



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

TESE DE DOUTORADO

**Um Método Espectrométrico de Emissão em Chama
Baseado em Imagens Digitais para Determinação Indireta
de Fármacos e Determinação Simultânea de Sódio e Cálcio**

Wellington da Silva Lyra

João Pessoa – PB - Brasil

2012



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

TESE DE DOUTORADO

**Um Método Espectrométrico de Emissão em Chama
Baseado em Imagens Digitais para Determinação Indireta
de Fármacos e Determinação Simultânea de Sódio e Cálcio**

Wellington da Silva Lyra

Tese apresentada como um dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química pela Universidade
Federal da Paraíba.

Orientador: **Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida**
Co-orientador: **Prof. Dr. Valdomiro Lacerda Martins**

João Pessoa – PB - Brasil

2012

L992u Lyra, Wellington da Silva.

Um método espectrométrico de emissão em chama baseado em imagens digitais para determinação indireta de fármacos e determinação simultânea de sódio e cálcio / Wellington da Silva Lyra.- João Pessoa, 2013.

92f. : il.

Orientador: Luciano Farias de Almeida

Coorientador: Valdomiro Lacerda Martins

Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN

1. Química. 2. Imagens digitais. 3. Sistemas de cores RGB.
4. Espectrometria de emissão em chama - imagens digitais.
5. Injetáveis e leite em pó.

UFPB/BC

CDU: 54(043)

Aos professores com quem descobri e
passei a amar a química. Com todo
carinho e gratidão DEDICO.

Agradecimentos

- ✚ Ao grandioso Deus que em sua bondade infinita nos concedeu o dom da vida além de outros que nos tornam capazes de vencer os obstáculos da vivência humana.
- ✚ Aos meus familiares.
- ✚ Aos meus orientadores Luciano Farias de Almeida e Valdomiro Lacerda Martins que INCONDICIONALMENTE acreditaram na proposta deste trabalho e que estiveram ao meu lado incondicionalmente mesmo nos momentos de receber pedradas, além de me ensinar lições MUITO INSTRUTIVAS.
- ✚ Aos professores Edvan Cirino da Silva e Wallace Duarte Fragoso por todas as sugestões no exame de qualificação e na defesa da Tese.
- ✚ Aos membros externos da banca, a professora Fernanda Araújo Honorato e ao perito Ricardo Saldanha Honorato por todas as sugestões para a versão final da tese.
- ✚ Ao Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM), na pessoa dos professores Antônio Gouveia de Souza e Ieda Maria Garcia dos Santos que gentilmente disponibilizaram o espectrômetro de absorção atômica em chama para realização das análises de leite em pó.
- ✚ À Evaneide que disponibilizou seu tempo para operação do espectrômetro de absorção em chama e obtenção dos valores de referência das análises de leite em pó.
- ✚ Ao Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica/Quimiometria (LAQA), na pessoa do professor Mário César Ugulino de Araújo que gentilmente disponibilizou a infraestrutura do LAQA para o desenvolvimento desta tese.

- ✚ À Fátima, Paulo Henrique e Francisco Antônio (chicote) pela substancial ajuda na parte experimental.
- ✚ A Adriano pela revisão do texto e discussões profícuas acerca da análise multivariada;
- ✚ Aos demais alunos de iniciação científica, de mestrado e de doutorado do LAQA pela convivência que proporcionou momentos agradáveis e memoráveis.
- ✚ À Linda (*in memorian*), Diva (*in memorian*), Darinha (*in memorian*), Chatinha (*in memorian*), Feinho-Bonitinho (*in memorian*), Nininho (*in memorian*), Pepe, Larinha e aos demais integrantes do núcleo felino do DQ pelas lições diárias de amor incondicional e pela companhia nos dias de trabalho solitário.

**Um Método Espectrométrico de Emissão em Chama Baseado em
Imagens Digitais para Determinação Indireta de Fármacos e
Determinação Simultânea de Sódio e Cálcio**

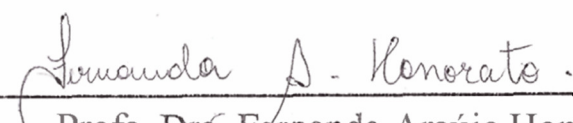
Tese de Doutorado de Wellington da Silva Lyra aprovada pela banca
examinadora em 11 de setembro de 2012:



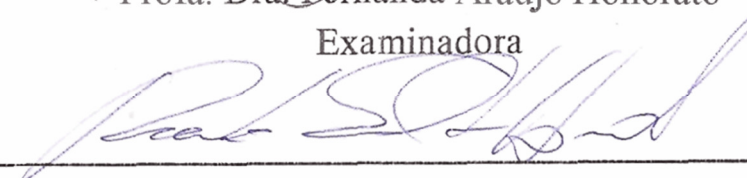
Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Valdomiro Lacerda Martins
2º. Orientador



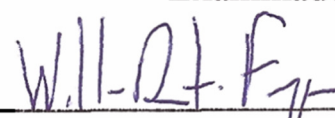
Profa. Dra. Fernanda Araújo Honorato
Examinadora



Prof. Dr. Ricardo Saldanha Honorato
Examinador



Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva
Examinador



Prof. Dr. Wallace Duarte Fragoso
Examinador

RESUMO

Título: “Um Método Espectrométrico de Emissão em Chama Baseado em Imagens Digitais para Determinação Indireta de Fármacos e para Determinação Simultânea de Sódio e Cálcio”

Neste trabalho a potencialidade da Espectrometria de Emissão em Chama Baseada em Imagens digitais (DIB-FES) é demonstrada por meio de duas aplicações completamente distintas. A primeira consiste na determinação indireta de três fármacos em soluções injetáveis: diclofenaco sódico, dipirona sódica e gluconato de cálcio e a segunda na combinação da DIB-FES com Regressão Linear Múltipla (MLR) para a determinação simultânea de sódio e cálcio em amostras de leite em pó. Até o presente momento a literatura não reporta a utilização da FES tradicional na: determinação indireta de substâncias orgânicas, determinação simultânea de analitos utilizando um único detector e superação do problema de interferência espectral. Na DIB-FES as imagens digitais da chama são capturadas pela *webcam* na região oxidante da mesma (2,5 cm acima do queimador do fotômetro) e estão associadas às radiações emitidas pelos metais presentes na chama ar-butano. Com base no sistema de cores Vermelho-Verde-Azul (RGB) foram desenvolvidos modelos de calibração univariada e multivariada, os quais foram validados e então aplicados em amostras reais. Em cada aplicação os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos por seus respectivos métodos de referência. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre resultados ao aplicar o teste *t* emparelhado ao nível de 95% de confiança. A precisão estimada foi melhor do que a de seus respectivos métodos de referência e a exatidão foi verificada por altas taxas de tendência e fatores de recuperação entre 97 e 104% nas duas aplicações.

Palavras-chave: Imagens digitais, Sistema de cores RGB, Espectrometria de emissão em chama baseada em imagens digitais, Injetáveis e Leite em pó.

ABSTRACT

Title: “A Digital Image-Based Flame Emission Spectrometric Method for Indirect Determination of Drugs and Simultaneous Determination of Sodium and Calcium”

In this work the potential of the Digital Image-Based Flame Emission Spectrometry (DIB-FES) is demonstrated through two completely separate applications. The first one consists in the indirect determination of three drugs in injectable form: sodium diclofenac, sodium dipyrone and clacium gluconate and the second in the combination of DIB-FES with Multiple Linear Regression (MLR) for the simultaneous determination of sodium and calcium in powder milk. Up to the present moment the literature does not report the use of traditional FES in: indirect determination of organic substances, simultaneous determination of analytes using a unique detector and overcoming the problem of spectral interference. In DIB-FES digital images of the flame are captured by webcam in its oxidant region (2,5 cm over the burner of the flame photometer) and are associated with the radiation emitted by metals present in the air-butane flame. Based on Red-Green-Blue (RGB) colour system, univariate and multivariate calibration models were developed, which were validated and then applied to real samples. In each application the results were compared with the results obtained by their respective reference methods. There were no statistically significant differences between the results when the paired *t*-test at the 95% confidence level. The estimated precision was better than the respective reference methods and accuracy was assessed by high values of bias and recovery rates between 97 and 104% in the two applications.

