrados ponderados – WLS).[32, 33]

Por fim, relativamente à propriedade estimada, existem várias classificações: estimadores de posição (que traduzem o valor mais provável da distribuição), estimadores de dispersão (que indicam a dispersão da população), estimadores da forma da distribuição (que traduzem o perfil de distribuição em causa como, por exemplo, a sua simetria e afilamento), estimadores de correlação (ou regressores, que indicam a interdependência entre sequências de dados) e estimadores de aleatoriedade (cujo propósito é permitir verificar a aleatoriedade de uma série de eventos).[31–33]

Dado que as estimativas por mínimos quadrados recorrem a todos os valores disponíveis para o seu cálculo, estes tornam-se sensíveis aos valores discrepantes, afetando a sua correta estimativa. Por este motivo, deve-se efetuar sempre um diagnóstico e rastreio prévio de valores anómalos de forma a evitar os erros de estimativa.[31]

Ao nível do controlo da qualidade, as estimativas de posição e de dispersão são as mais relevantes e de uso mais frequente.

2.2.1.1 Estimadores de posição

Os estimadores de posição pretendem fornecer informação sobre a localização mais provável de um determinado conjunto de valores, sendo as estimativas mais comuns a mediana e a média.

A mediana (\tilde{x}) é uma estimativa não paramétrica que representa o valor da variável independente que divide o espaço da amostra, sequencialmente ordenada, em duas partes iguais, contando o mesmo número de elementos para cada lado.[32] Em suma, é a estimativa mais robusta do valor central e corresponde ao valor do percentil 50 % (X_{50}).

Por sua vez, a média (\bar{x}) é uma estimativa paramétrica definida pela equação,

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} \quad (2.10)$$

onde N corresponde à dimensão da amostra e x_i representa cada valor, sendo que $i = \{1, 2, 3, \dots, N\}$.

2.2.1.2 Estimadores de dispersão

Os estimadores de dispersão fornecem informações sobre o “grau de espalhamento” dos dados, isto é, representam estimativas de incerteza.[32] O mais comum é o desvio padrão, σ_x , que não é mais do que o desvio quadrático médio em relação ao valor central, definido pela equação 2.11.

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N}} \quad (2.11)$$

Dado que os valores discrepantes surgem sempre nos extremos da distribuição em causa, a dispersão é severamente afetada pela sua presença, sempre no sentido de inflacionar a sua correta estimativa.

Há dois estimadores muito usados para estes casos: o desvio médio absoluto (AAD) e o desvio mediano absoluto (MAD). Dado que a mediana (\tilde{x}) é a estimativa central mais robusta, para ambos os casos, a referência central deve ser tomada como o valor de mediana. O desvio médio absoluto (AAD) é estimado com base na média dos N desvios absolutos, [31]

$$AAD = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |x_i - \tilde{x}| \quad (2.12)$$

e a sua relação com a estimativa da dispersão (σ_x) é dada pela equação 2.13.

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\pi}{2}} \times AAD \quad (2.13)$$

Já o desvio mediano absoluto (MAD) é estimado com base na mediana do conjunto de desvios absolutos através da expressão matemática, [31]

$$MAD = X_{50} (|x_i - \tilde{x}|) \quad (2.14)$$

sendo que a sua relação com a estimativa da dispersão é dada por,

$$\sigma_x = \left(\frac{1}{\sqrt{2} \operatorname{erf}^{-1}(1/2)} \right) \times MAD \simeq 1.4826 \times MAD \quad (2.15)$$

onde $\operatorname{erf}^{-1}(x)$ representa a função de erro inversa.

2.2.2 Testes estatísticos

Os testes estatísticos servem para auxiliar o analista de dados na avaliação e tomada de decisão relacionada com as estimativas efetuadas acerca de uma população bem como na interpretação de conclusões daí resultantes.[34, 35] A análise estatística convencional de dados está intimamente relacionada com o método de estimativa por mínimos quadrados, fundada sobre um determinado conjunto de pressupostos essenciais que condicionam as suas estimativas e subsequentes resultados, nomeadamente: ausência de erro sistemático, erro aleatório com distribuição normal e erro não correlacionado e conhecimento prévio do modelo a utilizar. Para que ela funcione corretamente é de todo conveniente explicar todo o procedimento inerente a uma tomada de decisão estatística.

2.2.2.1 Hipóteses de trabalho

Nos testes de hipóteses existem sempre duas hipóteses complementares: a hipótese nula (H_0), que vai no sentido da conformidade e da igualdade (não haver diferenças significativas), e a hipótese alternativa (H_1), que traduz todo o complementar à hipótese nula, completando o espaço de situações possíveis. Dado que se trata de um evento binomial complementar, a probabilidade da soma de ambas as hipóteses preenche toda a possibilidade da resposta do evento, sendo esta igual à unidade, como se demonstra na equação 2.16.

$$p[H_0] + p[H_1] = 1 \quad (2.16)$$

A hipótese nula é sempre definida de forma a conter a situação de igualdade (ou conformidade) e é sempre *à priori* assumida como verdadeira, até que seja demonstrado que esta é falsa.

Na realidade, as situações em estudo não são assim tão simples de sinalizar e as conclusões a tirar ainda menos distintas. Usando como exemplo um teste de diagnóstico para uma contaminação em que a hipótese nula vai no sentido da conformidade (teste negativo na identificação do contaminante), a hipótese alternativa irá no sentido de ser detetada a contaminação (teste positivo ao contaminante). Efetuando uma infinidade de testes ir-se-ia obter algo parecido ao mostrado na figura 2.10 - a distribuição da esquerda corresponde à hipótese nula (H_0), enquanto que a distribuição à direita corresponde à hipótese alternativa (H_1). Da figura 2.10 verifica-se que há uma certa sobreposição das áreas definidas por ambas as curvas e é através da imposição de um valor crítico (linha vertical vermelha que interceta as curvas) que se processa a tomada de decisão.

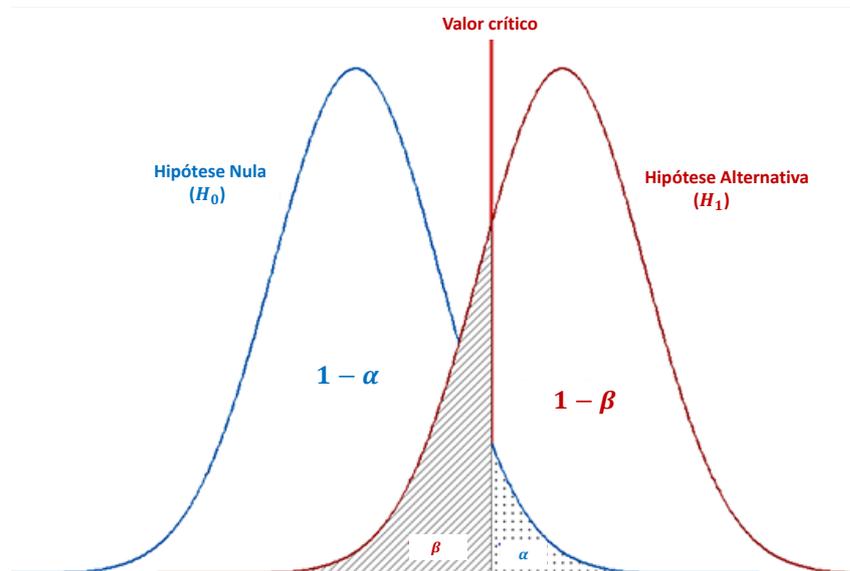


Figura 2.10: Curvas de aceitação da hipótese nula (H_0) ou da hipótese alternativa (H_1) perante um valor crítico (traçado verticalmente a vermelho). A tomada de decisão é realizada com base na região da curva em que nos encontramos.

Ao se definir o valor crítico, ambas as áreas são fragmentadas: a distribuição referente a H_0 é dividida em duas áreas - $(1 - \alpha)$ e (α) ; enquanto que a distribuição relativa a H_1 é fragmentada nas áreas $(1 - \beta)$ e (β) , como mostra a figura 2.10.

As zonas divididas pela linha divisória correspondem a situações de erro (anomalia) - a área (α) corresponde a erro de rejeição abusiva (erro do tipo I, onde a H_0 era verdadeira e foi tomada como falsa), enquanto que a área (β) corresponde ao erro de aceitação abusiva (erro do tipo II, onde a H_0 era falsa mas foi considerada verdadeira). Por uma questão de maior segurança, em controlo da qualidade é preferível cometer erros do tipo I (rejeição abusiva de material em condições) do que erros do tipo II (aceitação abusiva de material não conforme). Na figura 2.11 encontra-se esquematizado o tipo de erros que podem ocorrer numa tomada de decisão estatística.

		Realidade acerca da população	
		H_0 verdadeira H_1 falsa	H_0 falsa H_1 verdadeira
Decisão baseada na amostra	H_0 falsa	Erro Tipo I Probabilidade: α	Decisão Correta Probabilidade: $1 - \beta$
	H_0 verdadeira	Decisão Correta Probabilidade: $1 - \beta$	Erro Tipo I Probabilidade: β

Figura 2.11: Tomada de decisão com suporte estatístico com base na amostra colhida da população em estudo. As situações assinaladas a verde correspondem a decisões bem tomadas e as assinaladas a laranja correspondem a erros de avaliação - (α) é a probabilidade associada à rejeição abusiva (erro do tipo I, falsos positivos); enquanto que (β) corresponde à probabilidade de aceitação abusiva (erro do tipo II, falsos negativos).

A probabilidade máxima com que se pretende tomar decisões, aceitando um certo nível de erro do tipo I, é designada por nível de significância do teste (α) e a probabilidade de aceitação da hipótese correta designa-se de nível de confiança $(1 - \alpha)$. [32] De modo similar, para um determinado valor teste, a probabilidade de aceitação da hipótese nula ($p[H_0]$) chamamos de

valor de prova, vulgarmente designado por *p-value*.

Para uma correta tomada de decisão é imprescindível seguir um procedimento padrão, de modo a que todas as questões importantes sejam tidas em conta no momento da decisão final.[28] Deste modo, recomenda-se o seguinte procedimento:

1. Formulação do problema - traduzir por uma equação simples o problema que se pretende avaliar;
2. Expressão do teste - escolher o teste que melhor se adequa ao problema em causa, atendendo à distribuição estatística subjacente;
3. Definir as hipóteses de trabalho - escrever as duas hipóteses relacionadas com o problema em questão, sendo que devem ser complementares e não sobreponíveis; a H_0 deve indicar no sentido de não haver diferença significativa, enquanto que a H_1 deve incorrer no contrário, isto é, no sentido de haver diferença significativa.
4. Simetria do teste - com base na hipótese alternativa, determinar a simetria do teste (unilateral ou bilateral);
5. Nível de confiança, $(1 - \alpha)^{10}$ - estabelecer o nível de confiança com que se pretendem tirar as conclusões, ou seja, definir qual o erro máximo admissível para H_0 ;
6. Cálculo do valor de teste - o valor experimental do teste (TV) é um parâmetro calculado de acordo com a distribuição estatística previamente escolhida;
7. Comparação com o valor crítico - os valores críticos (X_{crit}) de cada distribuição estatística encontram-se tabelados de acordo com o nível de significância, α , e com o número de graus de liberdade (ndf), devendo ser comparados com o TV obtido. Esta comparação pode ser evitada se se calcular diretamente o respetivo valor de prova;
8. Conclusão - por comparação de TV com o valor crítico, se este for inferior ou igual a X_{crit} aceita-se H_0 ao nível de significância considerado; caso TV exceda o valor crítico, rejeita-se H_0 em detrimento de H_1 ao nível de significância escolhido. A mesma conclusão pode ser efetuada, de modo similar, por comparação do valor de prova obtido (*p-value*) com o nível de significância pretendido.

¹⁰O nível de confiança $(1 - \alpha)$ reflete a probabilidade para concluir corretamente com base na hipótese nula. Este valor está intimamente relacionado com o nível de significância (ou de diferença significativa, α) através da complementaridade exibida na equação $1 = \alpha + (1 - \alpha)$.

Segundo as normas da Organização Internacional para a Normalização (ISO) referentes à qualidade, a tomada de conclusão nos testes estatísticos deve ser efetuada aos níveis de significância de 5 % e 1 % ($\alpha = 0.05$ e $\alpha = 0.01$, respectivamente), podendo-se verificar três cenários possíveis, tal como demonstra o esquema da figura 2.12: H_0 aceite ($TV \leq X_{0.05}$), H_0 dúbia ($X_{0.05} < TV \leq X_{0.01}$) ou H_1 aceite ($TV > X_{0.01}$).

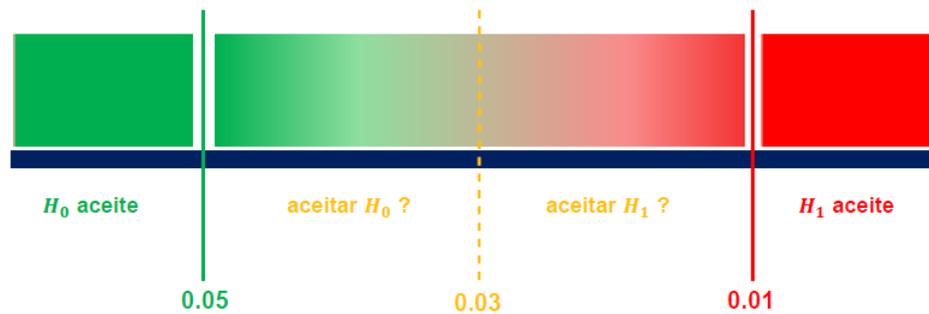


Figura 2.12: Esquema representativo da tomada de decisão com base no valor de prova considerando os limites $\alpha = 0.05$ e $\alpha = 0.01$ para a aceitação hipótese nula (H_0) e da hipótese alternativa (H_1), respectivamente. Na figura surge a indicação do valor $\alpha = 0.03$ como limite de decisão em situações onde a dúvida estatística é demasiado elevada para a correta avaliação.

Existem testes baseados em distribuições estatísticas que têm por base as hipóteses previamente formuladas.[28] As distribuições mais comuns são as de t -Student (para situações relacionadas com a posição), F de Fisher-Snedcor (situações relacionadas com a comparação de dispersões) e do qui-quadrado (relacionada com a comparação da forma), pois estão bem evidenciadas e todos os valores críticos se encontram devidamente tabelados, providenciando grande segurança no momento da tomada de decisão.

2.2.2.2 Distribuição t -Student

A distribuição t -Student é muito usada quando se pretende comparar estimativas de posição. O valor de teste (TV) é calculado de acordo com a equação 2.17, através do quociente entre a diferença da média pelo valor de referência (X_{ref}) e o desvio padrão dessa média ($\sigma_{\bar{x}}$).

$$TV = \frac{|\bar{x} - X_{ref}|}{\sigma_{\bar{x}}} \quad (2.17)$$

Para que não existam diferenças significativas, isto é, para que a H_0 seja aceite, o valor de teste deve ser inferior ou igual ao valor crítico¹¹, ao nível de significância, α , considerado.

2.2.2.3 Distribuição de Fisher-Snedcor

Quando se pretendem comparar variâncias (σ^2) usa-se a distribuição F de Fisher-Snedcor, sendo que, para estes casos, a H_0 assume que não existem diferenças significativas entre variâncias e H_1 assume o contrário. O valor de teste calcula-se através do quociente entre determinada variância (σ_j^2) com o valor de referência (σ_i^2), como indicado na equação 2.18.

$$TV = \left(\frac{\sigma_j^2}{\sigma_i^2} \right) \quad (2.18)$$

Não havendo uma referência de variância, a expressão anterior é calculada considerando a de menor valor como sendo a referência, de modo a se obter um valor de teste superior ou igual à unidade.

Caso o valor crítico¹² seja superior ao valor de teste, assume-se que a diferença é puramente aleatória, caso contrário afirma-se que existem diferenças significativas entre as variâncias.

2.2.2.4 Distribuição qui-quadrado

Esta distribuição pode ser usada para diversos fins, variando a forma de cálculo do TV consoante o objetivo pretendido: normalidade, intervalos de confiança ou comparação direta. No caso de se estar a verificar a qualidade do ajuste sob amostras do mesmo tipo, a distribuição do qui-quadrado (χ^2) apresenta um valor de teste dado pela equação 2.19.

$$TV = \sum_i^N z_i^2 = \sum_i^N \left(\frac{x_i - X_{ref}}{\sigma_x} \right)^2 \quad (2.19)$$

¹¹O valor crítico para o teste t -Student é definido por $t_{\alpha}^s(ndf)$, sendo s a simetria do teste (unilateral ou bilateral), α o nível de significância do teste e ndf o número de graus de liberdade.

¹²O valor crítico para o teste F de Fisher-Snedcor é definido por $F_{\alpha}^s(ndf1, ndf2)$, sendo s a simetria do teste (unilateral ou bilateral), α o nível de significância do teste, $ndf1$ o número de graus de liberdade do numerador e $ndf2$ o número de graus de liberdade do denominador.

Para aceitação da hipótese nula em estudo, o valor de teste, TV , deve ser inferior ao valor crítico, $\chi_{\alpha}^2(ndf)$, ao nível de significância α com ndf graus de liberdade.

2.2.3 Testes mais frequentes

Há um conjunto de testes estatísticos que são mais frequentes e que foram utilizados ao longo deste trabalho. Nesta sub-secção revemos alguns dos seus conceitos básicos de forma a documentar e sustentar a respetiva utilização. Além dos testes diretos (t -Student, Fisher-Snedcor e qui-quadrado) abordados na sub-secção 2.2.2, os testes mais utilizados são o teste de Grubbs (para rastrear eventuais valores discrepantes presentes numa amostra), o teste t -emparelhado (na comparação de duas situações de correspondência analítica na ausência de réplicas), teste de Mandel (para avaliar o efeito de valores discrepantes ou parâmetros supérfluos no ajuste de um modelo), o teste de Cochran (para comparar simultaneamente valores discrepantes de variância) e o teste ANOVA (para comparar simultaneamente diversas estimativas posicionais).

2.2.3.1 Teste de Grubbs

Na sub-secção 2.2.1 evidenciou-se o impacto que valores anómalos têm sobre as estimativas paramétricas de posição (média) e dispersão (desvio padrão), sendo vital a remoção desses valores discrepantes para evitar erros sistemáticos nestas estimativas.

Para detetar eventuais *outliers* numa amostra (conjunto de valores) podem ser utilizados vários testes estatísticos. O mais referenciado é o teste de Grubbs.[36]

De acordo com este teste, um determinado valor é considerado discrepante (*outlier*) se a sua distância à estimativa central for superior a um valor múltiplo do desvio padrão, ou seja, se o valor de teste ($TV(G)$, ver equação 2.20) exceder o valor crítico tabelado, sendo $x_?$ o ponto a testar, \bar{x} a média, σ_x o desvio padrão e N a dimensão da amostra.

$$TV(G) = \frac{\max(x_i - \bar{x})}{\sigma_x} = \frac{|x_? - \bar{x}|}{\sigma_x} \quad (2.20)$$

Caso o valor suspeito não seja um *outlier*, considera-se que a amostra está validada, incluindo esse ponto duvidoso, e pode-se afirmar que não existem mais valores discrepantes.

Se, pelo contrário, o ponto suspeito for um valor anômalo, então testa-se o ponto suspeito seguinte até que se verifique que não existem mais *outliers*. [32, 36] Em apêndice, ver tabela A.1, apresentam-se alguns valores críticos de Grubbs ao nível de confiança de 95 % ($G_{0.05}$) para N valores experimentais.

2.2.3.2 Teste t -emparelhado

Este teste é usado para comparar os resultados obtidos entre duas situações de teste (ex: condições experimentais) em que um conjunto de amostras independentes são avaliadas, através de ensaio único, por cada situação em teste. Caso exista similaridade nos resultados obtidos entre as duas situações em teste, a diferença média entre os respectivos resultados obtidos deve tender para zero ($\bar{x}_d \simeq 0$). [32] O valor de teste é calculado pela equação 2.21,

$$TV = \frac{|\bar{x}_d| \cdot \sqrt{N}}{\sigma_d} \quad (2.21)$$

onde \bar{x}_d representa a média das diferenças entre as estimativas e σ_d designa o desvio padrão dessas diferenças.

2.2.3.3 Teste de Mandel

O teste de Mandel (ou teste F incremental) permite comparar alterações na variabilidade ($\Delta\sigma^2$) provocada por uma alteração pontual do número de graus de liberdade (através da remoção de um conjunto de valores ou de parâmetros do modelo) em relação a uma estimativa puramente aleatória de dispersão (σ_{pe}^2). [33] O seu valor de teste é calculado pela equação 2.22.

$$TV = \frac{\Delta\sigma^2}{\sigma_{pe}^2} = \frac{(\Delta SS / \Delta ndf)}{\sigma_{pe}^2} = \frac{(SS_1 - SS_2) / (ndf_1 - ndf_2)}{\sigma_{pe}^2} \quad (2.22)$$

2.2.3.4 Teste de Cochran

O teste de Cochran permite detetar eventuais valores anômalos (extremos máximos ou mínimos) de dispersão entre diversos conjuntos de dados, sendo que a variância máxima detetada

(σ_{max}^2) é usada como termo de comparação com a respetiva soma. A hipótese nula assume que o valor extremo encontrado não difere significativamente dos restantes valores.[33]

O valor de teste de Cochran ($TV(C)$) calcula-se através da equação 2.23.

$$TV(C) = \frac{\sigma_{max}^2}{\sum_{i=1}^N \sigma_i^2} \quad (2.23)$$

O valor de teste deve ser inferior ao valor crítico tabelado ($C_{0.05}$, ver tabela A.2) para N variâncias com M réplicas, ao nível de significância de 5 %.

2.2.3.5 Teste ANOVA

A análise de variância (ANOVA) é uma ferramenta estatística importante para distinguir as diversas contribuições sobre a variância total observada. Assume que cada nível de fator está representado por distribuições normais e independentes que possuem em comum a mesma variabilidade. Esta ferramenta estatística permite estimar a variabilidade puramente aleatória e discriminar, dentro da variabilidade total, a variabilidade devida a cada fator em teste.

A ANOVA de fator único assume que a dispersão total (SS_T) se divide em duas componentes: a dispersão puramente aleatória (SS_{pe}), que traduz a variabilidade não explicada pelo fator, e a dispersão causada pelo efeito do fator (SS_A), conforme descrito pela equação 2.24, onde SS representa a soma de quadrados,[37]

$$SS_T = SS_{pe} + SS_A \quad (2.24)$$

mais em detalhe,

$$\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{M_i} (x_{ij} - \bar{x})^2 = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{M_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 + \sum_{i=1}^N M_i \cdot (\bar{x}_i - \bar{x})^2 \quad (2.25)$$

Assim, permite não só estimar as diversas contribuições de variabilidade, como também verificar se as amostras (fatores) exercem um efeito significativo, contribuindo para diferenças

significativas entre si.[32, 33]

A variância interna (σ_i^2) é calculada através da equação 2.26, sendo que M_i representa o número da réplicas no nível i e \bar{x}_i a média desse nível.

$$\sigma_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{M_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{(M_i - 1)} \quad (2.26)$$

Por sua vez, a variabilidade dentro dos N grupos (σ_0^2) é estimada com base na média das variâncias internas de todos os grupos, como demonstra a equação 2.27.

$$\sigma_0^2 = \frac{\sum_{i=1}^N \sigma_i^2}{N} = \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{M_i} (x_{ij} - \bar{x})^2}{N \cdot (M - 1)} \quad (2.27)$$

A variabilidade associada ao fator em estudo (σ_A^2) é estimada através da dispersão das médias de cada um dos níveis (\bar{x}_i) em relação à média global (\bar{x}), como se pode verificar na equação 2.28.

$$\sigma_A^2 = \frac{\sum_{i=1}^N M_i \cdot (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{(N - 1)} \quad (2.28)$$

O valor de teste, TV , calcula-se através do teste F de Fisher-Snedcor, de acordo com a equação 2.29, sendo que a hipótese nula afirma que a dispersão introduzida pelo fator em estudo não afeta significativamente a variabilidade mantendo-se esta similar à da componente puramente aleatória, ou seja, se H_0 for aceite não existe efeito do fator.[37]

$$TV = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_0^2} \quad (2.29)$$

Atendendo aos pressupostos em que a ANOVA assenta (distribuições normais e independentes com homogeneidade de variância) é de todo conveniente realizar previamente o teste de Cochran (ver equação 2.23) previamente para garantir que as conclusões retiradas são fiáveis.

2.2.4 Intervalo de confiança

O intervalo de confiança é um tipo de estimativa calculada a partir das estatísticas dos dados observados, o que propõe uma faixa de valores plausíveis para um parâmetro desconhecido (por exemplo, a média). O intervalo tem um nível de confiança associado, $(1 - \alpha)$, de, normalmente, 0.95, daí que seja designado por intervalo de confiança a 95 % ($IC_{0.05}$), embora possa ser determinado a outros níveis de confiança (90 ou 99 %, por exemplo).[38] Esta estimativa é calculada através da equação 2.30.

$$IC_{0.05} = t_{0.05(ndf)}^b \cdot \frac{\sigma_x}{\sqrt{N}} \quad (2.30)$$

Assim, considerando a média (\bar{x}) como o valor da estimativa central que se pretende calcular, os valores que constam no intervalo aceitável para essa estimativa são dados pelo intervalo $[\bar{x} - IC_{0.05}$ a $\bar{x} + IC_{0.05}]$, representado-se sob a forma $\bar{x} \pm [IC_{0.05}]$.

Em termos gerais, um intervalo de confiança para um parâmetro desconhecido é baseado na amostragem da distribuição de um estimador correspondente. Há fatores que afetam a largura do intervalo de confiança, tais como o tamanho da amostra (N), o nível de confiança $(1 - \alpha)$ ou a variabilidade na amostra¹³. [38]

2.3 Análise multivariada

Nos dias de hoje, a quantidade de informação disponibilizada é cada vez mais desafiante - não só os dados são obtidos com uma elevada frequência de amostragem como o número de variáveis recolhidas em simultâneo cresce a um ritmo preocupante, gerando congestionamentos de informação que dificilmente consegue ser seguida no instante imediato. Perante este desafio quantitativo, com base na matemática e estatística, desenvolveram-se algoritmos adequados para lidar com as novas questões relacionadas com a Química Analítica designada de Quimiometria.[39]

¹³Uma maior amostra (aumento de N) tenderá a produzir uma melhor estimativa da dispersão populacional (σ_x) e, conseqüentemente, uma menor incerteza em relação à variabilidade da estimativa posicional ($\sigma_{\bar{x}} = \sigma_x/\sqrt{N}$); enquanto que um nível de confiança mais elevado (menor α) tenderá a produzir um intervalo de confiança mais amplo, já que inflaciona o termo multiplicativo ($t_{\alpha(ndf)}^b$).

Além da Química Analítica, a Quimiometria é uma ciência transversal a outras áreas, como mostra a figura 2.13. Graças ao rápido desenvolvimento desta área de processamento numérico avançado, diversos algoritmos complicados são agora utilizados de forma rotineira como, por exemplo, as análises PCA (Análise de Componentes Principais), PCR (Regressão de Componente Principal) ou PLS (Mínimos Quadrados Parciais).

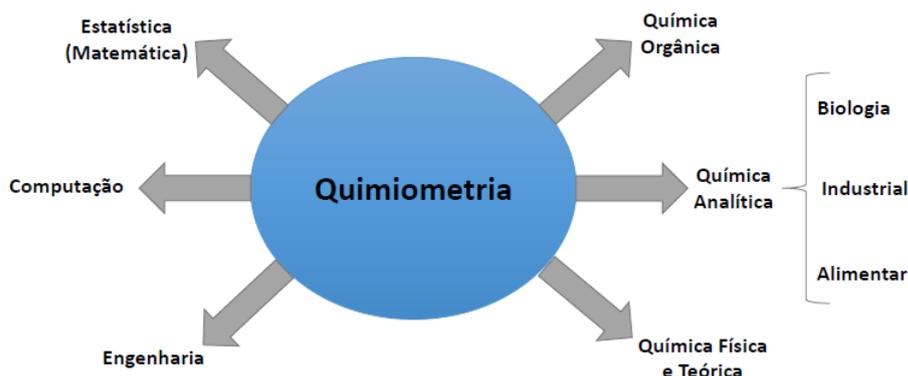


Figura 2.13: Principais áreas relacionadas com a ciência quimiométrica (adaptado de [39]).

Genericamente, estas ferramentas são utilizadas em processos de otimização, planeamento e calibração multivariada ou no processamento de sinais e imagens. Estes algoritmos estão presentemente a ser usados para prever e descrever relações quantitativas entre estrutura molecular e propriedade química (QSPR) e entre estrutura molecular e atividade química (QSAR), muito vantajosa para a “química virtual” de pesquisa de novos materiais e fármacos.[40]

2.3.1 Modelação

A melhor forma de descrever uma relação casuística que descreve um determinado fenómeno passa certamente por desenvolver um modelo matemático que permita prever os valores da variável em estudo. Um modelo é a representação simplificada de um determinado problema ou situação da vida real. Contudo, há uma infinidade de modelos que podem ser usados para descrever a mesma situação, cabendo-nos a nós testar esses modelos e verificar qual o que melhor descreve o conjunto de dados em análise.

Baseado em estimativas paramétricas, segundo o método de mínimos quadrados, existem, por assim dizer, dois algoritmos distintos na forma como efetuam o ajuste de uma resposta:

a modelação explícita, onde o modelo é previamente definido, e a modelação implícita, onde o modelo não é previamente conhecido. O primeiro caso corresponde a uma “modelação supervisionada”, imposta pelo operador, enquanto que o segundo caso pertence à “modelação não supervisionada”, em que o operador apenas tem de tomar decisões ao nível do desempenho do modelo.

2.3.1.1 Modelação explícita

O vulgar método de mínimos quadrados pressupõe o conhecimento prévio da equação do modelo que se pretende ajustar. Assumindo que a resposta (variável dependente, y_i) pode ser descrita em cada ponto ($i = 1, \dots, N$) pela função

$$f(x_i; \theta_j) = y_i^* \quad (2.31)$$

e dado que irá existir um certo erro ou desvio entre os valores ajustados (y_i^*) e os valores obtidos experimentalmente,

$$e_i = (y_i^* - y_i) \quad (2.32)$$

as melhores estimativas paramétricas do modelo (θ_j , $j = 1, \dots, p$) serão aquelas que permitem reduzir o erro do modelo em cada ponto simultaneamente. Assim, a otimização paramétrica é efetuada com base na minimização da função de mérito do ajuste conhecida como soma de quadrados, SS , definida pela equação 2.33.

$$SS = \sum_{i=1}^N (y_i^* - y_i)^2 \quad (2.33)$$

No caso de se estar a trabalhar com “modelos lineares”¹⁴, a estimativa paramétrica pode ser facilmente obtida através de operações matriciais simples, demonstradas de seguida, sem

¹⁴Chamam-se modelos lineares ao conjunto de modelos cujas derivadas parciais da soma de quadrados em ordem a cada modelo conduzem a uma expressão que não depende de nenhum parâmetro do modelo em causa.

se ter de recorrer a algoritmos iterativos.

Assumindo que se possui um sub-espço preditor com n amostras representadas sobre m variáveis ($\mathbf{X}_{(n \times m)}$) e se pretende ajustar um modelo com p parâmetros ($p = (m + 1)$) para descrever a resposta ($\mathbf{Y}_{(n \times 1)}$), a equação inicial será,

$$\mathbf{X}_{(n \times p)} \cdot \mathbf{B}_{(p \times 1)} = \mathbf{Y}_{(n \times 1)} \quad (2.34)$$

onde a matriz $\mathbf{B}_{(p \times 1)}$ corresponde a um vetor coluna e acomoda os valores das estimativas paramétricas definidas no modelo a ajustar. Para que se possa visualizar melhor, apresenta-se na figura 2.14 um esquema matricial da equação 2.34.

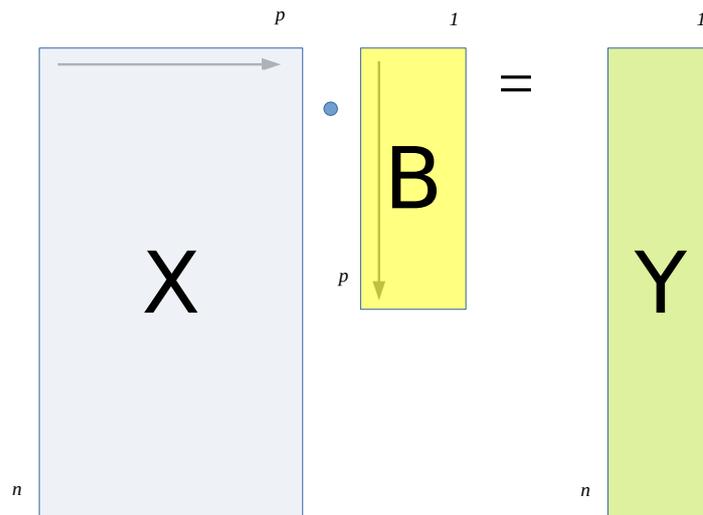


Figura 2.14: Representação da equação inicial do ajuste da resposta ($\mathbf{Y}_{(n \times 1)}$) com base nos preditores ($\mathbf{X}_{(n \times p)}$) e parâmetros do modelo ($\mathbf{B}_{(p \times 1)}$).

Entre outras operações matriciais simples, a resolução desta equação matricial passa por encontrar a matriz de projeto ($\mathbf{A}_{(p \times p)}$) do sistema em causa,

$$\mathbf{A}_{(p \times p)} = \mathbf{X}_{(p \times n)}^T \cdot \mathbf{X}_{(n \times p)} \quad (2.35)$$

onde $\mathbf{X}_{(p \times n)}^T$ corresponde à matriz transposta do sub-espço preditor. A matriz de covariância paramétrica ($\mathbf{C}_{(p \times p)}$) é obtida através da inversa da matriz de projeto,

$$\mathbf{C}_{(p \times p)} = \mathbf{A}_{(p \times p)}^{-1} \quad (2.36)$$

estimativa dos termos independentes ($\mathbf{XtY}_{(p \times 1)}$),

$$\mathbf{XtY}_{(p \times 1)} = \mathbf{X}_{(p \times n)}^T \cdot \mathbf{Y}_{(n \times 1)} \quad (2.37)$$

e, finalmente, obtêm-se as estimativas paramétricas do modelo ($\mathbf{B}_{(p \times 1)}$).

$$\mathbf{B}_{(p \times 1)} = \mathbf{C}_{(p \times p)} \cdot \mathbf{XtY}_{(p \times 1)} \quad (2.38)$$

2.3.1.2 Modelação implícita

O método de mínimos quadrados parciais (PLS) é o mais utilizado para este tipo de modelação não supervisionada. Como a sua designação sugere, este algoritmo é de cariz iterativo.

O conjunto de dados é inicialmente definido de forma independente, composto por dois sub-espços, preditor ($\mathbf{X}_{(n \times m)}$) e resposta ($\mathbf{Y}_{(n \times r)}$), que devem ser inicialmente centrados (ou normalizados). O passo seguinte consiste em avaliar as covariâncias entre o sub-espço preditor e a resposta (\mathbf{C}_{XY}) e entre a resposta e o sub-espço preditor (\mathbf{C}_{YX}) com base nas seguintes operações matriciais.

$$\mathbf{C}_{XY(p \times p)} = \mathbf{X}_{(p \times n)}^T \cdot \mathbf{Y}_{(n \times r)} \cdot \mathbf{Y}_{(r \times n)}^T \cdot \mathbf{X}_{(n \times p)} \quad (2.39)$$

$$\mathbf{C}_{YX(r \times r)} = \mathbf{Y}_{(r \times n)}^T \cdot \mathbf{X}_{(n \times p)} \cdot \mathbf{X}_{(p \times n)}^T \cdot \mathbf{Y}_{(n \times r)} \quad (2.40)$$

Efetua-se a decomposição da variabilidade de cada matriz de covariância nos respectivos fatores latentes de forma a construir as relações externas do sub-espço preditor e da resposta (equações 2.41 e 2.42).

$$\mathbf{X}_{(n \times m)} = \mathbf{T}_{(n \times f)} \cdot \mathbf{P}_{(f \times m)}^T + \mathbf{E}_{(n \times m)} \quad (2.41)$$

$$\mathbf{Y}_{(n \times r)} = \mathbf{U}_{(n \times f)} \cdot \mathbf{Q}_{(f \times r)}^T + \mathbf{F}_{(n \times r)} \quad (2.42)$$

Estas relações externas permitem decompor cada sub-espço nos respectivos “*scores*” (representação das n amostras no sub-espço fator f) e “*loadings*” (matriz que estabelece a relação entre as variáveis de cada sub-espço, m ou r , e cada fator latente f). As matrizes residuais (\mathbf{E} e \mathbf{F}) contêm a quantidade de informação das matrizes originais que não foi ainda descrita. Daqui para a frente inicia-se o processo iterativo em que são calculados os parâmetros do modelo que satisfazem a melhor relação interna entre os “*scores*” de cada sub-espço, preditor ($\mathbf{T}_{(n \times f)}$) e resposta ($\mathbf{U}_{(n \times f)}$), de acordo com a equação 2.43.

$$u_{(n \times i)} = b_i \cdot t_{(n \times i)} \quad (2.43)$$

Após encontrada a melhor estimativa paramétrica para cada relação interna pela equação anterior, a informação contida nesse fator latente é descontada nos sub-espços preditor e resposta até se conseguir esvaziar a informação contida em cada um dos sub-espços. Na figura 2.15 representam-se as matrizes dos sub-espços preditor e resposta, bem como se realizam as relações externas e internas do algoritmo PLS.

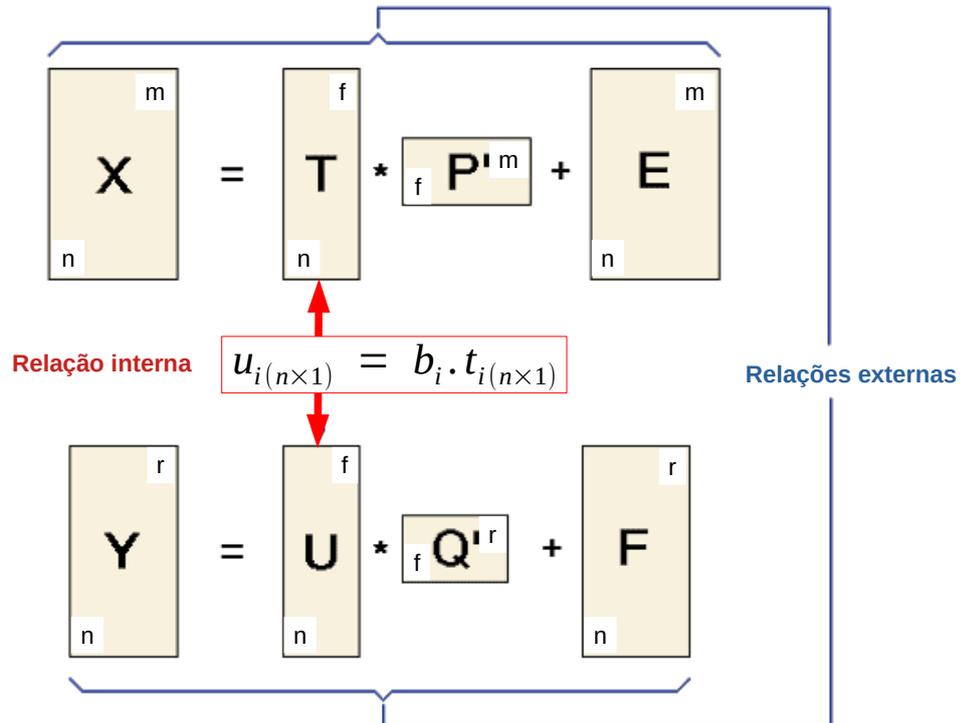


Figura 2.15: Esquema matricial representativo das relações externas e interna do método de ajuste implícito com PLS. As matrizes \mathbf{T} e \mathbf{U} designam-se de “scores” e \mathbf{P} e \mathbf{Q} de “loadings”, enquanto as matrizes \mathbf{E} e \mathbf{F} são as matrizes residuais dos sub-espacos preditor e resposta, respetivamente.