Keywords: Digital images, RGB colour system, Digital Image-based flame emission spectrometry, Injection drugs and Powder milk.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1.1. Anatomia do olho humano	16
Ilustração 1.2. Cone e bastonete	16
Ilustração 1.3. curvas de resposta dos cones	17
Ilustração 1.4. Cubo de cor	17
Ilustração 1.5. Cores primárias aditivas: vermelho, verde e azul	18
Ilustração 1.6. Representação geométrica de um ângulo diedral e de um azimutal	20
Ilustração 2.1. Espaço RGB ilustrando um vetor posição de uma imagem digital	32
Ilustração 2.2. Fórmula estrutural do diclofenaco sódico	34
Ilustração 2.3. Fórmulas estruturais da: dipirona sódica (a) e seus produtos de hidrólise: 4-N-metil-amino-antipirina (4MAA) (b) e 4-amino-antipirina (4AA) (c)	35
Ilustração 2.4. Fórmula estrutural do gluconato de cálcio	35
Ilustração 2.5. Foto do módulo de aquisição de imagens e seu diagrama esquemático ao lado	38
Ilustração 2.6. Foto da tela do programa de “Capturar Imagens da <i>webCam</i> ”	39
Ilustração 2.7. Foto da tela do programa “Cor Emissão”	40
Ilustração 2.8. Diagrama esquemático simplificado da rotina do cálculo da norma do vetor pelo programa “Cor Emissão”	42
Ilustração 2.9. Imagem digital com $n \times m$ <i>pixels</i> obtida na determinação de sódio. x_1 , x_2 , y_1 e y_2 são coordenadas da região delimitada	42
Ilustração 2.10. Imagens digitais da emissão de: (a) diclofenaco sódico (24,9 – 124,5 mg L ⁻¹), (b) dipirona sódica (27,5 – 137,5 mg L ⁻¹) e (b) e gluconato de cálcio (282,0 – 1410,0 mg L ⁻¹)	45
Ilustração 2.11. Espectros de emissão em uma chama butano-ar de: (a) sódio e (b) banda de emissão do radical CaOH. Em destaque, são mostradas: (a) a raia de ressonância do sódio e (b) o pico correspondente ao comprimento de onda máximo da banda de emissão do radical CaOH	46
Ilustração 2.12. Norma dos vetores $\mathbf{v}_1 - \mathbf{v}_5$ de cada solução de calibração e os valores $\bar{R}_{s-b}$, $\bar{G}_{s-b}$ e $\bar{B}_{s-b}$ para cada imagem digital de: (a) diclofenaco sódico,	

(b) dipirona sódica e (c) gluconato de cálcio	47
Ilustração 2.13. Curvas analíticas DIB-FES e resíduos deixados pelos modelos lineares para os três analitos determinados: (a) diclofenaco sódico, (b) dipirona sódica e (c) gluconato de cálcio	49
Ilustração 3.1. Espectros de transmissão dos filtros de interferência do fotômetro de chama utilizado	56
Ilustração 3.2. Imagens digitais da emissão de das misturas de: (a) sódio e (b) cálcio	70
Ilustração 3.3. Efeito da adição de metais sobre as componentes R e G das imagens digitais das misturas de: (a) sódio e (b) cálcio	71
Ilustração 3.4. Imagens referentes aos conjuntos de calibração e previsão. A disposição das imagens segue exatamente a mesma disposição das misturas na Tabela 3.2	73
Ilustração 3.5. Ferramentas de diagnóstico: (a) gráfico de concentração prevista versus concentração real, (b) resíduo versus ordem das amostras e (c) EJCR	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Avaliação da seletividade de um método analítico	11
Tabela 1.2. Parâmetros para escolha da faixa de trabalho de um método analítico	12
Tabela 1.3. Critérios de aceitação dos parâmetros de validação usados neste trabalho	15
Tabela 2.1. Métodos oficiais descritos para a determinação de diclofenaco sódico, dipirona sódica e gluconato de cálcio em três farmacopéias diferentes.	26
Tabela 2.2. Equações para ANOVA de dados experimentais adaptados a modelos lineares determinados pelo método OLS	29
Tabela 2.3. Valores de $\bar{R}$, $\bar{G}$ e $\bar{B}$ obtidos das imagens digitais capturadas para as soluções padrão	44
Tabela 2.4. Intervalo de confiança (ao nível de 95%) para os coeficientes do modelo do método DIB-FES	48
Tabela 2.5. Análise de variância para o ajuste do modelo linear ($\hat{Y} = \alpha + \beta X$) das curvas analíticas (Ilustração 2.13)	50
Tabela 2.6. Faixa de trabalho e linearidade para os três analitos usando o método DIB-FES	51
Tabela 2.7. LOD e LOQ para os três analitos usando o método DIB-FES	51
Tabela 2.8. Resultados da determinação indireta de diclofenaco sódico, dipirona sódica e gluconato de cálcio em amostras de injetáveis	53
Tabela 3.1. Métodos descritos na literatura para a determinação de sódio e cálcio	55
Tabela 3.2. Critérios de aceitação de um modelo de calibração multivariada usados neste trabalho	62
Tabela 3.3. Níveis de concentração das misturas	65
Tabela 3.4. Níveis de concentração (mg L^{-1}) das misturas binárias utilizadas no estudo de influência da emissão de diferentes metais sobre a cor da chama	70
Tabela 3.5. Composição das misturas binárias na Ilustração 3.2	71
Tabela 3.6. Valores de VIF para as variáveis da matriz X	73
Tabela 3.7. Valores dos parâmetros de avaliação qualidade dos modelos de calibração MLR	74

Tabela 3.8. Resultados da determinação de Na e Ca em amostras sintéticas (conjunto de previsão) utilizando os modelos de calibração MLR	74
Tabela 3.9. Valores de correlação e RMSEP referentes à previsão das amostras sintéticas utilizando os modelos de calibração MLR	75
Tabela 3.10. Resultados da determinação simultânea de sódio e cálcio em amostras de leite em pó	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
C	Concentração do analito
DIB-FES	Espectrometria de emissão em chama baseada em imagens digitais
EJCR	Região Elíptica de Confiança Conjunta
EDTA	Ácido etileno – diamino – tetraacético
FAAS	Espectrometria de absorção atômica em chama
FES	Espectrometria de emissão em chama
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MC	Mistura de calibração
MLR	Regressão linear múltipla
MP	Mistura de previsão
MQ	Média quadrática
OLS	Mínimos quadrados ordinários
REM	Radiação eletromagnética
RGB	Vermelho-verde-azul
RMSEC	Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração
RMSEP	Raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão
SD	Desvio padrão
SQ	Soma quadrática

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1. Caracterização geral da problemática e proposta de solução	2
1.2. Objetivos	3
1.2.1. Objetivo geral	3
1.2.2. Objetivos específicos	3
1.3. Métodos diretos de calibração univariada	4
1.3.1. Método dos mínimos quadrados ordinários	4
1.4. Métodos inversos de calibração multivariada	7
1.4.1. Regressão Linear Múltipla	7
1.5. Validação de métodos analíticos	10
1.5.1. Seletividade	11
1.5.2. Linearidade	11
1.5.3. Faixa de trabalho	11
1.5.4. Limite de detecção e de quantificação	12
1.5.5. Tendência	13
1.5.5.1. Ensaios de recuperação	13
1.5.6. Precisão	14
1.5.7. Robustez	14
1.5.8. Critérios de aceitação para validação de um método analítico	15
1.6. Sistema de cores primárias aditivas	15
1.7. Emprego de imagens digitais nas ciências analíticas	21
1.8.1. Em métodos baseados na emissão de REM	21
1.8.2. Em calibração multivariada	23
 CAPÍTULO 2: DETERMINAÇÃO INDIRETA DE FÁRMACOS EM INJETÁVEIS	25
2.1. Considerações gerais	26
2.1.1. Determinação indireta de substâncias orgânicas	26
2.1.2. Injetáveis	27
2.1.3. Validação de modelos de calibração univariada	28
2.1.4. O modelo matemático utilizado	31
2.1.5. Cálculo dos limites de detecção e de quantificação	33

2.1.6. Os analitos	34
2.1.6.1. Diclofenaco sódico	34
2.1.6.2. Dipirona sódica	34
2.1.6.3. Gluconato de cálcio	35
2.2. Métodos oficiais	36
2.3. Experimental	36
2.3.1. Reagentes, soluções padrão e amostras	36
2.3.2. Equipamentos	37
2.3.2.1. Sistema de aquisição de imagens	37
2.3.3. Programas computacionais utilizados	38
2.3.3.1. Desenvolvimento dos modelos de calibração univariada	38
2.3.3.2. Na captura de imagens digitais	38
2.3.3.3. No tratamento de imagens digitais	40
2.3.4. Tratamento das imagens digitais	42
2.3.5. Procedimento adotado	43
2.3.6. Testes de recuperação	43
2.3.7. O banco de dados	43
2.4. Resultados e discussão	43
2.4.1. Os dados oriundos das imagens digitais	43
2.4.2. Imagens digitais e o fenômeno de emissão de REM	44
2.4.3. Relação entre $\ V\ $ e os valores experimentais de $\bar{R}_{s-b}$, $\bar{G}_{s-b}$ e $\bar{B}_{s-b}$	46
2.4.4. Curvas analíticas e validação	47
2.4.5. Análise do desempenho do método DIB-FES	51
CAPÍTULO 3: DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE SÓDIO E CÁLCIO EM	
LEITE EM PÓ	54
3.1. Considerações gerais	55
3.1.1. Determinações simultâneas utilizando FES	56
3.1.2. Leite em pó	57
3.1.3. Validação de modelos de calibração multivariada	58
3.1.3.1. Avaliação da calibração	58
3.1.3.2. Avaliação da previsão	59
3.1.3.3. Critérios para aceitação de um modelo de calibração multivariada	62

3.2. Métodos oficiais	63
3.3. Experimental	64
3.3.1. Reagentes, soluções padrão e amostras	64
3.3.2. Equipamentos	65
3.3.2.1. Sistema de aquisição de imagens	66
3.3.3. Programas computacionais utilizados	66
3.3.3.1. No desenvolvimento dos modelos de calibração MLR	66
3.3.3.1. Na captura de imagens digitais e no tratamento de imagens digitais ...	66
3.3.4. A escolha entre agente de liberação e de proteção	66
3.3.5. Procedimento adotado	68
3.3.6. Testes de recuperação	68
3.3.7. O banco de dados	69
3.4. Resultados e discussão	69
3.4.1. Influência da emissão de diferentes metais sobre a cor da chama	69
3.4.2. Desenvolvimento e validação dos modelos de calibração MLR	73
 CAPÍTULO 4: CONCLUSÃO	 78
4.1. Propostas futuras	80
 CAPÍTULO 5: REFERÊNCIAS	 82



A galáxia arco-íris – Nina Yang

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Caracterização geral da problemática e proposta de solução

A Espectrometria de Emissão em Chama, FES (do inglês: *Flame Emission Spectrometry*) também conhecida por fotometria de chama é a técnica mais antiga para a realização de análise química sem a utilização dos procedimentos químicos tradicionais (JARREL, 2000).