Idealmente, se o conjunto de preditores for bem escolhido, com um número pequeno de iterações consegue-se reduzir o erro do ajuste da resposta, fazendo com que a matriz de erro ($\mathbf{F}_{(n \times r)}$) seja próxima da matriz nula. Este processo iterativo é normalmente seguido, iteração a iteração, em termos de informação utilizada no sub-espaco preditor para conseguir justificar uma certa quantidade de informação contida na resposta.

2.3.2 Otimização de modelos

Na perspetiva multivariada de ajuste explícito de modelos lineares através do método comum de mínimos quadrados não ponderados (MOLS) existem algumas limitações. A primeira está relacionada com o número de parâmetros do modelo - quanto maior for o número de parâmetros do modelo, maiores são as chances de que alguns destes apresentem correlações significativas. A consequência derradeira resulta numa matriz de projeto que fica mal condicionada e, quando é invertida para que se calcule a matriz de correlação, por vezes, conduz a indeterminações. Outra limitação provém do número de graus de liberdade, pois à medida

que o número de parâmetros aumenta, o respetivo número de graus de liberdade vai convergindo para zero, o que torna impossível ter acesso à componente estatística associada ao ajuste. Este tipo de estimativa é também vulnerável a valores discrepantes - valores anómalos têm a tendência para distorcer as estimativas central e de dispersão dos parâmetros do modelo.[39, 41]

Como estratégia de prevenção destas anomalias procura-se remover pontos influentes e valores anómalos numa fase precoce do ajuste. Outra alternativa consiste em iniciar o ajuste com um número muito restrito de parâmetros e prosseguir na busca de novos parâmetros (pesquisa de preditores que consigam melhorar o desempenho do modelo).

Existem três critérios de base para efetuar esta pesquisa - coeficiente de determinação (R^2), critério de Akaike (AIC) e critério Bayesiano (BIC).

2.3.2.1 Coeficiente de determinação

O coeficiente de determinação, R^2 , é uma medida de ajuste de um modelo estatístico linear aos valores obtidos para uma determinada variável aleatória. Calcula-se através da equação 2.44, onde x_i representa cada valor i da variável independente, \bar{x} a média desses valores, y_i a resposta que se procura modelar (por exemplo, corresponde ao sinal instrumental individual de uma determinada concentração i) e \bar{y} a média dessas respostas.

$$R^2 = \left(\frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}} \right)^2 \quad (2.44)$$

O valor de R^2 é largamente influenciado por valores que não se enquadram no conjunto de dados, isto é, valores discrepantes.[42] Varia entre 0 e 1 (ou entre 0 e 100 %), sendo que quanto mais próximo da unidade for o valor do coeficiente de determinação, melhor e mais explicativo é o modelo para o conjunto de dados em causa.[40, 42] Segundo as normas, um modelo linear é aceite se $R^2 \geq 0.99$.

Para comparar o poder explicativo de modelos de regressão que contêm diferente número de preditores é comum usar o coeficiente de determinação ajustado, R_{adj}^2 , ao invés do R^2 que não é sensível a esta questão. Ou seja, o R_{adj}^2 é uma versão modificada de R^2 que aumenta somente se o novo termo melhorar o modelo mais do que seria expectável. Este parâmetro

pode ser calculado através da equação 2.45, onde N representa o número de pontos na amostra e k diz respeito ao número de regressores independentes, isto é, o número de preditores do modelo (excluindo a constante).

$$R_{adj}^2 = 1 - \left[(1 - R^2) \cdot \left(\frac{N - 1}{N - k - 1} \right) \right] \quad (2.45)$$

À semelhança do coeficiente de determinação, quanto mais próximo da unidade for o valor de R_{adj}^2 , mais explicativo é o modelo para o conjunto de dados em análise.

2.3.2.2 Critério de Akaike

O critério de informação de Akaike (AIC) é um estimador que usa o ajuste dentro de um conjunto de dados para prever a capacidade de um modelo ajustar um conjunto de valores com um valor mínimo de parâmetros. O AIC baseia-se da teoria da informação e foi desenvolvido para escolher o modelo que produz uma distribuição de probabilidade com a menor discrepância em relação à verdadeira distribuição.[43, 44]

O AIC não é uma prova sobre o modelo no sentido de testar hipóteses, mas sim uma ferramenta para a seleção de modelos e, por isso, não é um teste de hipóteses nem há níveis de significância ou valores de prova. Para estimar o valor de AIC usa-se a equação 2.46, onde L é o valor maximizado da função de probabilidade e k é o número de parâmetros estimados.

$$AIC = -2 \times \ln(L) + 2k \quad (2.46)$$

Assim, considera-se um bom modelo aquele que possuir um valor de AIC mínimo, ou seja, se um modelo com k_1 parâmetros apresentar um valor AIC_1 e um segundo modelo com k_2 parâmetros apresentar valor AIC_2 , o primeiro modelo será melhor se $AIC_1 < AIC_2$. Para saber quantas vezes esse modelo é melhor do que o segundo, é comum calcular o parâmetro AIC_{rel} , através da equação 2.47, onde a função exponencial permite que os valores obtidos sejam sempre positivos, facilitando a interpretação.[43, 44]

$$AIC_{rel} = \exp(AIC_1 - AIC_2) / 2 \quad (2.47)$$

2.3.2.3 Critério Bayesiano

O critério informativo Bayesiano (*BIC*), também conhecido como critério de Schwarz, é um critério usado na seleção de modelos, uma vez que avalia em simultâneo a qualidade do ajuste e a respetiva complexidade do modelo.

Ao ajustar modelos, é possível aumentar a qualidade do ajuste através da adição de mais parâmetros, mas isso pode resultar numa “sobre-parametrização” desnecessária do modelo em causa.[41] O *BIC* resolve essa questão introduzindo um termo de penalização para o número de parâmetros no modelo, sendo que esse termo é mais relevante no *BIC* do que no *AIC*.

Assim, à semelhança do critério *AIC*, um valor baixo de *BIC* indica um melhor ajuste do modelo ao conjunto de dados em causa. Pode ser calculado através da equação 2.48, onde L representa o valor maximizado da função probabilidade, N corresponde à dimensão da amostra e k ao número de parâmetros estimados.

$$BIC = -2 \times \ln(L) + k \times \ln(N) \quad (2.48)$$

Como os fatores de Bayes dependem da probabilidade marginal dos dados num modelo presumido, eles só existem se o modelo for, efetivamente, adequado.[45, 46]

O *BIC* tem sido amplamente utilizado para identificação de modelos em séries temporais e regressão linear.[46] No entanto, pode ser aplicado a qualquer conjunto de modelos baseados na máxima verosimilhança.

2.3.3 Validação de modelos

A validação de um modelo permite assegurar que o modelo escolhido é aquele que não só melhor descreve o conjunto de dados em causa como ainda permite melhor prever novas situações.[46] De um modo geral, a validação envolve três etapas: desenvolver modelos alternativos para o conjunto de dados em causa, escolher o método de validação e respetivos

indicadores de desempenho e comparar os parâmetros de desempenho dos modelos em validação para conseguir selecionar o modelo mais adequado.

Atendendo a que o melhor modelo é aquele que não só permite descrever o conjunto de dados em causa como ainda permite estimar novas situações, desenvolveu-se um modo especial de escolha de modelos assente na previsão ao qual se chama de validação cruzada (*cross-validation*).[47, 48] O objetivo da validação cruzada é testar a capacidade do modelo de prever novos resultados que não foram utilizados na estimativa paramétrica - deste modo consegue-se avaliar alguns problemas, tais como a sobreparametrização ou a tendência para desvios sistemáticos (*bias*), de modo a poder prever o seu comportamento quando este for submetido a um conjunto de dados independente.[48]

Existem dois tipos de validação cruzada: validação cruzada exaustiva e não exaustiva. Os métodos exaustivos testam todas as maneiras possíveis de dividir a amostra original num conjunto de treino ("*training set*") e teste ("*test set*"). Os métodos não exaustivos não calculam todas as formas de dividir a amostra original, mas optam por efetuar amostragens programadas ou pseudo-aleatórias ao conjunto de dados, de forma a conseguir obter uma representatividade suficiente.[48] A estratégia *JackKnife* é talvez o exemplo mais simples de um método baseado em métodos exaustivos, embora peque por ser demasiado conservativo, já que o conjunto de calibração é muito maior do que o conjunto de previsão (apenas um ponto).

2.3.3.1 Estratégia *JackKnife*

JackKnife é uma estratégia de reamostragem útil para verificar a capacidade de previsão de um modelo. O seu algoritmo recorre à exclusão sucessiva e sistemática de cada observação de um conjunto de dados e estimativa do respetivo valor excluído, avaliando a capacidade de previsão com base no conjunto de desvios estimados.[49]

Este processo de validação cruzada pode ser utilizado para prever o desvio sistemático ou a incerteza da estimativa de uma valor (por exemplo, da média), bem como para prever a incerteza na previsão de um modelo.

Uma estimativa da variância do estimador pode ser calculada a partir da variância dessa distribuição de \bar{x} ($\sigma_{\bar{x}}^2$), sendo que,

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \bar{x}_i \quad (2.49)$$

$$\sigma_{\bar{x}}^2 = \frac{N-1}{N} \sum_{i=1}^N (\bar{x}_i - \bar{x})^2 = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \quad (2.50)$$

Relativamente a estimativas de desvios de uma amostra, a estratégia *JackKnife* calcula o fator *bias* ($\hat{\theta}_{jack}$) através da equação 2.51, onde $\hat{\theta}$ é o estimador calculado do parâmetro de interesse com base em todas as N observações e $\hat{\theta}_i$ é a estimativa de interesse com base na amostra com a i -ésima observação removida.[50]

$$\hat{\theta}_{jack} = \hat{\theta} - \left[(N-1) \cdot \left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\hat{\theta}_{(i)} - \hat{\theta}) \right) \right] \quad (2.51)$$

Um parâmetro muito importante de qualidade do preditor é o erro médio de previsão (*MSPE*), calculado através da equação 2.52, enquanto uma estimativa importante da qualidade do ajuste é o erro médio de ajuste (*MSFE*), calculado pela equação 2.53, onde \hat{y}_i e $\hat{y}_{i(\cdot)}$ representam o valor estimado e o valor previsto no ponto i e y_i representa a variável dependente da regressão.

$$MSPE = \left(\frac{1}{N} \right) \sum_{i=1}^N (\hat{y}_{i(\cdot)} - y_i)^2 \quad (2.52)$$

$$MSFE = \left(\frac{1}{N} \right) \sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - y_i)^2 \quad (2.53)$$

O erro de previsão foi obtido segundo a estratégia *JackKnife*, enquanto que o segundo caso foi obtido após o ajuste do modelo ao conjunto integral de dados.[49, 50]

2.4 Validação de métodos analíticos

De um modo geral, um método analítico é um conjunto de processos que visa identificar e quantificar um determinado analito numa certa matriz a um certo nível de concentração. Um método analítico não só é complexo como muitas vezes moroso, envolvendo diferentes fases suscetíveis de causar erros sistemáticos e/ou aleatórios, pondo em risco o rigor do resultado final.

Devido à enorme diversidade e disparidade de situações analíticas que nem sempre estão previstas ou descritas na literatura científica certificada, os laboratórios têm muitas vezes de desenvolver ou adaptar métodos que achem convenientes para esse fim, sendo um risco analítico.

É, portanto, fundamental que os laboratórios detenham meios e critérios universais para demonstrar, através da validação, que os métodos internos que executam são adequados e conduzem a resultados credíveis e fiáveis quando comparados com métodos amplamente estudados, tomados como referência.[26] Deste modo, a validação de um método é um elemento-chave no estabelecimento de métodos de referência e na avaliação da competência de um laboratório na produção de registos analíticos de confiança. A figura 2.16 representa um plano geral para a validação de um método analítico.

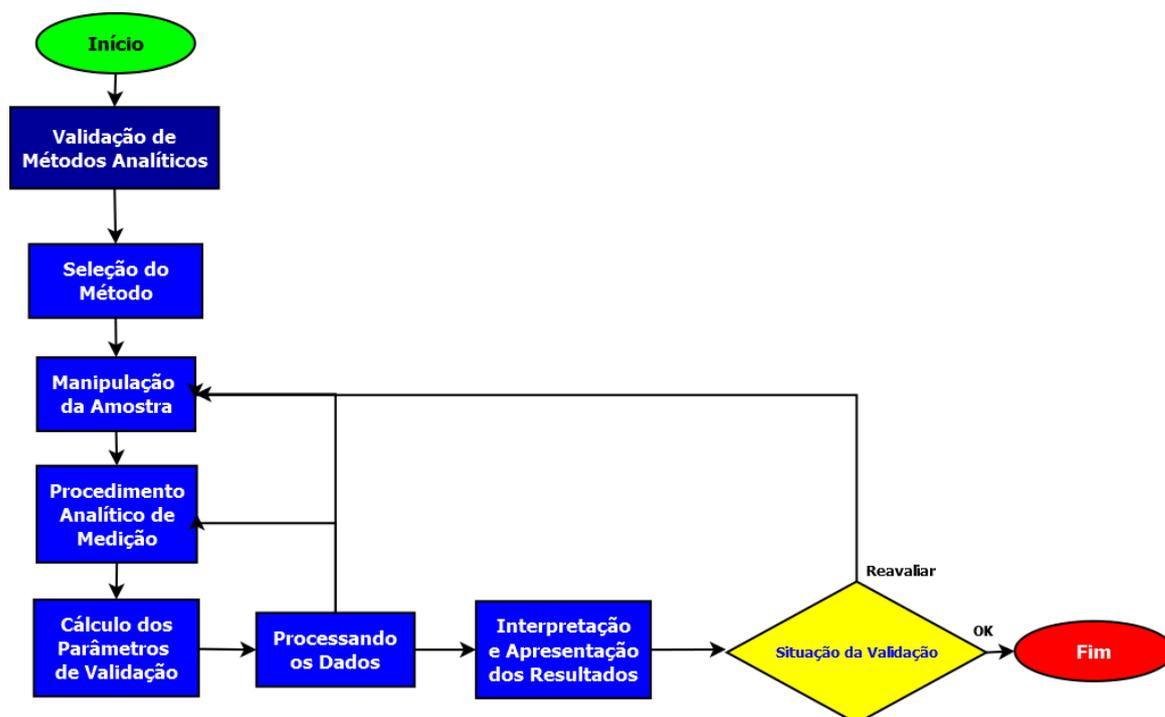


Figura 2.16: Planejamento geral das diversas fases envolvidas na validação de um método analítico (adaptado de [51]).

Existe uma diferença categórica entre validação e transferência de um método analítico - no primeiro caso, a validação é definida como a “comprovação, através de evidências objetivas, de que o método cumpriu os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido” de acordo com a norma ISO/IEC17025; já a transferência analítica é uma atividade específica que permite a implementação de um método analítico existente noutra laboratório, podendo ser de dois tipos: transferência interna (a mesma organização com o mesmo sistema operacional, independente da localização) ou transferência externa (diferentes organizações ou a mesma organização, mas com diferentes sistemas operacionais).[13, 51] A forma mais comum de realizar uma transferência analítica é por transposição de métodos de compêndios nacionais, europeus ou internacionais, como as Farmacopeias, uma vez que são métodos fidedignos e totalmente reprodutíveis, sendo apenas necessário avaliar os parâmetros que cada método exige *per se*, dependendo estes de analito para analito e de laboratório para laboratório.

Em suma, através da validação de um método analítico, demonstra-se que este é adequado

para a identificação e quantificação de um determinado analito numa determinada matriz a um certo nível de concentração.

Conforme estipulado por diversas organizações relacionadas com a validação de métodos analíticos, como a Conferência Internacional de Harmonização (ICH), os parâmetros de desempenho mais relevantes na validação de um método são: identificação, especificidade e seletividade, linearidade, limiares analíticos, gama analítica, sensibilidade, precisão, exatidão, robustez e coerência.[52]

2.4.1 Identificação

A identificação trata de demonstrar inequivocamente que o analito está presente na amostra. Regra geral, exige a utilização de um conjunto de metodologias analíticas instrumentais que permitem caracterizar o analito e distingui-lo de outros eventuais compostos análogos. Sendo um processo demasiado complexo para as operações analíticas de rotina, há a necessidade de abreviar esta demonstração. Em condições analíticas muito bem controladas (ex: matrizes de amostra bem conhecidas) é possível simplificar a identificação por comparação de propriedades relacionadas com o analito com as de um material de referência ou padrão de forma a verificar a presença ou ausência do analito na matriz.

As normas fornecidas pelas Farmacopeias referem que, no caso de análises cromatográficas, em condições bem controladas, o tempo de retenção, R_T , e o perfil de eluição desse componente pode servir para identificar a presença do analito se este corresponder ao do material de referência (CRM ou SRM); já para o caso de análises espectrais, tem de haver uma excelente correspondência espectral, em especial entre os máximos e mínimos de absorvância evidenciados para o analito com os do material de referência.

2.4.2 Especificidade e seletividade

O conceito de especificidade é usado para avaliar a capacidade do método analítico em ser capaz de responder a uma determinada entidade química (espécie) sem apresentar interferência de outras espécies. Por sua vez, a seletividade está relacionada com a capacidade do método responder ao analito de interesse quando estão presentes na amostra outras espécies interferentes que vão condicionar e afetar o sinal original.

Ainda de acordo com as Farmacopeias, para validar a seletividade, é necessário um teste de análise cromatográfica, verificando a capacidade de resolver os sinais mais próximos do

analito de interesse, bem como comparar os respectivos perfis de eluição com os do padrão ou material de referência.

2.4.3 Linearidade

A linearidade de um método analítico é a sua capacidade de obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras para um determinado intervalo de concentrações previamente estipulado.

Na equação 2.54 pode-se verificar uma expressão genérica de uma função polinomial linear (P_{01}), enquanto na equação 2.55 se encontra representada uma expressão geral de uma função polinomial quadrática (P_{012}), sendo que b_0 representa a ordenada na origem, b_1 o declive e b_2 o coeficiente do termo quadrático da função. Este último parâmetro é, geralmente, o responsável pela perda de linearidade da resposta instrumental ao analito numa função quadrática.

$$P_{01} : \hat{y} = b_0 + b_1 \cdot x_i \quad (2.54)$$

$$P_{012} : \hat{y} = b_0 + b_1 \cdot x_i + b_2 \cdot x_i^2 \quad (2.55)$$

Um forma simples de avaliar a linearidade da resposta antes de esta ser ajustada com qualquer tipo de modelo polinomial consiste em calcular a sensibilidade pontual relativa ($\%Sens_i$) de cada resposta (y_i) no respetivo nível de concentração (x_i),

$$\%Sens_i = 100 \times \left(\frac{y_i}{x_i} \right) \left(\frac{\bar{x}}{\bar{y}} \right) \quad (2.56)$$

sendo \bar{x} e \bar{y} os valores médios das concentrações e respetivos sinais obtidos com os padrões da curva de calibração. Normalmente, considera-se que valores de sensibilidade pontual relativa situados entre 90 e 110 % são prenúncio de uma boa linearidade.

O teste de linearidade corresponde a uma fase crítica da calibração e, por definição é imposto o nível de confiança de 99%. De acordo com as normas ISO8466-1 e ISO8466-2, a

linearidade da resposta é avaliada através de um teste de escolha do melhor modelo avaliada pelo teste de Mandel. Neste teste o valor calculado, equação 2.57, avalia a diferença de variâncias do ajuste polinomial de primeiro e segundo grau ($\Delta\sigma_{fit}^2$) com uma estimativa de variabilidade puramente aleatória, estimada pelo desvio padrão residual obtido no modelo polinomial quadrático.

$$TV = \frac{\Delta\sigma_{fit}^2}{\sigma_{pe}^2} = \frac{(SS(P_{01}) - SS(P_{012}))}{\sigma_{fit}^2(P_{012})} \quad (2.57)$$

sendo que,

$$\sigma_{fit} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{(N - p)}} \quad (2.58)$$

e assumindo como valor crítico de comparação para com o valor de TV valores de Fisher-Snedcor ao nível de significância, $\alpha = 0.01$. Assim, caso $TV > F_{0.01(1, N-3)}^u$, a calibração não é linear e deve-se usar o modelo P_{012} para calibração. Caso contrário, isto é, se $TV \leq F_{0.01(1, N-3)}^u$, usa-se o modelo de calibração com maior valor de graus de liberdade que corresponde ao modelo linear P_{01} . Habitualmente, quando a escolha recai sobre um modelo quadrático P_{012} , é comum reduzir a gama analítica (eliminando alguns valores da curva de calibração), sem comprometer demasiado o número de graus de liberdade, de forma a recuperar a linearidade da resposta e com a vantagem de possuir um modelo de calibração mais simples para ser usado na quantificação.

Após a obtenção de uma curva de calibração linear (com P_{01}) é também necessário avaliar o significado estatístico dos parâmetros.[53] Para tal, compara-se o módulo de cada parâmetro (b_0 e b_1) com a respetiva incerteza padrão (σ_{b_0} e σ_{b_1}) através da equação 2.59, usando-se os valores da distribuição t -Student como valores críticos, ao nível de confiança de 95 % ($t_{0.05(N-2)}^b$).

$$TV = \frac{|b_i|}{\sigma_{b_i}^2} \quad (2.59)$$

onde,

$$\sigma_{b_0}^2 = \left(\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{\left(N \cdot \sum_{i=1}^N x_i^2 - (\sum_{i=1}^N x_i)^2 \right)} \right) \times \sigma_{fit}^2 \quad (2.60)$$

$$\sigma_{b_1}^2 = \left(\frac{N}{\left(N \cdot \sum_{i=1}^N x_i^2 - (\sum_{i=1}^N x_i)^2 \right)} \right) \times \sigma_{fit}^2 \quad (2.61)$$

Este teste é importante para verificar se existe uma resposta analítica instrumental que depende da concentração do analito ($b_1 \neq 0$) e se a ordenada na origem pode ou não eventualmente vir a ser usada para estimar limiares analíticos ($b_0 \neq 0$).

Para avaliar a qualidade de ajuste do modelo aos valores experimentais usam-se diferentes aproximações - o coeficiente de determinação (R^2) e a resposta relativa pontual ($\%RR_i$). O coeficiente de determinação permite obter uma estimativa genérica acerca da quantidade de informação descrita pelo modelo de calibração - regra geral aceita-se valores $R^2 \geq 0.999$ que são prenúncio de que o modelo consegue descrever pelo menos 99.9 % do sinal obtido. A resposta relativa, equação 2.62, permite avaliar pontualmente a capacidade do modelo ajustar os valores experimentais através do quociente do valor previsto pela reta de calibração (\hat{y}_i) com o sinal experimental obtido (y_i) em cada nível de concentração testada.

$$\%RR_i = 100 \times \left(\frac{\hat{y}_i}{y_i} \right) \quad (2.62)$$

Normalmente aceita-se que esta resposta relativa assuma valores próximos de 100 %, convencionando-se os limites ± 5 % para a aceitação de conformidade destas estimativas.

Indo agora um pouco mais além, pode-se estimar a capacidade de quantificação do modelo através do cálculo da taxa de recuperação ($\%RecX$),

$$\%RecX = 100 \times \left(\frac{\hat{x}_i}{x_i} \right) \quad (2.63)$$

onde \hat{x}_i corresponde à concentração estimada referente ao padrão de concentração x_i . Não existe um critério rígido e uniforme para a taxa de recuperação, mas são, de uma forma

consensual, aceites valores próximos de 100 %, usualmente com limites de variação até 5 % relativamente a este valor central.

2.4.4 Limiares analíticos

Em Química Analítica é fundamental determinar quais os limites analíticos de um método, ou seja, qual a concentração mais baixa que esse método consegue detetar num determinado equipamento e a partir da qual é seguro quantificar uma amostra.[54] Para isso, calculam-se os limites de deteção e de quantificação.

2.4.4.1 Limite de deteção

À menor quantidade de analito a analisar capaz de ser detetada numa amostra denomina-se por limite de deteção (X_{LD}). Também pode ser definido como a concentração mínima possível de distinguir no branco, ou seja, contém a mesma matriz, mas não contém o analito de interesse.[54]

O cálculo deste parâmetro pode ser efetuada de três formas distintas: através de réplicas de branco (equação 2.64), através da ordenada na origem (b_0) da reta de calibração (equação 2.65) ou com base no desvio padrão do ajuste (equação 2.66), sendo Y_{LD} o sinal a ser estimado, \bar{y}_0 o valor médio do sinal do branco, σ_{y_0} o desvio padrão respetivo à média \bar{y}_0 , M_0 o número de réplicas de branco, b_0 o valor de interceção da reta de calibração, σ_{b_0} a respetiva incerteza de b_0 , ndf o número de graus de liberdade (N variáveis menos p parâmetros), σ_{fit} o desvio padrão do ajuste da reta de calibração e $t_{0.05}^u$ o valor crítico associado ao teste t -Student com $\alpha = 0.05$.

$$Y_{LD} = \bar{y}_0 + 2 \times t_{0.05(M_0-1)}^u \times \frac{\sigma_{\bar{y}_0}}{\sqrt{M_0}} \quad (2.64)$$

$$Y_{LD} = b_0 + 2 \times t_{0.05(N-p)}^u \times \sigma_{b_0} \quad (2.65)$$

$$Y_{LD} = 2 \times t_{0.05(N-p)}^u \times \sigma_{fit} \quad (2.66)$$

As normas ISO e IUPAC privilegiam o método de réplicas de branco para determinação do X_{LD} e só caso não seja possível se deve usar a forma de cálculo com base nos parâmetros da reta ou com base no desvio padrão do ajuste, respectiva e sequencialmente por ordem de preferência.[53]

Sendo que X_{LD} é expresso sob a forma de um limiar de concentração, estas expressões relativas a sinal (Y_{LD}) têm de ser convertidas em concentrações pela função da equação 2.67.

$$X_{LD} = F(Y_{LD}) \quad (2.67)$$

2.4.4.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação (X_{LQ}) é definido como a mais baixa concentração da curva calibração que pode ser quantificada com segurança e valores de precisão e exatidão aceitáveis.[54]

A forma de cálculo de X_{LQ} pode também ser efetuada de três vias distintas, à semelhança do cálculo do limite de deteção, podendo-se usar as equações 2.68 a 2.70, sendo que 2.68 corresponde à metodologia através de réplicas de branco ($M_0 \geq 5$), 2.69 ao método com base nos parâmetros da reta e 2.70 baseia-se no desvio padrão do ajuste (σ_{fit}).

$$Y_{LD} = \bar{y}_0 + 6 \times t_{0.05(M_0-1)}^u \times \frac{\sigma_{\bar{y}_0}}{\sqrt{M_0}} \quad (2.68)$$

$$Y_{LD} = b_0 + 6 \times t_{0.05(N-p)}^u \times \sigma_{b_0} \quad (2.69)$$

$$Y_{LD} = 6 \times t_{0.05(N-p)}^u \times \sigma_{fit} \quad (2.70)$$

Para transformar o sinal Y_{LD} calculado no limite de quantificação, X_{LD} , usa-se a função de quantificação descrita na equação 2.67.

2.4.5 Gama analítica

De acordo com as normas ICH, gama analítica é o intervalo que vai desde a concentração mais baixa à concentração mais elevada do analito de interesse, possíveis de detetar pelo método.[55] Ou seja, em termos práticos, gama analítica abrange a ordem analítica $X_{LD} \leq X_{LQ} \leq X_1 \leq \dots \leq X_N$, sendo X_1 o padrão de concentração mais baixa e X_N o padrão de concentração mais elevada a quantificar.[53]

Para um método analítico, a parte linear da curva de calibração deve abranger a concentração na qual a amostra é normalmente analisada, sendo que, idealmente, a amostra se deve encontrar no centróide da curva. Quando tal não é possível, é comum diluir a amostra previamente, entrando com esse fator depois na quantificação do analito.

Como na Indústria Farmacêutica, habitualmente, a gama analítica é muito abrangente, é recomendável realizar o teste de homogeneidade de variâncias previamente, através do teste F baseado na distribuição de Fisher-Snedcor (equação 2.18), onde se comparam as variâncias nos extremos do intervalo de calibração. Nesta situação, a hipótese nula (H_0) vai no sentido de assumir que a variabilidade é similar (existe homogeneidade de variâncias, caso homocedástico), enquanto que a hipótese alternativa (H_1) assume a diferença desses valores (caso heterocedástico).

2.4.6 Sensibilidade

A sensibilidade de um método traduz a variação da resposta do método (Δy) à variação do teor do analito (Δx) e pode ser determinada pela equação 2.71. Para casos em que a função de calibração é um polinómio de primeiro grau, a sensibilidade corresponde ao declive da reta de calibração(m).

$$m = \frac{\Delta y}{\Delta x} \quad (2.71)$$

Este parâmetro pode ser também definido como o menor incremento de concentração (x) necessário para que ocorra uma variação significativa no valor do sinal lido pelo equipamento (y), pelo que quanto maior for o valor de m , mais sensível é o método.

Como foi anteriormente visto, a sensibilidade pode ser avaliada pontualmente, ver equação 2.56, ou através de um modelo de calibração - no caso deste ser um polinómio de primeiro

grau (P_{01}) esta pode ser indicada através do declive da reta (b_1) com a vantagem adicional de possuir uma estimativa de incerteza associada (σ_{b_1}), segundo a equação 2.61.

2.4.7 Precisão

A precisão é uma das medidas mais importantes em química analítica, dado que representa a estimativa do grau de certeza de um determinado analista nos seus resultados. Assim, a precisão é definida como uma medida da proximidade relativa de um valor experimental em relação a outro valor já obtido, avaliando a concordância entre valores obtidos independentemente e em condições experimentais similares.

Este conceito pode parecer um pouco ambíguo porque trata da concordância experimental de valores quando de fato é avaliado através de estimadores de dispersão. Medidas como o desvio padrão (σ_x), a variância (σ^2) ou o coeficiente de variação ($\%CV$) são diferentes formas de estimar e indicar a incerteza dos resultados experimentais mas elas estão interligadas entre si e permitem avaliar diferentes graus de variabilidade com a repetibilidade e a reprodutibilidade.[53]

A repetibilidade diz respeito à precisão obtida entre ensaios realizados em condições idênticas no menor período temporal possível, enquanto que a reprodutibilidade avalia a dispersão dos valores obtidos através de ensaios interlaboratoriais, relativamente a uma mesma amostra. Ambos os conceitos podem ser expressos pelo coeficiente de variação (equação 2.72), onde se calcula o quociente entre o desvio padrão e a média de um conjunto de dados.

$$\%CV = 100 \times \left(\frac{\sigma_x}{\bar{x}} \right) \quad (2.72)$$

2.4.8 Exatidão

Exatidão é uma medida da proximidade do resultado obtido em relação ao valor correto ou de referência. Este parâmetro avalia a presença de eventuais erros sistemáticos. Uma vez mais, este conceito é também um pouco ambíguo já que a exatidão está relacionada com a ausência de desvios em relação ao valor de referência mas é estimada com base na avaliação desse desvio.

A exatidão pode ser avaliada através do desvio absoluto (ΔX) ou do erro relativo ($\%RE$),

$$\Delta X = X_{exp} - X_{ref} \quad (2.73)$$

$$\%RE = 100 \times \left(\frac{\Delta X}{X_{exp}} \right) = 100 \times \frac{(X_{exp} - X_{ref})}{X_{exp}} \quad (2.74)$$

onde X_{exp} representa o valor experimental obtido e X_{ref} o respetivo valor de referência.

Conhecendo-se a exatidão e a precisão do método consegue-se avaliar se existe erro sistemático quando a inexactidão (ΔX) não excede a respetiva incerteza além de um determinado fator multiplicativo. Na figura 2.17 apresenta-se algumas situações extremas possíveis que relacionam precisão, exatidão e erro sistemático (“*bias*”).

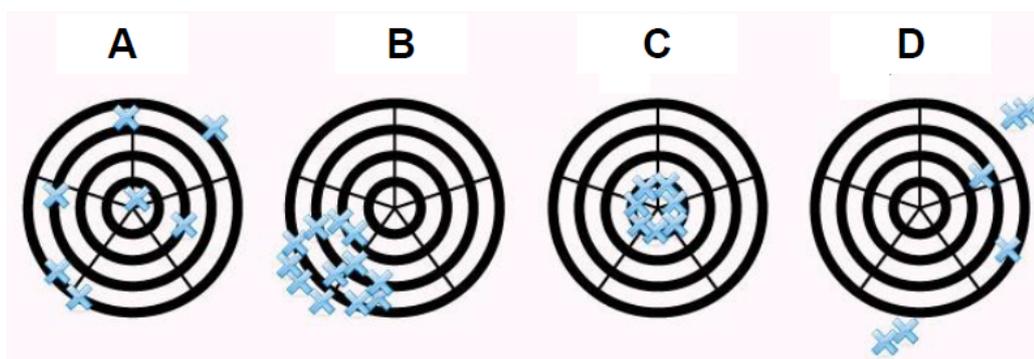


Figura 2.17: Representação esquemática de algumas situações limite que envolvem os conceitos de precisão, exatidão e erro sistemático (“*bias*”): em (A) existe má precisão, boa exatidão e ausência de erro sistemático (“*no bias*”); em (B) há boa precisão, má exatidão e evidência de erro sistemático (“*bias*”); em (C) coexiste boa precisão e exatidão levando a ausência de erro sistemático (“*no bias*”); em (D) existe má precisão e, provavelmente, má exatidão confluindo num eventual erro sistemático.

2.4.9 Robustez

A robustez de um método analítico avalia a sua capacidade de conduzir ao mesmo resultado quando o método é deliberadamente alterado por pequenas variações nas suas condições experimentais. Esta capacidade de resistir a alterações experimentais avalia a estabilidade do método em condições instrumentais laboratoriais extremas e não aleatórias.[53, 56] De um

modo geral, quanto mais robusto o método se revelar, mais insensível a alterações externas é e mais seguro e confiável se torna.

Concretamente, na Indústria Farmacêutica, usando a técnica HPLC, a forma mais comum de se estudar a robustez de um método consiste em comparar a resposta analítica em situações de alteração deliberada das condições analíticas tais como composição da fase móvel, velocidade de fluxo do eluente, temperatura da coluna de separação, comprimento de onda do detetor, etc.

2.4.10 Coerência

A coerência é um parâmetro que permite avaliar a capacidade do método analítico conduzir ao mesmo valor estimado sem se ter imposto qualquer alteração deliberada. Permite avaliar a fiabilidade do método quando é usado de modo rotineiro ou em períodos distintos no tempo. É comum realizar comparações entre analistas ou em períodos temporais distintos como forma de avaliação deste parâmetro.

2.5 *Software Empower™ 3*

O *software* Empower™ 3, desenvolvido pela empresa Waters®, foi concebido para integrar o funcionamento de equipamentos, para a operação automatizada e para permitir otimizar a rapidez de cálculo, aumentando a eficiência e segurança nos resultados comparativamente a folhas de cálculo. Deste modo, não há necessidade de efetuar as operações de exportação e análise de dados para um *software* de cálculo, já que tudo se resolve internamente, dentro do mesmo programa, minimizando perdas de tempo e eventuais perdas de informação. Estas e outras funções deste *software* encontram-se representadas na figura 2.18, enquanto na subsecção B.1 se encontram informações detalhadas sobre a interface deste programa.

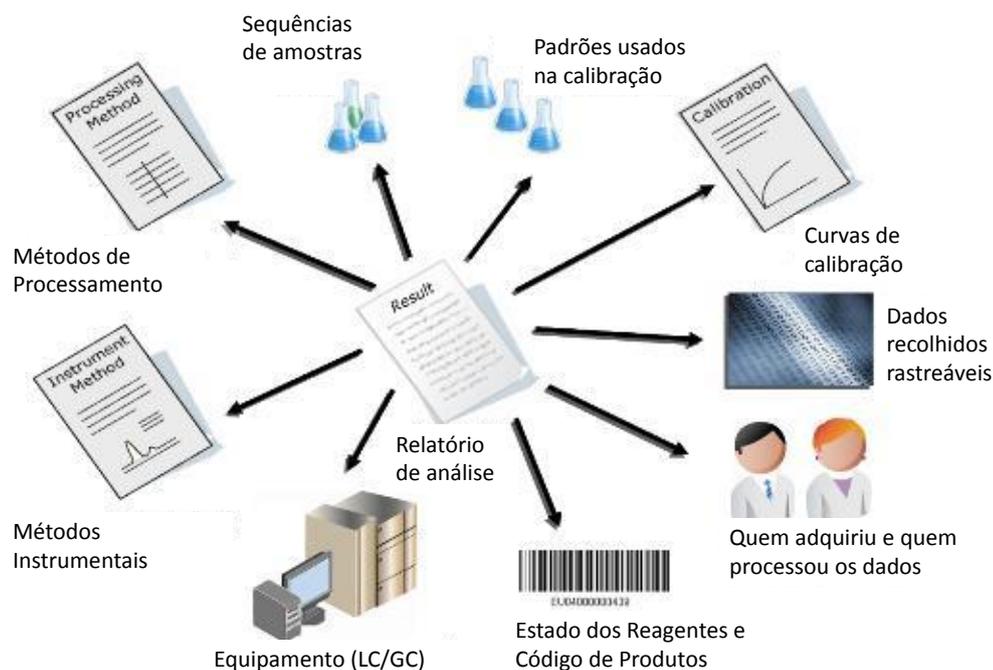


Figura 2.18: Principais funções disponíveis no *software* Empower™ 3 da Waters® Corporation, evidenciando a sua centralidade no controlo da informação analítica desde o controlo de equipamentos, registos de métodos e dados, registos operacionais, registo e rastreabilidade ao nível de operadores, controlo de bases de dados e emissão e arquivo de relatórios.

O Empower™ 3 é ideal para a Indústria Farmacêutica, uma vez que funciona como uma base de dados abrangente que inclui todos os métodos, informações, resultados e relatórios de análise dos produtos, sejam matérias primas (MP) ou produto acabado (PA), por longos períodos de tempo, minimizando ainda o gasto de papel e a dificuldade de pesquisa automática.

2.5.1 Cálculos

O *software* apresenta dois tipos de cálculo: predefinido e automático (baseado em campos personalizados, CF). No cálculo predefinido encontram-se várias funcionalidades já disponibilizadas pelo sistema como, por exemplo, a quantidade de composto por mililitro de solução (“*Amount*”, ver equação B.1) ou parâmetros de adequabilidade do sistema (fator de simetria, número de pratos teóricos, resolução, entre outros). Por sua vez, o cálculo baseado em CF pode servir para diversos tipos de campos, sendo que cada um deles permite um determinado conjunto de dados. Em anexos, na secção B.2, encontram-se mais informações sobre tipos de

campos, tipos de dados e cálculos através de CF. Todos os CF são criados por um supervisor responsável por desenvolver o programa e devem ser sempre validados, de modo a cumprir com as GLP.