A FES consolidou-se como técnica analítica por dois grandes feitos (FILGUEIRAS, 1996):

- Permitiu em poucos anos a descoberta de elementos químicos, especialmente os que correspondiam às lacunas presentes na tabela periódica publicada em 1869 por Dimitri Ivanovich Mendeleev.
- Lançou as bases experimentais para estudos da constituição íntima da matéria e o desenvolvimento de outros modelos atômicos.

Apesar dos trabalhos de Bunsen e Kirchhoff demonstrarem que usando a FES é possível determinar vários elementos, na prática ela é indicada apenas para a determinação de metais alcalinos (Li, Na, K, Rb e Cs) e alguns metais alcalino-terrosos (Ca, Sr e Ba) pois estes possuem energias de ionização relativamente baixas. Neste caso, ela não poderia ser utilizada na determinação de substâncias orgânicas.

Nos fotômetros de chama comerciais o isolamento das raias de emissão é feito por intermédio do uso de filtros ópticos de interferência individuais, os quais estão disponíveis apenas para determinação de Li, Na, K e Ca. Para cada filtro de interferência existe um sistema eletrônico independente (instrumento multicanal), permitindo que determinações simultâneas sejam realizadas.

Considerando um determinado filtro de interferência, a realização de determinações simultâneas utilizando este mesmo filtro não é possível devido à sua janela espectral que impossibilita a captura simultânea de mais de um sinal analítico.

Uma variante da FES tradicional denominada Espectrometria de emissão em chama Baseada em Imagens digitais, DIB-FES (do inglês: *Digital Image-Based Flame Emission Spectrometry*) proposta por neste trabalho mostrou um excelente desempenho analítico na determinação direta de lítio, sódio e cálcio em comprimidos

antidepressivos, soro fisiológico e águas respectivamente (LYRA et al., 2009).

Neste trabalho propõe-se o uso da DIB-FES na determinação indireta de fármacos em injetáveis e na determinação simultânea de sódio e cálcio em leite em pó.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Demonstrar a potencialidade da DIB-FES para a determinação indireta de fármacos em soluções injetáveis e para a determinação simultânea de sódio e cálcio em amostras de leite em pó mesmo na presença de interferência espectral.

1.2.2. Objetivos específicos

- ✚ Investigar a emissão em chama do diclofenaco sódico, dipirona sódica e gluconato de cálcio;
- ✚ Investigar a influência da emissão simultânea de metais na chama sobre a resposta analítica na DIB-FES;
- ✚ Investigar a influência da interferência espectral sobre as componentes RGB;
- ✚ Desenvolver modelos de calibração uni e multivariados;
- ✚ Validar os modelos de calibração univariada por intermédio da análise de variância, ANOVA (do inglês: *Analysis of Variance*);
- ✚ Validar os modelos de calibração multivariada por intermédio de ferramentas de diagnóstico;
- ✚ Aplicar a DIB-FES na determinação indireta de diclofenaco sódico, dipirona sódica e gluconato de cálcio em injetáveis e na determinação simultânea de sódio e cálcio em leite em pó;
- ✚ Avaliar o desempenho da DIB-FES comparando-a com os métodos de referência por intermédio de testes estatísticos aplicados aos resultados das determinações analíticas.

1.3. Métodos diretos de calibração univariada

1.3.1. Método dos mínimos quadrados ordinários

Ao construir uma curva analítica o ideal é que a mesma passe “o mais próximo possível” dos pontos experimentais. Para tal o método mais utilizado método dos Mínimos Quadrados Ordinários, OLS (do inglês: *Ordinary Least Squares*) que fornece resultados não tendenciosos e com variância mínima dentro de certas suposições de natureza estatística (DRAPER e SMITH, 1998 e MONTGOMERY e PECK, 1982).

Nos modelos de calibração univariada, a propriedade de interesse (y) está diretamente relacionada com a concentração do analito (x) na forma $\alpha + \beta x$. Então pode-se escrever um modelo de primeira ordem

$$y = \alpha + \beta x + \epsilon \quad (1)$$

isto é, para um dado x , uma observação correspondente y consiste do valor $\alpha + \beta x$ mais uma quantidade ϵ , o incremento pelo qual qualquer y individual pode cair fora linha de regressão. Usando as informações fornecidas pelo banco de dados para obter os estimadores a e b de α e β pode-se então escrever.

$$\hat{y} = a + bx \quad (2)$$

onde $\hat{y}$, lê-se “ y chapéu”, denota o valor previsto de y para um dado x , quando a e b são determinados por regressão linear usando o método OLS.

Para um dado número de observações (x_1, y_1) , (x_2, y_2) , ... , (x_n, y_n) pode-se escrever:

$$y_i = \alpha + \beta x_i + \epsilon_i \quad (3)$$

para $i = 1, 2, \dots, n$, então a soma dos quadrados dos desvios da linha ideal (que possui as menores distâncias com relação aos pontos) é:

$$S = \sum_{i=1}^n \epsilon_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - a - bx_i)^2 \quad (4)$$

S também é chamada de função soma dos quadrados. Escolhendo nos estimadores a e b para os valores que, quando substituídos por α e β na **Equação 4**, produzem os menores valores possíveis de S. Os valores de a e b podem ser determinados diferenciando a **Equação 4** primeiro com relação a α e em seguida com relação a β tem-se.

$$\frac{\partial S}{\partial a} = -2 \sum_{i=1}^n (y_i - a - bx_i) \quad (5)$$

$$\frac{\partial S}{\partial b} = -2 \sum_{i=1}^n x_i (y_i - a - bx_i) \quad (6)$$

Igualando as duas derivadas a zero e admitindo que os estimadores a e b são as soluções das **Equações 5 e 6** tem-se:

$$\sum_{i=1}^n (y_i - a - bx_i) = 0 \quad (7)$$

$$\sum_{i=1}^n x_i (y_i - a - bx_i) = 0 \quad (8)$$

Desdobrando os somatórios das **Equações 7 e 8** tem-se um sistema de duas equações lineares, que são chamadas equações normais:

$$an + b \sum_{i=1}^n x_i = \sum_{i=1}^n y_i \quad (9)$$

$$a \sum_{i=1}^n x_i + b \sum_{i=1}^n x_i^2 = \sum_{i=1}^n x_i y_i \quad (10)$$

Cuja solução é:

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (11)$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (12)$$

A **Equação 11** é o intercepto da reta e a **Equação 12** é a inclinação da reta que melhor se ajusta aos pontos experimentais (reta ideal). Os erros padrão

associados às estimativas desses parâmetros podem ser calculados por intermédio das expressões (PIMENTEL E BARROS NETO, 1996):

$$s(a) = s \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i)^2}{n \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (13)$$

$$s(b) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (14)$$

$$s = \sqrt{MQ_{Residual}} \quad (15)$$

A $MQ_{Residual}$ é calculada de acordo com a **Equação 41** (Seção 2.1.3.).

A partir dos valores dos erros padrão das estimativas de a e b , são construídos os seus respectivos intervalos de confiança a um dado nível de confiança para verificar se os parâmetros possuem significância estatística.

Utilizando a distribuição de *Student*, o intervalo de confiança é construído em torno das estimativas de a e b :

$$\alpha = a \pm t_v s(a) \quad (16)$$

$$\beta = b \pm t_v s(b) \quad (17)$$

onde t é o ponto da distribuição de *Student* a um dado nível de confiança (geralmente 95%) e v graus de liberdade. O número de graus de liberdade, v , é o mesmo da $MQ_{Residual}$.

Se o intervalo de confiança de algum parâmetro contenha o zero, isto significa que a hipótese nula é verdadeira e o parâmetro em questão não possui significância estatística. Caso o intervalo de confiança de algum parâmetro não contenha o zero, isto significa que a hipótese nula deve ser rejeitada e o parâmetro em questão possui significância estatística.

Para a utilização satisfatória do método OLS é necessário que algumas condições com relação à natureza dos erros associados às medidas sejam satisfeitas:

- ✚ Os erros nas medidas são exclusivamente oriundos de flutuações do sinal analítico (variável dependente y). Mesmo que a concentração do analito (variável independente x) esteja sujeita a erros, quando comparados com os erros em y estes devem ser desprezíveis;
- ✚ Os erros ϵ_i são variáveis aleatórias com média igual a zero e variância constante σ^2 (homocedasticidade);
- ✚ Os erros ϵ_i não são correlacionados;
- ✚ Os erros ϵ_i seguem uma distribuição normal.

Ao preparar as soluções padrão com rigor analítico, a primeira condição é satisfeita sem maiores dificuldades.

A segunda condição é normalmente satisfeita se a técnica analítica utilizada não possui uma faixa de trabalho extensa. Entretanto algumas técnicas analíticas possuem faixas de trabalho bastante extensas, como consequência a variância do sinal analítico é proporcional à sua intensidade e neste caso o método OLS não poderá ser utilizado, sendo recomendado o uso do método dos mínimos quadrados ponderados, WLS (do inglês: *Weighted Least Squares*) (DAVIDIAN e HAALAND, 1990).

A preparação das soluções padrão de calibração, de forma independente, porém de maneira semelhante em cada nível de concentração possibilita que a terceira condição seja satisfeita.