2.5.1.1 Matéria prima

Os cálculos de doseamento na análise de matéria prima (MP) são sempre realizados de duas formas: para a molécula tal como existe (doseamento *as is*) e para a molécula anidra (doseamento em base anidra/seca), sendo que para esta segunda situação é necessário que se determine previamente a quantidade de água presente na amostra.

O doseamento *as is* ($DOS_{as\ is}$) é definido pela equação 2.75, enquanto que o doseamento em base anidra ($DOS_{base\ anidra}$) é obtido pela equação 2.76, onde $\%H$ representa a humidade percentual da amostra previamente determinada.

$$DOS_{as\ is} = 100 \times Amount \quad (2.75)$$

$$DOS_{base\ anidra} = DOS_{as\ is} \times \left(\frac{100}{100 - \%H} \right) \quad (2.76)$$

2.5.1.2 Produto acabado

No produto acabado (PA) existem algumas variáveis específicas para cada produto a ter em atenção nos cálculos para ensaios de doseamento, nomeadamente o peso médio do lote (P_M), a dosagem teórica do componente (D_T) ou a densidade da amostra (ρ), quando aplicável.

Genericamente, a equação 2.77 representa a fórmula de cálculo para o doseamento em miligramas por unidade (DOS_{mg}), enquanto que a equação 2.78 corresponde ao doseamento percentual ($\%DOS$) de um componente para análises de produto acabado.

$$DOS_{mg} = Amount \times P_M \times \rho \quad (2.77)$$

$$\%DOS = 100 \times \left(\frac{DOS_{mg}}{D_T} \right) \quad (2.78)$$

Para ensaios de uniformidade de conteúdo (UC), gastro-resistência (GR) e dissolução (DISS), o doseamento do analito é determinado através das mesmas equações usadas para DOS, sendo que nestes casos a única diferença é o facto de não existir peso médio ou densidade a considerar. Ensaios de impurezas e substâncias relacionadas (IMP) estão ainda em fase de estudo e desenvolvimento.

2.5.2 Validação de folhas de cálculo

Todas as análises realizadas na FARMALABOR têm vindo a ser calculadas através de folhas de cálculo. No entanto, com a implementação de todo o sistema Empower™ 3 em meados de 2017, começaram a surgir as primeiras ideias de cálculo automático através deste novo *software*. Devido ao pouco tempo disponível pelos utilizadores do tipo supervisor, o desenvolvimento e otimização destes cálculos automáticos nunca foi realmente iniciado, uma vez que esta é uma tarefa que requer foco, capacidade analítica e, sobretudo, tempo. Assim, quando se iniciou este projeto industrial, foi proposto que a validação do *software* começasse a ser o principal foco da FARMALABOR no que ao projeto Empower™ 3 diz respeito, através do desenvolvimento de métodos e da criação e validação de campos personalizados para a realização de todos os cálculos que até então eram efetuados através de folhas do Excel.

Para se considerar um produto como validado, os resultados obtidos entre programas não podem ter qualquer diferença significativa, sendo que o processo tem de ser replicado por três lotes distintos do mesmo produto. Internamente convencionou-se que para cada caso em concreto tem de ser efetuada a sua verificação em triplicado - após a avaliação de três conjuntos de resultados, se estes forem concordantes passa-se ao estado validado para o ensaio em causa. Após esta tomada de decisão, deixa-se de usar a folha de cálculo externo para reportar os resultados de lotes futuros, usando exclusivamente o Empower™ 3 como ferramenta de registo e obtenção de resultados da análise efetuada.

Este processo de validação é longo e demorado, não só pela grande quantidade de fármacos que se analisam nos laboratórios de controlo da qualidade desta unidade industrial, mas também pela exigência e rigor que o processo acarreta. Uma das maiores vantagens da

validação deste *software* prende-se com a integridade dos dados e com a minimização de erros por parte dos analistas, uma vez que não só tudo fica rastreável no programa (em rede), como também se evitam falhas e eventuais perdas de informação na transição da informação entre os equipamentos laboratoriais e as folhas de cálculo externo.

Capítulo 3

Parte experimental

Nesta secção estão descritos todos os materiais, reagentes, soluções e equipamentos usados durante toda a parte experimental, bem como os procedimentos adotados para cada uma das experiências realizadas.

3.1 Materiais

Os materiais usados nos procedimentos experimentais foram:

- Material vidrado volumétrico de classe A na preparação de soluções;
- Materiais específicos para HPLC: micro-seringas de volume 15 mL, sistema de vácuo e bomba de vácuo Millipore[®], filtros Nylaflo[®] de dimensão máxima do poro de 0.45 μm e *vials* 12 \times 32 mm com septo de silicone VWR[®];
- Equipamentos auxiliares: agitador vortex (Genic[™] 2), banho de ultrassons (BioBlock[®]), exsicador, estufa de vácuo, forno de cinzas, sistema potenciométrico para medir *pH* (Metrohm[®]) e micropipeta Pipetman P20 (Gilson[®]).

Todas as pesagens foram efetuadas numa balança analítica (Mettler-Toledo[®] XSR204).

3.2 Reagentes

Os reagentes utilizados na preparação de soluções encontram-se descritos na tabela 3.1, enquanto os reagentes usados como padrões encontram-se discriminados na tabela 3.2.

Tabela 3.1: Reagentes usados nos procedimentos experimentais.

Reagente	Fórmula Química	#CAS	Fornecedor	MW (g mol ⁻¹)	Grau de Pureza (%)	Densidade* (g cm ⁻³)
Acetato de amónia	CH_3COONH_4	631-61-8	Merck	77.08	≥ 98.0	NA
Acetonitrilo	C_2H_3N	75-05-8	Honeywell	41.05	≥ 99.9	0.786
Ácido acético glacial	CH_3COOH	64-19-7	Chem-Lab	60.05	100	1.05
Ácido perclórico 1 mM	$HClO_4$	7601-90-3	Merck	52.46	100	1.67
Ácido sulfúrico	H_2SO_4	7664-93-9	Honeywell	98.08	95.0 – 97.0	1.84
Brometo de potássio	KBr	7758-023	Merck	119.00	≥ 99.0	NA
Dicromato de potássio	$K_2Cr_2O_7$	7778-50-9	Merck	294.19	≥ 99.9	NA
Etanol	C_2H_6O	603-002-00-5	Honeywell	46.07	≥ 99.9	0.812
Metanol	CH_4O	67-56-1	Honeywell	32.04	≥ 99.9	0.792

*NA - Não Aplicável

Tabela 3.2: Padrões usados nos procedimentos experimentais.

Padrão	Fórmula Química	#CAS	Fornecedor	MW (g mol ⁻¹)	Grau de Pureza (%)
Ácido oxálico dihidratado	$C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$	6153-56-6	Merck	126.07	≥ 99.9
Rebaudiosídeo A	$C_{44}H_{70}O_{23}$	58543-16-1	Sigma Aldrich	967.01	98.0
Steviosídeo	$C_{38}H_{60}O_{18}$	57817-89-7	TCI	804.88	91.0

Foi usado um padrão de poliestireno 1.5mil da Thermo[®] Corporation para verificação do estado da calibração do equipamento de IR.

A água utilizada neste projeto classifica-se como água de qualidade para cromatografia segundo a Farmacopeia Europeia para uso no fabrico de medicamentos não obrigatoriamente estéreis (conforme requisitos das GMP), sendo que é purificada por osmose inversa a partir da água de consumo humano por um sistema (Enkrott[®]) existente na unidade industrial.[57] A água apresenta uma condutividade de 1.58 $\mu S\ cm^{-1}$ (a 20 °C) e TOC¹ < 10 ppm.

3.3 Soluções

De seguida encontram-se descritos os procedimentos de preparação de todas as soluções usadas nos procedimentos experimentais. Todas as soluções foram filtradas e desgaseificadas antes de serem utilizadas, assim como preparadas e conservadas à temperatura ambiente do laboratório (23.0 ± [1.5] °C).

¹TOC representa o valor total de compostos oxidáveis (“Total Organic Carbon”), determinado por via instrumental (titulação redox).

3.3.1 Solução tampão acetato de amônio 2 mM ($pH = 4.3$)

Pesar 0.125 g de acetato de amônio e dissolver em 900 mL de água. Medir o pH e ajustar até ao valor de 4.3 com ácido acético glacial ($\simeq 30 \mu\text{L}$). Transferir para um balão de diluição de 1000 mL e completar com água até ao menisco.

3.3.2 Solução de diluição

Medir rigorosamente 250 mL de tampão acetato de amônio 2 mM ($pH = 4.3$) e adicionar a 750 mL de acetonitrilo num balão de diluição de 1000 mL.

3.3.3 Soluções padrão de Rebaudiosídeo A

Dissolveram-se 100.0 mg de Rebaudiosídeo A em solução de diluição num balão de diluição de 20 mL e prepararam-se quatro padrões distintos por diluição desta solução “mãe” de concentrações 250.0, 1000, 2500, 4000 e 5000 mg L⁻¹. Estas soluções (P1 a P5) foram usadas no ensaio de doseamento de *Stevia*.

3.3.4 Soluções padrão de Steviosídeo

Preparou-se uma solução *stock* de Steviosídeo dissolvendo-se 25.0 mg de padrão em 100 mL de solução de diluição num balão de diluição dessa capacidade. As quatro concentrações finais (0.500, 5.00, 25.0, 125 e 250 mg L⁻¹) foram obtidas por diluição. Estas soluções (P1 a P5) foram usadas no ensaio de impurezas por HPLC para a matéria prima *Stevia*.

3.3.5 Soluções amostra de *Stevia*

Preparam-se duas concentrações distintas de solução amostra (2500 e 5000 mg L⁻¹), dissolvendo-se 50.0 e 100.0 mg de amostra, respetivamente, em solução de diluição num balão de diluição de 20 mL. As amostras (A1 e A2, em duplicado) foram usadas tanto nos ensaios de doseamento como nos ensaios de determinação de impurezas por HPLC da matéria prima em estudo.

3.3.6 Fase móvel para equipamento cromatográfico

Medir rigorosamente 130 mL de tampão acetato de amônio 2 mM ($pH = 4.3$), transferir para um balão de diluição de 1000 mL e aferir com acetonitrilo.

3.3.7 Soluções padrão de dicromato de potássio

Preparou-se uma solução *stock* de concentração 1000 mg L^{-1} pesando 250.0 mg de dicromato de potássio e dissolvendo em 250 mL de ácido perclórico 1 mM num balão de diluição de 1000 mL . Os cinco padrões de dicromato de potássio de concentração 20.0 , 40.0 , 60.0 , 80.0 e 100 mg L^{-1} foram preparados por diluições da solução *stock* para balões de diluição de 100 mL .

3.3.8 Solução para verificação de *pH*

Pesar rigorosamente cerca de 1.0000 g de amostra e dissolver em 100 mL de água num balão de diluição dessa capacidade.

3.3.9 Solução para verificação de solubilidade

Pesar 1.0000 g de amostra e dissolver em 10 mL de uma solução etanol : água ($50 : 50$, % *V/V*). Agitar no vortex durante cerca de 30 segundos.

3.4 Equipamento e condições instrumentais

Para a análise por HPLC usou-se um equipamento Waters® Alliance e2695 com detetor UV a 210 nm . Usou-se uma coluna Cosmosil Sugar-D compactada com sílica gel ligada a uma fase de propil-amino silano de dimensões $4.6 \times 150 \text{ mm}$ com $5 \mu\text{m}$ de dimensão de partícula. O equipamento apresenta quatro canais, nomeadamente: A – fase móvel (conforme descrito na sub-secção 3.3.6); B – água; C – acetonitrilo; D – metanol. Foram ainda definidas as seguintes condições instrumentais: temperatura do forno de $30.0 \pm [2.5] \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura do amostrador automático de $15.0 \pm [2.5] \text{ }^\circ\text{C}$, fluxo de 1.50 mL min^{-1} , volume de injeção de $10.0 \mu\text{L}$, pressão de $65.0 \pm [5.0] \text{ bar}$ e tempo de corrida de 75.0 minutos. Os dados foram adquiridos e analisados segundo o *software* Empower™ 3.

Para os estudos de FTIR usou-se um equipamento Nicolet380 da Thermo Fisher® com *software* EZ OMNIC™. Predefiniu-se um número de 32 scans por amostra e uma janela de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. O KBr usado nas pastilhas foi mantido sempre em exsiccador, a temperatura controlada ($23.0 \pm [1.5] \text{ }^\circ\text{C}$).

O equipamento de titulação de Karl Fischer, KFT701 (Metrohm®), foi sempre usado no modo potenciométrico e calibrado diariamente com o padrão de ácido oxálico dihidratado.

Os espectros na região do UV-Vis foram realizados num equipamento Specord200 Plus

(Analytik-Jena[®]), munido com o *software* AspectUV[™]. Foi definido o modo de varrimento entre 400 a 200 nm, com uma velocidade de varrimento de 1 nm s⁻¹, fenda de 0.2 nm e incremento de 1 nm.

3.5 Procedimentos

Em seguida encontram-se os procedimentos adotados em algumas das experiências realizadas ao longo deste trabalho.

3.5.1 Valor de *pH*

O valor de *pH* de uma amostra é um parâmetro físico-químico importante para caracterizar o comportamento ácido ou básico de sólidos quando são dissolvidos em solução aquosa, podendo ser definido quantitativamente pela equação 3.1, onde (H_3O^+) representa a concentração termodinâmica da espécie iônica em solução, isto é, a atividade de H_3O^+ .

$$pH = -\log(H_3O^+) \quad (3.1)$$

Prepararam-se quatro soluções (A1 a A4) para os testes de *pH* conforme descrito em 3.3.8. Segundo esta metodologia analítica, o valor aceitável para este ensaio situa-se entre 4.5 e 7.0.

3.5.2 Solubilidade

A solubilidade de uma determinada amostra é classificada de acordo com a tabela 3.3 e segundo as Farmacopeias Europeia e Americana.

Tabela 3.3: Classificação da solubilidade de uma solução.

Nomenclatura	Volume aproximado de solvente*
Muito solúvel	menos de 1
Facilmente solúvel	de 1 a 10
Solúvel	de 10 a 30
Ligeiramente solúvel	de 30 a 100
Pouco solúvel	de 100 a 1000
Muito pouco solúvel	de 1000 a 10000
Praticamente insolúvel	menos de 10000

*em mililitros, por grama de soluto

Assim, quanto maior o volume de solvente necessário (mL) por cada grama de soluto, mais insolúvel se classifica o composto em estudo.

3.5.3 Cinzas sulfúricas

O ensaio para cinzas sulfúricas permite detetar eventuais impurezas orgânicas que possam existir na amostra. Após obter o valor da massa do cadinho² (m_0), pesa-se a amostra para o cadinho (m_A) e adiciona-se 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (97 %, V/V). Aquece-se o cadinho a uma temperatura baixa até carbonização completa e aguarda-se que o resíduo fique completamente incinerado. Retira-se a placa, arrefece-se em exsiccador e repete-se o processo de pesagem até se registar de novo massa constante (m_1). A percentagem de resíduo, %*Resíduo*, é estimada com base na equação 3.2.

$$\%Resíduo = 100 \times \left(\frac{m_1 - m_0}{m_A} \right) \quad (3.2)$$

Segundo a USP, para que esta matéria prima esteja em conformidade, o resíduo percentual (equação 3.2) não pode exceder o valor máximo de 1.0 %.[58]

3.5.4 Teor de água

A determinação do teor de água por titulação de Karl Fischer (KF) foi realizada pelo método potenciométrico, sendo que o equipamento deteta automaticamente o ponto final de titulação

²Esta etapa consiste em aquecer o cadinho de sílica num forno a 600 °C durante cerca de 30 minutos, deixando-se depois arrefecer num exsiccador que contém sílica gel anidra. Periodicamente, efetua-se a sua pesagem e retorno ao exsiccador até se obter a massa constante (variação inferior a 0.0005 g) entre pesagens consecutivas.

por via potenciométrica e fornece os resultados percentuais da humidade em cada amostra.

O equipamento é calibrado diariamente com um padrão de ácido oxálico dihidratado ($C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$) através de três medições consecutivas desse padrão. O equipamento gera uma reta de calibração e determina o título do reagente de KF através da equação 3.3, onde V_1 representa o volume de reagente de KF utilizado até se atingir o ponto termo (mL), C_{KF} representa a concentração do reagente de KF ($mg\ mL^{-1}$), m designa a massa de padrão (g), MW_{H_2O} representa o peso molecular da água ($18.00\ g\ mol^{-1}$) e MW_{ox} o peso molecular do padrão de ácido oxálico dihidratado ($126.07\ g\ mol^{-1}$).

$$C_{KF} = 1000 \times \left(\frac{m}{V_1} \right) \left(\frac{2 \times MW_{H_2O}}{MW_{ox}} \right) \quad (3.3)$$

A calibração é aceite se $\sigma_x \leq 0.50\ mg\ mL^{-1}$ e $\%CV \leq 5.0$ entre leituras de padrão.

O teor de humidade ($\%H(KF)$) é calculado através da equação 2.3, sendo que critério de aceitação, à semelhança do que acontece na calibração, é dado por $\sigma_x \leq 0.50\ mg\ mL^{-1}$ e $\%CV \leq 5.0$ entre leituras de amostras, com a nuance de que o valor calculado também deve estar dentro dos limites estabelecidos pela metodologia analítica e/ou pelo fabricante - por exemplo, no caso da matéria prima em estudo, $\%H(KF)$ tem de ser inferior ou igual a 6.0 %, segundo a metodologia FCC7-USP.[58]

3.5.5 Método analítico para *Stevia*

Adaptou-se a metodologia analítica descrita no 1º Suplemento da 7ª edição do Código de Alimentos Químicos da Farmacopeia Americana (FCC7 - USP) para os ensaios de doseamento e determinação de impurezas e glicosídeos relacionadas de *Stevia*. [58] O mesmo método serve, então, para dois ensaios distintos da mesma matéria prima, havendo dois analitos principais - no ensaio de doseamento pretende-se identificar e quantificar o constituinte mais abundante, o analito Rebaudiosídeo A (RebA); enquanto no ensaio de impurezas se pretende determinar o analito Steviosídeo (Stev), usando-o como comparação na determinação de todos os outros glicosídeos identificados.

Injetar no equipamento cromatográfico iguais volumes das soluções padrão de RebA (ver sub-secção 3.3.3), das soluções padrão de Steviosídeo (ver sub-secção 3.3.4) e das soluções

amostra da matéria prima *Stevia* (ver sub-secção 3.3.5) e medir os sinais obtidos nos respectivos cromatogramas.

Os tempos de retenção (R_T) dos picos de RebA, Stev e restantes glicosídeos relacionados devem ser aproximados àqueles que estão descritos na tabela 3.4. No cálculo do tempo de retenção relativo (RR_T), usa-se o sinal de RebA como referência.

Tabela 3.4: Tempos de retenção aproximados, em minutos, dos principais componentes de *Stevia* e respetivos tempos de retenção relativos (considerando RebA como referência), assim como o peso molecular de cada componente.[58]

Componente	R_T (min)	RR_T (- -)	MW (g mol ⁻¹)
Rubusosídeo	2.6	0.186	642.73
Dulcosídeo A	4.3	0.307	788.87
Steviosídeo	6.6	0.471	804.88
Rebaudiosídeo C	8.5	0.607	951.01
Rebaudiosídeo F	9.6	0.686	936.99
Rebaudiosídeo A	14	1.000	967.01
Steviolbiosídeo	29	2.071	642.73
Rebaudiosídeo D	41	2.928	1129.15
Rebaudiosídeo B	66	4.714	804.88

3.5.5.1 Ensaio de doseamento

Para ensaios de doseamento (DOS), elaborar uma reta de calibração através de um gráfico das áreas obtidas nos padrões para o sinal de RebA em função da concentração do respetivo padrão, em mg L⁻¹ e usar a equação 3.4 como fórmula de cálculo, onde C_{RebA} representa a concentração de RebA na amostra em mg L⁻¹ e C_P designa a concentração da solução padrão em mg L⁻¹.

$$\%DOS = 100 \times \left(\frac{C_{RebA}}{C_P} \right) \quad (3.4)$$

O intervalo de aceitação para valores de %DOS da matéria prima *Stevia* é [97.0 a 103.0] %, segundo a USP.[58]

3.5.5.2 Ensaio de impurezas

Para ensaios de determinação de impurezas e glicosídeos relacionados (IMP), elaborar uma reta de calibração através de um gráfico das áreas obtidas nos padrões para o sinal de Stev em função da concentração do respetivo padrão, em mg L^{-1} . Para determinação da impureza Steviosídeo ($\%IMP_{Stev}$) usa-se a equação 3.5, enquanto para determinação dos outros glicosídeos relacionados ($\%IMP_{subs}$) se aplica a equação 3.6, onde C_{Stev} representa a concentração de Steviosídeo na amostra em mg L^{-1} , C_P designa a concentração da solução padrão em mg L^{-1} , C_{subs} representa a concentração de qualquer uma das outras sete substâncias relacionadas calculada através da reta de Stev em mg L^{-1} , MW_1 designa o peso molecular de um glicosídeo identificado (g mol^{-1}) e MW_2 representa o peso molecular do analito Steviosídeo (g mol^{-1}).

$$\%IMP_{Stev} = 100 \times \left(\frac{C_{Stev}}{C_P} \right) \quad (3.5)$$

$$\%IMP_{subs} = 100 \times \left(\frac{C_{subs}}{C_P} \right) \left(\frac{MW_1}{MW_2} \right) \quad (3.6)$$

O limite máximo de aceitação para a soma de todas as oito impurezas (glicosídeos) de *Stevia* é de 3.0 %, de acordo com a USP.[58]

Capítulo 4

Resultados e discussão

Este capítulo dedica-se à apresentação e discussão dos resultados obtidos ao longo de todo este projeto industrial. Conforme foi anteriormente referido na introdução (capítulo primeiro), a aprovação de lotes de matéria prima é imprescindível para garantir a conformidade com as boas práticas de fabrico. A diversidade e quantidade de ensaios e testes realizados nesta rotina serão triados e aqui evidenciados, de forma resumida, apenas para contextualizar algumas operações efetuadas no controlo da qualidade da matéria prima em estudo.

Sempre que possível, são indicados os valores das estimativas central (média) e respetiva incerteza (desvio padrão ou erro padrão) obtidas, assumindo que a incerteza do parâmetro surge indicada entre parêntesis e o respetivo intervalo de confiança, estimado de forma a prever 95 % dos casos, surge associado ao símbolo “ \pm ” e envolvido entre parêntesis retos. Convencionou-se ainda que, para simplificação da escrita em notação científica, se usa o símbolo “ e ” como indicador de número exponencial onde, por exemplo, $0.00025 = 2.5e - 4$. No caso de se estar a usar uma notação científica abreviada, a indicação da ordem de grandeza surge após o termo de incerteza como, por exemplo, $1.30(0.16)e3$ é usado para exprimir o valor 1.30×10^3 com uma incerteza respetiva de 0.16×10^3 .

4.1 Ensaios físico-químicos

Foram realizados vários ensaios físico-químicos às amostras de *Stevia* (matéria prima), que devem obedecer a determinados parâmetros definidos pela metodologia analítica e pelo fabricante. Os ensaios realizados consistiram na medição do valor de pH , testes de solubilidade, cinzas sulfúricas e determinação do teor de água (humidade) por KF. Foi ainda efetuada a

verificação do estado de calibração dos equipamentos de UV-Vis e IR.

4.1.1 Valor de pH

Efetuaram-se medições em duplicado de cada uma das amostras (A1 a A4). Os valores obtidos encontram-se na tabela 4.1, onde C representa a concentração de cada amostra em mg mL^{-1} .

Tabela 4.1: Valores de pH obtidos nas diferentes amostras de *Stevia*.

Solução	A1		A2		A3		A4	
C (mg mL^{-1})	10.030		10.012		10.022		10.010	
pH	5.46	5.47	5.46	5.50	5.50	5.51	5.49	5.48

Realizou-se o teste de Grubbs para verificar a existência de eventuais valores discrepantes no conjunto de resultados obtidos, ver tabela 4.1. O respetivo valor teste obtido foi $TV(G) = 1.29$, que não excede o valor crítico previsto por Grubbs, $G_{0.05(4)} = 1.48$, indicando que não existem valores anómalos no conjunto de valores obtidos e as respetivas estimativas $pH = 5.484(0.017)^1$ encontram-se validadas.

Os resultados obtidos ($pH = 5.484 \pm [0.026]$)² permitem prever, ao nível de confiança de 95 %, que os valores medidos devem estar incluídos no intervalo de pH situado entre 5.46 a 5.51, incluído nos limites impostos para a respetiva aceitação, demonstrando a conformidade deste produto em termos de valor de pH .

4.1.2 Teste de solubilidade

Prepararam-se duas soluções, A1 e A2, pensando-se 1.0004 e 1.0002 g de *Stevia*, respetivamente, e efetuando o procedimento referido em 3.3.9.

Após a adição de 10 mL da solução etanol : água (50 : 50, % V/V) às amostras, verificou-se que estas não se dissolveram totalmente, mesmo após se recorrer a homogeneização em vortex durante 5 minutos. Assim, adicionaram-se mais 5 mL da mistura de teste a cada uma das amostras e, após nova homogeneização, a amostra ficou totalmente solubilizada.

¹Indicação das estimativas posicional e de dispersão sob a forma de média e desvio padrão, a última envolvida entre parêntesis curvos.

²Neste caso, indica-se a estimativa central e o respetivo intervalo de confiança estimado a 95 %, envolvido entre os parêntesis retos.

De acordo com os valores da tabela 3.3, a matéria prima em estudo foi classificada como “solúvel”, em conformidade com o que está descrito no boletim do fabricante relativo a esta matéria prima.

4.1.3 Cinzas sulfúricas

Procedeu-se conforme descrito em 3.5.3, tendo-se obtido os resultados presentes na tabela 4.2, onde $\%Resíduo$ representa o resíduo percentual, obtido através da equação 3.2 e m_1 representa a soma da massa do cadinho (m_0) com a massa da amostra (m_A).

Tabela 4.2: Resultados obtidos para o teste de cinzas sulfúricas.

	m_0	m_A	m_1	m_1
massa (g)	32.7824	1.0059	32.7838	32.7833
		$\%Resíduo$	0.14	0.09

De acordo com os dados da tabela 4.2, a amostra atingiu massa constante na segunda pesagem com um valor de resíduo de 0.09 %. O ensaio é válido e encontra-se dentro dos parâmetros aceitáveis pela metodologia analítica.

4.1.4 Teor de água

Os sólidos utilizados na indústria devem manter as suas propriedades até ao momento da sua utilização. Devido à sua higroscopicidade, deve-se procurar avaliar o seu estado de contaminação com água através da determinação do teor de água por titulação de Karl Fischer (KF).

Calibrou-se o equipamento com um padrão de ácido oxálico dihidratado ($C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$), sendo que esses resultados se encontram na tabela 4.3.

Tabela 4.3: Estimativas obtidas na calibração do equipamento de titulação de Karl Fischer com um padrão de ácido oxálico dihidratado, onde m representa a massa (g), V_1 o volume de reagente de KF utilizado até se atingir o ponto termo (mL) e C_{KF} a concentração do reagente de KF ($mg mL^{-1}$).

Padrão	m (g)	V_1 (mL)	C_{KF} ($mg mL^{-1}$)
P1	0.0613	3.640	4.809
P2	0.0600	3.464	4.946
P3	0.0614	3.530	4.967

Com recurso à equação 3.3, obteve-se um título de reagente de KF de 4.907(0.086) mg mL⁻¹ com %CV = 1.7, aceitando-se a calibração efetuada, uma vez que não se excedeu o valor limite de aceitação ($\sigma \leq 0.50$ mg mL⁻¹). Assim, podem-se efetuar as leituras das amostras da matéria prima *Stevia* com segurança.

Efetuaram-se seis leituras independentes (A1 a A6) de amostra da matéria prima *Stevia*, sendo que os resultados se encontram registados na tabela 4.4.

Tabela 4.4: Resultados obtidos no teste de determinação do teor de água (%H(KF)) em amostras de *Stevia*.

Amostra	m (g)	V_{KF} (mL)	%H(KF)
A1	0.4972	3.548	3.50
A2	0.4910	3.372	3.37
A3	0.5001	3.549	3.48
A4	0.4884	3.501	3.52
A5	0.4992	3.602	3.54
A6	0.4871	3.380	3.41

No sentido de validar estes resultados foi efetuado o teste de Grubbs, tendo-se obtido o valor de teste $TV = 1.51$ que não excede o valor crítico previsto por Grubbs ($G_{0.05(6)} = 1.89$), indicando que não existem valores anómalos neste conjunto de resultados. Assim sendo, obteve-se um teor de humidade de %H(KF) = 3.470(0.067) com %CV = 1.9. Como a metodologia analítica refere que o teor de humidade deve ser inferior ou igual a 6.0 %, dado que se obteve %H(KF) = 3.470 ± [0.071], então o teor de humidade situa-se entre 3.40 e 3.54 %, cerca de metade do valor máximo de aceitação.

Como também se tem que $\sigma_x \leq 0.50$ mg mL⁻¹, o ensaio cumpre os requisitos exigidos para a sua aceitação, demonstrando a conformidade da matéria prima em estudo em termos de teor de água.

4.1.5 Verificação do estado da calibração

Os resultados da calibração de um instrumento de medição, expressos num certificado de calibração, são importantes porque fornecem informações válidas e úteis que podem auxiliar na tomada de decisão perante os resultados obtidos. Na Indústria Farmacêutica onde este projeto foi realizado, as calibrações de equipamentos laboratoriais são realizadas por empresas externas certificadas. No entanto, a calibração de um equipamento deve ser periodicamente

verificada de forma a avaliar o estado em que se encontra.

Dado que houve necessidade de efetuar estudos de absorção na região UV para a implementação e validação do método de quantificação da matéria prima *Stevia* por HPLC-UV e que foi desenvolvido um método alternativo para quantificar o teor de humidade nesta matéria prima por FTIR, verificou-se o estado da calibração destes dois equipamentos, o espectrofotómetro de UV-Vis na região 200 – 500 nm e FTIR na região do infravermelho próximo e médio ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$).

4.1.5.1 Equipamento de UV-Vis

Recorrendo-se a valores certificados de absorvância de soluções de dicromato de potássio em ácido perclórico 1 mM aos comprimentos de onda de 235, 257, 313 e 350 nm (ver tabela A.3) e a soluções preparadas do mesmo composto nas concentrações descritas para os valores de referência, foi possível avaliar o desempenho instrumental do espectrofotómetro de UV-Vis.[59]

A figura 4.1 representa os espectros obtidos para as soluções de dicromato de potássio de concentração 20.1, 40.1, 60.2, 80.2 e 100.3 mg L^{-1} .

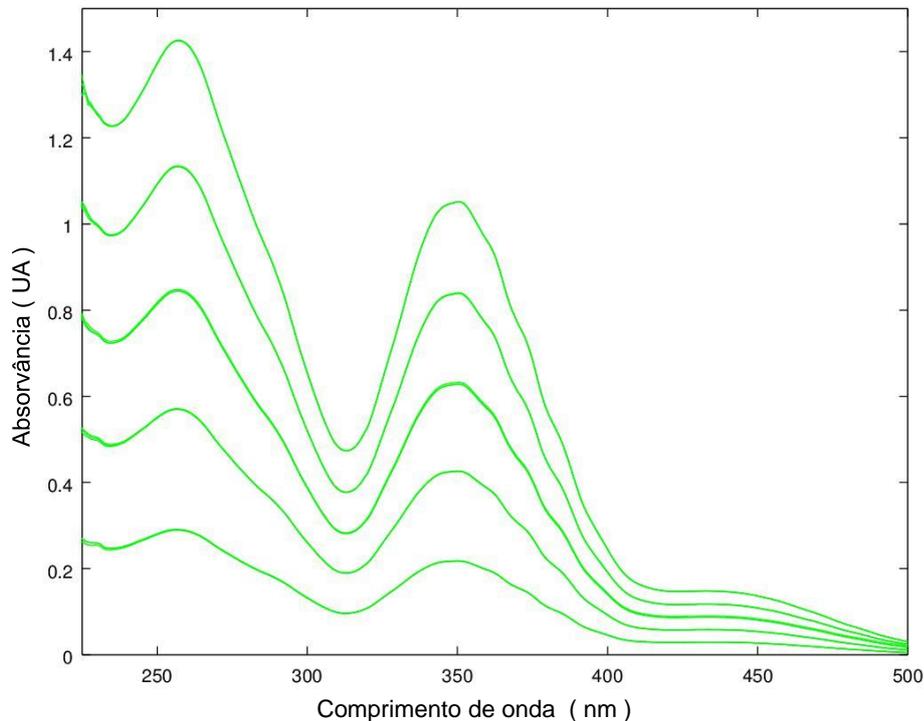


Figura 4.1: Espectros das soluções padrão de dicromato de potássio em ácido perclórico 1 mM de concentração 20.1, 40.1, 60.2, 80.2 e 100.3 mg L^{-1} .

Por inspeção visual da figura 4.1 pode-se verificar que existe elevada coerência entre soluções da mesma concentração, o que é corroborado pelos valores de absorvância obtidos, registados na tabela 4.5 para cada comprimento de onda verificado e para cada uma das soluções de dicromato (S1 a S5).

Tabela 4.5: Registo de valores de absorvância (A_λ) obtidos para cada uma das soluções de dicromato de potássio (S1 a S5) aos comprimentos de onda, λ , de 235, 257, 313 e 350 nm e indicação das estimativas pontuais da sensibilidade pontual relativa ($\%Sens_i$).

C (mg mL ⁻¹)		A_{235} (UA)	A_{257} (UA)	A_{313} (UA)	A_{350} (UA)
S1	20.1	0.2459	0.2901	0.0963	0.2178
S2	40.1	0.4862	0.5702	0.1897	0.4262
S3	60.2	0.7250	0.8456	0.2819	0.6295
S4	80.2	0.9739	1.1337	0.3772	0.8394
S5	100.3	1.2272	1.4260	0.4735	1.0515
S1	$\%Sens_1$	100.6	101.8	101.6	103.0
S2	$\%Sens_2$	99.7	100.3	100.3	101.1
S3	$\%Sens_3$	99.1	99.1	99.3	99.4
S4	$\%Sens_4$	99.9	99.7	99.8	99.5
S5	$\%Sens_5$	100.6	100.3	100.1	99.7

Como se pode verificar da tabela 4.5, a sensibilidade relativa pontual oscila entre 99.1 e 103.0 %, tendo como estimativa média valores entre 100.0 e 100.5 %, indicando que a resposta instrumental ao dicromato de potássio nas condições de trabalho é linear - possui uma sensibilidade constante na gama analítica testada. Esta conclusão está de acordo com o estipulado pelo NIST³ ao garantir que estas soluções padrão permitem avaliar a capacidade de resposta linear do espectrofotómetro.

Com base nos dados da tabela 4.5, elaboraram-se as retas de calibração dos quatro comprimentos de onda, como mostra a figura 4.2.

³O NIST (National Institute of Standards and Technology) é uma instituição que estabelece os padrões da qualidade relativamente à medição e calibração, entre outras áreas.

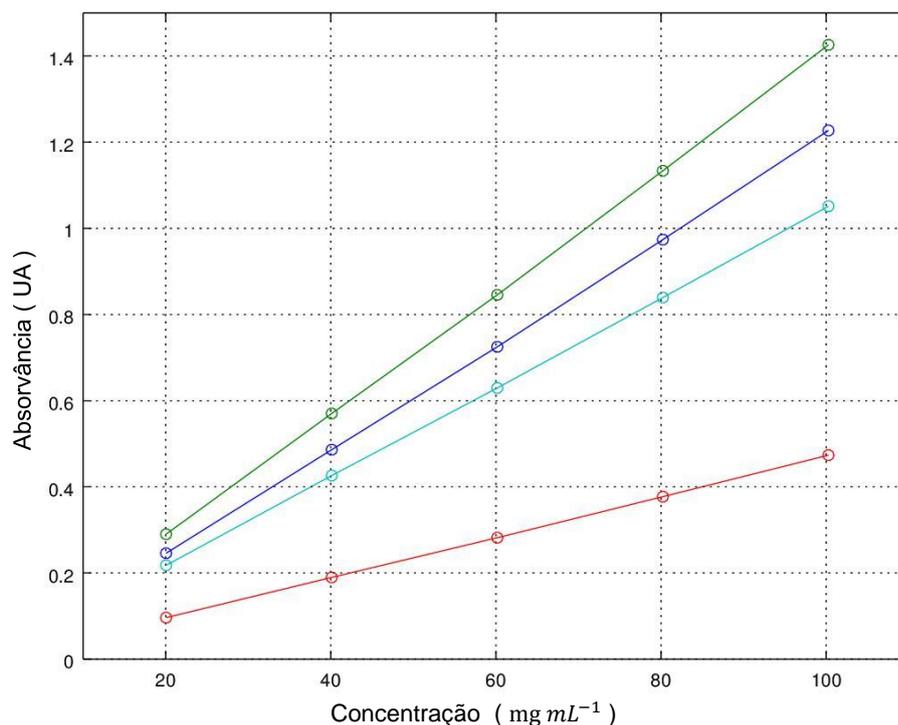


Figura 4.2: Retas de calibração de absorvância (UA) em função da concentração das soluções de dicromato de potássio (mg mL^{-1}) aos comprimentos de onda $\lambda = 235$ nm (azul), $\lambda = 257$ nm (verde), $\lambda = 313$ nm (vermelho) e $\lambda = 350$ nm (azul claro).

Procedeu-se, inicialmente, a uma análise estatística destes valores de referência, obtendo-se os valores presentes na tabela 4.6.

Tabela 4.6: Estimativas obtidas para os vários comprimentos de onda estudados: 235, 257, 313 e 350 nm.

$\lambda(\text{nm})$	b_0	$SE(b_0)$	$\%RSE(b_0)$	b_1	$SE(b_1)$	$\%RSE(b_1)$	R^2	σ_{fit}
235	-0.0035	0.0061	174	0.012218	0.000091	0.74	0.9998	0.0058
257	0.0025	0.0065	258	0.01414	0.00010	0.69	0.9999	0.0062
313	0.0011	0.0016	139	0.004697	0.000024	0.51	0.9999	0.0015
350	0.0087	0.0029	33.4	0.010373	0.000044	0.42	0.9999	0.0028

Como os valores mais discrepantes correspondem à absorvância medida a $\lambda = 235$ nm (R^2 mais baixo), verificou-se a presença de *outliers* pela análise dos dados obtidos a esse comprimento de onda. Pelo teste de Mandel, obteve-se $TV = 5.98$ com um valor de prova de 0.134, pelo que se pode afirmar que não existem *outliers* ao nível de significância de 0.01.

Como este era o comprimento de onda mais dúbio, não existindo *outliers*, considera-se que para os restantes comprimentos de onda também não existem valores discrepantes.

Através de um teste *t*-emparelhado foi possível comparar os valores de absorvância obtidos com os valores de referência (tabela A.3) a cada comprimento de onda. Parece existir boa exatidão a todos os comprimentos de onda estudados, tendo-se obtido valores de prova muito superiores a 0.05 para todas as situações (0.800, 0.925, 0.954 e 0.876, para 235, 257, 313 e 350 nm, respetivamente). Realizou-se ainda o teste ANOVA de fator único, corroborando os resultados obtidos com o teste anterior, uma vez que se tem *p-value* > 0.05 em todas as situações.

Os resultados obtidos permitem afirmar que existe boa exatidão na medição da absorvância, revelando um bom desempenho do equipamento, pelo que o espectrofotómetro UV-Vis se encontra devidamente calibrado.

4.1.5.2 Equipamento de IR

Efetuararam-se dez leituras (E01 a E10), espaçadas temporalmente, de um padrão SRM de poliestireno no equipamento de infravermelho. A figura 4.3 representa os espectros obtidos nessas leituras.

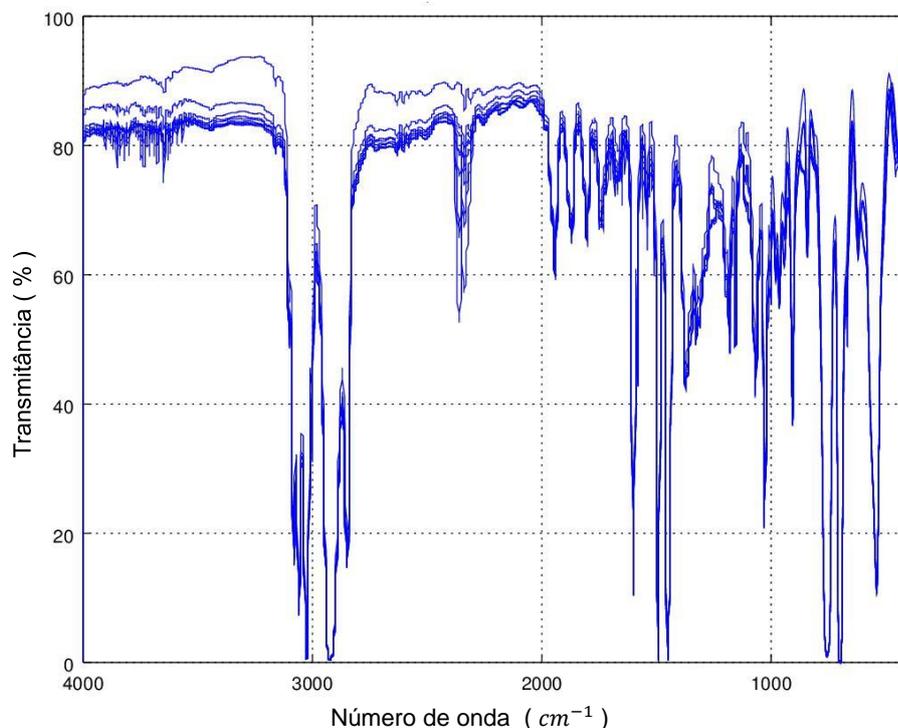


Figura 4.3: Espectros obtidos nas $N = 10$ leituras do padrão de poliestireno no equipamento de IR.

Por inspeção visual da figura anterior, verifica-se que todos se encontram muito coerentes entre si com a exceção de um deles. Os resultados obtidos para cada leitura encontram-se resumidos na tabela 4.7.

Tabela 4.7: Resultados obtidos na verificação do equipamento de IR com um padrão secundário de poliestireno.

Param.	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10
$\%Sim$	92.29	95.33	94.41	95.63	97.09	97.06	95.57	95.08	98.29	93.23
Res_X	26.50	25.29	24.37	27.60	26.62	24.42	24.56	25.13	24.80	24.48
Res_Y	13.77	13.65	13.31	14.39	14.12	13.44	13.35	13.88	13.54	13.30

$\%Sim$ - percentagem de similaridade entre o espectro teórico de poliestireno e o espectro obtido em cada leitura;

Res_X - poder de resolução entre as bandas 2870 e 2849.5 cm^{-1} ;

Res_Y - poder de resolução entre as bandas 1589 e 1583 cm^{-1} .

Através dos resultados obtidos (ver tabela 4.7), verificou-se o cumprimento dos critérios descritos na sub-secção 2.1.3, sendo que a verificação dos números de onda específicos (3060.0, 2849.5, 1942.9, 1601.2, 1583.0, 1154.5 e 1028.3 cm^{-1}), em todos os ensaios, apresentaram uma variação inferior a 1 cm^{-1} .

Relativamente à similaridade, começou por se verificar a existência de eventuais valores discrepantes pelo teste de Grubbs, obtendo-se $TV(G) = 1.72$, pelo que não existem *outliers*⁴. Obteve-se $\%Sim = 95.4 \pm [1.3]$, pelo que a percentagem de similaridade se encontra entre 94.1 e 96.7 %, encontrando-se bastante acima do limite mínimo de aceitação (90 %), cumprindo-se este requisito. Comparando a estimativa obtida com o valor de referência de 95 % através de um teste *t*-Student, obteve-se $TV = 0.22$ com um valor de prova de 83.1 %, pelo que não existem diferenças significativas nas posições.

Quanto ao poder de resolução, foi avaliada a existência de *outliers* pelo teste de Grubbs, tendo-se obtido $TV(G) = 1.96$ e $TV(G) = 1.95$ para Res_X e Res_Y , respetivamente, confirmando-se que não existem valores discrepantes no conjunto de dados, encontrando-se estes validados. Como se obteve $Res_X = 25.4 \pm [0.81]$ e $Res_Y = 13.68 \pm [0.26]$, as estimativas encontram-se dentro dos limites de aceitação para estes critérios ($Res_X > 18$ e $Res_Y > 10$), pelo que são válidas.

Dado que a estimativa $\%Sim$ se encontra acima de 95 %, e todos os outros critérios são cumpridos, classifica-se o estado da calibração do equipamento de IR como “excelente”, embora se deva admitir que se encontra no limiar desse patamar ([95 a 100] %), podendo-se

⁴O valor crítico de Grubbs para $N = 10$ é dado por $G_{0.05(10)} = 2.29$.

classificar apenas como “muito bom”. Para uma maior certeza da classificação da calibração do equipamento, dever-se-iam fazer mais leituras numa próxima ocasião.

4.2 Validação do método analítico para *Stevia*

Para realizar a análise da matéria prima *Stevia* por HPLC, aplicou-se a metodologia analítica especificada pelo 1º suplemento do 7º Código dos Químicos Alimentares da Farmacopeia Americana (FCC7-USP) para os ensaios de doseamento e impurezas.[58] Tiveram-se ainda em atenção as recomendações da norma ICH Q2(R1).[55] O procedimento utilizado está resumidamente descrito na sub-secção 3.5.5.

4.2.1 Caracterização espectroscópica

Realizou-se um estudo preliminar da matéria prima em estudo por espectrofotometria de UV-Vis, de forma a verificar se o comprimento de onda referido pela monografia (210 nm) era, efetivamente, o mais adequado à sua análise.

Efetuaram-se espectros de soluções de *Stevia* de concentrações 2500, 4000 e 5000 mg L⁻¹ entre 200 e 400 nm, como mostra a figura 4.4.

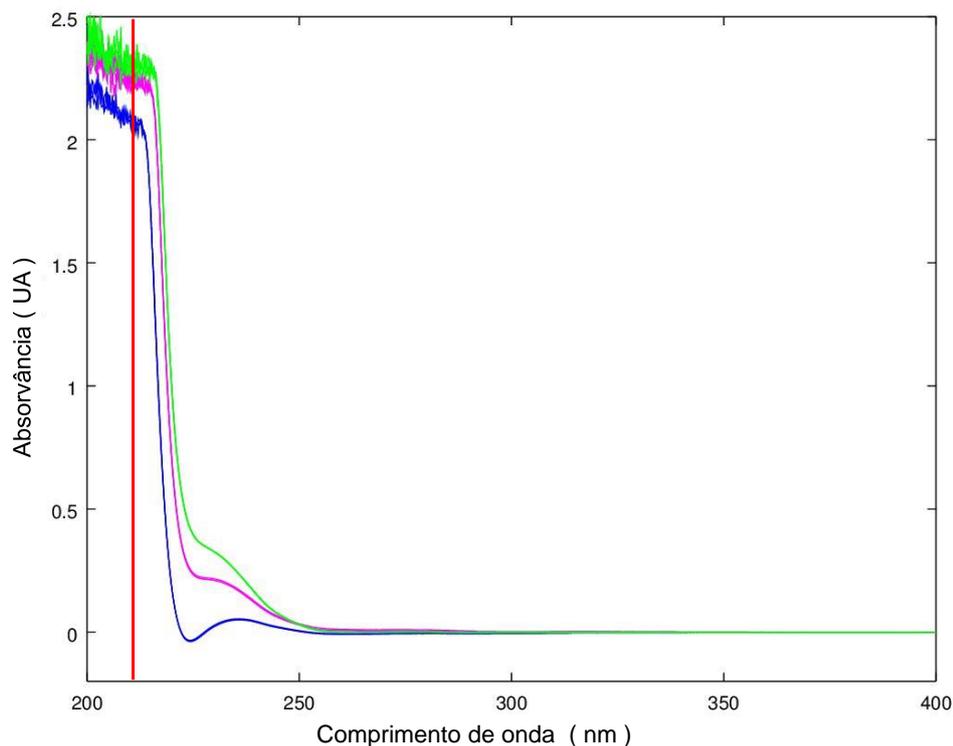


Figura 4.4: Espectros das soluções da matéria prima *Stevia* de concentração 2500 (a azul), 4000 (a magenta) e 5000 mg L⁻¹ (a verde) entre 200–400 nm. A linha vertical vermelha colocada a $\lambda = 210$ nm assinala a posição do comprimento de onda sintonizado no detetor - os resultados confirmam que esta escolha permitirá obter maior sensibilidade para o analito em causa, bem como a possibilidade eventual de poder detetar/quantificar outras substâncias presentes na matéria prima em estudo.

Dos espectros obtidos (figura 4.4), pode-se confirmar que o comprimento de onda referido pela metodologia FCC7-USP é, de facto, um comprimento de onda adequado à análise da matéria prima em estudo, uma vez que corresponde a uma região máxima de absorção do analito.

Deste modo, o estudo foi realizado por HPLC com detetor de UV a 210 nm, tal como sugeria a metodologia analítica.[58]

4.2.2 Identificação

Dado que os padrões utilizados de RebA e Stev não eram puros, foi efetuada uma listagem exaustiva de sinais detetados, tendo em conta os três padrões de maior concentração (S3, S4 e S5 relativos a Stev e R3, R4 e R5 relativos a RebA). Os valores encontram-se organizados na tabela 4.8.

Tabela 4.8: Listagem dos tempos de retenção médios de todos os sinais detetáveis obtidos para os duplicados de padrões de Stev (S3, S4 e S5) e padrões de RebA (R3, R4 e R5), de maior concentração, usados na calibração.

#	S3	S4	S5	R3	R4	R5
1	2.73	3.35	2.98	3.36	3.36	3.28
2	6.80	4.55	3.37	4.39	4.42	4.38
3	10.25	6.81	4.14	5.26	5.19	5.24
4	52.92	14.84	4.60	6.82	6.80	6.82
5	58.46	10.31	5.12	8.91	8.66	8.91
6		23.11	6.81	10.09	10.01	10.08
7		27.97	10.40	11.02	11.00	10.99
8			14.85	13.25	13.16	13.23
9			23.09	14.89	14.89	14.91
10			28.02	21.52	25.22	23.05
11				23.16	44.68	25.33
12				25.34	53.64	29.70
13				43.83		44.78
14				53.68		47.86
15				68.45		53.63

Uma vez que as condições experimentais usadas são em tudo equivalentes às referidas na metodologia FCC7-USP (ver sub-secção 3.5.5), numa primeira tentativa de identificação foram representados na figura 4.5 os tempos de retenção em sobreposição com o tempos característicos dos nove analitos descritos.

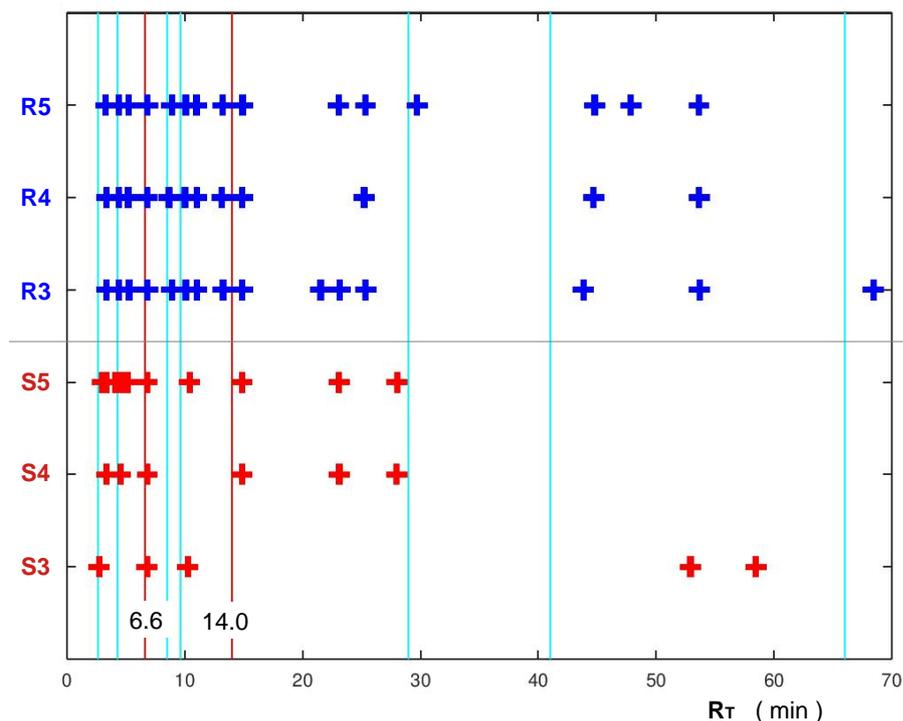


Figura 4.5: Representação dos tempos de retenção de todos os sinais detetáveis nos padrões de Stev (S3, S4 e S5) e de RebA (R3, R4 e R5) em relação aos valores previstos na metodologia FCC7-USP (ver tabela 3.4).

Através da figura 4.5 é possível verificar que para tempos de retenção menores ($R_T < 10$ min.), a coerência dos mesmos é maior, sobretudo entre os valores obtidos e alguns valores previstos. Contudo, para tempos de retenção mais elevados ($R_T > 10$ min.), esta sobreposição já é mais difícil de obter. Ainda através da figura 4.5 é possível observar a coincidência dos sinais com $R_T \simeq 6.60$ min. que se devem reportar ao analito Stev. O mesmo já não se pode dizer perante os sinais que variam entre 14.84 e 14.91 min. como sendo relativos a RebA. Os analitos são identificados através do respetivo padrão de concentração mais elevada e as amostras de *Stevia*, sendo que o tempo de retenção (R_T) do sinal cromatográfico referente a RebA e a Stev tem de ser coincidente, sendo consideradas aceitáveis diferenças até 0.05 minutos.

No sentido de melhor verificar as respetivas coincidências e proceder à identificação, considerou-se o conjunto tempos de retenção na proximidade de 14.8 min, tendo-se escrutinado previamente para eventuais valores discrepantes, obteve-se o valor médio, $R_{T(ref)} = 14.88$ min que foi usado para normalizar todos os tempos de retenção, gerando os respetivos tempos de retenção relativo. Na figura 4.6 encontram-se agora representados os valores dos tempos de

retenção relativo referentes aos padrões de Stev e de RebA de maior concentração.

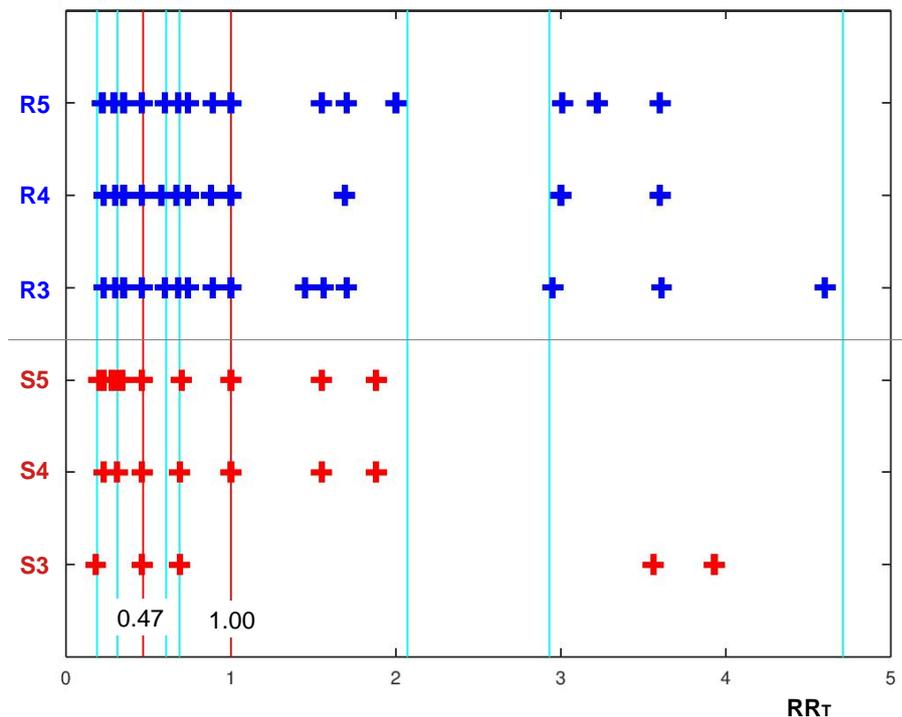


Figura 4.6: Representação dos tempos de retenção relativo dos sinais detetados nos padrões de Stev (S3, S4 e S5) e de RebA (R3, R4 e R5) de maior concentração, sobrepostos com os valores previstos por FCC7-USP (ver tabela 3.4) .

Nesta figura pode-se verificar agora a sobreposição mais evidente entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos, permitindo, deste modo, efetuar a atribuição (identificação) das espécies de interesse para este trabalho - o analito principal (RebA), bem como o conjunto de impurezas a estimar.

A figura 4.7 representa os cromatogramas dos padrões de maior concentração (P5) de Stev e de RebA, assim como das amostras da matéria prima em estudo.

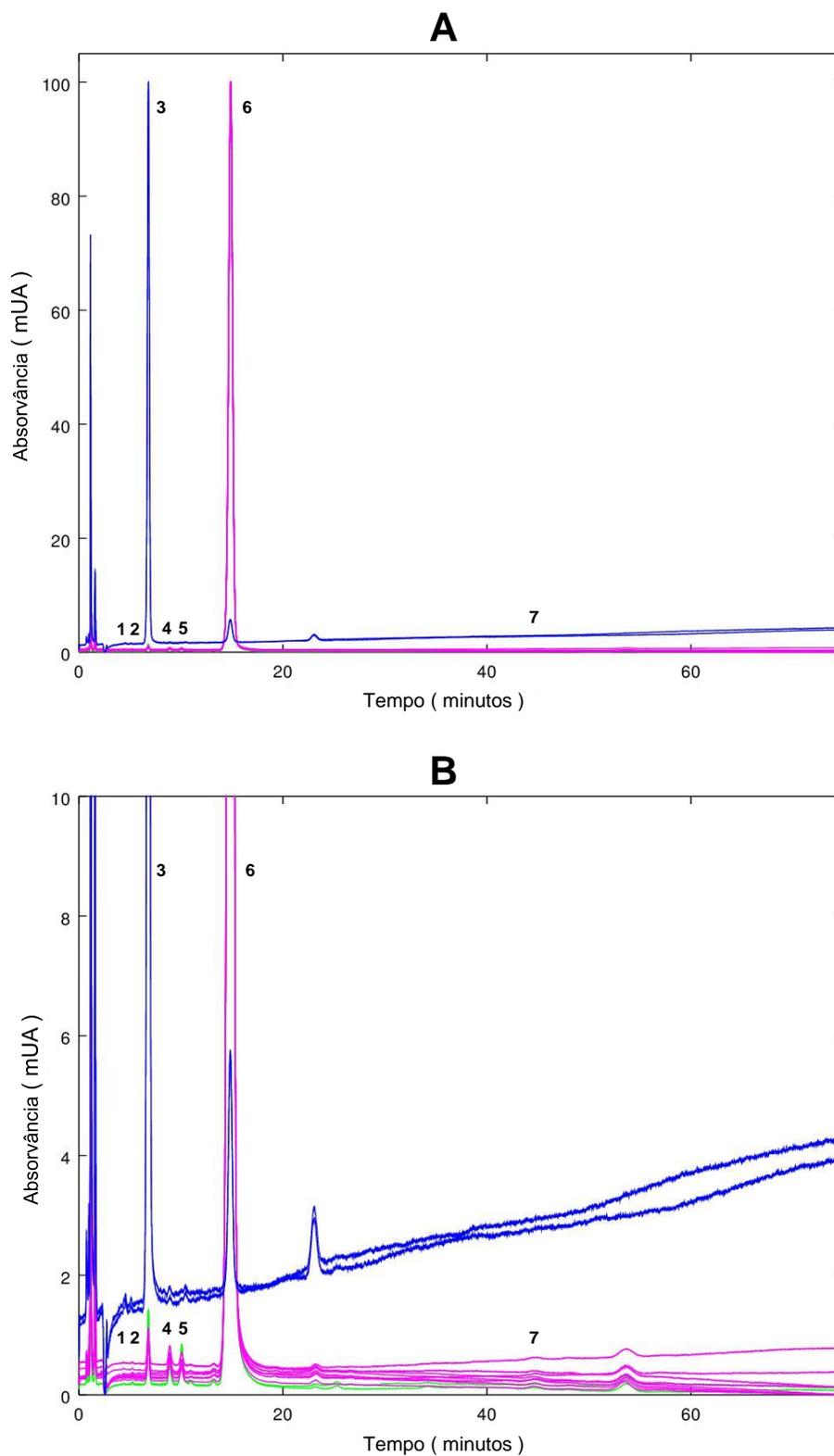


Figura 4.7: Cromatogramas obtidos para os padrões de maior concentração de RebA (a verde) e de Stev (a azul) e para as amostras da matéria prima *Stevia* (a magenta): (A) numa escala normal e (B) numa escala ampliada do eixo das ordenadas. Os sinais cromatográficos integrados encontram-se numerados, sendo: 1 - Rubusosídeo ($R_T = 2.7$ min.), 2 - Dulcosídeo A ($R_T = 4.4$ min.), 3 - Steviosídeo ($R_T = 6.8$ min.), 4 - Rebaudiosídeo C ($R_T = 8.9$ min.), 5 - Rebaudiosídeo F ($R_T = 10.1$ min.), 6 - Rebaudiosídeo A ($R_T = 14.9$ min.), 7 - Rebaudiosídeo D ($R_T = 44.5$ min.).

Pelos cromatogramas da figura 4.7, pode-se afirmar que existe elevada coerência entre os padrões de RebA e as amostras de *Stevia*, enquanto que os padrões de Stev apresentam maior ruído e uma linha de base menos estável. Apesar de haver uma tendência para a diferença na linha de base entre padrões e amostras (horizontal no primeiro caso e oblíquo no segundo), os tempos de retenção são concordantes e as áreas dos sinais conseguem ser bem integradas, assumindo-se um polinómio de primeiro grau como linha de base.

A tabela 4.9 mostra os tempos de retenção (min.) obtidos para cada um dos sinais de interesse nos padrões de maior concentração e nas amostras de *Stevia*.

Tabela 4.9: Tempos de retenção (em min.) obtidos para os sinais cromatográficos de Stev e RebA em cada um dos respetivos padrões de maior concentração (P5) e em cada uma das amostras de *Stevia* (A1 e A2).

	Stev R_T (min.)	RebA R_T (min.)
P5 1	6.8100	14.9067
P5 2	6.8167	14.9033
A1 1	6.8183	14.8867
A1 2	6.8167	14.8833
A2 1	6.8083	14.8900
A2 2	6.8033	14.8767

Com base nos valores da tabela 4.9 foi efetuado um estudo ANOVA de fator único para cada analito. Os resultados obtidos mostram que, em ambos os casos, os valores de tempo de retenção são concordantes ($p[H_0] = 0.093$ e 0.056 , respetivamente). Os tempos de retenção obtidos, $6.8122(0.0035)$ e $14.8911(0.0058)$ minutos apresentam uma variabilidade respetiva da ordem de 0.05 e 0.04% , respetivamente.

Assim, os critérios de aceitação são cumpridos e pode-se afirmar que a metodologia é específica para os analitos em causa e adequada à análise da matéria prima *Stevia*.

A tabela 4.10 apresenta as principais informações dos sinais cromatográficos dos analitos em estudo em cada uma das soluções utilizadas neste trabalho, nomeadamente o tempo de retenção (R_T , em min.), a área (A , em mUA*min.), o fator de simetria (F_S), o número de pratos teóricos (N_P) e a resolução (R_S).

Tabela 4.10: Informações cromatográficas dos sinais obtidos para cada um dos analitos nas soluções usadas para validação da metodologia analítica, sendo que X designa a concentração do analito (mg L^{-1}), R_T o tempo de retenção do sinal (min.), A a área do sinal cromatográfico ($\text{mUA} \cdot \text{min.}$), F_S o fator de simetria, N_P o número de pratos teóricos e R_s a resolução do sinal.

	Steviosídeo						Rebaudiosídeo A					
	X_1	R_{T_1}	A_1	F_{S_1}	N_{P_1}	R_{s_1}	X_2	R_{T_2}	A_2	F_{S_2}	N_{P_2}	R_{s_2}
P1	0.5049	6.81	681	0.97	5903	15.3	250.0	14.88	321689	0.97	6313	7.6
		6.83	706	0.98	5741	15.6		14.87	323299	0.96	6289	7.8
P2	5.060	6.81	6853	0.98	5678	15.3	1050	14.88	1343648	0.97	6269	7.0
		6.80	6713	0.99	5760	15.6		14.89	1346262	0.96	6285	7.9
P3	25.30	6.81	33580	0.98	5834	15.0	2520	14.89	3222184	0.96	6337	7.7
		6.81	33229	0.96	5855	15.5		14.90	3228297	0.95	6313	7.7
P4	126.5	6.80	165120	0.97	5860	15.7	4010	14.88	5001041	0.96	6290	7.0
		6.81	165907	0.98	5799	15.8		14.90	4998401	0.96	6319	7.8
P5	253.0	6.81	333484	0.99	5858	15.9	4995	14.91	6393674	0.95	6295	7.7
		6.82	333762	0.99	5886	16.0		14.88	6402814	0.96	6317	7.8
A1	2608	6.82	9462	0.91	5490	15.2	2608	14.89	3327387	0.96	6271	7.7
		6.82	9472	0.94	5802	15.2		14.89	3353177	0.96	6269	7.0
	2542	6.82	9301	0.97	5950	15.5	2542	14.88	3257199	0.96	6285	7.1
		6.82	9610	1.02	5559	15.4		14.87	3253444	0.95	6267	7.6
A2	5031	6.81	18397	0.96	5760	15.5	5031	14.89	6426260	0.94	6300	7.9
		6.81	18546	0.99	5624	15.3		14.88	6459326	0.94	6289	7.8
	5034	6.81	18656	0.96	5772	15.9	5034	14.88	6462832	0.96	6303	7.6
		6.80	18861	0.96	5727	15.7		14.87	6430906	0.94	6284	7.8

De modo similar, usou-se a ANOVA de fator único para avaliar a consistência dos resultados obtidos com padrões (P1 a P5) e com amostras (A1 e A2): no que se refere aos tempos de retenção, eles mantiveram-se concordantes entre si ($p[H_0] = 0.161$ e 0.063), sendo as novas estimativas $R_{T_1} = 6.8122$ (0.0067) e $R_{T_2} = 14.8811$ (0.0082) minutos. A variabilidade obtida aqui foi ligeiramente maior (0.098 e 0.055 %, respetivamente) do que no caso anterior.

No sentido de verificar se os tempos de retenção se mantinham concordantes, efetuou-se o teste t -Student (caso homocedástico com um total de 9 graus de liberdade) e obteve-se valores de prova superiores a 0.05 (0.999 e 0.337 , respetivamente), indicando que há uma excelente concordância destes valores.

Para avaliar a capacidade de se manterem as condições de integração do sinal cromatográfico, foi ainda avaliada a consistência da simetria (F_s) e da sua forma (N_p) através de um teste ANOVA (fator único) a cada tipo de sinal, valores da tabela 4.10. Em termos de simetria do sinal, a ANOVA deteta que esta se mantém constante em ambos os casos (p -value = 0.189 e 0.102 , respetivamente) e ainda que o primeiro sinal aparenta ser mais simétrico

($F_{S_1} = 0.967 (0.027)$), embora menos consistente do que o segundo ($F_{S_2} = 0.9561 (0.0071)$). No sentido de se verificar se, de facto, havia similaridade ou não entre estas duas estimativas, foi efetuado o teste t -Student e obteve-se um valor de prova de 0.709, indicando que os valores são concordantes na posição, ou seja, as simetrias dos sinais são similares. O teste ANOVA global a dois níveis (amostra e analito) revelou a concordância para amostra e para analito ($p[H_0] = 0.626$ e 0.210 , respetivamente).

Passando ao perfil do sinal em termos de número de pratos teóricos, em ambos os casos a ANOVA de fator único confirma que os valores obtidos também são coerentes (p -value = 0.698 e 0.142) para cada analito. Contudo, as respetivas estimativas $N_{P_1} = 5.77 (0.13)e3$ e $N_{P_2} = 6.296 (0.015)e3$ são distintas ($TV = 3.99$, p -value = 0.001, com 17 graus de liberdade) - esta discordância é compreensível dado que os tempos de retenção são muito distintos, como demonstrado nas figuras 4.7 e 4.5.

4.2.3 Especificidade e seletividade

Analisando os cromatogramas obtidos (ver figura 4.7), apenas por inspeção visual, parece existir especificidade e seletividade, uma vez que o sinal obtido é muito semelhante entre padrões e amostras, permitindo, assim, a identificação e quantificação inequívoca dos analitos.

Calculando a resolução entre os sinais cromatográficos através da equação 2.8, valores da tabela 4.10, obteve-se $Rs_1 = 15.52 (0.28)$ e $Rs_2 = 7.58 (0.32)$. Como estas estimativas são superiores aos valores mínimos de aceitação ($Rs_1 \geq 10.0$ e $Rs_2 \geq 5.0$), pode-se afirmar que o método é seletivo e, desse modo, é também específico, uma vez que não há evidência de interferência de outros analitos.

Através de um teste ANOVA de fator único verificou-se concordância no sinal de RebA (p -value = 0.766) quanto à resolução, enquanto para o analito Stev a concordância neste parâmetro é dúbia, uma vez que o valor de prova obtido foi de 0.021.

Comparando as estimativas obtidas para ambos os analitos em estudo através de um teste t -Student, verificou-se que existe total discordância entre os valores de resolução para cada analito ($TV = 90.73$ e p -value = 0.000, com $ndf = 17$), o que é compreensível dado os tempos de retenção e a largura dos picos serem parâmetros muito distintos entre os dois analitos.

4.2.4 Linearidade

Nesta fase é fundamental avaliar a homogeneidade da variância, realizar o teste de linearidade e, por fim, avaliar a presença de eventuais valores discrepantes no conjunto de dados de cada um dos analitos em estudo.

4.2.4.1 Homogeneidade da variância

Tendo em conta os valores de tempo de retenção obtidos para os padrões que se encontram nos extremos de cada calibração (ver tabela 4.10), realizou-se o teste F de Fisher-Snedcor para verificação da homogeneidade da variância (ver equação 2.18). Obteve-se um valor de prova superior a 0.05 em ambos os casos ($p[H_0] = 0.114$ e 0.222 para Stev e RebA, respetivamente), pelo que se assume que existe homogeneidade da variância em ambos os casos, podendo-se usar OLS.

4.2.4.2 Verificação da linearidade

Na figura 4.8 encontram-se representados os valores obtidos para as réplicas de padrão dos dois analitos em estudo.

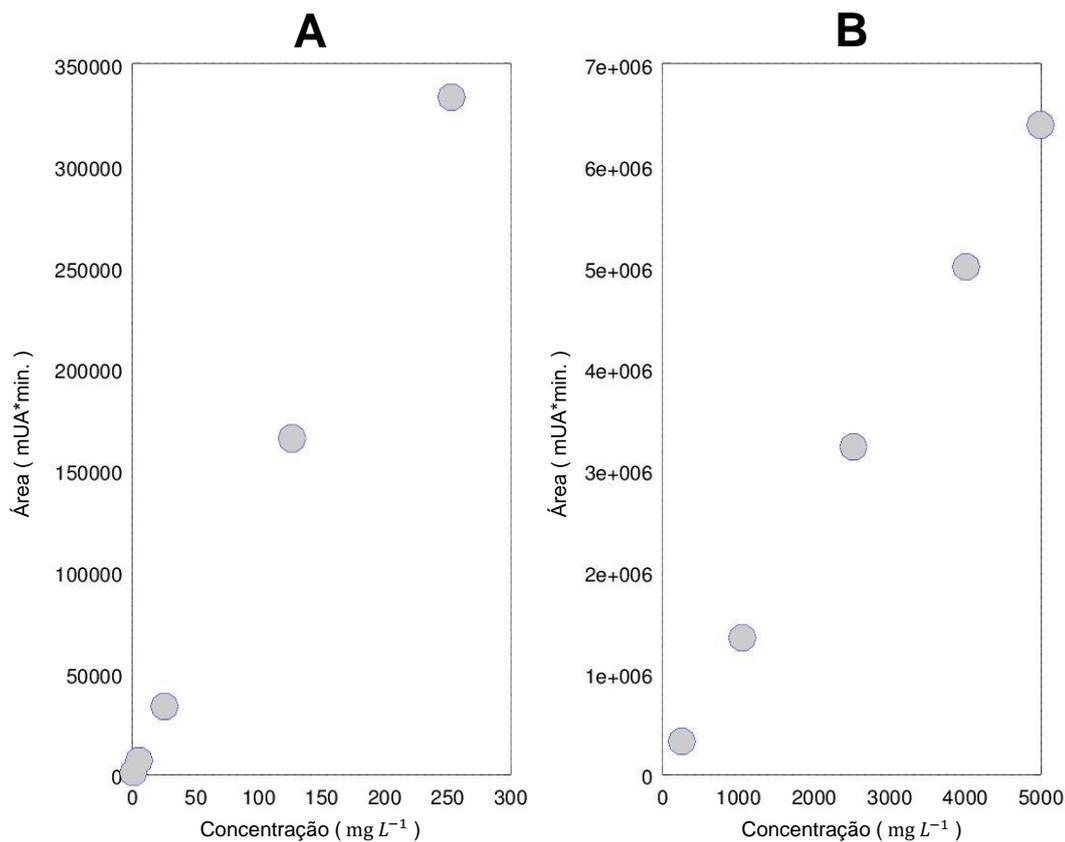


Figura 4.8: Representação dos valores obtidos para as réplicas de padrão de (A) Steviosídeo e (B) Rebaudiosídeo A.

Para verificar a linearidade compara-se o desempenho do ajuste entre polinómio de primeiro e de segundo grau, através do teste de Mandel (equação 2.57). Em ambos os casos, o teste foi decisivo para a preferência de ajuste com polinómio de primeiro grau já que os valores de prova obtidos eram altos ($p\text{-value} = 0.299$ e 0.679 , respetivamente). Neste caso, a hipótese nula favorece o modelo que possui maior número de graus de liberdade, que corresponde ao polinómio de primeiro grau (P_{01}).

Na figura 4.9 encontram-se representadas as retas de calibração de Stev (A) e RebA (B).

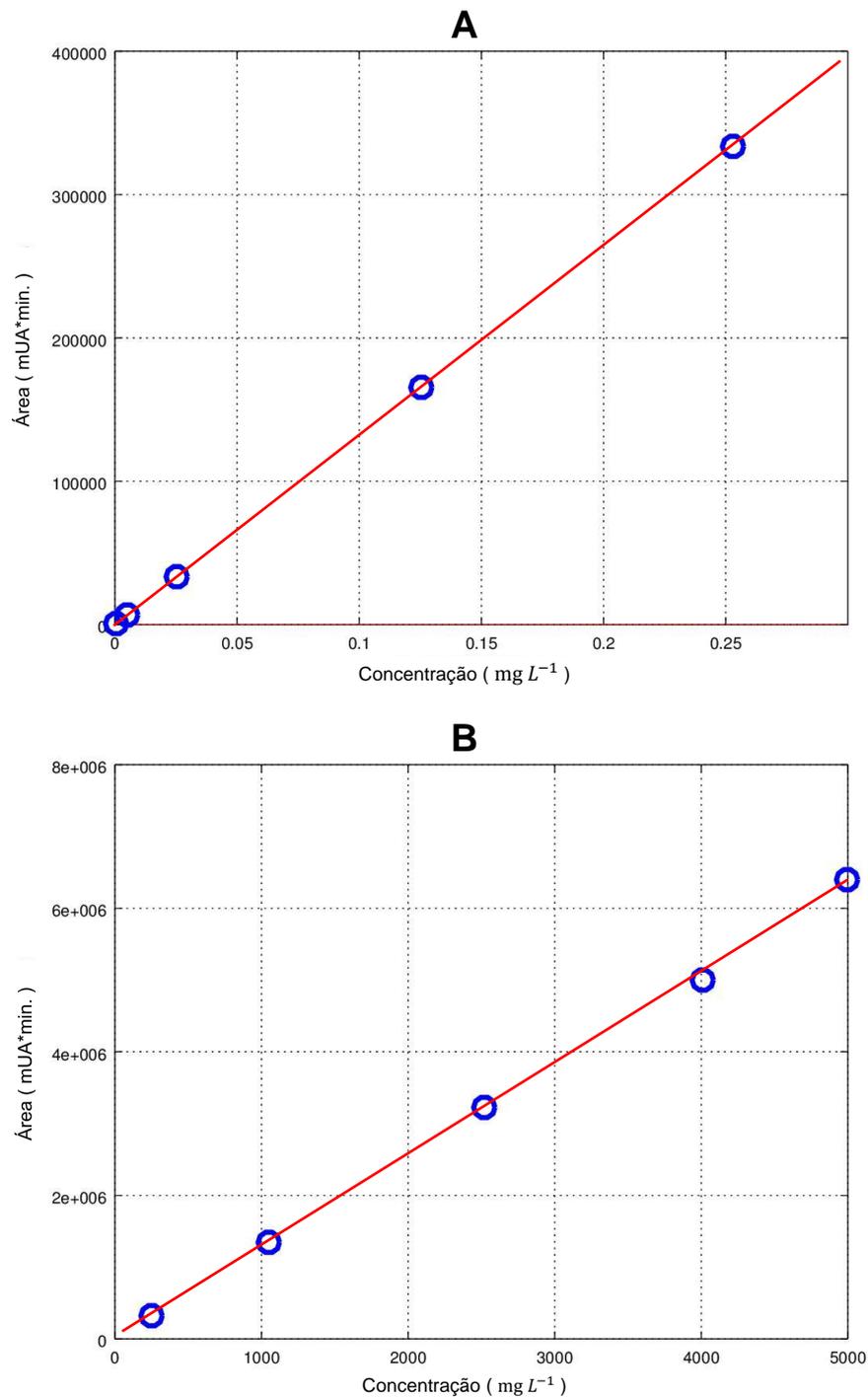


Figura 4.9: Retas de calibração dos padrões em (A) Steviosídeo e em (B) Rebaudiosídeo A. Ambas as retas foram ajustadas por função polinomial de primeiro grau, P_{01} .