Por fim as medidas analíticas devem ser realizadas de maneira aleatória para que não haja correlação entre os erros na determinação da concentração do analito.

1.4. Métodos inversos de calibração multivariada

1.4.1. Regressão Linear Múltipla

A regressão linear múltipla, MLR (do inglês: *Multiple Linear Regression*) foi proposta por Sternberg et al. (1960). Este método de regressão busca estabelecer uma relação linear entre sinais analíticos e concentração de mais de um analito por meio da aplicação do método dos mínimos quadrados.

O modelo MLR pode ser obtido a partir de uma matriz $\mathbf{X}$ de respostas instrumentais com dimensão $(m \times k)$, onde m representa o número de amostras e k o número de variáveis ($k = 3$, no caso das imagens digitais obtidas por DIB-FES).

Além disso, utiliza os dados de uma matriz **Y** de dimensão (m x n) (onde n é o número de analitos) que contém as concentrações (ou outra propriedade) das amostras obtidas por um método de referência.

Cada variável dependente de **Y** é expressa como uma combinação linear das variáveis independentes da matriz **X** por intermédio da expressão:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X}\mathbf{b} \quad (18)$$

onde, o vetor **b** contém os coeficientes da regressão e é calculado por mínimos quadrados a partir da pseudo-inversa de **X**:

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^T\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}^T\mathbf{Y} \quad (19)$$

os índices sobrescritos -1 e T representam as operações de inversão e transposição da matriz, respectivamente.

Com o modelo determinado, as concentrações de novas amostras podem ser estimadas a partir da seguinte equação:

$$\mathbf{Y}_{\text{prev}} = \mathbf{X}_{\text{prev}} \mathbf{b} \quad (20)$$

onde **X_{prev}** representa a matriz de dados para as novas amostras.

O método MLR apresenta dois problemas que limitam sua aplicação:

1. O número de amostras deve ser igual ou superior ao número de variáveis. Uma vez que o modelo consiste na resolução de um sistema de equações lineares simultâneas, e essa condição necessita ser satisfeita. Caso contrário, o sistema tornar-se-á indeterminado.
2. A inversão da matriz (**X^TX**) que pode promover a propagação de erros quando existe forte correlação (grandeza que indica a magnitude e a direção da relação linear entre duas variáveis aleatórias) ou multicolinearidade (quando qualquer variável independente é altamente correlacionada com um conjunto de outras variáveis independentes) entre as variáveis.

Um método para avaliar o grau de multicolinearidade entre um conjunto de variáveis é o fator de inflação da variância, VIF (do inglês: *Variance Inflation Factor*) (GALVÃO e ARAÚJO, 2009; DRAPER e SMITH, 1998).

Para uma k-ésima variável, o VIF é calculado como:

$$VIF(k) = \frac{1}{1 - \rho^2(k)} \quad (21)$$

onde: $\rho(k)$ é coeficiente de correlação entre a variável x_k e o x_k estimado pela regressão com as variáveis restantes.

Em outras palavras, é feita uma regressão entre x_k e as variáveis restantes. Assim estima-se o vetor de coeficientes **b** utilizando x_k na **Equação 19** e com os valores de **b** estima-se x_k estimado utilizando a **Equação 18** e assim $\rho(k)$ é calculado de acordo com a equação:

$$\rho(k) = \frac{1}{N-1} \sum_1^N \left(\frac{x_{k \text{ estimado}} - \bar{x}_{k \text{ estimado}}}{s_{x_{k \text{ estimado}}}} \right) \left(\frac{x_k - \bar{x}_k}{s_{x_k}} \right) \quad (22)$$

onde: $\bar{x}_{k \text{ estimado}}$ é a média de $x_{k \text{ estimado}}$

$\bar{x}_k$ é a média de x_k

$s_{x_{k \text{ estimado}}}$ é o desvio-padrão de $x_{k \text{ estimado}}$

s_{x_k} é o desvio-padrão de x_k

N é o número de amostras

O valor de VIF(k) é um indicativo do grau com que a variância de b_k estimado inflaciona (aumenta) com relação à variância que resultaria se as variáveis restantes não fossem correlacionadas. Um valor alto do VIF indica uma forte multicolinearidade da variável em relação às demais. Valores de VIF abaixo de 4, 5, 7, 10 são citados como indicadores de não-multicolinearidade (GIACOMELLI et al., 1998).

Naes e Mevik (2001) utilizaram o método de Regressão por Componentes Principais (PCR) com o objetivo de minimizar efeitos de multicolinearidade em problemas de regressão e também de análise discriminante.

1.5. Validação de métodos analíticos

A validação é o processo que confere validade a um método, instrumento ou equipamento, cujas especificações são aceitas como corretas, conferindo confiabilidade aos resultados obtidos (LEITE, 2008). Neste processo, por meio de evidências objetivas se comprova que os requisitos para uma determinada aplicação ou uso específico são atendidos (NBR ISO/IEC 17025:2001).

Ter um resultado validado significa que o procedimento, que inclui desde as condições de operação do equipamento até a sequência analítica, seja aceito como correto. Para isso estabelecem-se níveis de exigência que podem definir a aprovação do produto ou espécie em estudo (SILVA e ALVES, 2006).

A fim de confirmar que os métodos analíticos são apropriados para uso ao qual se pretende, o laboratório deve validar:

- ✚ Métodos não normalizados;
- ✚ Métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório;
- ✚ Métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos;
- ✚ Ampliações e modificações de métodos normalizados.

O processo de validação de um método analítico é constituído pelas seguintes etapas (INMETRO, 2010):

1. Definição da aplicação, objetivo e escopo do método;
2. Definição dos parâmetros de validação e critérios de aceitação;
3. Verificação da compatibilidade entre as características de desempenho do equipamento e as exigidas pelo método em estudo;
4. Qualificação dos materiais (padrões e reagentes);
5. Planejamento dos experimentos de validação incluindo o tratamento estatístico;
6. Execução dos experimentos de validação.

Os parâmetros que precisam ser estimados durante o processo de validação variam de acordo com o tipo de ensaio realizado. Para a determinação de um analito em maior teor (majoritário) os parâmetros, quando aplicáveis, são: seletividade,

linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção, LOD (do inglês: *Limit of Detection*), limite de quantificação (do inglês: *Limit of Quantification*), tendência, recuperação, precisão e robustez (INMETRO, 2010). Ainda de acordo com a referência anterior, para analitos majoritários com concentração entre 1 e 100% não é necessário estimar LOD e LOQ.

1.5.1. Seletividade

A seletividade de um método é a extensão até a qual o mesmo pode determinar analito(s) específico(s) numa mistura complexa, sem a interferência dos outros componentes da mistura (ANVISA, 2005). Caso a seletividade não seja assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas. Na tabela abaixo são descritos procedimentos para avaliação da seletividade de um método analítico (INMETRO, 2010).

Tabela 1.1. Avaliação da seletividade de um método analítico.

Procedimento	Demonstrar	Comentários
Fazer análise com a mostra e materiais de referência pelo método em estudo e outros métodos validados.	Habilidade do método de identificar e quantificar o analito na presença de interferentes.	Evidências necessárias para dar suporte e gerar confiabilidade suficiente.
Analisar amostras contendo vários interferentes suspeitos na presença do analito.	Efeito de interferentes - a presença de interferentes altera a detecção a quantificação do analito.	Se alterarem os resultados, aperfeiçoar o método ou selecionar outro mais adequado.

1.5.2. Linearidade

É a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (SILVA e ALVES, 2006). A linearidade é obtida em termos da expressão matemática que relaciona a resposta analítica e a concentração do analito na amostra real. Esta equação é frequentemente obtida pelo método OLS.

1.5.3. Faixa de trabalho

É o intervalo de concentrações no qual a sensibilidade é ou pode ser considerada constante (SILVA e ALVES, 2006). Normalmente esta faixa é expressa

na mesma unidade do resultado obtido pelo método analítico. A escolha da faixa de trabalho é feita de acordo com duas condições descritas na Tabela 1.2.

Tabela 1.2. Parâmetros para escolha da faixa de trabalho de um método analítico.

Condição	Parâmetro
Quando se tem uma amostra específica.	A concentração esperada deve estar no meio da faixa de trabalho.
Quando a concentração do analito é desconhecida.	Utilizar a faixa de trabalho para amostras diversificadas.

1.5.4. Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção, LOD é a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectada, sem necessariamente ser quantificada em condições experimentais definidas. Varia de acordo com o método utilizado.

Nos métodos não instrumentais, tais como: cromatografia em camada delgada, TLC (do inglês: *Thin Layer Chromatography*), titulação, comparação visual, etc. o LOD se define como sendo a mínima concentração do analito capaz de produzir o efeito esperado.

Nos métodos instrumentais a estimativa pode ser feita com base na relação de três vezes o ruído da linha de base ou a partir do desvio padrão do sinal do branco (IUPAC, 1976) conforme **Equação 23**.

$$\text{LOD (unidades de concentração)} = \frac{3 s_b}{\beta \text{ (unidades de concentração}^{-1}\text{)}} \quad (23)$$

onde: s_b é o desvio padrão do sinal do branco.

β é a inclinação da curva analítica e estimada por regressão linear utilizando pelo método OLS.