A equação da reta de calibração obtida para Stev é dada pela equação 4.1, com coeficiente de determinação $R^2 = 1.000$; enquanto que a reta de calibração obtida para RebA é dada pela equação 4.2, com $R^2 = 0.9995$.

$$y = 72(33) + 1.31852(0.00026)e3 \cdot x \quad (4.1)$$

$$y = 0.6(5.1)e4 + 1.268(0.016)e3 \cdot x \quad (4.2)$$

4.2.4.3 Avaliação de valores discrepantes

Para se efetuar a avaliação de eventuais valores discrepantes na curva de calibração usou-se a regressão robusta para gerar uma listagem ordenada de eventuais valores a testar⁵ que serão sucessivamente avaliados pelo teste de Mandel (equação 2.22). Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4.11.

Tabela 4.11: Estimativas obtidas na avaliação de valores discrepantes por regressão robusta e teste de Mandel, sendo que SS representa a soma de quadrados, ndf o número de graus de liberdade e σ_{fit} o desvio padrão do ajuste.

Param.	Stev		RebA	
	Todos	[-P4]	Todos	[-P5]
SS	9.5e3	3.9e3	1.2e10	4.1e9
ndf	3	2	3	2
σ_{fit}	56	44	6.4e4	4.5e4
	TV	2.91	TV	4.00
	$p-value$	0.230	$p-value$	0.184

Conforme a tabela 4.11 indica, os valores mais desviados a testar foram o padrão P4 no caso de Stev e o padrão P5 no caso de RebA. Os valores de prova obtidos em ambos os casos ($p-value = 0.230$ e 0.184) confirmam que estes valores devem ser mantidos na curva de calibração, dado que superam o valor limite de referência $\alpha = 0.01$.

Calcularam-se os parâmetros de sensibilidade pontual (equação 2.56) e a taxa de recuperação (equação 2.63) para avaliar cada réplica dos padrões de Steviosídeo e de Rebaudiosídeo

A. Os valores obtidos encontram-se sistematizados na tabela 4.12.

⁵Dado que a regressão robusta é muito insensível a valores discrepantes, através da diferença absoluta entre o valor da variável dependente e o valor previsto pelo modelo consegue-se criar uma listagem ordenada (no sentido decrescente) dos valores mais desviados, cuja eventual remoção deve ser testada sucessivamente até o teste de Mandel não acusar anomalia.

Tabela 4.12: Valores de sensibilidade relativa ($\%Sens$) e recuperação relativa ($\%RecX$) obtidos para cada réplica dos padrões de Steviosídeo e de Rebaudiosídeo A.

Param.	Analito	P11	P12	P21	P22	P31	P32	P41	P42	P51	P52
$\%Sens$	Stev	102.4	103.6	102.8	100.7	100.8	99.7	99.1	99.6	100.1	100.2
	RebA	101.5	102.0	100.9	101.1	100.8	101.0	98.4	98.3	100.9	101.1
$\%RecX$	Stev	104.8	104.1	104.3	102.2	101.1	100.0	99.2	99.6	100.1	100.2
	RebA	99.7	100.2	100.5	100.7	100.7	100.9	98.2	98.2	100.9	101.0

$\%Sens$ - avalia a sensibilidade pontual da resposta y_i à concentração do analito x_i

$\%RecX$ - avalia a proximidade do valor de concentração estimada x_i^* à concentração x_i

Em termos de sensibilidade pontual, os valores obtidos situam-se entre $\%Sens(Stev) = 100.9(1.5)$ e $\%Sens(RebA) = 100.6(1.2)$, ficando sempre dentro dos limites de $\pm 5\%$ (entre 95 e 105 %), em ambos os casos. Já no que respeita à recuperação, os valores obtidos também são muito próximos da situação ideal ($\%RecX(Stev) = 101.6(2.1)$ e $\%RecX(RebA) = 100.1(1.1)$), nunca excedendo os mesmos limites de $\pm 5\%$ em relação ao valor de referência.

4.2.5 Limiares e gama analítica

Dado que não foram realizadas réplicas de branco, segundo as normas ISO, a forma mais correta de determinar os limiares analíticos é através das estimativas da reta, b_0 e b_1 . Para isso, é fundamental avaliar o significado estatístico dos parâmetros. Caso esta hipótese não seja possível, calculam-se os limiares através do desvio padrão do ajuste (σ_{fit}).

4.2.5.1 Significado estatístico dos parâmetros

As estimativas dos parâmetros b_0 e b_1 obtidas para ambos os analitos encontram-se na tabela 4.13.

Tabela 4.13: Estimativas obtidas para o conjunto de dados validado para os analitos Steviosídeo e Rebaudiosídeo A.

Param.	Steviosídeo					Rebaudiosídeo A				
	Valor	SE	%RSE	TV	p-value	Valor	SE	%RSE	TV	p-value
b_0	72	33	45.5	2.20	0.115	5.8e3	5.1e4	874	0.11	0.916
b_1	1.3e3	0.26	0.0197	5076.21	0.000	1.3e3	16	1.28	78.23	0.000

Através do teste t -Student, comparou-se o valor obtido para cada parâmetro com o valor de referência ($X_{ref} = 0$). Para Stev obteve-se $p[b_0] = 0.115$ e $p[b_1] = 0.000$, pelo que apenas

b_1 apresenta significado estatístico; enquanto que para RebA se obteve $p[b_0] = 0.916$ e $p[b_1] = 0.000$, pelo que b_0 também não tem significado estatístico e não pode ser usado no cálculo de limiares analíticos.

4.2.5.2 Cálculo dos limiares analíticos

Dado que não se possuía informação sobre brancos e ainda atendendo a que a ordenada na origem (parâmetro b_0) não apresentava significado estatístico, os limiares analíticos (limite de deteção, X_{LD} , e de quantificação, X_{LQ}) foram avaliados através do desvio padrão do ajuste (σ_{fit}), de acordo com as equações 2.66 e 2.70.

A tabela 4.14 apresenta as estimativas obtidas para os analitos estudados, onde X_1 diz respeito ao padrão de concentração mais baixa e X_N ao padrão de concentração mais elevada (em mg L^{-1}).

Tabela 4.14: Limiares analíticos obtidos para cada um dos analitos em estudo.

Stev					RebA				
X_{LD}	X_1	X_{LQ}	X_2	X_N	X_{LD}	X_1	X_{LQ}	X_2	X_N
0.20	0.51	0.60	5.1	2.0e2	2.4e2	2.5e2	7.1e2	1.1e3	5.0e3

Pela análise dos valores obtidos (tabela 4.14), pode-se afirmar que para ambos os analitos nos encontramos numa situação não ideal, mas que é aceitável, onde o padrão de concentração mais baixa se situa entre o limite de deteção e o limite de quantificação e o segundo padrão já se encontra dentro da gama de quantificação.

4.2.5.3 Gama analítica

A gama analítica é definida pelo intervalo de concentrações desde o limite de quantificação (X_{LQ}) até ao padrão de concentração mais elevada (X_N).

Assim, a gama analítica para o analito Steviosídeo é [0.60 a 2.0e2] mg L^{-1} , estendendo-se por 2.6 ordens de grandeza⁶; enquanto que para o analito RebA a gama analítica é definida pelo intervalo [7.1e2 a 5.0e3] mg L^{-1} , estendendo-se por 0.85 ordens de grandeza⁷. Deste modo,

⁶A amplitude da gama de trabalho pode ser traduzida através da ordem de grandeza dessa amplitude estimada através da expressão matemática $\log_{10}(203/0.602) = 2.62$.

⁷A amplitude da gama de trabalho pode ser traduzida através da ordem de grandeza dessa amplitude estimada através da expressão matemática $\log_{10}(4995/714.0) = 0.845$.

pode-se afirmar que existe boa linearidade em ambos os casos, ainda que para Steviosídeo se tenha uma melhor linearidade do que para Rebaudiosídeo A.

4.2.6 Quantificação

Na figura 4.10 encontram-se representados os cromatogramas das amostras da matéria prima em estudo, cujos dados se encontram na tabela 4.10.

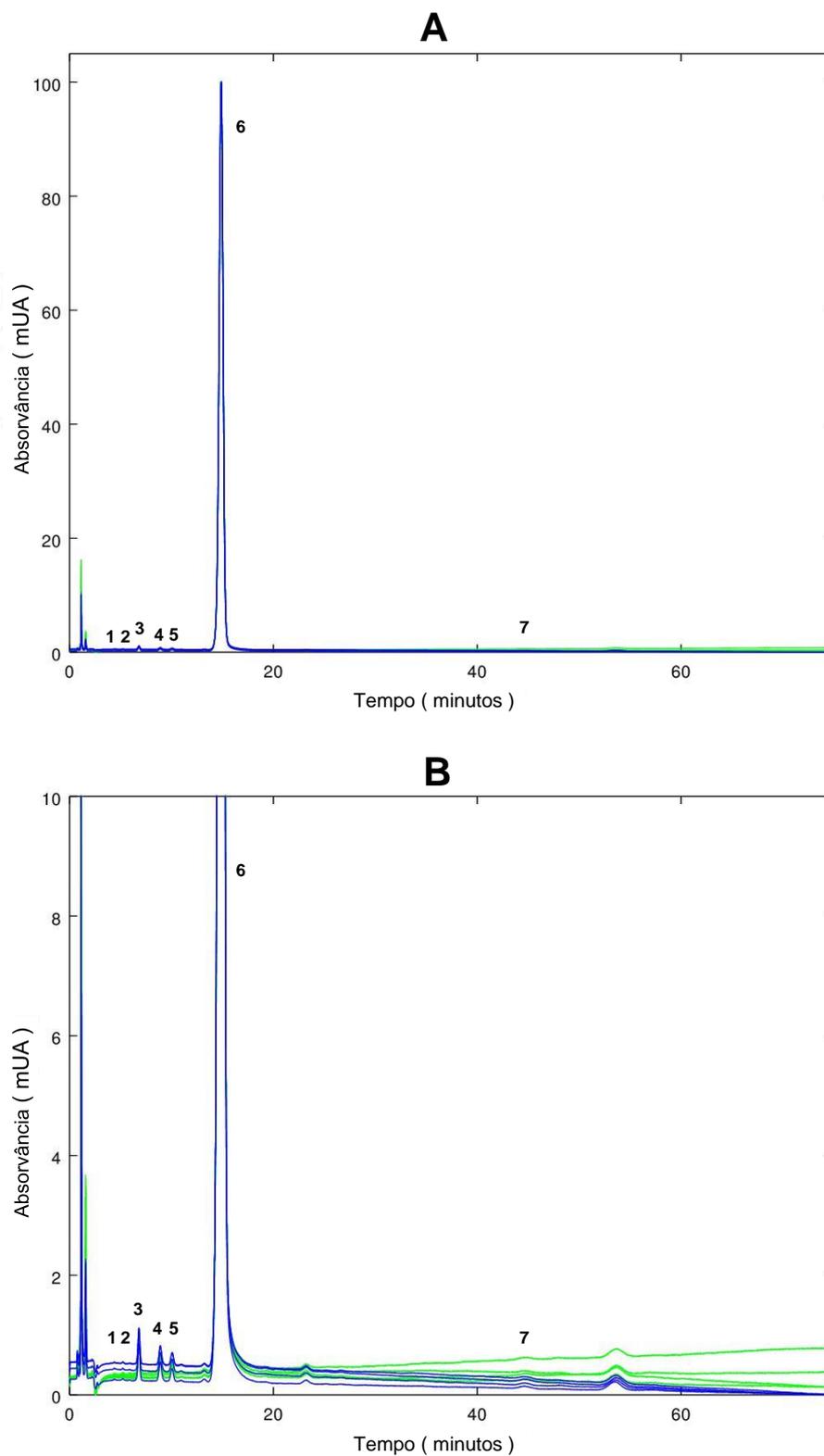


Figura 4.10: Cromatogramas das amostras A1 (a verde) e A2 (a azul) da matéria prima *Stevia* numa (A) escala normal e (B) numa escala ampliada no eixo das ordenadas. Os sinais cromatográficos integrados encontram-se numerados, sendo: 1 - Rubusosídeo ($R_T = 2.7$ min.), 2 - Dulcosídeo A ($R_T = 4.4$ min.), 3 - Steviosídeo ($R_T = 6.8$ min.), 4 - Rebaudiosídeo C ($R_T = 8.9$ min.), 5 - Rebaudiosídeo F ($R_T = 10.1$ min.), 6 - Rebaudiosídeo A ($R_T = 14.9$ min.), 7 - Rebaudiosídeo D ($R_T = 44.5$ min.).

Pela análise dos cromatogramas da figura 4.10, todos os sinais definidos pela metodologia analítica (FCC7-USP) foram identificados nas amostras de *Stevia*, à exceção dos glicosídeos Stevioldiosídeo e Rebaudiosídeo B. Na tentativa de verificar se os sinais que surgem sistematicamente a $R_T \simeq 23.24$ e $R_T \simeq 53.63$ min. e dado que as condições são em tudo idênticas às estipuladas pela metodologia analítica FCC7-USP, compararam-se estes tempos de retenção com os tempos de retenção teóricos dos glicosídeos que não foram identificados (ver tabela 3.4). Após validação das estimativas pelo teste de Grubbs ($TV(G) = 1.61$ e 1.77 para o primeiro e segundo tempos de retenção sistemático, respetivamente, com $G_{0.05(8)} = 2.13$), efetuou-se um teste t -Student para as comparar com os valores teóricos, obtendo-se que estes sinais sistemáticos não correspondem aos glicosídeos não identificados Stevioldiosídeo e Rebaudiosídeo B ($p[R_T = R_{T(ref)}] = 0.000$ para ambos os casos), podendo, no entanto, corresponder a outros glicosídeos derivados dos compostos em solução que não são do interesse desta metodologia. Esta questão deve ser abordada com maior detalhe numa próxima ocasião.

Quantificaram-se as amostras de ambas as concentrações, sendo que os resultados se encontram resumidos na tabela 4.15, onde X_a representa a concentração da amostra (mg L^{-1}), Y_a o sinal da amostra ($\text{mUA} \cdot \text{min.}$) e $IC_{0.05}$ o intervalo de confiança a 95 % para essa amostra.

Tabela 4.15: Valores obtidos na quantificação de amostras de *Stevia* para o ensaio de doseamento (RebA) e para o ensaio de impurezas e glicosídeos relacionados (Stev).

Amostra	RebA				Stev			
	Y_a	X_a	$SE(X_a)$	$IC_{0.05}$	Y_a	X_a	$SE(X_a)$	$IC_{0.05}$
A1 1	3340282	2630	31	87	9467	7.125	0.031	0.086
A1 2	3255322	2563	31	87	9456	7.116	0.031	0.086
A2 1	6442793	5077	46	127	18472	13.954	0.030	0.084
A2 2	6446869	5080	46	127	18759	14.172	0.030	0.084

Para o analito RebA, as amostras A1 encontram-se dentro da gama analítica e concordantes entre si, enquanto que as amostras A2 também se encontram muito concordantes entre si, mas estão fora da gama analítica calculada. Deste modo, as amostras A2 não são uma boa escolha para o ensaio de doseamento⁸, já que estão num extremo da gama analítica e podem, por qualquer falha ou interferência analítica, sair fora do intervalo aceitável para quantificação. A metodologia analítica da USP refere esta concentração como a que deve ser usada em ensaios

⁸De realçar que as amostras de concentração 5000 mg L^{-1} são as mencionadas pela metodologia analítica proposta pela USP e, por isso, foram testadas nesse sentido.

de doseamento. No entanto, fica comprovado que amostras de concentração mais próxima do centro da gama de calibração são mais corretas e fiáveis. Assim, internamente, alterou-se a metodologia analítica para uma concentração de 2500 mg L⁻¹ nos ensaios de doseamento.

O valor de doseamento a reportar é de $2.596 \pm [0.087]e3$ mg L⁻¹ que equivale a um teor de RebA de 103.0 %. Como a USP define os intervalos de aceitação em base anidra, é fundamental corrigir o teor obtido subtraindo o teor de humidade determinando previamente por KF ($\%H(KF) = 3.470 (0.067)$), obtendo-se $\%DOS = 99.557 (0.095)$. Este valor encontra-se dentro da gama de aceitação ([97.0 a 103.0] %) e muito próximo do centro desse intervalo, pelo que o ensaio é válido.

Quanto ao ensaio de impurezas (onde o analito principal é Stev), as amostras A1 e A2 encontram-se dentro da gama analítica e muito concordantes entre si. Obtiveram-se os resultados $\%IMP_{Stev}(A1) = 7.121 \pm [0.086]$ mg L⁻¹ e $\%IMP_{Stev}(A2) = 14.063 \pm [0.084]$ mg L⁻¹, que correspondem a um teor de Stev de 0.28 % em ambos os casos, se considerarmos um teor percentual. Assim, para os restantes glicosídeos identificados nas soluções amostra, usou-se a equação 3.6 para determinar a sua concentração (%Teor) em cada uma das amostras, tendo-se obtido os resultados que se encontram na tabela 4.16.

Tabela 4.16: Resultados percentuais de impurezas e glicosídeos relacionados nas soluções amostra A1 e A2 da matéria prima *Stevia*, onde Y_a representa o sinal (mAU*min.) e X_a a concentração (mg L⁻¹).

Analito	A1					A2				
	R_T	RR_T	Y_a	X_a	%Teor	R_T	RR_T	Y_a	X_a	%Teor
Rubusosídeo	2.7	0.18	555	0.37	0.01	2.7	0.18	1209	0.86	0.02
Dulcosídeo A	4.4	0.30	464	0.30	0.01	4.4	0.30	683	0.46	0.01
Steviosídeo	6.8	0.46	9461	7.1	0.28	6.8	0.46	18615	14.1	0.28
Rebaudiosídeo C	8.9	0.60	6733	5.1	0.20	8.9	0.60	13467	10.2	0.20
Rebaudiosídeo F	10.1	0.68	4863	3.6	0.15	10.1	0.68	9031	6.8	0.14
Stevioldiosídeo	ND	ND	--	--	--	ND	ND	--	--	--
Rebaudiosídeo D	ND	ND	--	--	--	44.5	3.0	6212	4.66	0.09
Rebaudiosídeo B	ND	ND	--	--	--	ND	ND	--	--	--
Total:					0.66	0.74				

Pela análise da tabela 4.16, pode-se afirmar que se obteve %Teor= 0.66 e 0.74 para A1 e A2, respetivamente. Estes valores encontram-se dentro do critério definido pela USP (%Teor < 3.0 %), pelo que as estimativas são válidas.

No entanto, também pela análise da tabela 4.16, pode-se afirmar que a amostra A2 é

mais adequada ao ensaio de impurezas e substâncias relacionadas do que a amostra A1, uma vez que um dos glicosídeos (Rebaudiosídeo D) não é identificado em A1 (mais diluída, 2500 mg L⁻¹), mas aparece em A2 (mais concentrada, 5000 mg L⁻¹), interferindo no valor total de %Teor calculado. Nos ensaios de impurezas é fulcral ir de encontro à “lei do pior caso”, isto é, é fundamental que se identifiquem e quantifiquem o maior número de impurezas possível, garantindo uma maior segurança na qualidade do produto ou matéria prima em análise. Assim, internamente, optou-se por se usar amostras de *Stevia* de concentração 5000 mg L⁻¹ nos ensaios de impurezas.

4.2.7 Sensibilidade

Uma vez que a sensibilidade de um método pode ser determinada através do quociente entre a variação do sinal obtido e a variação do teor do analito (equação 2.71), pode-se afirmar que a sensibilidade não é mais do que o declive da reta de calibração obtida (m) para cada um dos analitos em estudo.

Assim, as sensibilidades obtidas foram $m(Stev) = 1.31852 (0.00026)e3 \text{ mUA} \cdot \text{min}/\text{mg L}^{-1}$ e $m(RebA) = 1.268 (0.016)e3 \text{ mUA} \cdot \text{min}/\text{mg L}^{-1}$. Estes valores revelam uma elevada sensibilidade do método, dado que é necessária uma variação muito pequena no teor do analito (x) para que ocorra grande variação na resposta do sinal medido (y).

4.2.8 Precisão

Para avaliar a precisão calculou-se o valor de %CV de acordo com a equação 2.72 e perante os resultados obtidos para cada uma das amostras (ver tabela 4.15).

Para Steviosídeo, entre amostras A1 obteve-se %CV = 0.087, enquanto que para as amostras A2 se obteve %CV = 1.1; já para RebA, obteve-se %CV = 1.8 e %CV = 0.045 para as amostras A1 e A2, respetivamente.

Como todos os valores estão abaixo do limite aceitável (2.0 %), pode-se afirmar que os resultados obtidos são precisos.

4.2.9 Exatidão

Durante o período de tempo disponível não foi possível avaliar devidamente este parâmetro de desempenho - não estava disponível nenhum tipo de CRM ou SRM alternativo referente

a RebA e Stev. Neste período decorrido também ainda não houve condições para efetuar validação por via externa como, por exemplo, através de um ensaio interlaboratorial.

No entanto, prepararam-se amostras cegas (de 1^a ordem) com base nas amostras da matéria prima *Stevia* e procurou-se efetuar a sua quantificação de forma a poder estimar a ordem de grandeza do erro relativo.

Para o analito Stev, obtiveram-se os valores $\%RE = 1.7$ e $\%RE = 0.78$ para as amostras A1 e A2, respetivamente; enquanto que para RebA se obteve $\%RE = 0.34$ para A1 e $\%RE = 1.0$ para A2. Como o valor máximo aceitável para esta estimativa é de 2.0 %, pode-se afirmar que os resultados obtidos são válidos para ambos os analitos.

4.2.10 Coerência

Compararam-se os resultados obtidos neste trabalho com os resultados obtidos por outro analista à mesma matéria prima, nas mesmas condições laboratoriais e em períodos temporais distintos. A tabela 4.17 apresenta o registo desses resultados entre analistas.

Tabela 4.17: Resultados obtidos entre analistas numa análise da matéria prima *Stevia* para amostras de doseamento (analito RebA) e impurezas (analito Stev), sendo que C_{RebA} designa a concentração do analito Rebaudiosídeo A em mg L^{-1} e C_{Stev} a concentração do analito Steviosídeo em mg L^{-1} .

	Analista 1		Analista 2	
	C_{RebA}	C_{Stev}	C_{RebA}	C_{Stev}
A1 1	2620	13.90	2531	12.43
A1 2	2640	14.01	2536	12.95
A2 1	2564	14.09	2489	12.33
A2 2	2561	14.25	2508	12.56

Começou por se verificar a existência de algum valor discrepante no conjunto de dados através do teste de Grubbs. Para as amostras de doseamento obteve-se $TV(G) = 1.10$ para o analista 1 e $TV(G) = 1.24$ para o analista 2; enquanto que para as amostras de impurezas se obteve $TV(G) = 1.26$ para o analista 1 e $TV(G) = 1.40$ para o analista 2. Como o valor crítico, $G_{0.05(4)} = 1.48$, não foi excedido em ambos os casos, então não existem *outliers* ao nível de significância de 0.05.

Para ambos os ensaios existe homogeneidade da variância: $TV = 3.36$ e $p\text{-value} = 0.346$ para as amostras de doseamento e $TV = 3.43$ e $p\text{-value} = 0.338$ para as amostras de impurezas.

A comparação direta das estimativas obtidas através de um teste t -Student permitiu obter $TV(RebA) = 1.77$ enquanto $TV(Stev) = 4.84$ na comparação dos resultados obtidos por ambos os analistas, o que levou à conclusão de que eles concordam no ensaio de doseamento ($p\text{-value} = 0.127$), mas discordam no ensaio de impurezas ($p\text{-value} = 0.003$).

Efetuuou-se ainda um teste ANOVA de fator único e obteve-se $TV = 0.54$ com uma probabilidade de aceitação da hipótese nula de 68.2 % para as amostra de doseamento e $TV = 93.11$ com $p[H_0] = 0.000$ para as amostras de impurezas, pelo que se pode afirmar que a resposta entre analistas é muito semelhante no ensaio de doseamento, mas é totalmente distinta no que ao ensaio de impurezas diz respeito.

Pode-se afirmar, portanto, que os analistas não possuem coerência entre resultados reportados. Esta situação de não conformidade deve ser averiguada com maior detalhe numa próxima ocasião.

4.2.11 Adequabilidade do sistema

A metodologia analítica FCC7-USP refere que há parâmetros que devem obedecer a determinados critérios aceitação como forma de adequabilidade do sistema (*System Suitability*), tanto em ensaios de doseamento como na determinação de impurezas e glicosídeos relacionados.[58]

Para o ensaio de doseamento, esses critérios devem ser tidos em conta no padrão de concentração mais elevada (P5) de RebA, nomeadamente: $\%CV(A)$ e $\%CV(R_T)$ inferior ou igual a 2.0 %, R_T inferior a 15.0 min e F_S inferior ou igual a 2.0 unidades. No ensaio de impurezas, no padrão de concentração mais elevada (P5) de Stev, o valor da razão sinal-ruído (S/N) deve ser superior a 3.0 unidades.

Os resultados obtidos para estes parâmetros encontram-se resumidos na tabela 4.18.

Tabela 4.18: Valores obtidos para os parâmetros necessários à adequabilidade do sistema no ensaio de doseamento (P5 de RebA) e no ensaio de impurezas (P5 de Stev).

	Doseamento			Impurezas
	R_T (min.)	A (mAU*min.)	F_S	S/N
P5 1	14.9067	6393674	0.9300	3.6
P5 2	14.9033	6402814	0.9303	5.3
\bar{x}	14.9050	6398244	0.93015	4.4
σ_x	0.0024	6463	0.00021	1.2

De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que a análise cumpre todos os requisitos de adequabilidade do sistema para ambos os ensaios, uma vez que: $\%CV(R_T) = 0.016$, $\%CV(A) = 0.10$, $\bar{x}(R_T) = 14.9050 (0.0024)$ min, $\bar{x}(F_S) = 0.93015 (0.00021)$ e $S/N = 4.4 (1.2)$.

4.3 Método alternativo de determinação do teor de água

Atendendo a que o método KF é relativamente moroso e muito solicitado nas rotinas diárias, pretendeu-se desenvolver um método alternativo para diagnóstico do teor de humidade existente na matéria prima *Stevia* através de análise por FTIR.

Para o efeito, efetuou-se um estudo comparativo de resultados obtidos com $N = 93$ amostras processadas por KF (método de referência) e por FTIR (método alternativo, espectros obtidos entre $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, em $M = 1869$ pontos). Dado que as amostras da matéria prima em causa apresentam, geralmente, valores baixos de humidade, procurou-se obter amostras cujo teor se situava na gama entre 2 e 10 % de humidade. Na figura 4.11 encontram-se representados todos os espectros adquiridos, enquanto na figura 4.12 se representa um histograma de valores obtidos por KF para o teor percentual de humidade das mesmas amostras de *Stevia*.

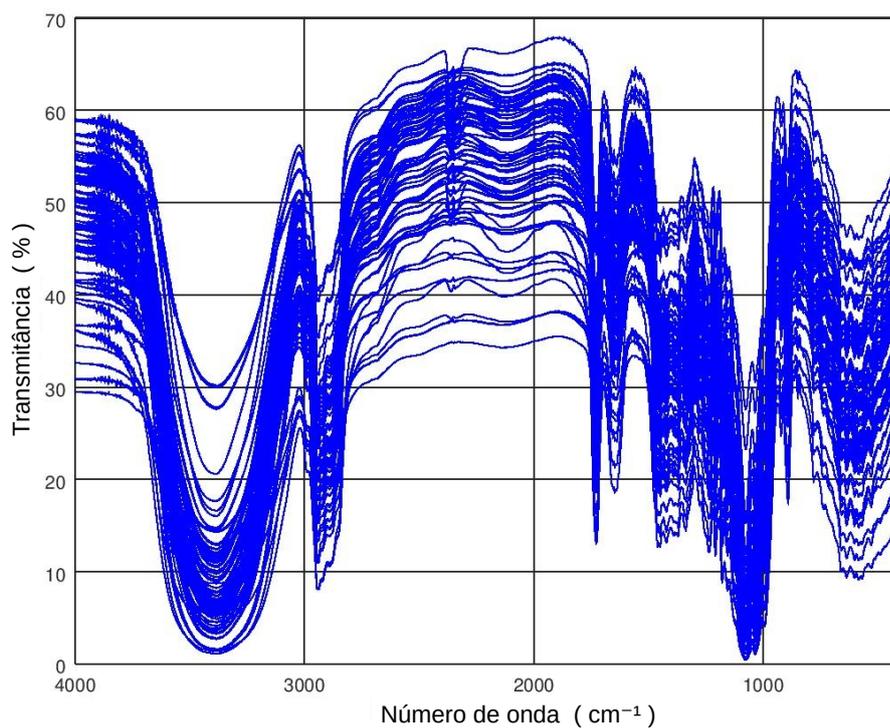


Figura 4.11: Representação dos espectros FTIR obtidos para $N = 93$ amostras da matéria prima *Stevia* com diferentes teores de umidade relativa.

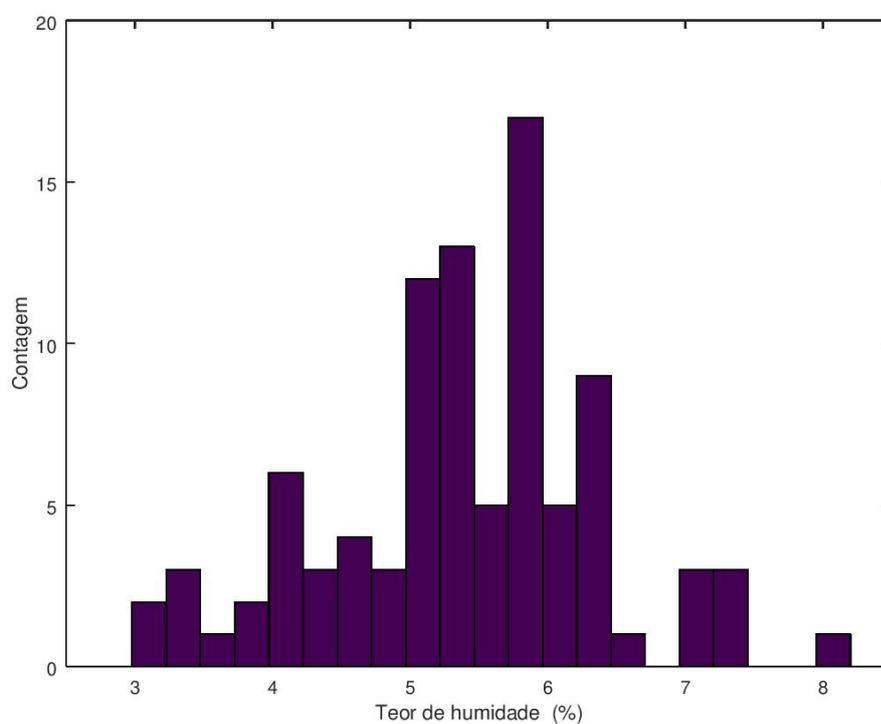


Figura 4.12: Histogramação dos valores obtidos para a taxa de umidade percentual para amostras de *Stevia* obtidas por KF ($N = 93$).

4.3.1 Modelação implícita

Numa primeira abordagem foi efetuado o ajuste dos resultados obtidos por KF (método de referência) em relação à informação espectral colhida por FTIR por mínimos quadrados parciais (PLS). Apenas considerando os primeiros 10 fatores latentes ($f = 10$), obtiveram-se os resultados de diagnóstico que se encontram na tabela 4.19.

Tabela 4.19: Resultados obtidos no diagnóstico do ajuste dos valores da taxa de humidade obtida por KF com os espectros FTIR segundo o método de mínimos quadrados parciais (PLS).

#	V_x	RV_x	RUV_x	$\sum RUV_x$	V_y	RV_y	RJV_y	$\sum RJV_y$	Param
0	8.304e6	100.00	0.00	0.00	92.31	100.00	0.00	0.00	—
1	6.707e6	80.76	19.24	19.24	80.02	86.68	13.32	13.32	3.51
2	0.889e6	10.71	70.05	89.29	77.32	83.76	2.92	16.24	1.64
3	0.058e6	0.70	10.02	99.30	62.34	67.53	16.23	32.47	3.87
4	0.026e6	0.31	0.38	99.69	59.90	64.88	2.64	35.12	1.56
5	0.017e6	0.20	0.11	99.80	56.12	60.79	4.09	39.21	1.94
6	0.011e6	0.13	0.07	99.87	46.85	50.76	10.04	49.24	3.04
7	0.007e6	0.09	0.04	99.91	31.95	34.61	16.15	65.39	3.86
8	0.006e6	0.07	0.02	99.93	15.76	17.07	17.54	82.93	4.02
9	0.003e6	0.04	0.03	99.96	11.77	12.75	4.32	87.25	2.00
10	0.002e6	0.03	0.01	99.97	4.96	5.38	7.38	94.62	2.61

- número de fatores latentes considerados no modelo PLS; V_x e V_y - variância dos sub-espacos preditor e resposta; RV_x e RV_y - taxa de variância remanescente nos sub-espacos preditor e resposta; RUV_x e RJV_y - percentagem de informação usada e justificada nos sub-espacos preditor e resposta; $\sum RUV_x$ e $\sum RJV_x$ - total de informação usada e justificada nos sub-espacos preditor e resposta; Param - parâmetros do modelo.

Da tabela 4.19 verifica-se que o PLS tem alguma dificuldade em descrever o conjunto inicial de valores ($N = 93$): o primeiro fator latente ($\# = 1$) usa cerca de 19.2 % de informação dos preditores para descrever 13.3 % da resposta; o segundo fator latente ($\# = 2$) consome cerca de 70.0 % do espaço preditor para apenas justificar 2.9 % da resposta; com o oitavo fator latente ($\# = 8$) já se utilizou cerca de 99.9 % de informação dos preditores para apenas justificar cerca de 82.9 % da informação contida na resposta. Esta ineficiência mantém-se, sem grandes alterações, até ao décimo fator latente ($\# = 10$) em que já se consumiu cerca de 100 % da informação contida no espaço preditor para descrever apenas 94.6 % da mesma.

Na figura 4.13 encontra-se representada a resposta PLS global ($f = 10$) em função dos valores obtidos por KF.

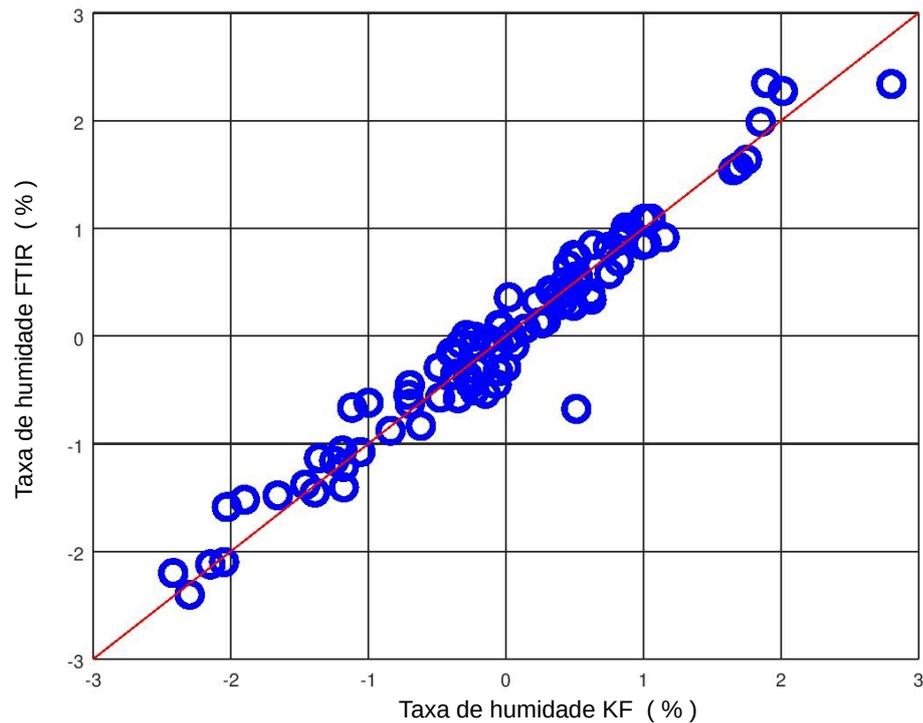


Figura 4.13: Confrontação dos resultados obtidos por KF (taxa de humidade relativa) com os resultados ajustados por FTIR (taxa de humidade relativa). Em ambos os casos, os valores encontram-se centrados.

A linha a vermelho traçada na figura 4.13 representa a situação onde não existe erro sistemático constante (ordenada na origem, $b_0 = 0$) nem proporcional (declive, $b_1 = 1$). Por regressão linear entre os valores previstos por PLS com os valores KF obteve-se $R^2 = 0.9462$, sendo as respetivas estimativas paramétricas, $b_0 = 0.000 (0.024)$ e $b_1 = 0.946 (0.024)$.

No sentido de verificar se existe erro sistemático e qual a sua origem, foram estimados os respetivos valores de prova referentes a $TV[b_0 = 0] = 0.00$ e a $TV[b_1 = 1] = 2.27$, tendo-se obtido os valores de prova $p[b_0 = 0] = 1.000$ e $p[b_1 = 1] = 0.025$, respetivamente. Estes resultados indicam que não existe erro sistemático constante ($b_0 = 0$), mas há uma certa dúvida acerca do erro sistemático proporcional, já que o valor de prova obtido se encontra situado entre 0.05 e 0.01. Contudo, em termos globais, verifica-se que existe uma boa concordância de resultados obtidos entre ambos os métodos, dado que o teste global $TV[b_0 = 0 \wedge b_1 = 1] = 5.17$ conduz ao valor de prova $p[b_0 = 0 \wedge b_1 = 1] = 0.075$, superior a 0.05.

Da figura 4.13 verifica-se que existem alguns valores que parecem ser discrepantes e que, eventualmente, podem condicionar as estimativas efetuadas. Dado o elevado impacto que os valores discrepantes têm sobre as estimativas por mínimos quadrados da dispersão, o desvio

padrão do ajuste ($\sigma_{fit} = 0.227$) não deve ser utilizado como uma estimativa válida para efeito de avaliação de valores discrepantes do ajuste. Assim sendo, optou-se por se usar estimativas mais robustas para a dispersão baseadas na média dos desvios absolutos (AAD) e na mediana dos desvios absolutos (MAD). Com base nas estimativas obtidas ($AAD = 0.0976$ e $MAD = 0.0753$) chegou-se aos valores de $\sigma(AAD) = 0.122$ e $\sigma(MAD) = 0.112$. Com base nestas duas estimativas, marcaram-se como eventuais *outliers* todos os valores que excediam mais de três vezes a respetiva estimativa.

Curiosamente, estas duas estimativas, ligeiramente diferentes, permitiram detetar 9 e 10 eventuais valores discrepantes, respetivamente. Na figura 4.14 encontram-se representados os valores identificados como eventuais valores discrepantes através das estimativas AAD e MAD , assinalados a vermelho.

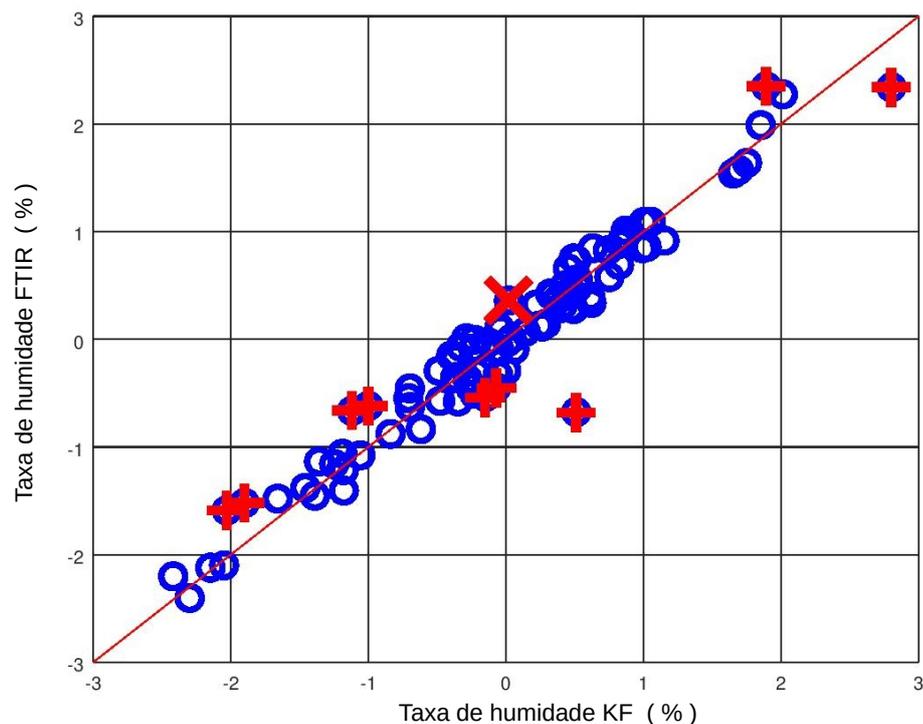


Figura 4.14: Detecção de eventuais valores discrepantes com base em AAD e MAD . Os pontos assinalados a vermelho assinalam os valores discrepantes, sendo o ponto assinalado com “×” o único ponto adicional que foi detetado com MAD .

Após a remoção destes eventuais *outliers*, manteve-se o mesmo tipo de dificuldade no ajuste dos valores da resposta (teor de humidade determinado por KF) por modelação implícita com PLS, uma vez que a qualidade do ajuste em ambos os casos é similar ao caso

inicial: $R^2(AAD) = 0.9446$ e $R^2(MAD) = 0.9500$, assim como as estimativas paramétricas também são similares. Na tabela 4.20 resume-se o desempenho dos modelos PLS na descrição da resposta, antes e após a rejeição de alguns eventuais *outliers*.

Tabela 4.20: Comparação de estimativas relativas à qualidade do ajuste PLS ($f = 10$) em relação aos valores de teor de humidade obtidos por KF.

N	R^2	σ_{fit}	b_0 (σ_{b_0})	b_1 (σ_{b_1})	$p[b_0 = 0]$	$p[b_1 = 1]$	$p[b_0 = 0 \wedge b_1 = 1]$
93	0.9462	0.227	0.000 (0.024)	0.946 (0.024)	1.000	0.025	0.075
84	0.9446	0.212	0.000 (0.023)	0.945 (0.025)	1.000	0.031	0.090
83	0.9500	0.207	0.000 (0.023)	0.948 (0.024)	0.993	0.033	0.094

Dos valores da tabela 4.20, verifica-se que a remoção dos nove e dez *outliers* é benéfica no sentido em que a capacidade de descrição da resposta (R^2) aumenta, bem como as evidências de ausência de erro sistemático constante (b_0) e proporcional (b_1) se tornam melhor definidas. Nas figuras 4.15 e 4.16 encontra-se a representação do ajuste de valores KF com a modelação PLS, após a remoção de nove (*AAD*) e dez (*MAD*) valores discrepantes, respetivamente.

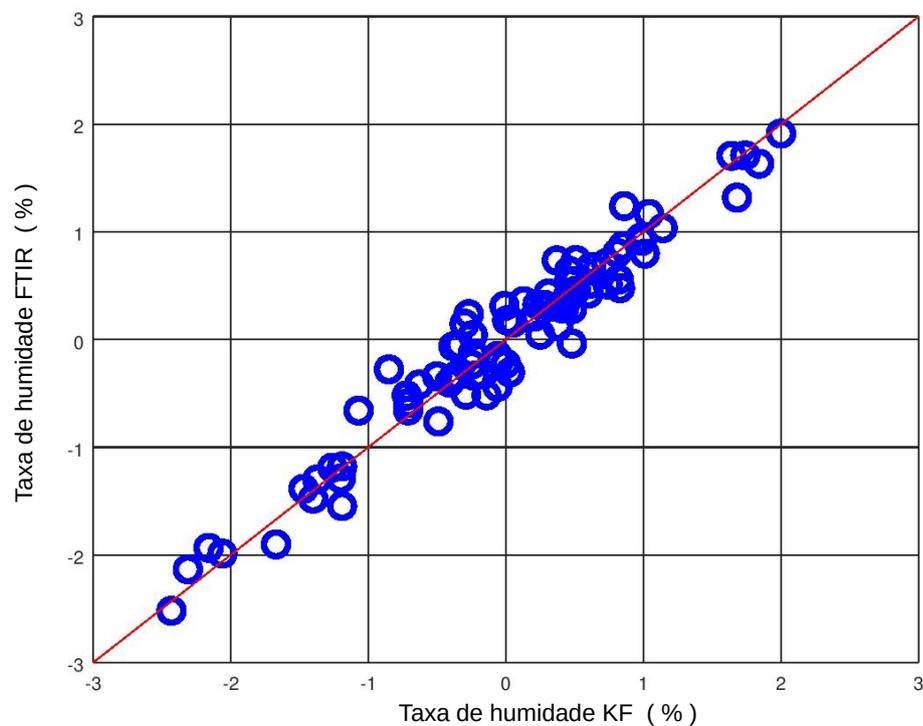


Figura 4.15: Representação dos valores ajustados por PLS para a descrição da resposta (taxa de humidade) obtida por KF após a remoção de 9 *outliers*, detetados por *AAD*.

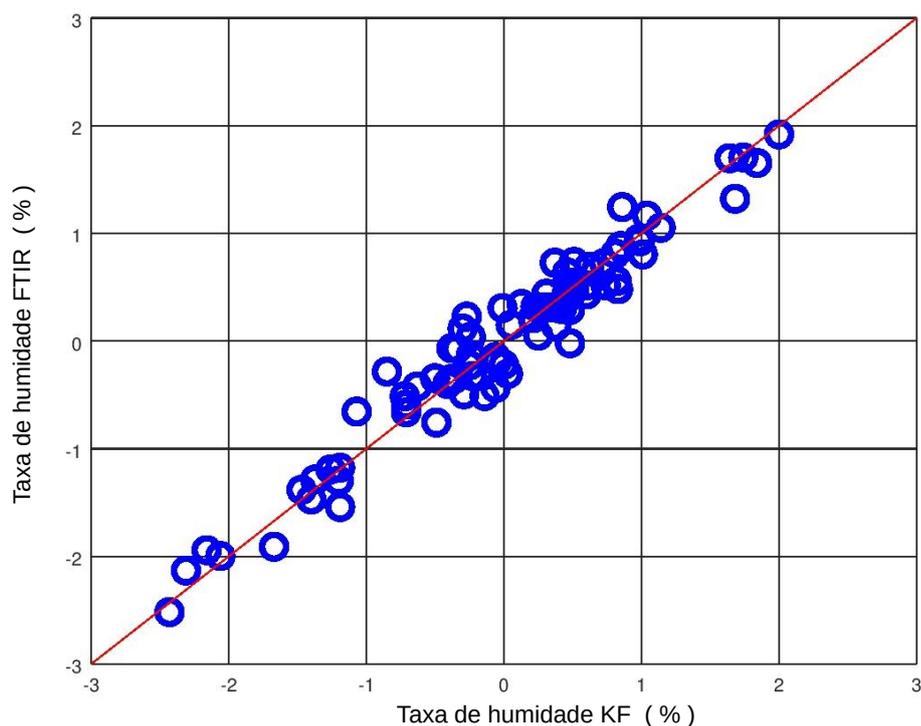


Figura 4.16: Representação dos valores ajustados por PLS para a descrição da resposta (taxa de humidade) obtida por KF após a remoção de 10 *outliers*, detetados por *MAD*.

Comparando as figuras 4.15 e 4.16 com a figura 4.13, verifica-se que a capacidade de descrição PLS da resposta KF melhorou significativamente à custa de um ligeiro encurtamento da gama analítica.

4.3.2 Modelação explícita

A modelação implícita com PLS é uma maneira robusta e não supervisionada de efetuar a descrição da resposta com base numa panóplia imensa de preditores. Contudo, o conceito de “fator latente” não apresenta, por vezes, o significado físico-químico necessário à boa interpretação dos resultados. Assim, optou-se por efetuar a modelação multivariada através da busca direta de conjuntos de preditores com melhores potencialidades para a descrição da resposta. Para este processo iniciou-se com duas abordagens: baseada nos melhores resultados PLS ($N = 83$) e baseado na correlação direta entre preditor e resposta.

4.3.2.1 Preditores detetados por PLS

Multiplicando a matriz das “loadings” do sub-espço predictor ($\mathbf{P}_{(m \times f)}$) pela respetiva quantidade de informação que é descrita nos f fatores latentes em causa, consegue-se evidenciar os preditores que mais contribuem para descrever a resposta em cada fator latente ou no global, por exemplo, considerando os $f = 10$ primeiros fatores latentes consecutivos.

Considerando o caso em que foram removidos os valores anómalos ($N = 83$), e atendendo ainda aos valores da tabela 4.19, na figura 4.17 estão representados por ordem decrescente de impacto os preditores mais relevantes detetados por PLS através dos primeiros $f = 10$ fatores latentes.

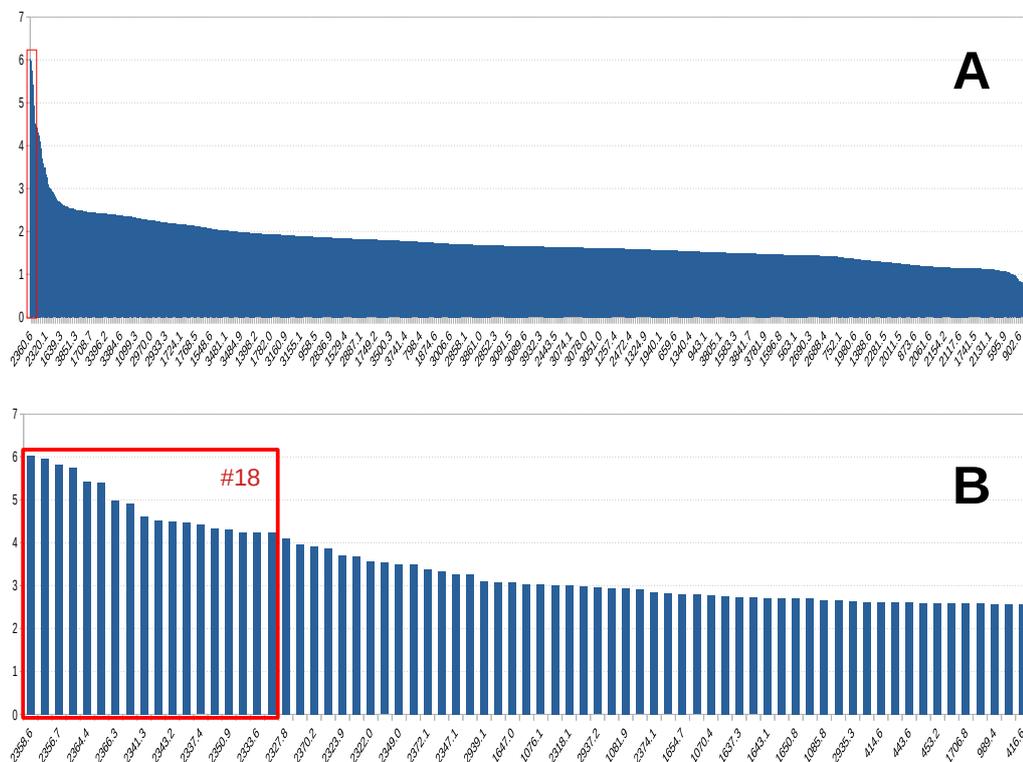


Figura 4.17: Representação da relevância da série de $M = 1868$ variáveis predictoras em relação aos primeiros $f = 10$ fatores latentes. (A) Distribuição por ordem decrescente de relevância; (B) destaque das 80 variáveis mais relevantes.

Por inspeção da parte esquerda, onde se localizam os valores mais elevados, figura 4.17 parte B, verifica-se que os primeiros dezoito valores parecem ser capazes de melhor descrever a resposta em causa. Na tabela 4.21 encontram-se listados, por ordem decrescente, os vinte primeiros valores.

Tabela 4.21: Listagem do impacto dos primeiros vinte preditores que melhor descrevem a resposta, por ordem decrescente de relevância.

#	Preditor	n.o. (cm^{-1})	Relevância	#	Preditor	n.o. (cm^{-1})	Relevância
1	x1017	2358.6	6.0338	11	x1009	2343.2	4.5057
2	x1018	2360.6	5.9671	12	x1022	2368.3	4.4666
3	x1016	2356.7	5.8239	13	x1006	2337.4	4.4154
4	x1019	2362.5	5.7542	14	x1005	2335.5	4.3335
5	x1020	2364.4	5.4243	15	x1013	2350.9	4.3091
6	x1015	2354.8	5.4128	16	x1002	2329.7	4.2417
7	x1021	2366.3	4.9937	17	x1004	2333.6	4.2409
8	x1014	2352.8	4.9208	18	x1003	2331.6	4.2381
9	x1008	2341.3	4.6114	19	x1001	2327.8	4.0937
10	x1007	2339.3	4.5213	20	x1010	2345.1	3.9599

- ordem de relevância; n.o. - número de onda

Da tabela 4.21 é curioso notar que os números de onda encontrados como melhores preditores para o teor de humidade dado pelo método KF possuem números de onda que se encontram numa faixa estreita de apenas 38.6 cm^{-1} , situados mais concretamente entre 2329.7 e 2368.3 cm^{-1} .

Na figura 4.18 encontram-se sobrepostas com os espetros FTIR das $N = 93$ amostras as 18 variáveis mais relevantes (marcadas com linhas vermelhas verticais) sugeridas por PLS.

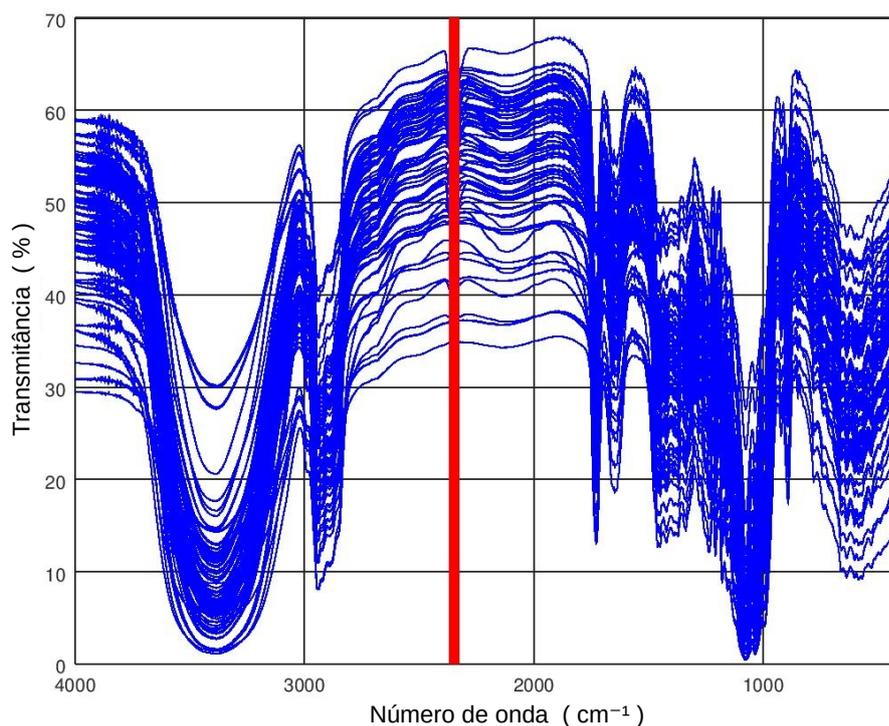


Figura 4.18: Sobreposição das variáveis relevantes identificadas por PLS (traços verticais a vermelho) com os $N = 93$ espectros FTIR.

De acordo com o conhecimento prévio, esperava-se que a banda $3200 - 3500 \text{ cm}^{-1}$, onde a molécula de água absorve com maior intensidade (figura A.2), fosse a mais ativa neste processo de modelação. Procurando outras atribuições possíveis, nenhuma era coincidente com a região espectral evidenciada.

4.3.2.2 Preditores detetados por correlação

Numa abordagem mais simplista, efetuou-se a correlação direta dos $M = 1868$ preditores com a resposta, utilizando apenas as $N = 83$ amostras melhor comportadas.

Seguindo uma estratégia similar à anteriormente praticada para seleção de preditores mais relevantes, ordenou-se cada preditor em relação ao valor de correlação de Pearson, conforme mostra a figura 4.19.

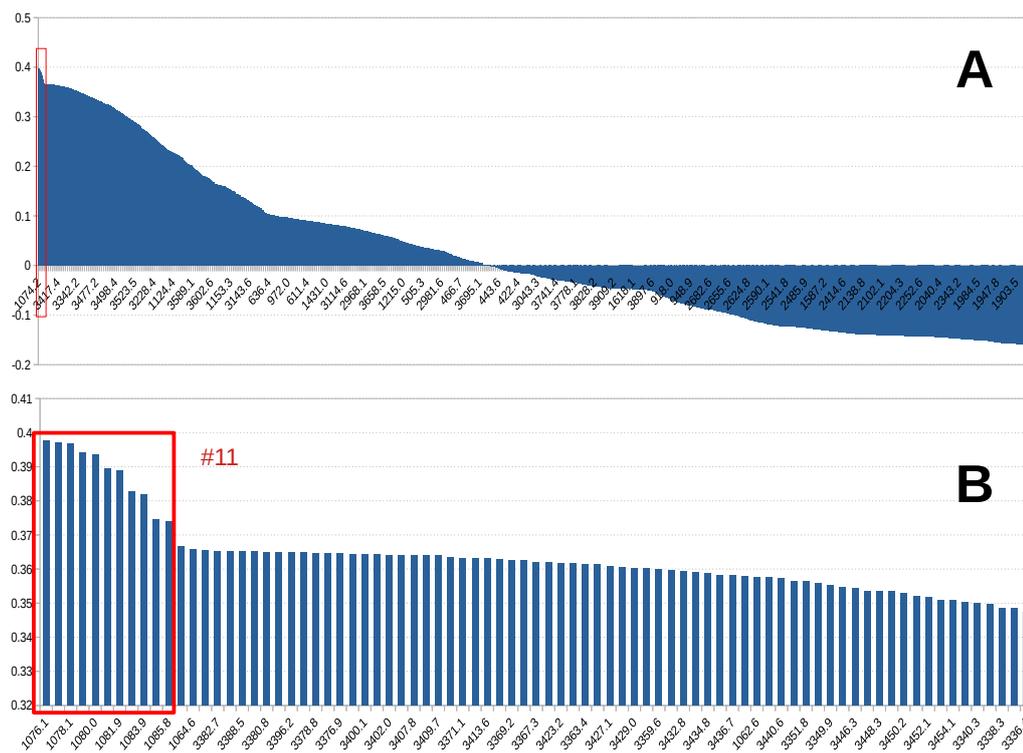


Figura 4.19: Representação da relevância da série de $M = 1868$ variáveis predictoras em relação à correlação direta com a resposta. (A) Distribuição por ordem decrescente de relevância; (B) destaque das 80 variáveis mais relevantes.

Neste caso, em relação à correlação, os valores aparentam variar mais uniformemente do que no caso anterior. Contudo, evidencia-se um pequeno lote de variáveis (apenas 11) que parecem ser ligeiramente mais relevantes. Na tabela 4.22 listam-se os vinte preditores mais relevantes, detetados por correlação, por ordem decrescente de relevância.

Tabela 4.22: Listagem dos vinte preditores mais relevantes detetados através da correlação direta.

#	Preditor	n.o. (cm^{-1})	Correlação	#	Preditor	n.o. (cm^{-1})	Correlação
1	x0352	1076.1	0.3977	11	x0357	1085.8	0.3741
2	x0351	1074.2	0.3970	12	x0358	1087.7	0.3665
3	x0353	1078.1	0.3967	13	x0346	1064.6	0.3657
4	x0350	1072.3	0.3942	14	x1549	3384.6	0.3654
5	x0354	1080.0	0.3936	15	x1548	3382.7	0.3653
6	x0349	1070.4	0.3896	16	x1550	3386.6	0.3652
7	x0355	1081.9	0.3890	17	x1551	3388.5	0.3652
8	x0348	1068.4	0.3826	18	x1552	3390.4	0.3650
9	x0356	1083.9	0.3819	19	x1547	3380.8	0.3650
10	x0347	1066.5	0.3745	20	x1554	3394.3	0.3650

- ordem de relevância; n.o. - número de onda

Da tabela anterior, verifica-se que os preditores mais relevantes se situam também numa faixa estreita de apenas 19.3 cm^{-1} , compreendida entre 1066.5 e 1085.8 cm^{-1} . Após estes números de onda, começam a surgir outros situados na região $3380.8 - 3394.3 \text{ cm}^{-1}$. Na figura 4.20 representa-se a sobreposição destas duas regiões no conjunto de espectros obtidos.

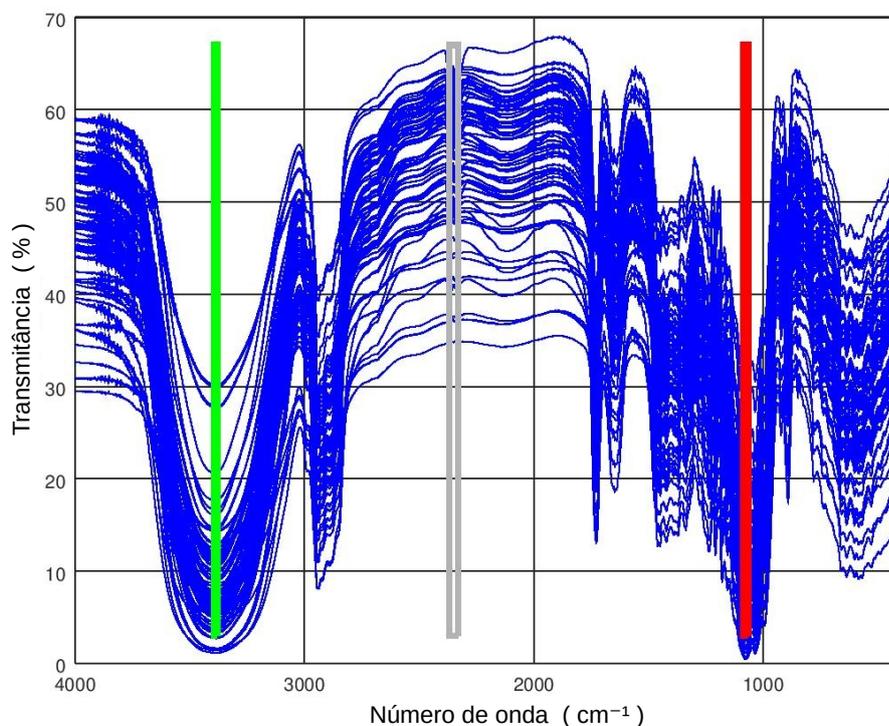


Figura 4.20: Representação das faixas de frequências detetadas como relevantes através da correlação direta com a resposta (teor de humidade obtido pelo método KF). A vermelho as frequências mais relevantes, a verde as secundárias e a cinza as que foram detetadas através de PLS.

4.3.2.3 Modelação multivariada

No sentido de construir modelos de ajuste da resposta, foram utilizados três critérios - coeficiente de determinação (R^2), critério de Akaike (AIC) e critério Bayesiano (BIC). Para iniciação dos modelos, usaram-se os preditores evidenciados como relevantes tanto por PLS como através da correlação direta com a resposta, dado que os valores testados coincidem com as variáveis extremo e central de cada faixa de números de onda identificados anteriormente.

Este tipo de ajuste por pesquisa de novos preditores não resultou nos casos em que se usou como critério o coeficiente de determinação, bem como o critério de Akaike - o melhor modelo

convergia sempre para situações onde o número de graus de liberdade se tornava nulo⁹. Na tabela 4.23 encontram-se alguns dos indicadores de desempenho dos modelos obtidos segundo o critério Bayesiano (*BIC*).

⁹É de salientar que a resposta possui 83 valores e que os modelos ajustados segundo este critério carecem de um número muito elevado de parâmetros.

Tabela 4.23: Resumo dos modelos testados utilizando como critério o *BIC*. A negrito destacam-se os preditores com valores de coeficiente de determinação, R^2 , muito próximos da unidade.

Origem	Código	Sentido	p^*	p	ndf	σ_{fit}	R^2	R^2_{adj}	AIC	BIC
Intcp.	m01	FB	1	6	77	0.5553	0.6638	0.6419	145.67	162.60
	m02	F	1	9	74	0.5472	0.6862	0.6523	145.94	170.13
x0347	m03	FB	1	6	77	0.5553	0.6638	0.6419	145.67	162.60
	m04	F	1	9	74	0.5472	0.6862	0.6523	145.94	170.13
x0352	m05	FB	1	6	77	0.5553	0.6638	0.6419	145.67	162.60
	m06	F	1	9	74	0.5472	0.6862	0.6523	145.94	170.13
x0357	m07	FB	1	6	77	0.5553	0.6638	0.6419	145.67	162.60
	m08	F	1	9	74	0.5472	0.6862	0.6523	145.94	170.13
x0347+x0352	m09	FB	2	5	78	0.6608	0.5176	0.4929	173.62	188.14
	m10	F	2	9	74	0.5472	0.6862	0.6523	145.94	170.13
x0347+x0357	m11	FB	2	6	77	0.5553	0.6638	0.6419	145.67	162.60
	m12	F	2	9	74	0.5472	0.6862	0.6523	145.94	170.13
x0352+x0357	m13	FB	2	15	68	0.3260	0.8976	0.8766	64.95	103.66
	m14	F	2	17	66	0.3289	0.8989	0.8744	67.94	111.48
x0347+x0352+x0357 (1)	m15	FB	3	8	75	0.6296	0.5791	0.5398	168.32	190.09
	m16	F	3	8	75	0.6296	0.5791	0.5398	168.32	190.09
x1002	m17	FB	4	4	79	0.7753	0.3276	0.3021	199.19	211.28
	m18	F	4	4	79	0.7753	0.3276	0.3021	199.19	211.28
x1014	m19	FB	1	6	77	0.5553	0.6638	0.6419	145.67	162.61
	m20	F	1	9	74	0.5472	0.6862	0.6523	145.94	170.13
x1022	m21	FB	1	4	79	0.7927	0.2971	0.2704	202.88	214.97
	m22	F	1	4	79	0.7927	0.2971	0.2704	202.88	214.97
x1002+x1014	m23	FB	2	4	79	0.7753	0.3276	0.3021	199.19	211.28
	m24	F	2	5	78	0.7779	0.3317	0.2974	200.68	215.20
x1002+x1022	m25	FB	2	4	79	0.7753	0.3276	0.3021	199.19	211.28
	m26	F	2	6	77	0.7555	0.3776	0.3372	196.78	213.71
x1014+x1022	m27	FB	2	6	77	0.5553	0.6638	0.6419	145.67	162.60
	m28	F	2	9	74	0.5472	0.6862	0.6523	145.94	170.13
x1002+x1014+x1022 (2)	m29	FB	3	6	77	0.5553	0.6638	0.6419	145.67	162.60
	m30	F	3	9	74	0.5472	0.6862	0.6523	145.94	170.13
x1547	m31	FB	1	3	80	0.8092	0.2583	0.2397	205.34	215.01
	m32	F	1	3	80	0.8092	0.2583	0.2397	205.34	215.01
x1550	m33	FB	1	3	80	0.8100	0.2568	0.2382	205.50	215.18
	m34	F	1	3	80	0.8100	0.2568	0.2382	205.50	215.18
x1554	m35	FB	1	3	80	0.8098	0.2570	0.2385	205.48	215.15
	m36	F	1	3	80	0.8098	0.2570	0.2385	205.48	215.15
x1547+x1550	m37	FB	2	3	80	0.8092	0.2583	0.2397	205.34	215.01
	m38	F	2	4	79	0.8137	0.2593	0.2311	207.23	219.32
x1547+x1554	m39	FB	2	3	80	0.8092	0.2583	0.2397	205.34	215.01
	m40	F	2	9	74	0.5472	0.6862	0.6523	145.94	170.13
x1550+x1554	m41	FB	2	3	80	0.8098	0.2570	0.2385	205.48	215.15
	m42	F	2	4	79	0.8149	0.2572	0.2290	207.46	219.55
x1547+x1550+x1554 (3)	m43	FB	3	3	80	0.8092	0.2583	0.2397	205.34	215.01
	m44	F	3	9	74	0.5472	0.6862	0.6523	145.94	170.13
(1)+(2)+(3)	m45	FB	9	6	77	0.6093	0.5952	0.5689	161.08	178.01
	m46	F	9	13	70	0.6039	0.6385	0.5765	165.68	199.55
Todos os termos	m47	FB	41	22	61	0.2566	0.9431	0.9236	30.15	85.79
	m48	B	41	22	61	0.2566	0.9431	0.9236	30.15	85.79

(1),(2),(3) - modelos completos sugeridos por correlação e PLS; F, B, FB - sentidos impostos para a pesquisa de novos parâmetros (F=forward, B=backward, FB=both); p^* e p - número de preditores do modelo inicial e final.

Da tabela anterior verifica-se que cada região sugerida por PLS (2) ou correlação (1 e 3) foi testada com três valores cada (2 extremos e o valor central). Após esta fase de diagnóstico individual de zonas do espectro IR, ajustou-se um modelo inicial que continha estes preditores em simultâneo (1+2+3). Já no final deste diagnóstico foi efetuada uma listagem de todas as variáveis que surgiram nos 46 modelos estudados (m01 a m46) e verificou-se que os modelos otimizados apenas recorriam a um conjunto de 41 variáveis comuns. Na tabela 4.25 encontra-se uma listagem das 41 encontradas e assinaladas quanto à sua frequência de aparecimento.

Tabela 4.25: Lista ordenada de preditores encontrados através do algoritmo iterativo de busca segundo o critério de *BIC*, ver tabela 4.23. A negrito destacam-se os preditores com valores acima da média, a vermelho o mais frequente e a azul os preditores com uma frequência próxima do dobro da frequência média.

Preditor	Freq.	Preditor	Freq.	Preditor	Freq.	Preditor	Freq.
x0004	2	x0298	2	x0357	6	x1022	5
x0021	2	x0322	2	x0363	2	x1023	6
x0023	2	x0324	2	x0369	1	x1322	2
x0026	2	x0325	3	x0383	2	x1431	2
x0043	1	x0326	1	x0408	7	x1516	4
x0131	7	x0327	3	x0421	8	x1525	8
x0137	7	x0335	4	x1002	7	x1547	7
x0138	2	x0341	2	x1006	1	x1550	5
x0140	2	x0347	4	x1008	2	x1554	5
x0292	7	x0352	15	x1014	3	x1673	2

Freq. = Frequência

Atendendo a que o valor médio da frequência de aparecimento destes preditores deu um valor próximo de 3.8, assinalou-se na tabela 4.25 a negrito todos os valores com frequências acima deste valor. De entre os valores assinalados encontram-se preditores na região prevista por correlação (x0347, x0352), através de PLS (x1002, x1023) e ainda pela correlação de novo (x1516, x1525, x1547, x1550 e x1554). De salientar ainda que o preditor mais frequente (x0352) foi previamente sugerido por correlação. Os preditores frequentes (x1002, x1525 e x1547) estão também relacionados com as sugestões PLS e correlação.

Após esta listagem, procurou-se refinar este modelo com dependência em 41 preditores - modelos m47 e m48 na tabela 4.23. Curiosamente, a equação final do modelo (m47 e m48) engloba apenas 21 preditores (x0004, x0023, x0026, x0137, x0298, x0324, x0325, x0352, x0357, x0363, x0383, x0408, x0421, x1006, x1008, x1014, x1022, x1023, x1322, x1431, x1676).

4.3.2.4 Seleção de modelos

De entre os modelos encontrados na tabela 4.25, selecionaram-se os que apresentam melhores características para passar à fase de validação. Nesta fase, as atenções focam-se nos modelos que melhor ajustam os valores experimentais (maior valor de R^2) e possuem menor erro de ajuste (menor valor de σ_{fit}). Para melhor efetuar esta escolha simultânea, na figura 4.21 representa-se, para cada modelo, cada uma destas estimativas e ainda o valor do quociente R^2 / σ_{fit} .

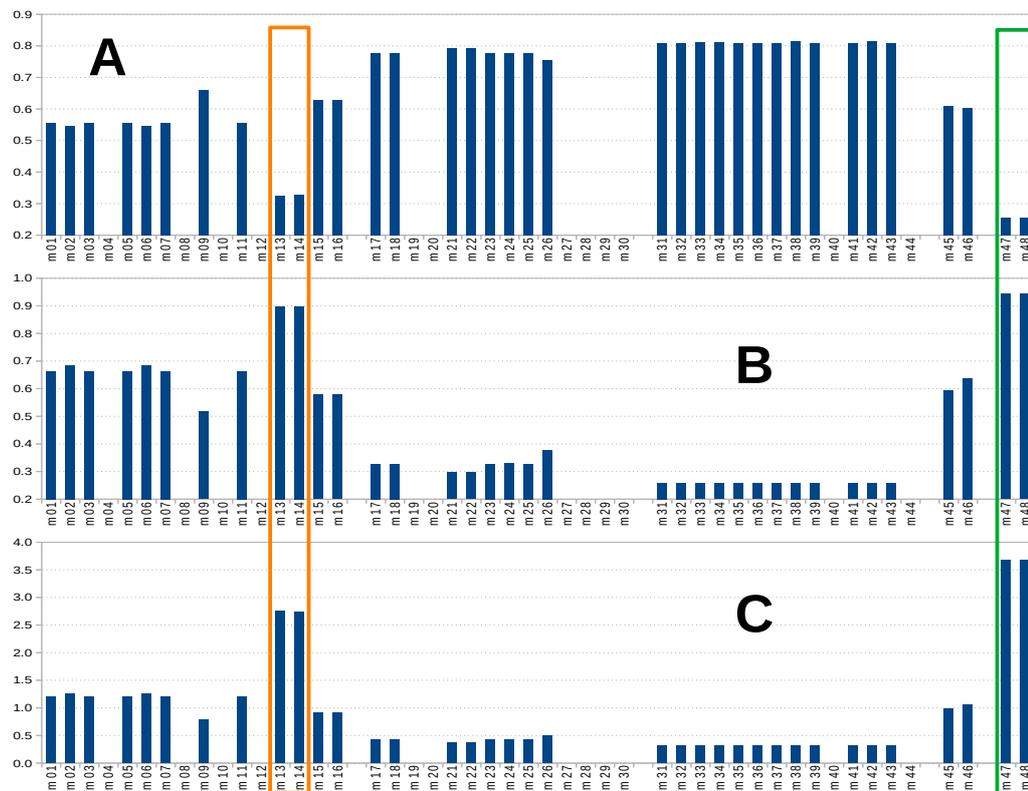


Figura 4.21: Desempenho dos modelos encontrados em termos de (A) desvio padrão do ajuste (σ_{fit}), (B) coeficiente de determinação (R^2) e (C) quociente de desempenho global (R^2 / σ_{fit}).

Da figura 4.21 repara-se que há 4 modelos que possuem as melhores características para seguirem para a fase de validação - são os modelos m13, m14, m47 e m48. Por inspeção detalhada na equação de cada um dos modelos,

m13	$y \sim x0023+x0026+x0138+x0140+x0298+x0322+x0352+x0357+x0363+x0383+x1322+x1431+x1673+x1676$
m14	$y \sim x0023+x0026+x0043+x0138+x0140+x0298+x0322+x0352+x0357+x0363+x0369+x0383+x1322+x1431+x1673+x1676$
m47	$y \sim x0004+x0023+x0026+x0137+x0298+x0324+x0325+x0352+x0357+x0363+x0383+x0408+x0421+x1006+x1008+x1014+x1022+x1023+x1322+x1431+x1676$
m48	$y \sim x0004+x0023+x0026+x0137+x0298+x0324+x0325+x0352+x0357+x0363+x0383+x0408+x0421+x1006+x1008+x1014+x1022+x1023+x1322+x1431+x1676$

verifica-se que o modelo m14 apenas possui dois termos a mais que o m13 (x0043 e x0369) e que os modelos m47 e m48 são idênticos. Assim, passa-se a ter apenas 3 modelos para a segunda fase deste estudo, nomeadamente os modelos m13, m14 e m47.

Nas tabelas 4.26 e 4.27 apresenta-se um resumo das estimativas paramétricas relacionadas com estes modelos.

Tabela 4.26: Avaliação do significado estatístico dos parâmetros dos modelos m13 e m14. A negrito estão assinalados os valores de prova superiores a 0.01.

m13					m14				
Var.	Valor	SE	TV	p-value	Var.	Valor	SE	TV	p-value
(Const.)	4.90	0.42	11.77	0.000	(Const.)	4.87	0.43	11.35	0.000
x0023	-2.44	0.40	-6.15	0.000	x0023	-2.38	0.41	-5.77	0.000
x0026	2.06	0.38	5.39	0.000	x0026	1.92	0.49	3.89	0.000
x0138	4.03	0.35	11.42	0.000	x0043	0.11	0.45	0.24	0.810
x0140	-1.84	0.24	-7.65	0.000	x0138	4.04	0.36	11.24	0.000
x0298	-1.27	0.17	-7.42	0.000	x0140	-1.89	0.25	-7.59	0.000
x0322	0.95	0.33	2.89	0.005	x0298	-1.40	0.22	-6.23	0.000
x0352	5.42	1.18	4.60	0.000	x0322	1.31	0.52	2.51	0.015
x0357	-10.37	2.10	-4.93	0.000	x0352	5.29	1.28	4.13	0.000
x0363	5.31	1.17	4.56	0.000	x0357	-10.48	2.35	-4.45	0.000
x0383	-2.41	0.26	-9.44	0.000	x0363	6.13	1.74	3.51	0.001
x1322	1.56	0.17	9.37	0.000	x0369	-1.37	1.59	-0.86	0.392
x1431	-1.35	0.20	-6.80	0.000	x0383	-1.78	0.77	-2.31	0.024
x1673	-0.81	0.31	-2.61	0.011	x1322	1.46	0.23	6.44	0.000
x1676	1.27	0.25	5.05	0.000	x1431	-1.33	0.22	-5.92	0.000
					x1673	-0.85	0.32	-2.64	0.010
					x1676	1.34	0.28	4.76	0.000

Tabela 4.27: Avaliação do significado estatístico dos parâmetros do modelo m47. A negrito estão assinalados os valores de prova superiores a 0.01.