O limite de quantificação, LOQ é a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis em condições experimentais estabelecidas. Assim como o LOQ, o LOD pode ser estimado a partir do desvio padrão do branco (IUPAC, 1975) conforme **Equação 24**.

$$\text{LOQ (unidades de concentração)} = \frac{10 s_b}{\beta \text{ (unidades de concentração}^{-1}\text{)}} \quad (24)$$

1.5.5. Tendência

É expressa em termos de recuperação analítica, isto é, a percentagem de concordância entre o valor observado (obtido) e o valor esperado (ou previsto) conforme **Equação 25**:

$$\text{Tendência (\%)} = \frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor esperado}} \times 100 \quad (25)$$

A avaliação numérica da tendência é um indicativo da exatidão, pois é um componente essencial da incerteza global. Quando aplicada numa série de dados representa a combinação de erros sistemáticos e aleatórios. Esta tendência deve ser corrigida ou demonstrar que ela é desprezível.

Para avaliar a tendência de um método analítico os processos normalmente utilizados são: uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais e ensaios de recuperação.

1.5.5.1. Ensaios de recuperação

A recuperação está relacionada com a tendência, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. Essa estratégia é a recomendada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada, IUPAC (do inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*) (BURNS, DANZER e TOWNSHEND, 2002).

O ensaio de recuperação consiste na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição do analito em uma ou mais quantidades na amostra (*spike*) seguida pela determinação analito adicionado. O analito deve ser adicionado na amostra antes de todo processo analítico e preferencialmente na mesma forma em que está presente na amostra de modo a evitar avaliações excessivamente otimistas.

Calcula-se o fator de recuperação usando a **Equação 26**:

$$R_A(\%) = \frac{x_A(O+S) - x_A(O)}{x_A(S)} \times 100 \quad (26)$$

onde: $x_A(O + S)$ é concentração fortificada do analito (unidades de concentração).

$x_A(O)$ é concentração não fortificada do analito (unidades de concentração).

$x_A(S)$ é concentração adicionada teórica do analito (unidades de concentração).

Deve-se ressaltar que o processo de fortificação tenta simular condições reais, não interferindo significativamente nas interações que ocorrem na própria amostra. Sendo assim o ensaio de recuperação comporta-se como um método de adição padrão, SAM (do inglês: *Standard Addition Method*).

1.5.6. Precisão

É normalmente determinada para circunstâncias específicas para as quais as medidas são realizadas. As maneiras mais comuns de expressão da precisão são por meio da: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (INMETRO, 2010). Para uma série de resultados, a precisão é expressa em termos do desvio padrão relativo conjunto, RSD conjunto (do inglês: *Relative Standard Deviation overall*) (ou coeficiente de variação, CV).

O coeficiente de variação é calculado como:

$$\text{RSD conjunto (\%)} = \frac{\sqrt{\frac{\sum s_i^2 \cdot q_i}{\sum q_i}}}{\text{CMD}} \times 100 \quad (27)$$

onde: s_i é o desvio padrão da concentração determinada.

q_i é o número de replicatas da medida.

CMD é a concentração média determinada.

A repetitividade, ou precisão intra-ensaios, expressa a precisão considerando as seguintes condições de medida: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições no menor espaço de tempo possível. Neste trabalho a precisão foi avaliada em termos de repetitividade.

1.5.7. Robustez

Algumas vezes também chamada de solidez, é a grandeza que mede a capacidade de um determinado método analítico de não ter o seu desempenho

afetado quando modificações são introduzidas em seu procedimento. Quando vários laboratórios utilizam um determinado método analítico é inevitável que cada um introduza pequenas variações no procedimento. É importante determinar até que ponto essas pequenas variações influenciam o desempenho do método.

Uma maneira de determinar a robustez de um método analítico é a utilização do teste de Youden (INMETRO, 2010). Trata-se de um teste que permite ordenar e indicar o tipo de influência de cada uma das variações sobre os resultados finais.

1.5.8. Critérios de aceitação para validação de um método analítico

Após a realização dos experimentos necessários durante a etapa de validação é preciso estimar os valores dos parâmetros recomendados para tal. De posse destes valores estimados é preciso saber se os mesmos são adequados, para isso é necessário que se estabeleça os critérios de aceitação.

Neste trabalho, os critérios de aceitação dos parâmetros de validação, quando aplicáveis, são descritos na Tabela 1.3.

Tabela 1.3. Critérios de aceitação dos parâmetros de validação usados neste trabalho.

Parâmetro	Critério adotado
Seletividade	Maior ou igual ao do método de referência
Linearidade	Maior ou igual ao do método de referência
Faixa de trabalho	Maior ou igual ao do método de referência
LOD	Menor ou igual ao do método de referência
LOQ	Menor ou igual ao do método de referência
Tendência	Entre 95 e 105%
Recuperação	Entre 90 e 110%
Precisão	Maior ou igual ao do método de referência
Robustez	Maior ou igual ao do método de referência

1.6. Sistema de cores primárias aditivas

No olho a focalização da luz de uma imagem não é realizada pelo cristalino, mas pela córnea, camada curva localizada na frente do olho. O cristalino realiza o foco secundário através do auxílio de minúsculos músculos que estão localizados ao redor dela (FRASER, MURPHY e BUNTING, 2005).

Da córnea até o cristalino a luz passa através de uma abertura chamada pupila. Essa abertura se contrai ou se dilata de acordo com a intensidade da luz por meio da ação da íris (a parte colorida do olho), conforme Ilustração 1.1.

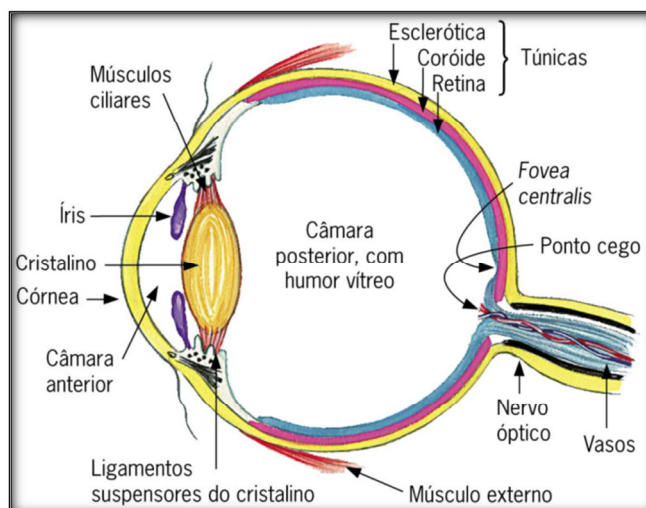


Ilustração 1.1. Anatomia do olho humano.
Adaptado de SILVA JUNIOR e SASSON (2007)

O cristalino permite a passagem da luz pelo gel transparente chamado de humor vítreo, formando na retina, parte de trás do olho, a imagem invertida do objeto.

A retina é a parte do olho sensível à luz e sua superfície é composta de fotorreceptores e terminações nervosas. Nela, existem dois tipos de fotorreceptores (células sensíveis à luz) chamados de cones e bastonetes (RETONDO e FARIA, 2006). Tais nomes foram dados devido às suas formas, conforme Ilustração 1.2.

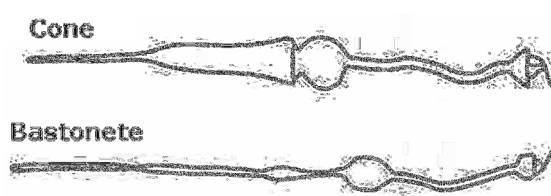


Ilustração 1.2. Cone e bastonete.
Adaptado de FRASER, 2005

Cada olho possui aproximadamente 120 milhões de bastonetes e 6 milhões de cones (TASI, 2007 e RETONDO e FARIA, 2006). Os bastonetes se concentram mais ao redor da retina e registram informações monocromáticas do claro ao escuro, sendo muito úteis para detectar movimentos e visualização com baixo nível de luminosidade.

Os cones estão concentrados no centro da retina, área esta chamada de *fóvea centralis*, onde há maior incidência de luz. No centro da *fóvea centralis* existe uma área chamada de fovéola, composta totalmente por cones. Os cones são sensíveis às REM's na região visível do espectro eletromagnético e estão divididos

em três grupos (vermelhos, verdes e azuis) de acordo às suas respectivas curvas de resposta (Ilustração 1.3). Em função destas curvas de resposta as cores vermelho, verde e azul, RGB (do inglês: *Red-green-blue*) são chamadas de primárias.

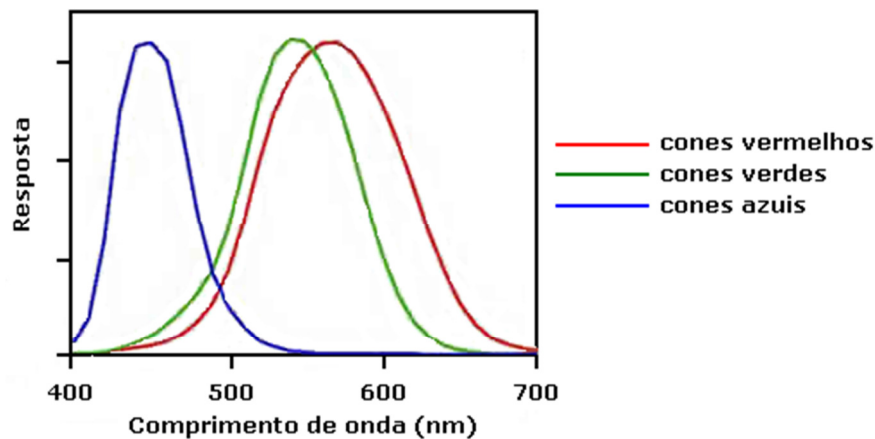


Ilustração 1.3. Curvas de resposta dos cones.
Adaptado de RETONDO e FARIA, 2006

A partir da identificação dos tipos de cones presentes na retina foi desenvolvido no século XIX o modelo tricromático de percepção das cores (TASI, 2007). De acordo com esse modelo a mistura das cores dominantes vermelho, verde e azul, também chamadas de primárias aditivas, em diferentes combinações e níveis variados de intensidade pode simular todas as cores existentes no espectro eletromagnético na região do visível.

Ao dispor as cores primárias num sistema de eixos é um espaço tri dimensional conhecido como cubo de cor (Ilustração 1.4).

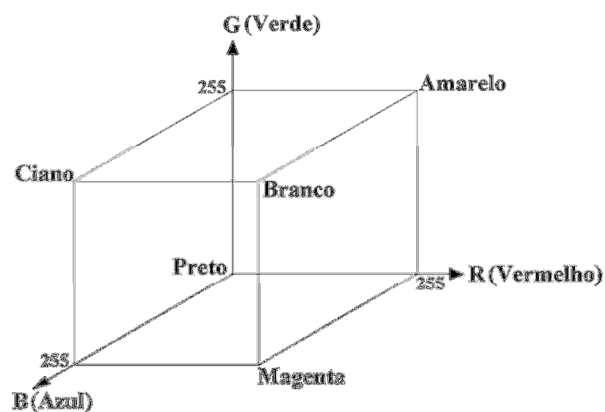


Ilustração 1.4. Cubo de cor.
Adaptado de LYRA, 2008.

Neste cubo, cada eixo representa a contribuição de uma cor primária com intensidades variando na faixa 0 - 255 (8 bits), ou seja, com 256 níveis de intensidade. Cada par de eixos gera um plano em que são representadas as cores secundárias (contribuição equitativa de duas cores primárias) no vértice de cada plano. A interseção dos três planos define a cor preta (não há contribuição de nenhuma das cores primárias) e a cor branca (mistura equitativa das três cores primárias com a intensidade máxima). A diagonal principal deste cubo representa a escala de cinza.

Se a luz refletida contem a máxima intensidade das luzes R, G e B o olho percebe o branco, e se não existir luz, é percebido o preto (BERNS, 2000). Combinando duas cores aditivas primárias puras será produzida uma cor secundária (ou primária subtrativa), conforme o diagrama mostrado na Ilustração 1.5. As cores secundárias: ciano, magenta e amarelo são as cores opostas ao vermelho, verde e azul, respectivamente.

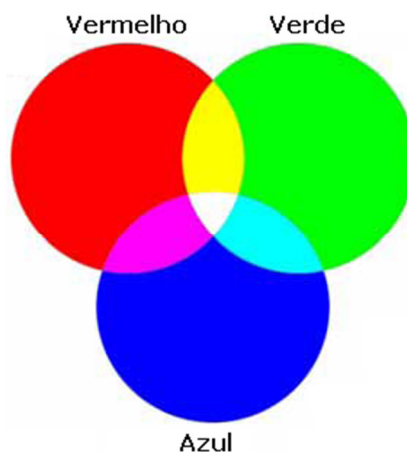


Ilustração 1.5. Cores primárias aditivas: vermelho, verde e azul.
Adaptado de LYRA, 2008.

Cada cor no cubo é definida por um único conjunto de valores (coordenadas) de R, G e B e assim cada cor define um único ponto neste espaço. Como este espaço é definido por três eixos, com cada um contendo 256 níveis de intensidade, então o número total de cores possíveis será: $256 \times 256 \times 256 \approx 1,67 \times 10^7$ cores.

Ao representar as cores primárias por meio de vetores, o cubo de cor passa a ser descrito por um espaço vetorial em $\mathfrak{R}^3$ (espaço RGB). Para este espaço vetorial algumas propriedades são demonstradas (BOLDRINI et al., 1980).

Quanto ao produto interno de vetores tem-se:

$$\vec{R} \cdot \vec{G} = 0 \Rightarrow \vec{R} \perp \vec{G} \quad (28)$$

$$\vec{R} \cdot \vec{B} = 0 \Rightarrow \vec{R} \perp \vec{B} \quad (29)$$

$$\vec{G} \cdot \vec{B} = 0 \Rightarrow \vec{G} \perp \vec{B} \quad (30)$$

O símbolo $\perp$ indica que os vetores são ortogonais entre si.

Quanto ao produto vetorial de vetores tem-se:

$$\vec{R} \times \vec{G} = \vec{B} \quad (31)$$

$$\vec{R} \times \vec{B} = \vec{G} \quad (32)$$

$$\vec{G} \times \vec{B} = \vec{R} \quad (33)$$

Quanto ao produto misto de vetores tem-se:

$$\vec{R} \times \vec{G} \cdot \vec{B} \neq 0 \quad (34)$$

$$\vec{G} \times \vec{R} \cdot \vec{B} \neq 0 \quad (35)$$

$$\vec{B} \times \vec{R} \cdot \vec{G} \neq 0 \quad (36)$$

A partir dos resultados dos produtos internos, dos produtos vetoriais e do produto misto, pode-se afirmar que os vetores são linearmente independentes (LI). Para um conjunto de três vetores LI a seguinte equação é válida:

$$\vec{R} + \vec{G} + \vec{B} = \vec{0} \quad (37)$$

Isto significa que a única solução da equação acima é $\vec{R} = \vec{G} = \vec{B} = \vec{0}$ que corresponde exatamente à origem do sistema RGB (cor preto). Uma vez que o espaço vetorial RGB é gerado por um conjunto de vetores LI, pode-se afirmar que o mesmo é uma base canônica em $\mathfrak{R}^3$.

No espaço vetorial RGB cada cor passa então a ser representada por meio de um vetor posição, cuja norma é calculada pela distância euclidiana no espaço.

$$\|v\| = \sqrt{R^2 + G^2 + B^2} \quad (38)$$

onde R, G e B são as coordenadas do ponto no sistema de eixos.

É importante destacar que qualquer comprimento de onda na região visível do espectro eletromagnético é definido por único vetor posição. Cada vetor posição por sua vez, é definido em termos de sua direção no espaço e não por sua norma (que reflete apenas a intensidade da REM). Num espaço tridimensional a direção de um vetor é dada em termos de:

- ✚ Ângulo diedral (Φ): ângulo entre dois planos verticais e a projeção do vetor num terceiro plano;
- ✚ Ângulo azimutal (θ): o qual é definido como o ângulo entre o vetor e o terceiro plano (que contem a sua projeção).

A representação geométrica destes ângulos é mostrada conforme Ilustração 1.6.

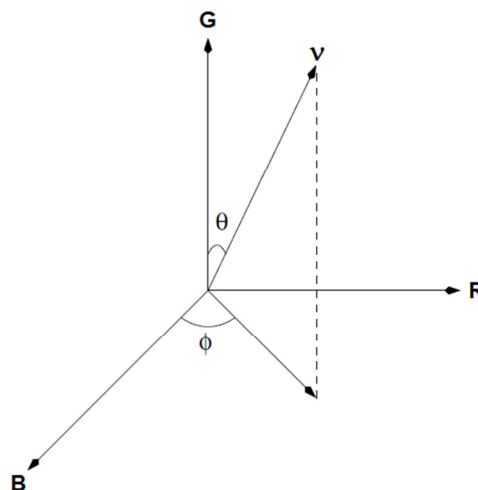


Ilustração 1.6. Representação geométrica de um ângulo diedral e de um azimutal.

Num espaço tridimensional é possível uma quantidade infinita de vetores que possuem o mesmo valor de norma e, consequentemente com infinitas direções. No espaço RGB, como cada eixo assume apenas valores inteiros entre 0 e 255, essa quantidade diminui drasticamente para apenas seis: $\overrightarrow{RGB}$, $\overrightarrow{RBG}$, $\overrightarrow{GRB}$, $\overrightarrow{GBR}$, $\overrightarrow{BRG}$ e

$\overrightarrow{BGR}$. De acordo com o princípio da ordenância nenhum deles terá a mesma direção, pois: $\overrightarrow{RGB} \neq \overrightarrow{RBG} \neq \overrightarrow{GRB} \neq \overrightarrow{GBR} \neq \overrightarrow{BRG} \neq \overrightarrow{BGR}$ e para cada um dos seis vetores existe um par (Φ, θ) diferente. Em outras palavras:

$$\lambda = f(\Phi, \theta) \quad (39)$$

1.7. Emprego de imagens digitais nas ciências analíticas

Inicialmente o emprego das imagens digitais fazia parte do cotidiano apenas da microscopia. Hoje em dia muitos outros campos do conhecimento as utilizam para obtenção de informações úteis (GELADI e GRAHN, 1996). Sob este aspecto é inquestionável a revolução que o emprego das imagens digitais provocou não apenas nas ciências da saúde (por meio do diagnóstico por imagens), mas nas ciências como um todo.

O número de publicações envolvendo o emprego das imagens digitais cresce tanto em revistas científicas nacionais quanto em internacionais para os mais diversos fins. A cada trabalho publicado antigos conceitos são revisados, reinventados ou expandidos, novos conceitos são criados e principalmente o vislumbre de outras possibilidades de aplicações são lançados por seus autores criando assim um ciclo. Como consequência desse processo cíclico tem-se a consolidação desse novo campo da ciência das imagens digitais.

A seguir serão mostrados, de forma resumida, os trabalhos envolvendo análise quantitativa que foram publicados até então neste campo.