Var.	n.o. (cm^{-1})	Valor	<i>SE</i>	<i>TV</i>	<i>p-value</i>
(Const.)	--	4.56	0.47	9.66	0.000
x0004	405.0	-0.41	0.19	-2.15	0.035
x0023	441.6	-1.25	0.40	-3.14	0.003
x0026	447.4	1.21	0.32	3.74	0.000
x0137	661.5	2.14	0.17	12.89	0.000
x0298	972.0	-1.26	0.14	-8.86	0.000
x0324	1022.1	7.24	3.27	2.21	0.031
x0325	1024.1	-6.35	3.43	-1.85	0.069
x0352	1076.1	5.19	1.12	4.65	0.000
x0357	1085.8	-9.79	2.01	-4.87	0.000
x0363	1097.4	5.22	1.16	4.50	0.000
x0383	1135.9	-2.61	0.40	-6.57	0.000
x0408	1184.1	-1.06	0.52	-2.03	0.046
x0421	1209.2	1.41	0.47	2.99	0.004
x1006	2337.4	9.07	2.16	4.21	0.000
x1008	2341.3	-8.56	2.31	-3.70	0.000
x1014	2352.8	-2.64	0.60	-4.44	0.000
x1022	2368.3	3.57	1.15	3.10	0.003
x1023	2370.2	-1.46	0.79	-1.84	0.071
x1322	2946.8	1.16	0.22	5.27	0.000
x1431	3157.1	-1.44	0.18	-7.97	0.000
x1676	3629.6	0.72	0.09	7.69	0.000

Da tabela 4.26 verifica-se que o modelo m13 tem todos os parâmetros com significado estatístico ($p\text{-value} < 0.01$). Contudo, o modelo m14 apresenta indicação de que provavelmente existem 2 parâmetros sem significado estatístico ($p\text{-value} > 0.05$), pelo que este modelo deve ser revisto em termos de teste de parcimonia (teste de Mandel). Da tabela 4.27 também se pode verificar que, provavelmente, existem 2 parâmetros supérfluos no modelo m47.

4.3.2.5 Teste de parcimonia

No sentido de averiguar se os modelos m14 e m47 podem ser simplificados por parcimonia, foi efetuado o teste de Mandel. A sequência de parâmetros a testar depende do valor de prova desse parâmetro¹⁰. Na tabela 4.28 encontram-se os resultados para a avaliação da parcimonia dos modelos m14 e m47.

¹⁰Os parâmetros são sucessivamente testados por ordem decrescente do seu valor de prova.

Tabela 4.28: Resultados obtidos referentes ao teste de Mandel na verificação da parcimonia dos modelos m14 e m47.

	m14	[-x0043]	[-x0369]	m47	[-x1023]	[-x0325]	[-x0408]
<i>SS</i>	7.1408	7.1471	7.2283	4.0150	4.2377	4.4114	4.5418
<i>ndf</i>	66	67	68	61	62	63	64
σ_{fit}^2	0.1082	0.1067	0.1063	0.0658	0.0683	0.0700	0.0709
	<i>TV</i>	0.06	0.76	<i>TV</i>	3.38	2.54	1.86
	<i>p-value</i>	0.810	0.386	<i>p-value</i>	0.071	0.116	0.177

Da tabela 4.28 verifica-se que, apesar de alguns parâmetros dos modelos testados possuírem uma incerteza considerável ao ponto de sugerir que eles não tenham significado estatístico, estes, de facto, não são prescindíveis no que respeita a manter a qualidade do ajuste efetuado com o modelo completo. Assim sendo, os modelos encontram-se em condições para ser validados.

4.3.2.6 Validação dos modelos

A escolha do melhor modelo deve sempre passar pela validação cruzada, já que interessa que o modelo não só ajuste bem os resultados como ainda sirva para prever adequadamente novos resultados.

Embora seja uma perspetiva bastante conservadora, a estratégia “*JackKnife*” («*Leave-one-out*») é fácil de implementar e permite avaliar a capacidade preditiva do modelo numa situação em que o “*training set*” é muito superior ao “*test set*”: no caso em questão tem-se um “*training set*” com 82 elementos para prever 1 elemento, em cada amostra experimental.

Na tabela 4.29 fez-se uma síntese do desempenho dos modelos em teste.

Tabela 4.29: Avaliação do desempenho dos modelos selecionados com base nas características de ajuste (*MSFE*) e de previsão (*MSPE*) de novos valores.

Modelo	<i>p</i>	<i>ndf</i>	<i>SS</i>	σ_{fit}	R^2	<i>AIC</i>	<i>BIC</i>	<i>MSFE</i>	<i>MSPE</i>
m13	15	68	5.054	0.247	0.8976	64.95	103.66	0.326	0.131
m14	17	66	7.141	0.293	0.8989	67.94	111.48	0.329	0.138
m47	22	61	4.015	0.220	0.9431	30.15	85.79	0.257	0.101

p - número de preditores no modelo; *ndf*- número de graus de liberdade; *SS*- soma de quadrados;

σ_{fit} - desvio padrão do ajuste; R^2 - coeficiente de determinação;

AIC e *BIC* - desempenho do modelo segundo Akaike / Bayes;

MSFE - erro médio de ajuste; *MSPE*- erro médio de previsão segundo “*JackKnife*”.

Com base nos valores da tabela 4.29, verifica-se que o melhor ajuste é conseguido com o modelo m47, uma vez que possui um número de graus de liberdade muito similar aos anteriores (m13 e m14), menor soma de quadrados e, conseqüentemente, menor desvio padrão de ajuste. Além disso, neste modelo m47, o coeficiente de determinação é maior e os índices de Akaike e Bayes são os menores, reforçando que estamos perante o modelo que deve ser eleito. Já em termos de erro médio de ajuste ($MSFE$) e de previsão ($MSPE$), o modelo m47 continua-se a destacar dos restantes já que permite obter e estimar valores com menor erro possível.

Assim sendo, o modelo m47 não só ajusta melhor, como garante a reprodução de 94.3 % da informação contida na resposta e permite, ainda, estimar novos valores com uma incerteza na ordem de 0.10 - dentro da gama de valores testados (2 a 8 % na taxa de humidade), esta incerteza corresponde a erros relativos de 1.3 a 5.0 %, o que parecem ser valores bastante aceitáveis.

4.3.3 Detecção de desvios

Considerando que o método de KF para a determinação do teor de humidade é um método oficial, averiguou-se se se deteta alguma anomalia sistemática em relação aos métodos aqui avaliados por espectroscopia de infravermelho, quer segundo PLS, considerando os primeiros $f = 10$ fatores latentes, quer por MOLS, através dos modelos m13, m14 e m47.

Nas figuras 4.22 a 4.24 encontra-se representada a função de resposta e respetivos resíduos referentes aos modelos obtidos por MOLS: m13, m14 e m47, respetivamente.

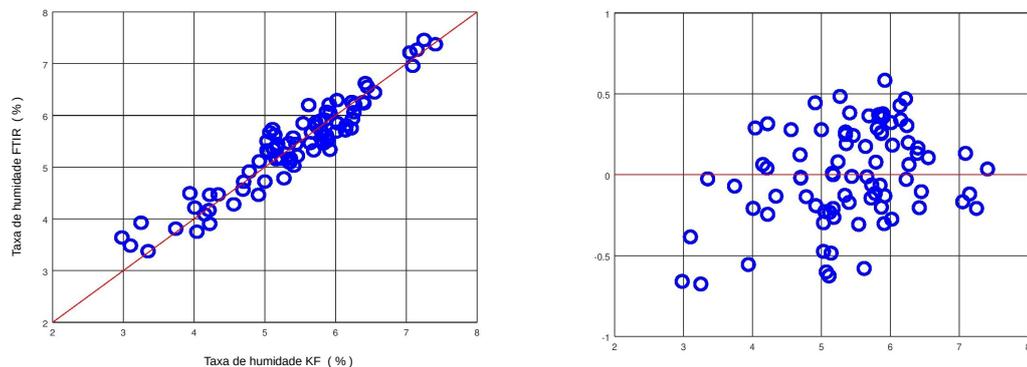


Figura 4.22: Representação da função de resposta e respetivo gráfico de resíduos para valores referentes ao modelo m13.

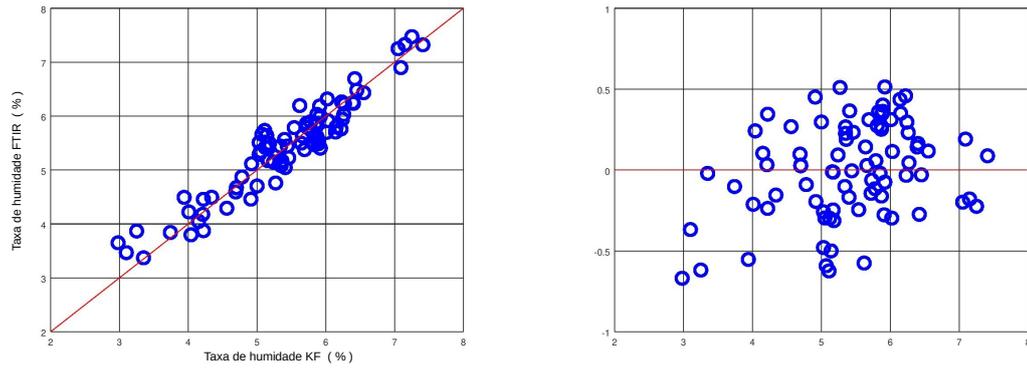


Figura 4.23: Representação da função de resposta e respetivo gráfico de resíduos para valores referentes ao modelo m14.

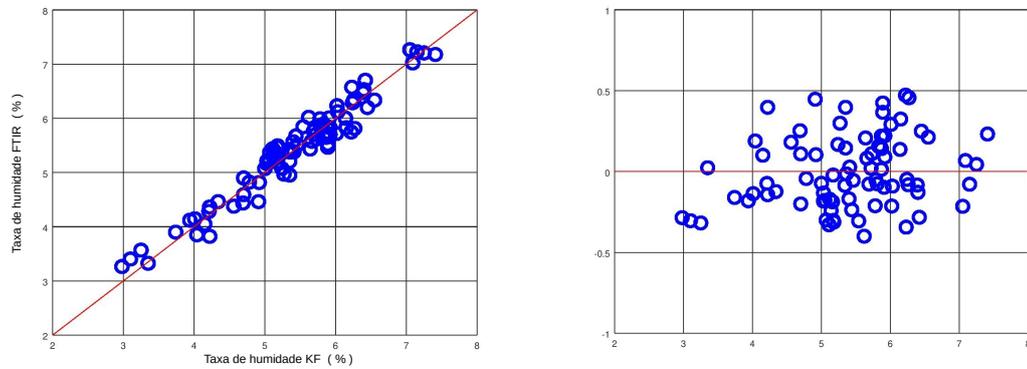


Figura 4.24: Representação da função de resposta e respetivo gráfico de resíduos para valores referentes ao modelo m47.

Das figuras anteriores verifica-se que os modelos testados apresentam uma boa linearidade em relação aos valores de referência, seguindo a linha mediatriz do primeiro quadrante, o que é prenúncio de que não deverão haver erros sistemáticos significativos. Além disso, os gráficos de resíduos são tendencialmente aleatórios, evidenciando que a função de resposta tem um comportamento linear na gama de valores testados.

Na tabela 4.30 encontram-se reunidas as estimativas paramétricas da avaliação da função de resposta para os quatro métodos em desenvolvimento.

Tabela 4.30: Avaliação de desempenho da função de resposta para os métodos em desenvolvimento.

	Param	Valor	SE	TV	p-value	z^2	TV	p-value
PLS	e_0	0.000	0.023	0.00	1.000	0.00		
	e_1	0.948	0.024	2.17	0.033	4.69	4.69	0.096
m13	e_0	0.55	0.18	3.00	0.004	8.98		
	e_1	0.898	0.034	3.04	0.003	9.24	18.21	0.000
m14	e_0	0.55	0.18	2.98	0.004	8.85		
	e_1	0.899	0.033	3.02	0.003	9.11	17.97	0.000
m47	e_0	0.18	0.16	1.09	0.278	1.19		
	e_1	0.948	0.026	2.02	0.047	4.08	5.28	0.071

e_0 e e_1 - estimativas relacionadas com erro sistemático constante e proporcional

Da tabela 4.30 verifica-se que o método espectroscópico baseado em PLS é exato, pois a ordenada na origem é nula ($p[e_0 = 0] = 1.000$), mas o declive é algo dúbio, sugerindo que pode haver um ligeiro erro proporcional. Contudo, em termos globais, o método parece estar isento de erros sistemáticos significativos ($p\text{-value} > 0.05$).

Já os modelos desenvolvidos por MOLS, m13 e m14, apresentam evidências de erro sistemático, uma vez que os termos de erro sistemático constante (e_0) e erro sistemático proporcional (e_1) estão presentes em ambos os casos, indicando uma probabilidade nula para a ausência de erro sistemático global. Finalmente, o modelo MOLS m47 reúne todas as condições para ser considerado como desprovido de erro sistemático significativo ($p\text{-value} > 0.05$), tendo $e_0 = 0$ e $e_1 = 1$.

A espectroscopia de infravermelho FTIR associada à modelação implícita (PLS) ou explícita (modelo m47) é uma boa alternativa de método analítico para a determinação do teor de água na região 2 – 8 % de humidade na matéria prima *Stevia*, tendo sido obtida uma boa precisão e boa capacidade de previsão. A modelação explícita apresenta a vantagem adicional de poder ser efetuada por via direta (não requerendo pré-processamento de dados) e permitir tirar ilações físico-químicas relacionadas com o fenómeno de interação da água presente na atmosfera com a matéria prima em causa, como se irá tentar demonstrar em seguida.

4.3.4 Interpretação

A maior vantagem de usar o método MOLS (m47) para ajustar, estimar e prever os teores de humidade da matéria prima *Stevia* na faixa analítica 2 – 8 % estão relacionadas com a enorme simplicidade de efetuar a estimativa, a possibilidade de se poder usar a estatística paramétrica na área da quantificação e ser possível interpretar os resultados em termos de

fenómenos espectrais que estão relacionados com a resposta analítica.

Importa, agora, tentar verificar a razão de ser das frequências localizadas na construção do modelo MOLS m47. Na figura 4.25 encontra-se assinalado no espectro das amostras os preditores usados neste modelo.

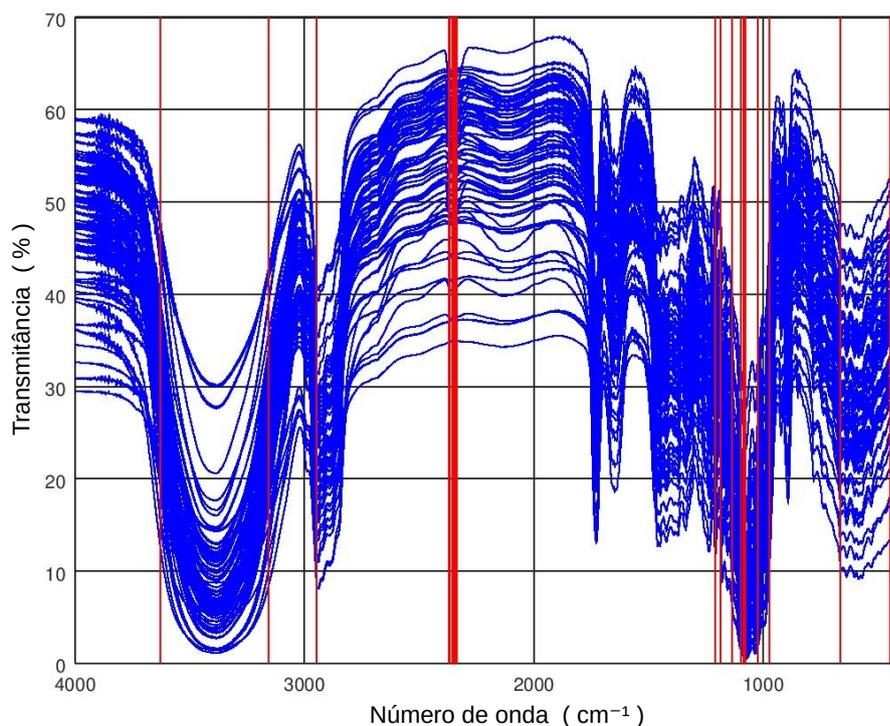


Figura 4.25: Marcação das frequências (a vermelho) encontradas com o modelo m47.

Com base nos valores indicados na tabela 4.27, as frequências assinaladas pelo modelo m47 são: 405.0, 441.6, 447.4, 661.5, 972.0, 1022.1, 1024.1, 1076.1, 1085.8, 1097.4, 1135.9, 1184.1, 1209.2, 2337.4, 2341.3, 2352.8, 2368.3, 2370.2, 2946.8, 3157.1 e 3629.6 cm^{-1} . De salientar que, através da modelação implícita, subsecção 4.3.2.1, o modelo desenvolvido por PLS destaca essencialmente um conjunto de preditores mais relevantes numa estreita faixa de números de onda compreendida entre 2329.7 – 2368.3 cm^{-1} (ver figura 4.18), enquanto que por correlação direta, subsecção 4.3.2.2 (ver figura 4.20), se obtiveram vários preditores na gama entre 1066.5 e 1085.8 cm^{-1} , mas também alguns menos relevantes na região de maior frequência 3380.8–3394.3 cm^{-1} . O modelo m47 combina, de uma forma genérica, a informação contida por estes dois tipos de abordagem e adiciona ainda mais algumas frequências e menor energia, na complexa região 400 – 1000 cm^{-1} .

Neste tipo de espectroscopia, o aparecimento de uma banda larga na região espectral compreendida entre 3300 a 3500 cm^{-1} está usualmente relacionada com a presença de grupos hidroxilo em amostras sólidas. O facto de haver alguns sinais relevantes detetados nesta região pode evidenciar a interferência da água, tanto por via direta (absorve nesta região) como por via indireta (alterações promovidas pela presença da água no analito). Alguns dos sinais evidenciados nas regiões 2300 – 2400 e 1000 – 1150 cm^{-1} podem também estar relacionados com vibrações envolvendo a ligação “C-O” em álcoois que, por sua vez, também são perturbadas com a presença da água na amostra; os restantes sinais, abaixo de 1000 cm^{-1} , já pertencem a uma região densamente conjugada e muito difícil de interpretar.

Salienta-se ainda o facto de nos espectros da matéria prima *Stevia* estarem bem evidenciados os sinais próximos de 1640, 1710 e 2950 cm^{-1} , típicos da presença de ligações duplas do tipo alceno “C=C”, carbonilo “C=O” e evidência da cadeia hidrocarbonada genérica, envolvendo grupos do tipo “-CH₂-” e “-CH₃”, sendo que os modelos desenvolvidos nunca detetaram estes sinais como relevantes. Compreende-se que a água, sendo um composto polar e com a capacidade de estabelecer ligações de hidrogénio, interaja preferencialmente com grupos mais polares, tais como os abundantes grupos hidroxilo presentes neste tipo de composto. Dado que o teor de humidade testado era relativamente baixo, a presença da água na amostra não aparenta este tipo de transições vibracionais relacionadas com partes da molécula menos polares.

Comparando os algoritmos de modelação implícita (PLS) com a modelação explícita (MOLS), o modelo obtido por modelação multivariada (m47, $p = 22$) para a determinação do teor de água por FTIR é mais preciso, tanto no ajuste dos valores experimentais como na previsão e depende de um conjunto de variáveis muito mais restrito do que o modelo desenvolvido PLS ($M = 1869$). Este modelo depende de variáveis localizadas em diferentes gamas de frequência de vibração - o modelo m47 resulta de uma combinação intermédia entre o PLS e a correlação, já que 5 dos seus preditores foram evidenciados por PLS (x1006, x1008, x1014, x1022 e x1023) e os restantes evidenciados por correlação direta (x004, x0023, x0026, x0137, x0298, x0324, x0325, x0352, x0357, x0363, x0383, x0408, x0421, x1322, x1431 e x1676).

Verifica-se, ainda, que na região de frequências mais baixas, o modelo m47 usa 13 preditores - esta quantidade elevada de preditores pode ser uma mais valia no desenvolvimento de um método específico para a caracterização da matéria prima *Stevia*.

Atendendo aos respetivos coeficientes de sensibilidade, os cinco preditores usados por m47

na estreita região dos $1000-400\text{ cm}^{-1}$ (nomeadamente as variáveis x0324, x0325, x0352, x0357 e x0363, indicadas na tabela 4.27) demonstram ter uma grande relevância na quantificação, já que correspondem às variáveis com maior coeficiente de sensibilidade. Como foi visto anteriormente, estas variáveis estão relacionadas com vibrações que envolvem a ligação “C-O” em álcoois.

Por fim, os dois preditores do modelo m47 que descrevem a região de frequências de vibração mais elevada (3157.1 e 3629.6 cm^{-1}) encontram-se nitidamente situados na região característica da presença de grupos hidroxilo e eventual formação de ligações de hidrogénio - nesta região espectral, a matéria prima exhibe um grande efeito com a variação do teor de humidade na amostra. Na figura em anexo, figura A.2, encontra-se um espectro FTIR da molécula de água que evidencia a banda característica do grupo “-OH” e subsequente alargamento devido à formação da ligação de hidrogénio.

Em conclusão, a espectroscopia de infravermelho associada à modelação explícita (modelo m47) é uma boa alternativa de método analítico para a determinação do teor de água, na região 2 – 8 % de humidade na matéria prima *Stevia*, com a vantagem adicional de permitir tirar ilações físico-químicas relacionadas com o fenómeno de interação da água presente na atmosfera com a matéria prima em causa.

4.4 Validação do *software* Empower™ 3

Por forma a se começar a usar apenas o programa Empower™ 3 na realização de cálculos e reporte de valores ao invés das folhas de cálculo, foi necessário validar o *software*. Criaram-se várias CF para automatizar os cálculos e torná-los mais precisos, rastreáveis e fluidos, assim como novos relatórios de análise que abrangessem uma maior informação sobre o fármaco em análise (para um maior detalhe sobre estes temas, ver sub-secções B.2 e B.3 em anexos). Foi ainda realizado um inquérito aos analistas do departamento de controlo da qualidade da FARMALABOR sobre todo o processo de validação via Empower™ 3, conforme detalhado na sub-secção B.4.

Na validação do *software* Empower™ 3 recorreu-se a folhas de cálculo para efetuar os cálculos de forma externa ao programa e poder validar os resultados por comparação direta. Sempre que possível, a incerteza foi estimada (com base em réplicas) e as estimativas representadas de acordo com as normas da qualidade impostas pelas normas ISO e IUPAC¹¹. Como critério

¹¹A incerteza é representada sob a forma de dois algarismos significativos e a estimativa central arredondada

de concordância nos resultados, aceitam-se desvios inferiores à unidade no último algarismo significativo das estimativas central e respetiva incerteza.

O processo de validação é complexo e demorado, muito devido a todas as nuances que dependem de produto para produto. No entanto, a dedicação neste assunto foi fundamental para que se atingisse uma marca impressionante de 207 validações em apenas nove meses¹². A figura 4.26 apresenta as estatísticas mensais do processo de validação, enquanto a tabela 4.31 mostra o número de validações existentes por cada tipo de ensaio - doseamento (DOS), dissolução (DISS), uniformidade de conteúdo (UC) e impurezas e substâncias relacionadas (IMP) -, aplicados tanto à matéria prima (MP) como ao produto acabado (PA).

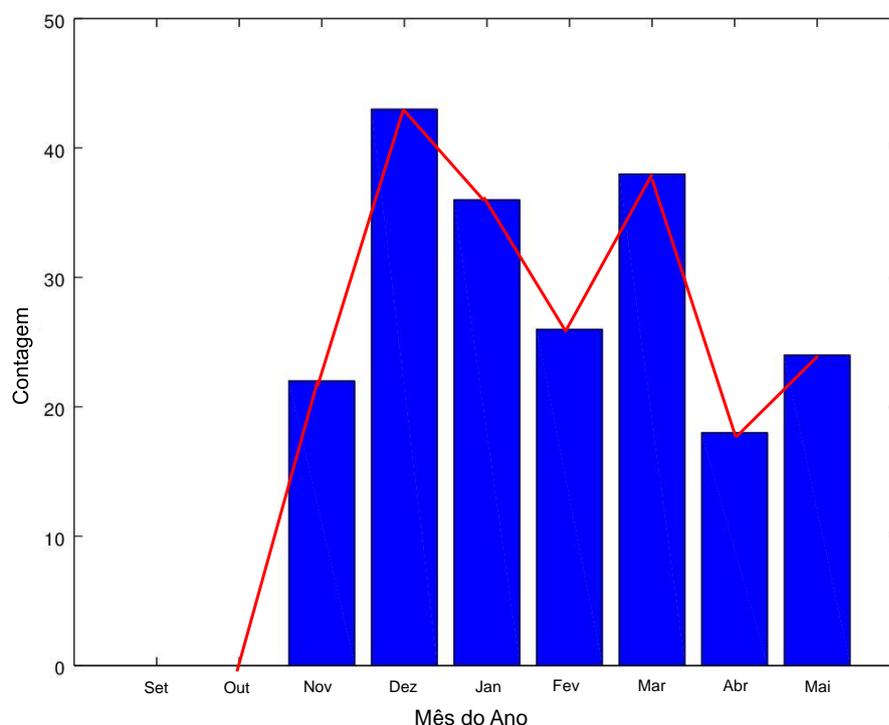


Figura 4.26: Evolução mensal das $N = 207$ validações realizadas. Dados recolhidos até à data de 31 de maio de 2020.

ao mesmo número de casas decimais da incerteza.

¹²O número de validações é referente ao período de 02 de setembro de 2019 a 31 de maio de 2020.

Tabela 4.31: Resultados de validação por tipo de ensaio. Entre parêntesis encontram-se os valores percentuais relativamente às $N = 207$ validações. Dados recolhidos até 31 de maio de 2020.

Ensaio	DOS	UC	DISS	GR	IMP	Total
PA	108	33	45	3	3	192 (92.8)
MP	13	--	--	--	2	15 (7.2)
Total	121 (58.5)	33 (15.9)	45 (21.7)	3 (1.7)	5 (2.4)	207 (100)

PA - produto acabado; MP - matéria prima; DOS - doseamento; UC - uniformidade de conteúdo;

GR - gastro-resistência; DISS - dissolução; IMP - impurezas e substâncias relacionadas

Pela análise da tabela 4.31, pode-se afirmar que do número total de validações, 92.8 % são referentes a produto acabado e 7.2 % correspondem a matéria prima. Verifica-se ainda que, no que ao PA diz respeito, os ensaios de doseamento são os que apresentam maior taxa de validação (56.3 %), seguindo-se os ensaios de dissolução, uniformidade de conteúdo, gastroresistência e impurezas com, respetivamente, 23.4 %, 17.2 %, 1.6 % e 1.6 % de validações. Quanto às MP, também os ensaios de doseamento dominam com 86.7 % de taxa de validação, sendo que os restantes 13.3 % dizem respeito aos ensaios de impurezas e substâncias relacionadas. É ainda de salientar que a quantidade de matéria prima doseada por HPLC é muito menor do que a quantidade de produto acabado, existindo também uma grande discrepância nesse sentido em termos de validações: 89.3 % dos doseamentos dizem respeito a PA, enquanto que apenas 10.7 % correspondem a MP. Globalmente, pode-se ainda afirmar que 58.5 % dos ensaios validados são de doseamento, em contrapartida com os ensaios de gastro-resistência que são os que apresentam menos validações (1.7 %).

De realçar que os ensaios de impurezas validados até agora dizem respeito a análises específicas em que se tem de determinar o teor de apenas uma impureza, o que, em termos analíticos, se comporta como um ensaio de doseamento, não havendo demais entraves no processo de validação desses ensaios. Os restantes ensaios de IMP mais comuns, em que é necessário determinar todas as impurezas presentes e somá-las para avaliação do teor total de substâncias, estão ainda em processo de estudo e de desenvolvimento.

Até ao presente momento, a taxa de validação global é de, aproximadamente, 40.3 %, o que corrobora com a ideia do processo ser demorado e complexo, não só pela enorme diversidade de PA e MP que são analisados nos laboratórios de controlo da qualidade da FARMALABOR, mas também pelo facto do processo exigir três lotes distintos para cada produto por tipo de ensaio, limitando temporalmente a validação do programa. Ainda assim, esta percentagem é um valor muito bom para um panorama geral de validação do Empower™ 3, uma vez que a

maioria dos ensaios em espera para validação são de impurezas e substâncias relacionadas (42.7 %), que ainda não estão totalmente implementadas nem otimizadas de forma automática.

Atendendo às inúmeras capacidades do *software* testado, acreditamos poder evoluir em breve em dois sentidos: a montante, na sincronização e automação de rotinas de análise automática supervisionada pelo computador e, a jusante, na sistematização da informação, sua validação e preservação, de forma organizada e rastreável, de modo a poder servir de base de dados para pesquisa futura, caso seja necessário.

Capítulo 5

Conclusões

O presente projeto, desenvolvido num laboratório de controlo da qualidade inserido numa empresa farmacêutica, acabou por ser uma experiência muito alargada onde foram desenvolvidas diferentes competências, desde algum trabalho de rotina, passando pela validação de um método analítico, desenvolvimento de um método analítico alternativo e automação e integração do funcionamento de equipamentos analíticos com vista à análise automática em rotina.

Sendo relevante para a determinação da conformidade físico-química da matéria prima *Stevia*, esta foi avaliada através de ensaios de diagnóstico simples quanto ao teste de solubilidade, valor de *pH*, índice de cinzas sulfúricas e teor de humidade. Os resultados obtidos revelaram a conformidade desta matéria prima quanto aos valores indicados pelo fabricante e com os aceites pela indústria. Verificou-se ainda o estado da calibração do equipamento de UV-Vis e de IR, tendo-se obtido estimativas que permitem afirmar que ambos os equipamentos se encontram devidamente calibrados.

No que à validação do método analítico para a matéria prima *Stevia* diz respeito, pode-se considerar que este foi um processo efetuado com sucesso. A identificação dos analitos de interesse em cada ensaio foi inequívoca através da elevada precisão em termos de tempos de retenção ($\Delta R_T \leq 0.05$ minutos), corroborada pelos espectros de UV-Vis de amostras de *Stevia* a diferentes concentrações, que indicam um máximo de absorção a 210 nm, comprimento de onda escolhido para o detetor na análise por HPLC. Os dados obtidos para cada um dos analitos estudados foram ajustados com elevada precisão através de uma função polinomial linear ($R^2 = 0.9995$ para Rebaudiosídeo A e $R^2 = 1.000$ para Steviosídeo), tendo-se calculado os limiares analíticos através do desvio padrão do ajuste, σ_{fit} , após se verificar que o parâmetro da reta b_0 não apresentava significado estatístico. A gama analítica determinada foi

abrangente para ambos os analitos, estendendo-se por 2.6 vezes no caso de Steviosídeo e 0.85 vezes no caso de Rebaudiosídeo A. O método revelou, ainda, apresentar elevada sensibilidade e demonstrou ser preciso, havendo necessidade de avaliar melhor a questão relacionada com a exatidão numa próxima ocasião. Quando se compararam resultados obtidos entre diferentes analistas a esta mesma matéria prima, concluiu-se que existe coerência apenas para o ensaio de doseamento, devendo-se averiguar esta situação num próximo estudo. De salientar ainda que se cumpriram os critérios de adequabilidade do sistema para ambos os ensaios. Assim, conclui-se que o método foi validado com sucesso para a matéria prima *Stevia* para os ensaios de doseamento e impurezas, tendo por base a metodologia analítica FCC7-USP e as normas ICH e ISO.

Relativamente ao método alternativo de determinação do teor de água por FTIR para amostras da matéria prima *Stevia*, testaram-se processos de modelação multivariada com PLS e por correlação. Obteve-se um modelo final com 21 preditores (cinco obtidos por PLS e os restantes por correlação direta), que consegue descrever cerca de 94.3 % da informação existente com elevada precisão e intervalos de erro reduzidos (1.3–5.0 %), concluindo-se assim que, usando MOLS, o processo de determinação do teor de água por este método alternativo se torna bastante simples e muito robusto.

Quanto à validação do *software* Empower™ 3, obteve-se uma taxa de validação global de 40.3 %, o que espelha a complexidade e demora do processo. Destas validações totais, 92.8 % correspondem a produto acabado e apenas 7.2 % a matéria prima. O tipo de ensaio mais validado é o de doseamento (58.5 %), o que revela que estes são os mais requisitados, em contrapartida com os ensaios de gastro-resistência que correspondem apenas a 1.7 %. Salienta-se também que os ensaios de impurezas e substâncias relacionadas se encontram em estudo e desenvolvimento, o que reflete a percentagem muito baixa de validações para este tipo de ensaio.

Em termos de perspetivas futuras, seria interessante realizar mais testes de estudo da matéria prima *Stevia*, nomeadamente através de HPLC-DAD, uma vez que este tipo de detetor permite uma melhor identificação dos analitos eluídos. Uma outra questão que poderia ser abordada no futuro está relacionada com a implementação do método alternativo de determinação do teor de água por FTIR à escala industrial, primeiramente para comparação entre valores obtidos com KF e, posteriormente, como metodologia de confirmação de resultados, aumentando a confiança no valor reportado e garantindo que não existe influência de nenhum

fator externo (humidade, neste caso) na análise do fármaco. A possibilidade de evoluir este método para análises não destrutivas através de ATR-FTIR seria também algo interessante, com as vantagens de serem ensaios mais simples (sem tratamento da amostra), não destrutivos e mais rápidos.

Por fim, futuramente, ainda há muito a desenvolver no *software* Empower™ 3, desde a implementação de cálculo automático para ensaios de impurezas à otimização de todos os projetos, CF e relatórios de análise. Seria também muito interessante estudar e avaliar a possibilidade de interligar outros equipamentos na rede Empower™, desde o equipamento de IR ao espectrofotômetro UV-Vis, garantindo uma maior automatização de processos nos laboratórios de controlo da qualidade, inovando tecnológica e cientificamente.

Bibliografia

- [1] A. Kumar, R. D. Rawlings, and D. C. Beaman. The mystery ingredients: Sweeteners, flavorings, dyes, and preservatives in analgesic/antipyretic, antihistamine/decongestant, cough and cold, antidiarrheal, and liquid theophylline preparations. *Pediatrics*, 1993.
- [2] Yu F. Sasaki, Satomi Kawaguchi, Asako Kamaya, Miyuki Ohshita, Kazumi Kabasawa, Kayoko Iwama, Kazuyuki Taniguchi, and Shuji Tsuda. The comet assay with 8 mouse organs: Results with 39 currently used food additives. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2002.
- [3] S. K. Goyal, Samsher, and R. K. Goyal. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: A review, 2010.
- [4] Aracy Pereira Silveira Balbani, Lucilena Bardella Stelzer, and Jair Cortez Montovani. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 2006.
- [5] Salete Moura Bonifácio da Silva and Carlos Ferreira dos Santos. Medicamentos pediátricos e risco de cárie: uma revisão TT - Pediatric medicines and caries risk: a review. *Rev. Fac. Odontol. Bauru*, 1994.
- [6] Venkata Sai Prakash Chaturvedula, Mani Upreti, and Indra Prakash. Diterpene glycosides from stevia rebaudiana. *Molecules*, 2011.
- [7] Katarzyna Marcinek and Zbigniew Krejpcio. Stevia Rebaudiana bertonii - chemical composition and functional properties. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 2015.
- [8] Roberto Lemus-Mondaca, Antonio Vega-Gálvez, Liliana Zura-Bravo, and Ah Hen Kong.

- Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects, 2012.
- [9] Manish Tadhani and Rema Subhash. Preliminary studies on Stevia rebaudiana leaves: Proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. *Journal of Medical Sciences*, 2006.
- [10] Muchsin Darise, Hiroshi Kohda, Kenji Mizutani, Ryoji Kasai, and Osamu Tanaka. Chemical Constituents of Flowers of Stevia rebaudiana bertoni. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1983.
- [11] David L. Nelson and Michael M. Cox. Lehninger Principles of Biochemistry 5th. *W.H. Freeman and Company*, 1921.
- [12] Masoom Raza Siddiqui, Zeid A. AlOthman, and Nafisur Rahman. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review, 2017.
- [13] Ludwig Huber. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. 2007.
- [14] S. Yazgan, A. Bernreuther, F. Ulberth, and H. D. Isengard. Water - An important parameter for the preparation and proper use of certified reference materials. In *Food Chemistry*, 2006.
- [15] A. Bruttel and R. Schlink. Water Determination by Karl Fischer Titration. Technical report, Metrohm, 2011.
- [16] S. Eugen. *Karl Fischer Titration: Determination of Water—Chemical Laboratory Practice*. Springer, Heidelberg, Germany, 1984.
- [17] Douglas A Skoog, F James Holler, and Stanley R Crouch. *principles of instrumental analysis sixth edition*. 2007.
- [18] J. A. M. Simões, M. A. R. B. Castanho, Isabel M. S. Lampreia, and Et Al. *Guia do laboratório de química e bioquímica*. LIDEL, Lisboa, 2000.
- [19] M. N. Berberan-Santos. Beer's law revisited. *Journal of Chemical Education*, 1990.
- [20] F. C. Da Conceição, P. P. Borges, and J. F.S. Gomes. Fundamental studies to develop certified reference material to calibrate spectrophotometer in the ultraviolet region. In *Journal of Physics: Conference Series*, 2016.

- [21] Hellma Analytics. Certified Reference Materials for UV/ Vis Spectroscopy. *Disponível em: <https://www.hellma.com/en/laboratory-supplies/certified-reference-materials/>*, 2020.
- [22] DL Pavia, GM Lampman, GS Kriz, and JR Vyvyan. Introdução à espectroscopia. *Cengage Learning*, 2012.
- [23] AnalChem Resources. Instrumental infrared and Fourier Transform Spectroscopy. *Disponível em: http://delloyd.50megs.com/MOBILE/infrared_spectroscopy.html*, 2000.
- [24] D. Peak. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In *Encyclopedia of Soils in the Environment*. 2004.
- [25] P.S. Collins, C.H., Braga, G.L., Bonato. *Fundamentos de Cromatografia*. Editora UNICAMP, Campinas, 2006.
- [26] Mcpolin Oona. *Validation of analytical methods for pharmaceutical analysis, Mourne Training Services*. 2009.
- [27] C. Hartmann, J. Smeyers-Verbeke, D. L. Massart, and R. D. McDowall. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1998.
- [28] Douglas a. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, and S.R. Couch. Fundamentos de Química Analítica. *Fundamentos de Química Analítica*, 2005.
- [29] Alankar Shrivastava and VipinB Gupta. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2011.
- [30] M. Lyman Ott, R., Longnecker. *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*. Brooks/Cole, 6 edition, 2010.
- [31] E L Lehmann and G Casella. *Theory of Point Estimation* , *Second Edition Springer Texts in Statistics*. 1998.
- [32] Douglas .C Montgomery. *Introduction To Statical Quality Control*. 2009.
- [33] James Miller and Janc Miller. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry (4th ed.). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry (4th ed.)*, 2000.

- [34] J.J. Hibbert, D.B., Gooding. *Data Analysis for Chemistry*. Oxford University Press, 1 edition, 2006.
- [35] Peter C. Meier and Richard E. Zünd. *Statistical methods in analytical chemistry*. 2005.
- [36] Frank E. Grubbs. Sample Criteria for Testing Outlying Observations. *The Annals of Mathematical Statistics*, 1950.
- [37] H. Scheffé. *The Analysis of Variance*. New York: Wiley, 1959.
- [38] Sander Greenland, Stephen J. Senn, Kenneth J. Rothman, John B. Carlin, Charles Poole, Steven N. Goodman, and Douglas G. Altman. Statistical tests, P values, confidence intervals, and power: a guide to misinterpretations. *European Journal of Epidemiology*, 2016.
- [39] Richard G. Brereton. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. John Wiley & Sons, 2003.
- [40] Charles K. Bayne and Richard Kramer. Chemometric Techniques for Quantitative Analysis. *Technometrics*, 1999.
- [41] Fred S. Guthery, Kenneth P. Burnham, and David R. Anderson. Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach. *The Journal of Wildlife Management*, 2003.
- [42] A. Colin Cameron and Frank A.G. Windmeijer. An R-squared measure of goodness of fit for some common nonlinear regression models. *Journal of Econometrics*, 1997.
- [43] Hirotugu Akaike. A New Look at the Statistical Model Identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 1974.
- [44] Hamparsum Bozdogan. Model selection and Akaike's Information Criterion (AIC): The general theory and its analytical extensions. *Psychometrika*, 1987.
- [45] Kenneth P. Burnham and David R. Anderson. Multimodel inference: Understanding AIC and BIC in model selection, 2004.
- [46] Thomas H. Naylor and J. M. Finger. Verification of Computer Simulation Models. *Management Science*, 1967.

- [47] Gavin C. Cawley and Nicola L.C. Talbot. On over-fitting in model selection and subsequent selection bias in performance evaluation. *Journal of Machine Learning Research*, 2010.
- [48] Ron Kohavi. A Study of Cross-Validation and Bootstrap for Accuracy Estimation and Model Selection. *International Joint Conference of Artificial Intelligence*, 1995.
- [49] B. Efron and C. Stein. The Jackknife Estimate of Variance. *The Annals of Statistics*, 1981.
- [50] M. H. Quenouille. Notes on Bias in Estimation. *Biometrika*, 1956.
- [51] A. Gustavo González and M. Ángeles Herrador. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2007.
- [52] Michael E. Swartz and Ira S. Krull. *Handbook of Analytical Validation*. 2012.
- [53] Lloyd A. Currie. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Analytica Chimica Acta*, 1999.
- [54] L. A. Currie. Detection and quantification limits: Origins and historical overview. *Analytica Chimica Acta*, 1999.
- [55] European Medicines Agency. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1995.
- [56] Y. Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B. G.M. Vandeginste, and D. L. Massart. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001.
- [57] European Pharmacopoeia. Water, Purified. 04:0008, 2018.
- [58] Food Chemicals Codex 7. Rebaudioside A. *United States Pharmacopeia, USP*, 1st sup, 2012.
- [59] Starna Scientific. Spectrophotometer UV and Visible Absorbance Qualification. *Disponível em: <https://www.starna.com/uv-absorbance/potassium-dichromate>*.

Apêndice A

Tabelas e figuras auxiliares

Neste capítulo do apêndice podem ser encontradas algumas tabelas e figuras suplementares que podem auxiliar e complementar as informações contidas nas partes principais desta tese.

A tabela A.1 apresenta os valores críticos para o teste de Grubbs com $\alpha = 0.05$ para N valores experimentais. A tabela A.2 apresenta os valores críticos para o teste de Cochran ao nível de significância de 5 % para N estimativas independentes com M réplicas. A tabela A.3 diz respeito a valores de referência de absorvância para soluções de dicromato de potássio em ácido perclórico 1 mM aos comprimentos de onda de 235, 257, 313 e 350 nm.

A figura A.1 representa um espectro do padrão secundário de poliestireno, onde X (a vermelho) representa o poder de resolução X (Res_X , entre as bandas 2870 e 2849.5 cm^{-1} , marcado a vermelho) e Y (a verde) representa o poder de resolução Y (Res_Y , entre as bandas 1589 e 1583 cm^{-1} , marcado a verde). Por sua vez, a figura A.2 representa o espectro de infravermelho da molécula de água.

A.1 Tabelas

Tabela A.1: Valores críticos para o teste de Grubbs ($G_{0.05}$) ao nível de confiança de 95 % ($\alpha = 0.05$) para N valores experimentais.

N	$G_{0.05}$	N	$G_{0.05}$	N	$G_{0.05}$
3	1.154	15	2.584	80	3.306
4	1.481	16	2.586	90	3.348
5	1.715	17	2.620	100	3.384
6	1.887	18	2.652	120	3.445
7	2.020	19	2.681	140	3.495
8	2.127	20	2.708	160	3.537
9	2.215	25	2.822	180	3.574
10	2.290	30	2.909	200	3.606
11	2.355	40	3.036	300	3.724
12	2.412	50	3.128	400	3.803
13	2.462	60	3.200	500	3.863
14	2.507	70	3.258	600	3.911

Tabela A.2: Valores críticos para o teste de Cochran ($C_{0.05}$) ao nível de confiança de 95 % ($\alpha = 0.05$) para N estimativas independentes com M réplicas.

		M										
		$\alpha = 0.05$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	∞
N	2	0.9985	0.9750	0.9392	0.9057	0.8772	0.8534	0.8332	0.8159	0.8010	0.5000	
	3	0.9669	0.8709	0.7977	0.7457	0.7071	0.6771	0.6530	0.6333	0.6167	0.3333	
	4	0.9065	0.7679	0.6841	0.6287	0.5895	0.5598	0.5365	0.5175	0.5017	0.2500	
	5	0.8412	0.6838	0.5981	0.5441	0.5065	0.4783	0.4564	0.4387	0.4241	0.2000	
	6	0.7808	0.6161	0.5321	0.4803	0.4447	0.4184	0.3980	0.3817	0.3682	0.1667	
	7	0.7271	0.5612	0.4800	0.4307	0.3974	0.3726	0.3535	0.3384	0.3259	0.1429	
	8	0.6798	0.5157	0.4377	0.3910	0.3595	0.3362	0.3185	0.3043	0.2926	0.1250	
	9	0.6385	0.4775	0.4027	0.3584	0.3286	0.3067	0.2901	0.2768	0.2659	0.1111	
	10	0.6020	0.4450	0.3733	0.3311	0.3029	0.2823	0.2666	0.2541	0.2439	0.1000	
	12	0.5410	0.3924	0.3264	0.2880	0.2624	0.2439	0.2299	0.2187	0.2098	0.0833	
	15	0.4709	0.3346	0.2758	0.2419	0.2195	0.2034	0.1911	0.1815	0.1736	0.0667	
	20	0.3894	0.2705	0.2205	0.1921	0.1735	0.1602	0.1501	0.1422	0.1357	0.0500	
	30	0.2929	0.1980	0.1593	0.1377	0.1237	0.1137	0.1061	0.1002	0.0958	0.0333	
	40	0.2370	0.1576	0.1259	0.1082	0.0968	0.0887	0.0827	0.0780	0.0745	0.0250	
120	0.0998	0.0632	0.0495	0.0419	0.0371	0.0337	0.0312	0.0292	0.0279	0.0083		

Tabela A.3: Valores certificados de absorvância (em UA) de soluções de dicromato de potássio em ácido perclórico 1 mM aos comprimentos de onda de 235, 257, 313 e 350 nm, onde C representa a concentração em mg L^{-1} com largura de fenda de 1.0 nm (valores retirados de [59])

C (mg L^{-1})	A_{235}	A_{257}	A_{313}	A_{350}
P1 20.0	0.2184	0.2635	0.0917	0.2114
P2 40.0	0.4534	0.5407	0.1832	0.4119
P3 60.0	0.7239	0.8544	0.2661	0.6417
P4 80.0	0.9794	1.1388	0.3844	0.8523
P5 100	1.2291	1.4440	0.4855	1.0766

A.2 Figuras

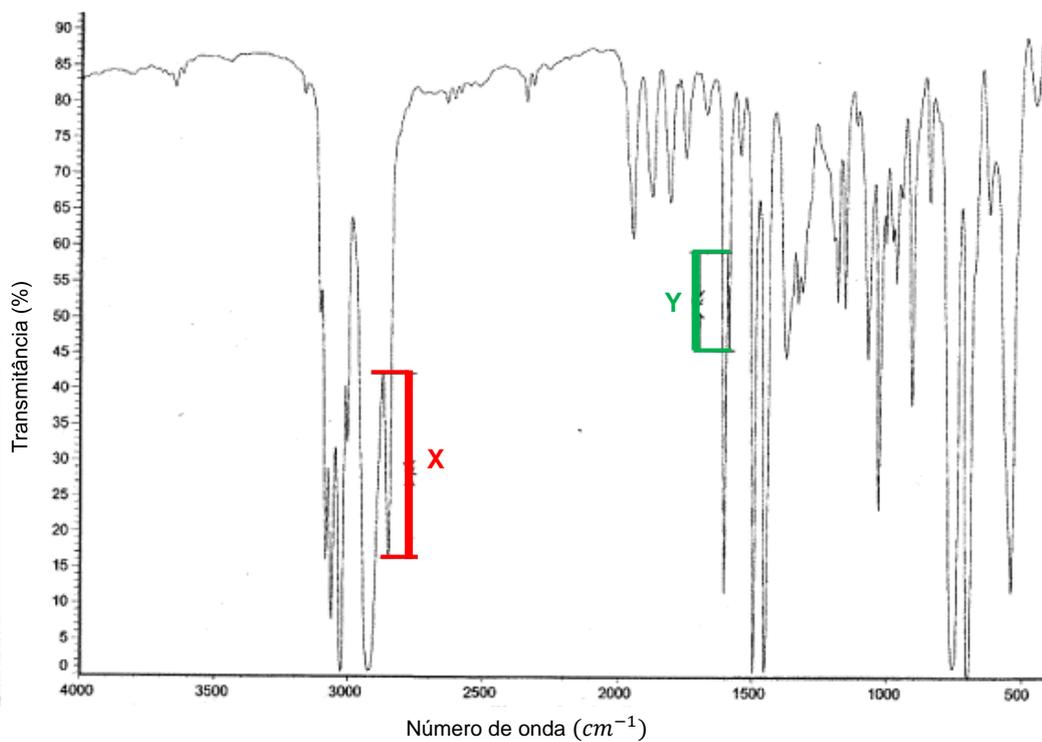


Figura A.1: Espectro do padrão secundário de poliestireno (SRM) usado na verificação do estado da calibração do equipamento de IR. Encontra-se marcada a vermelho a faixa que deve obedecer ao poder de resolução X (Res_X) e a verde a faixa que deve obedecer ao poder de resolução Y (Res_Y).

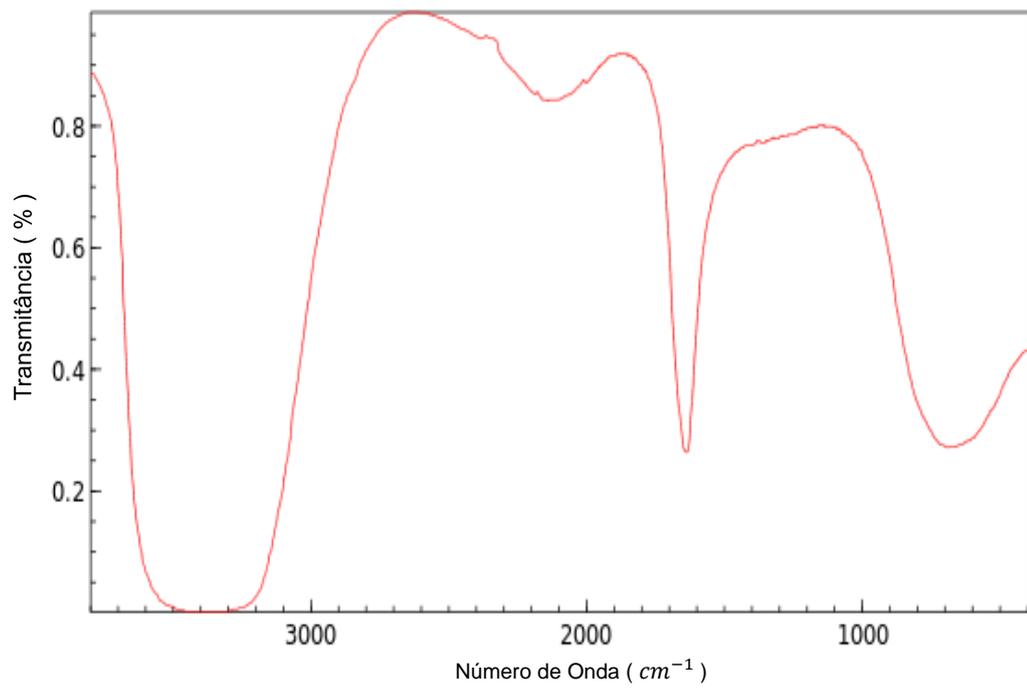


Figura A.2: Espectro de infravermelho da molécula de água (H_2O).

Apêndice B

Programa Empower™ 3

Nas sub-seções seguintes (B.1 a B.4) encontram-se informações relativas ao *software* Empower™ 3, nomeadamente sobre a interface, os cálculos personalizados e os relatórios de análise, assim como sobre o inquérito realizado aos analistas do departamento de controlo da qualidade da FARMALABOR.

B.1 Interface

Este programa foi projetado para ser o mais intuitivo possível. Apresenta uma janela inicial (figura B.1) onde cada utilizador deve iniciar a sua sessão (autenticar-se com o seu nome de utilizador e a palavra-passe respetiva), de modo a que todos os dados que sejam manipulados por esse utilizador possam ser rastreados por um utilizador do tipo supervisor ou administrador, caso necessário, garantindo também a integridade dos dados. Neste painel inicial existem ainda outras opções, nomeadamente a base de dados a que se pretende aceder, um menu de ajuda e uma opção de definição avançada. A base de dados está relacionada com outros programas que a empresa Waters® desenvolveu além do Empower™ 3, como, por exemplo, bases de gestão documental (NuGenesis™). A opção de definição avançada serve para que utilizadores que tenham dois perfis possam escolher com qual deles pretendem iniciar sessão, isto é, poderá haver utilizadores que têm perfil de analista e de supervisor, devendo usar apenas o segundo quando têm de verificar algo ou implementar um novo método de cálculo, enquanto o primeiro perfil deve ser usado sempre que se realizem análises físico-químicas, não se devendo usar para essas situações o perfil de supervisor, por convenção e estipulado na política interna da FARMALABOR. Por sua vez, o ícone de ajuda permite esclarecer qualquer questão que

se tenha através de uma espécie de manual de instruções *online*, em que se pode pesquisar de acordo com o tema ou por palavra-chave da dúvida que se tem. De realçar que todo o programa está desenhado em língua inglesa.

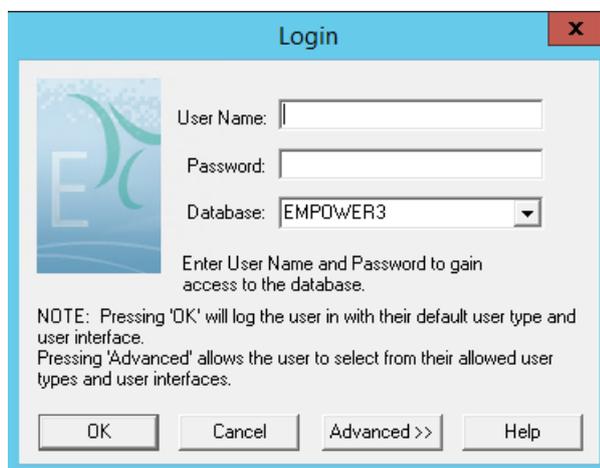


Figura B.1: Janela de início de sessão no Empower™ 3.

Após início de sessão, a interface apresentada é a representada na figura B.2. No topo dessa janela pode-se ver a base de dados que se está a usar, o nome e o tipo do utilizador com que se iniciou sessão, respetivamente. Aqui existem três opções possíveis: configurar o sistema - permite tarefas mais administrativas, como criar ou alterar nomes de projetos já existentes ou ver todos os projetos que constam na base de dados, bem como todos os dados em cada um deles; correr amostras - serve para colocar amostras em análise no respetivo equipamento e de acordo com um método geral previamente estabelecido pelo utilizador; e pesquisar projetos - ver dados, visualizar cromatogramas, realizar cálculos, elaborar relatórios, entre outras opções num determinado projeto.



Figura B.2: Interface de opções após o início de sessão no programa Empower™ 3.

A opção de configurar o sistema só está disponível para utilizadores do tipo supervisor e administrador, enquanto que as outras duas estão acessíveis para todos os utilizadores.

Existem ainda botões de ajuda e de informações no canto superior esquerdo para o caso de existir alguma dúvida por parte do utilizador, assim como a opção de sair da sessão e de iniciar com um novo utilizador.

Ao seleccionar a terceira opção (“*Browse Projects*”), aparecem todos os projetos existentes na memória do programa, sendo que se encontram divididos por ano e tema: matéria-prima (MP) e produto acabado (PA). Deste modo, por exemplo, podemos encontrar o projeto da *Stevia* na pasta de 2020, sub-pasta MP. Abrindo essa pasta, estarão lá todos os dados relativos a todas as análises realizadas a *Stevia* no ano de 2020, organizados por separadores. No cimo da janela principal de cada projeto encontra-se sempre escrito a pasta onde nos encontramos, a base de dados e quem a está a utilizar e qual o tipo de perfil desse utilizador (neste caso, por exemplo, apareceria “dsantos/Supervisor”). Dentro de cada separador é possível filtrar o que se pretende pesquisar, através de filtros automáticos ou de filtros criados pelos utilizadores do tipo supervisor, tornando o *software* mais rápido, dinâmico e intuitivo.

B.2 Cálculos personalizados

No Empower™ 3 existem diversos tipos de campos de cálculo personalizado (tabela B.1) e vários tipos de campos de dados (tabela B.2).

Tabela B.1: Tipos de campos de cálculo personalizado (CF) e tipos de dados suportados em cada um no *software* Empower™ 3.

Campo	Descrição	Tipos de dados suportados	Exemplos
Amostra	Quando existem informações distintas entre amostras ou parâmetros da amostra	Todos	Humidade da amostra
Resultado	Cálculo matemático definido através de parâmetros para cada cromatograma ou resultado	Todos	Resultado do doseamento
Pico	Cálculo matemático definido através de parâmetros para cada sinal existente no cromatograma	Todos	Doseamento em miligramas
Sequência	Quando a informação é igual para toda a amostra	Todos	Número da coluna
Componente	Informação para cada componente existente	Real	Teor do padrão
Distribuição	Intermediário para outros dados já existentes	Real, Booleano ou Enumerador	Nenhum a reportar

Tabela B.2: Tipos de dados existentes no *software* Empower™ 3.

Tipos de dados	Descrição
Real	Números com casas decimais
Inteiro	Números inteiros apenas
Texto	Caracteres alfanuméricos
Data	Números no formato de data
Booleano	Transforma uma fórmula num determinado valor ou texto, através de operadores específicos
Enumerados	Traduz vários Booleanos num valor ou numa lista de respostas de acordo com as condições determinadas pelos Booleanos introduzidos

O cálculo da quantidade de um determinado analito numa amostra é algo que o programa consegue fazer através de CF. Estes cálculos foram criados após um estudo intensivo das fórmulas automáticas que o *software* já apresenta e dos parâmetros que consegue calcular para cada amostra. Estes CF são desenvolvidos caso a caso, produto a produto, sendo necessária grande perícia e conhecimento do sistema *per si*, ainda que em muitos casos acabem por ser fórmulas de cálculo muito idênticas.

Estes campos de cálculo dependem, essencialmente, do tipo de fase do produto (matéria-prima ou produto acabado) e do tipo de ensaio (doseamento (DOS), uniformidade de conteúdo (UC), dissolução (DISS), gastro-resistência (GR) ou impurezas e substâncias relacionadas (IMP)). No entanto, em todos os casos, CF para o doseamento de um analito são sempre do tipo “Pico” e desenvolvidos para fornecer dados do tipo “Real” apenas para soluções do tipo amostra (“*Unknown*”), dado que não se pretende dosear o analito nos padrões.

Um parâmetro automático usado nestes cálculos é o “*Amount*”, que traduz o produto entre o quociente da área da amostra (A_A) pela área do padrão (A_P) e o quociente do fator de diluição do padrão (D_P) pelo fator de diluição da amostra (D_A), multiplicado pelo teor percentual do padrão (T_P), equação B.1, isto é, traduz a quantidade de analito existente por volume de solução (em mg mL⁻¹).

$$Amount = \frac{A_A}{A_P} \times \frac{D_P}{D_A} \times T_P \quad (B.1)$$

A partir daqui calculam-se os valores de doseamento conforme explicado na sub-secção 2.5.1 e de acordo com as equações 2.75 a 2.78.

O resultado final qualitativo é dado por um CF do tipo “Resultado” para dados do tipo “Booleano”, sendo que se define uma gama de valores¹ entre os quais se deve encontrar o valor do $DOS_{base\ anidra}$ ou %DOS da amostra em causa para análises de matéria prima ou produto acabado, respetivamente. Em suma, define-se a gama de aceitação conforme descrita pelas especificações do respetivo produto e dá-se a ordem para que caso o valor do parâmetro de doseamento esteja dentro dessa gama, apareça o texto “Conforme”; se tal não acontecer aparece “Não Conforme”. Genericamente, este CF pode ser definido pela equação B.2, onde “*Parâmetro*” representa $DOS_{base\ anidra}$ para análises de MP e %DOS para análises de PA e L_1 e L_2 representam os limites inferior e superior da gama de aceitação definida pela especificação, respetivamente.

$$Resultado\ Final = RANGE((Nome\ Analito[Parâmetro]), L_1, L_2) \quad (B.2)$$

¹Os valores definidos para a gama de aceitação dependem de produto para produto e são de acordo com a metodologia analítica seguida em cada caso, sempre suportada em monografias oficiais, como as Farmacopeias.

Por vezes, é necessário definir apenas que o resultado está “conforme” se for superior ou inferior a um determinado valor. Nessas situações, o CF a usar será igual ao anteriormente representado, mas com um operador booleano diferente em função do que se pretende, retirando-se também o limite L_2 , uma vez que se passará a querer apenas um valor como referência na tomada de decisão. Os operadores booleanos mais comuns são: *LTE* (inferior ou igual a), *GTE* (superior ou igual a), *LT* (inferior a), *GT* (superior a) e *EQ* (igual a).

B.3 Relatórios de Análise

Até então, todos os resultados eram dados por folhas de cálculo devidamente validadas onde os analistas tinham de digitar as áreas obtidas para cada componente, visualizadas através de *Reports* muito simplistas que continham apenas os cromatogramas e alguma informação acerca da amostra a que esse cromatograma corresponde (tempo de retenção, área, altura, etc.). Assim, de nada serviria ter cálculos automatizados se essas informações não viessem reportadas num documento final com o maior detalhe possível, pelo que uma das tarefas mais importantes no processo de validação e desenvolvimento do Empower™ 3 foi a elaboração e otimização de novos relatórios de análise.

Os novos *Reports* apresentam toda a informação necessária à avaliação dos resultados obtidos, nomeadamente:

1. **Cabeçalho:** contém o tipo de ensaio realizado (DOS, DISS, UC, GR ou IMP) e a dosagem do produto, caso tenha várias dosagens possíveis. Exemplo: “DOSEAMENTO” ou “DISSOLUÇÃO 10 mg”.
2. **Rodapé:** indica o nome do projeto em que se encontram os dados reportados, o nome do relatório de análise, o nome do utilizador que reportou os dados, o nome do equipamento onde foi realizada a análise, o número da coluna de HPLC utilizada, o ID do relatório de análise (número de identificação único para cada método, atribuído automaticamente pelo sistema, garantindo uma maior rastreabilidade), o número da página e a data e hora de impressão do relatório de análise.
3. **Página de rosto:** contém uma zona inicial com informações relativas à análise realizada, nomeadamente: o nome do produto ou matéria prima, o tipo de fase (produto acabado, matéria prima, estabilidade, núcleos ou mistura), nome da metodologia analítica seguida e critérios de aceitação dos resultados, nome do utilizador que realizou a

análise, número do lote e do certificado de análise do fármaco em análise, dados relativos às condições instrumentais (volume de injeção, tempo de corrida e datas de início de aquisição e de processamento dos dados) e nome dos métodos usados (de processamento e geral).

4. **Corpo do relatório:** após o campo inicial descrito anteriormente, as informações vêm ordenadas pela seguinte ordem:

- **Tabela de dados dos padrões:** dados relativos a todos os padrões utilizados: *vial*, número da injeção, nome do padrão, nome da substância a dosear, peso, volume, teor do padrão, lote interno, número do frasco utilizado e data limite de utilização;
- **Tabela de dados das amostras:** dados relativos a todas as amostras analisadas, nomeadamente: *vial*, número da injeção, nome da amostra, nome da substância a determinar, peso, volume, dosagem teórica, peso médio e densidade (estes dois últimos apenas se aplicável);
- **Cromatogramas:** gráficos de absorvância (em mUA) em função do tempo de corrida (em min.), ordenados por ordem de aquisição e com a identificação dos sinais cromatográficos conforme descrito no método de processamento usado;
- **Tabela de dados dos sinais:** dados relativos a todos os sinais identificados em todos os cromatogramas, como: *vial*, número da injeção, nome da solução (padrão/amostra), tempo de retenção, tempo de retenção relativo, área, altura do pico, fator de simetria, número de pratos teóricos e resolução relativa;
- **Tabelas de adequabilidade do sistema:** tabela de padrões individuais (P1, P2, P3, ...) e tabela com todos os padrões, de forma a avaliar os requisitos de adequabilidade do sistema (*System Suitability*) exigidos pela metodologia;
- **Tabela de resultados:** tabela de resultados finais obtidos, que contém a informação de cada amostra e ainda o valor de doseamento obtido em *as is* (para MP, ver equação 2.75) ou miligramas por unidade (para PA, ver equação 2.77) e em base anidra (para MP, ver equação 2.76) ou percentagem (para PA, ver equação 2.78), assim como se esse resultado está conforme ou não conforme perante os critérios de aceitação da metodologia, sendo que este resultado qualitativo é dado de acordo com a equação B.2.

B.4 Inquérito aos analistas

Foi realizado um inquérito aos analistas do departamento de controlo da qualidade da FARMALABOR que usam diariamente nas suas tarefas o Empower™ 3, com o objetivo de avaliar o trabalho desenvolvido ao longo de todo este projeto industrial relativamente à validação do programa Empower™ 3 e à sua otimização.

O inquérito foi realizado *online* de forma anónima e teve um período de aceitação de respostas de 10 dias. A taxa de respostas foi de 93.8 %, o que revela uma grande vontade dos analistas em quererem expressar a sua opinião relativamente ao programa em causa.

Começou-se por se pedir que os utilizadores classificassem (de 0 a 10, sendo 0 discordar totalmente e 10 concordar completamente) várias características do Empower™ 3, nomeadamente a utilidade, rapidez, facilidade, intuitividade e a lógica. Os resultados encontram-se esquematizados na figura B.3.

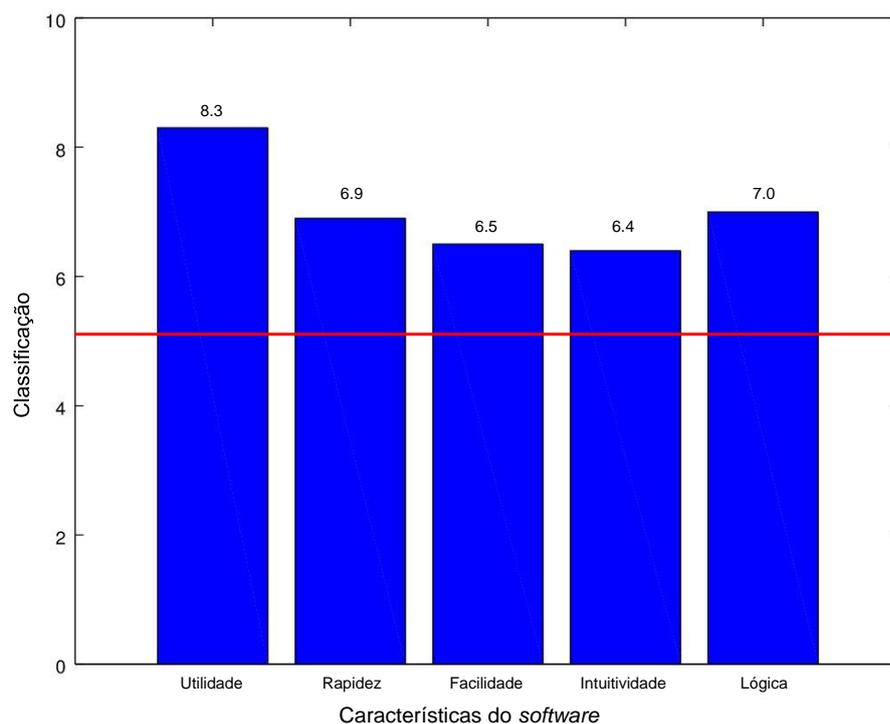


Figura B.3: Classificação quantitativa (de 0 a 10, sendo 0 discordar totalmente e 10 concordar completamente) das várias características do Empower™ 3 de acordo com a opinião dos analistas do controlo da qualidade da FARMALABOR. A linha a vermelho representa o valor central (5.0) da classificação.

Com base nas respostas (figura B.3), conclui-se que os analistas consideram o *software*

pouco intuitivo (classificação de 6.4) e ligeiramente difícil de entender (6.5), mas, em contrapartida, a maioria acha-o muito útil (8.3). Além disso, também consideram o Empower™ 3 lógico (7.0) e ligeiramente rápido (6.9).

Foram ainda realizadas outras questões, cujos resultados se encontram na figura B.4.

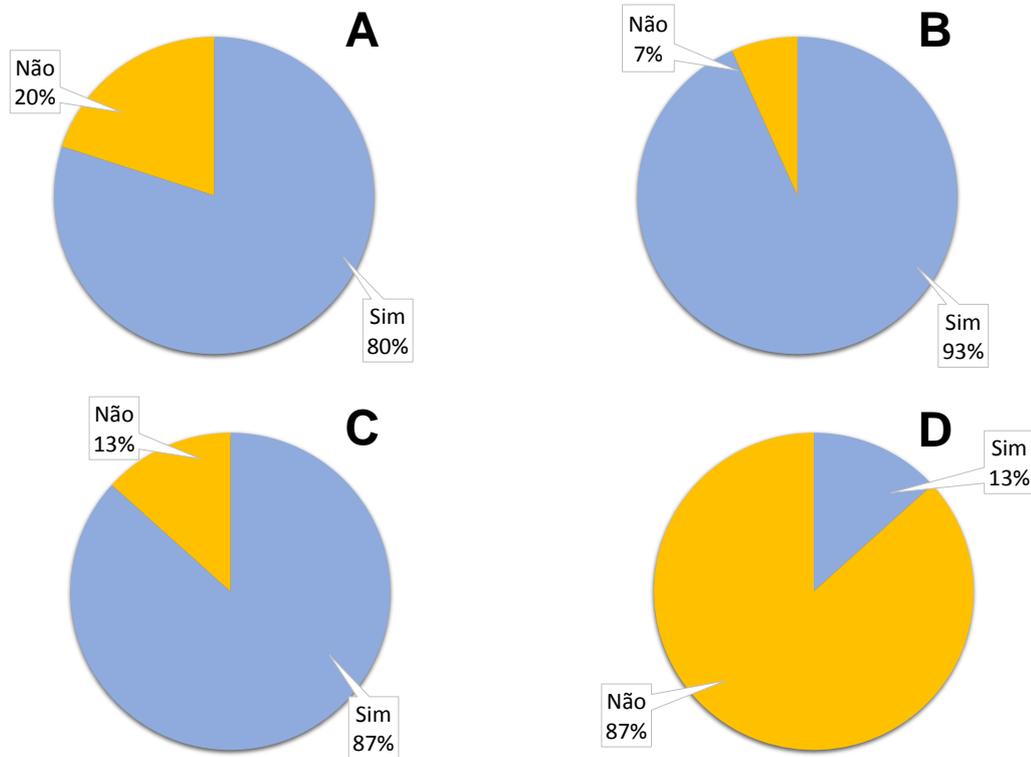


Figura B.4: Respostas obtidas às questões se: (A) o programa foi um *upgrade* em termos de cálculo laboratorial; (B) o *software* veio facilitar os cálculos; (C) sabem aceder ao documento informativo do estado de validação dos produtos; (D) o programa implicou gasto de tempo útil no quotidiano.

Questionados se consideravam que este programa teria sido um *upgrade* em termos de cálculo laboratorial quando comparado com o que se utilizava anteriormente (figura B.4 A), sendo que a resposta foi praticamente unânime com 80 % a afirmar que terá sido uma implementação de grande avanço tecnológico. A juntar-se a estes dados (figura B.4 B), 93 % dos analistas considera que o Empower™ 3 veio facilitar os cálculos que até então se realizavam nas folhas de cálculo de Microsoft® Excel.

Sobre a rapidez do processo de validação - iniciado em setembro de 2019 - obteve-se a classificação de 8.4 numa escala de 0 a 10, sendo 0 “muito lenta” e 10 “muito rápida”. Considera-se, portanto, que os colaboradores e analistas do departamento de controlo da

qualidade da unidade industrial em causa estão muito satisfeitos com a rapidez na validação via Empower™ 3. Os novos relatórios de análise foram classificados como fáceis de ler e compreender, após obtenção da classificação 7.8 em 10.

Questionados sobre o facto de saberem onde aceder para ver o estado de validação dos diversos produtos, 93 % afirmam saber (figura B.4 C) e todos os inquiridos consideram esse documento esclarecedor e de fácil consulta, pelo que não é necessária nenhuma otimização ou alteração no mesmo. Além do documento informativo em causa, são enviados semanalmente via *e-mail* para todos os colaboradores do controlo da qualidade da FARMALABOR o estado da situação da validação nessa semana, referindo-se quais os produtos validados ao longo desses cinco dias e para que tipo de ensaio.

Após se perguntar se o Empower™ 3 terá causado algum inconveniente na rotina diária do laboratório nos últimos tempos (figura B.4 D), 13 % responderam que sim, apresentando como principal razão o facto de se ter de ajustar manualmente alguns sinais, existindo trabalho “a dobrar”. Para essas situações, os métodos de processamento têm de ser otimizados e revistos. No entanto, 87 % considera que o *software* não implicou gasto de tempo que poderia ser dispensado noutras tarefas úteis ao quotidiano no laboratório.

Por forma a saber a capacidade de cada um dos colaboradores perante o *software* Empower™ 3, colocaram-se questões relativas às funcionalidades de cálculo mais utilizadas no quotidiano, pedindo-se que classificassem cada questão de 0 a 10, sendo 0 não saberem executar de todo e 10 saberem executar sem quaisquer dificuldades. Os resultados encontram-se na figura B.5.

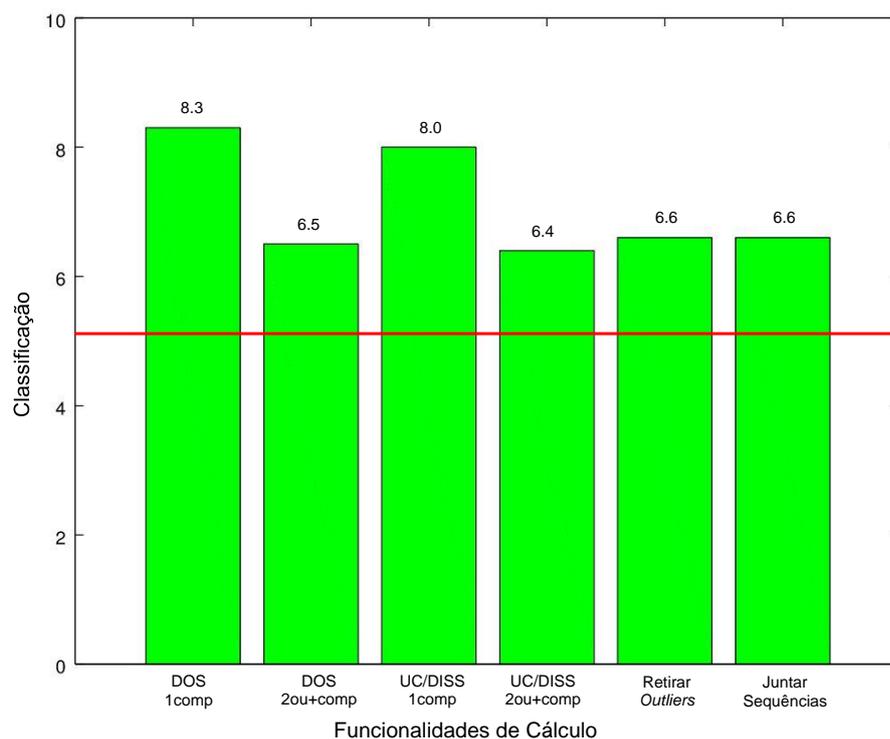


Figura B.5: Classificação do conhecimento de cada utilizador do departamento de controlo da qualidade da FARMALABOR perante os diversos ensaios e funcionalidades mais comuns de realizar no quotidiano laboratorial com o programa. A linha a vermelho representa o valor central (5.0) da classificação.

Quanto aos ensaios de doseamento (DOS) e aos ensaios de uniformidades de conteúdo (UC) ou dissolução (DISS) com apenas um componente, os colaboradores consideram-se capazes de realizar cálculos facilmente (8.3 e 8.0, respetivamente); já quando se trata de ensaios do mesmo tipo com dois ou mais componentes, os colaboradores consideram ligeiramente difícil realizar esses cálculos através do Empower™ 3 (6.5 e 6.4, respetivamente), o que é perfeitamente compreensível, dado que o processo de introdução de dados é ligeiramente distinto dos anteriores (apenas um componente), havendo maior fonte de erro.

Relativamente à capacidade para retirar valores anómalos de uma curva de calibração (por exemplo, quando um padrão está totalmente diferente de todos os outros ou quando ocorre alteração inesperada numa das injeções de padrão), os colaboradores consideram ser capazes de o fazer (6.6), embora possam ter algumas dificuldades. O mesmo se verifica (6.6) para quando é necessário juntar sequências no Empower™ 3, como em casos de ter de se parar o equipamento e voltar a retomá-lo por algum motivo (nestas situações, o sistema “parte” a sequência em duas).

De uma forma geral, ainda há muito para otimizar e implementar no Empower™ 3, mas também ainda há muito conhecimento a transmitir aos analistas que, aparentemente, estão focados em querer saber mais sobre este *software* e o seu modo de funcionamento, com 100 % dos inquiridos a afirmar que gostava de saber mais sobre este programa computacional.

Por fim, foram também pedidas sugestões de melhoria aos inquiridos. Na sua maioria, as sugestões e críticas foram construtivas e daqui poderão sair algumas ideias futuras bastante interessantes e promissoras. Foi referido mais do que uma vez a necessidade de formação aos colaboradores, assim como a vontade de implementação do cálculo automático de impurezas e substâncias relacionadas via Empower™ 3.