1.7.1. Métodos baseados na emissão de radiação eletromagnética (REM)

Inicialmente, ATARI e SVENSSON (1986) desenvolveram um sistema dosimétrico digital de alta resolução para caracterização espacial de campos de radiação usando a termoluminescência do cristal $\text{CaF}_2:\text{Dy}$ e uma câmera CCD.

KRAGER, WEISS E GESTELAND (1993) desenvolveram um sistema de varredura em linha para o imageamento digital da quimioluminescência do DNA em testes de sequenciamento.

MONEMI et al. (1999) usando uma câmera CCD, os autores determinaram a proteína ligante do retinol, RBP (do inglês: *Retinol Binding Protein*) por quimioluminescência capilar em imunoenaios.

CARLSSON et al. (2002) investigaram o mecanismo do movimento de filamentos de actina cortical em leveduras usando imagens digitais a partir de filmes de microscopia de fluorescência.

BUREL et al. (2003) utilizaram uma câmera com dispositivo de carga acoplada intensificada, ICCD (do inglês: *Intensified Coupled Charge Device*) para determinar alumínio, chumbo, carbaril e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, PAH's (do inglês: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) por fluorescência molecular e fluorescência induzida a laser. Ambas as metodologia foram aplicadas determinações ao nível de ng L^{-1} em, respectivamente, água do mar e de torneira.

FARHAT, NG e ZHANG (2005) realizaram medidas de emissão quimiluminescente de um jato de chama difusa.

LE et al. (2005) desenvolveram um sistema radiográfico digital. As imagens radiográficas são formadas por uma tela de cintilação acoplada a uma câmera CCD.

LUO, ZHANG e LIFENG (2005) desenvolveram um método simples e sensível para determinação do fator- α recombinante de necrose de tumores humanos, rh TNF- α (do inglês: *Recombinant Human Tumor Necrosis Factor alpha*) em soro humano por imagens digitais e imunoenaios com limite de detecção da ordem de 1 ng mL^{-1} .

MARCH et al. (2005) desenvolveram um sistema de detecção rápida e contagem de bactérias lácteas da deterioração da cerveja usando imuno-ensaio e uma câmera CCD.

FAJARDO, SMITH e SICK (2006) utilizaram velocimetria de partículas por imagens digitais, fluorescência induzida a *laser* com resolução planar e a quimiluminescência do radical OH para medição do fluxo local e das condições de mistura nas proximidades das velas em motores de combustão interna.

BARWOOD (2007) fez o imageamento de minerais por luminescência no infravermelho e catodoluminescência mostrando a potencialidade dessa técnica na pesquisa petrográfica.

KOARASHI et al. (2007) desenvolveram um método autoradiográfico usando imageamento de placas e luminescência fotoestimulada para identificar rapidamente a densidade de partículas de plutônio em amostras de filtro.

TSE e CHAN (2008) propuseram a espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente com visão inferior de base.

KIM, KO e LEE (2009) desenvolveram um dispositivo microfluídico para quimioluminescência ultra rápida. O dispositivo foi aplicado na reação entre 1-aminopireno, bis(2,4,6-triclorofenil)oxalato, TCPO (do inglês: *1-aminopyrene, bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate*) e 4-metil-imidazol, 4MImH (do inglês: *4-methylimidazole*).

LYRA et al. (2009) propuseram o uso de uma *webcam* CMOS como detector em FES. A técnica proposta foi aplicada com sucesso na determinação de lítio, sódio e cálcio em comprimidos antidepressivos, soro fisiológico e águas respectivamente.

COHEN et al. (2010) fizeram o imageamento de glicanos em células vivas em tempo real por bioluminescência.

KHOURY, PARKER e ASWAD (2010) utilizaram uma câmera CMOS para detecção de proteínas pelo uso de quimioluminescência reforçada em *Western Blot*. Essa câmera apresentou uma sensibilidade comparável aos filmes de raios-X além de eliminar o resíduo químico associado ao processamento do filme.

TRIGLAV, ELTEREN e ŠELIH (2010) otimizaram as condições para a melhoria da qualidade dos mapas de elementos de imagem gerados por ablação a laser em plasma acoplado indutivamente à espectrometria de massas, LA-ICP-MS (do inglês: *Laser Ablation in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*).

WANG et al. (2010) desenvolveram um sistema microfluídico para contagem de células-T CD4⁺ em sangue usando detecção por quimioluminescência da reação do luminol. O volume de amostra consumido foi de 3µL e os resultados são obtidos em segundos.

1.7.2. Em calibração multivariada

Inicialmente KLODWIG e MÄCHTLE (1989) usaram o imageamento *on-line* de dentro de uma ultracentrífuga para determinação simultânea de cinco parâmetros em células usando o efeito Schlieren.

LAWRENCE, NEU e SWERHONE (1998) aplicaram parâmetros de imageamento múltiplo para quantificação de componentes algais, bacteriais e epoxopolímeros em biofilmes microbianos.

HUBNER, WILL e LEIPERTZ (2001) desenvolveram um novo método de sedimentação de imagens para a determinação simultânea de densidade e tamanho de partículas de solo.

MALEKI, SAVAFI e SEDAGHAPOUR (2004) determinaram simultaneamente Fe^{3+} e Al^{3+} em ligas metálicas sintéticas usando cromazurol S, CAS (do inglês: *Chrome Azurol S*), como reagente cromogênico, e redes neurais artificiais, ANN (do inglês: Artificial Neural Network) para o tratamento de imagens.

SAVAFI, ROSTAMZADEH e MAESUM (2007) exploraram imagens digitais para desenvolver um sensor óptico visando à determinação de pH, empregando diversos indicadores ácido-base e modelos de regressão em mínimos quadrados parciais, PLS (do inglês: *Partial Least Squares*) e ANN.

SU et al. (2008) fizeram a determinação simultânea de clorofila a e lipídios em microalgas por colorimetria.

STICH et al. (2009) desenvolveram um sensor dual CO_2 /temperatura utilizando imagens digitais de uma câmera colorida e indicadores luminescentes.

VERRI (2009) fez a caracterização com resolução espacial de corantes por luminescência fotoinduzida e imageamento digital na região do infravermelho próximo, NIR (do inglês: Near Infrared).

KIMURA et al. (2010) fizeram medidas simultâneas de velocidade e pressão de gases usando microesferas luminescentes.

LOPEZ-MOLINERO et al. (2010) desenvolveram um método para determinação colorimétrica de titânio em plásticos utilizando modelos de calibração em ANN e pelo método da regressão em componentes principais, PCR (do inglês: *Principal Component Regression*).

HEMMATEENEJAD et al. (2010) desenvolveram a cromatografia de camada delgada com análise multivariada de imagens para a determinação simultânea de componentes co-eluentes.

PONTICORVO e DUNN (2010) fizeram o imageamento simultâneo da pressão do oxigênio e fluxo sanguíneo em células animais usando um dispositivo de microespelho digital.

FOCA et al. (2011) utilizando imagens digitais e técnicas de calibração multivariada conseguiram prever características sensoriais e de composição química em alimentos.



Primeira anestesia com éter – Robert C. Hinckley

CAPÍTULO 2

DETERMINAÇÃO INDIRETA DE FÁRMACOS EM INJETÁVEIS

2. DETERMINAÇÃO INDIRETA DE FÁRMACOS EM INJETÁVEIS

2.1. Considerações gerais

Nos últimos anos regulamentações estritas levaram ao aumento da demanda da indústria farmacêutica por ensaios analíticos rápidos e simples (SONG e ZHANG, 2003). A indústria está sempre buscando métodos que garantam o conteúdo do fármaco e identifique adulterações, as quais representam riscos à saúde (WEINERT, PEZZA e PEZZA, 2007). A necessidade é por métodos analíticos seletivos, rápidos e de baixo custo para o controle de qualidade de formulações farmacêuticas (MATIAS, VILA e TUBINO, 2004).

Para a determinação de fármacos, monografias descrevendo métodos titrimétricos e cromatográficos são bastante comuns. Entretanto esses métodos são laboriosos, lentos e geram grande quantidade de resíduos enquanto usam quantidades igualmente grandes de reagentes e solventes orgânicos tóxicos.

Uma pesquisa nas edições mais recentes das farmacopeias americana, brasileira e britânica mostra os métodos oficiais para a determinação de diclofenaco sódico, dipirona sódica e gluconato de cálcio (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Métodos oficiais descritos para a determinação de diclofenaco sódico, dipirona sódica e gluconato de cálcio em três farmacopéias diferentes.

Analito	Americana	Brasileira	Britânica
Diclofenaco sódico	Titulação potenciométrica em meio não aquoso	Espectrometria UV-Vis	Cromatografia líquida
Dipirona sódica	Não descrito	Titulação redox	Não descrito
Gluconato de cálcio	Não descrito	Titulação complexométrica	Titulação complexométrica

De acordo com a Tabela 2.1 apenas a farmacopéia brasileira descreve um método para a determinação de dipirona sódica. Detalhes sobre os métodos oficiais serão dados na seção 2.1.5.

2.1.1. Determinação indireta de substâncias orgânicas

Uma variedade de metodologias espectroanalíticas foi desenvolvida para análises farmacêuticas e biomédicas, as quais possuem certas vantagens tais como: baixo custo operacional e de manutenção e simplicidade do procedimento analítico (LYRA et al., 2011).

Neste contexto, uma tendência que surgiu em meados de 1986 foi a da determinação indireta de substâncias orgânicas utilizando Espectrometria de Absorção Atômica em Chama, FAAS (do inglês: *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) e Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma Acoplado Indutivamente, ICP-OES (do inglês: *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) em função de suas altas sensibilidade e frequência analítica que ampliam o alcance das mesmas (YEBRA, 2000).

De acordo com Yebra (2000) a determinação indireta de substâncias orgânicas utilizando FAAS e ICP-OES é realizada por uma reação prévia entre o analito e um cátion de metal de transição. A estimativa da concentração do analito pode ser feita utilizando três estratégias:

1. Após uma reação de precipitação, o precipitado é extraído em um solvente orgânico e a concentração do analito é estimada a partir da concentração do cátion metálico na fase orgânica.
2. Após uma reação de precipitação, a concentração do analito é estimada a partir da concentração do cátion metálico no sobrenadante (filtrado).
3. Após uma reação redox, ocorre uma reação de precipitação e em seguida extração por solvente. A concentração do analito é estimada a partir da concentração do cátion metálico na fase orgânica.

De acordo com as estratégias supracitadas e entre os fármacos determinados neste trabalho, apenas o diclofenaco sódico foi determinado indiretamente utilizando FAAS (ALPDOĞAN e SUNGUR, 1999 e ISSA et al., 2008).

Apesar dos bons resultados normalmente fornecidos pela FAAS e pela ICP-OES, estes métodos assim como os titrimétricos e cromatográficos utilizam reagentes e/ou solventes orgânicos. Embora haja uma grande variedade de metodologias para a determinação indireta de fármacos, nenhuma delas utiliza os íons inorgânicos associados (contra-íons).

2.1.2. Injetáveis

Consideram-se preparações injetáveis as soluções, suspensões e emulsões estéreis de substâncias medicamentosas em veículos aquosos, oleosos ou outros apropriados para serem administrados por via parentérica (PRISTA, ALVES e

MORGADO, 1990). Essa forma de administração de fármacos é muito eficiente, pois disponibiliza o princípio ativo diretamente na corrente sanguínea, proporcionando uma ação terapêutica mais rápida e eficaz (HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 2003).

Toda formulação farmacêutica é composta pelo princípio ativo (fármaco) e pelo veículo, que no caso dos injetáveis pode ser água, óleos e outros. Todas as preparações injetáveis independentemente do veículo utilizado devem estar isentas de microrganismos (estéreis). As preparações em veículo aquoso devem ter pressão osmótica igual à corrente sanguínea (isotônicas), apresentar pH próximo da neutralidade e não conter substâncias produzidas por microrganismos que causam febre (apirrogênicas). Por outro lado as preparações em veículo oleoso deverão ser preparadas com óleos isentos de acidez (PRISTA, ALVES e MORGADO, 1990).

Quando se prepara medicamentos injetáveis, a escolha do material do recipiente que irá contê-los é muito importante. As ampolas ou frascos que se empregam são frequentemente de vidro, mas também podem ser de polietileno ou cloreto de polivinila. Os recipientes de vidro utilizados podem ser incolores ou coloridos. O vidro colorido destina-se a proteger os medicamentos da ação da luz, quando estes se alteram nessas circunstâncias.

O material de confecção dos frascos não deve reagir nem com o princípio ativo e nem com o veículo utilizado na formulação. Deve-se ainda considerar a sua vedação, que geralmente, é feito por fusão, quando se trata de vidro, podendo ainda ser realizado mediante rolhas de borracha, de teflon, de elastômeros, etc. (LACHMAN, LIERMAN e KANING, 2001).

2.1.3. Validação de modelos de calibração univariada

Em análise química, o modelo de calibração somente pode ser usado para estimar a concentração do analito se for capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento dos valores experimentais. Em outras palavras, o modelo não pode apresentar evidência estatística de falta de ajuste. Além disso, deve refletir uma regressão estatisticamente significativa. Para esse propósito, a validação do modelo pode ser realizada por meio da análise de variância, ANOVA (BARROS NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2007 e PIMENTEL e BARROS NETO, 1996), cujas equações encontram-se na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Equações para ANOVA de dados experimentais adaptados a modelos lineares determinados pelo método OLS.

Fonte de variação	Graus de liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	Equação
Regressão	$p - 1$	$MQ_{\text{Regressão}} = \frac{\sum_{i=1}^n n_i [(y_e)_i - \bar{y}]^2}{(p - 1)}$	(40)
Residual	$n - p$	$MQ_{\text{Residual}} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m [(y_i)_j - (y_e)_i]^2}{(n - p)}$	(41)
Falta de ajuste	$m - p$	$MQ_{\text{Falta de ajuste}} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m n_i [(y_e)_i - (\bar{y}_1)]^2}{(m - p)}$	(42)
Erro puro	$n - m$	$MQ_{\text{Erro puro}} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m [(y_i)_j - (\bar{y}_1)]^2}{(n - m)}$	(43)

onde: p = número de coeficientes do polinômio do modelo de calibração, n = número total de medidas e m = número de níveis da variável independente x .

A validação de modelos lineares pela aplicação do método OLS consiste de:

 **Análise de resíduos:** verifica o comportamento dos erros de previsão do modelo (resíduos) em relação aos dados experimentais. No gráfico de resíduos é possível identificar o tipo de erro experimental associado aos dados experimentais. Se aparece uma estrutura no meso é porque o modelo postulado apresenta uma acentuada falta de ajuste. Caso os resíduos se distribuam aleatoriamente em torno de zero, apenas erros aleatórios estão associados aos dados experimentais. Os resíduos são calculados de acordo com a equação:

$$\epsilon = y_i - \hat{y} \quad (44)$$

onde: y_i = resposta analítica obtida experimentalmente;

$\hat{y}$ = resposta analítica prevista pelo modelo de calibração.

i = é o i -ésimo nível da variável independente x , a qual a resposta y está associada.

Para implementar uma ANOVA (Tabela 2.2), é necessário fazer uma decomposição algébrica dos desvios das respostas analíticas observadas em relação à média global, $(y_i - \bar{y})$, conforme descrito abaixo:

$$(y_i - \bar{y}) = (\hat{y}_i - \bar{y}) + (y_i - \hat{y}_i) \quad (45)$$

A primeira parcela, $(\hat{y}_i - \bar{y})$, representa o desvio dos valores previstos (ou estimados) pelo modelo em relação à média global e a segunda, $(y_i - \hat{y}_i)$, é a diferença entre o valor observado e o previsto pelo modelo (resíduo).

Elevando ambos os membros da **Equação 45** ao quadrado e fazendo o somatório sobre todos os pontos tem-se:

$$\sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (46)$$

Estas somas de quadrados são conhecidas como somas quadráticas (SQ) as quais podem ser representadas como:

$$SQ_{total} = SQ_{regressão} + SQ_{residual} \quad (47)$$

onde: SQ_{total} representa a variação total das observações em relação a media global;

$SQ_{regressão}$ exprime a parcela da variação total descrita pelo modelo de regressão;

$SQ_{residual}$ denota a parcela da variação total não explicada pela equação do modelo.

A fim de avaliar se o modelo apresenta ou não falta de ajuste, é necessária a realização de medidas repetidas (de maneira autêntica) em pelo menos um dos níveis da variável x_i . Sendo assim, a parcela relativa aos resíduos deixados pelo modelo de regressão pode ser decomposta de acordo com:

$$(y_{ij} - \hat{y}_i) = (y_{ij} - \bar{y}_i) - (\hat{y}_i - \bar{y}_i) \quad (48)$$

onde: j = é a j-ésima replicata da resposta y_i .

Elevando a **Equação 48** ao quadrado e somando sobre todas as observações tem-se:

$$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2 = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 + \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2 \quad (49)$$

Esta soma de quadrados é conhecida como soma quadrática residual:

$$SQ_{\text{residual}} = SQ_{\text{Erro puro}} + SQ_{\text{Falta de ajuste}} \quad (50)$$

Dividindo-se os valores de todas as somas quadráticas pelos seus respectivos graus de liberdade, obtêm-se as MQ mostradas na Tabela 2.2. Esses valores são utilizados nos testes F para verificar se há falta de ajuste do modelo e avaliar a significância estatística da regressão, conforme descrito abaixo (PIMENTEL E BARROS NETO, 1996):

✚ **Teste de falta de ajuste:** compara a $MQ_{\text{Falta de ajuste}}$ com a $MQ_{\text{Erro puro}}$. Para um modelo bem ajustado, ambas as médias quadráticas refletem os erros aleatórios num modelo. Sendo assim ambas estimam a variância populacional (σ^2) e, portanto, não deve haver diferenças significativas entre seus valores numéricos. Se razão $\frac{MQ_{\text{Falta de ajuste}}}{MQ_{\text{Erro puro}}}$ é menor que o valor do ponto da distribuição F referente aos mesmos graus de liberdade de $MQ_{\text{Falta de ajuste}}$ e $MQ_{\text{Erro puro}}$ para um determinado nível de confiança, o modelo pode ser considerado satisfatório;

✚ **Teste de significância de regressão:** Verifica se o coeficiente angular da curva analítica (β) é diferente de zero. Caso esta hipótese seja falsa não há relação linear entre as variáveis x e y e assim, tanto $MQ_{\text{Regressão}}$ e MQ_{Residual} Serão estimativas da variância populacional (σ^2). Se a razão $\frac{MQ_{\text{Regressão}}}{MQ_{\text{Residual}}}$ é maior que o valor do ponto da distribuição F referente aos graus de liberdade de $MQ_{\text{Regressão}}$ e MQ_{Residual} para um determinado nível de confiança, indica uma relação linear entre as variáveis. Quanto maior essa razão comparado ao valor de F , mais significativa será a relação.

2.1.4. O modelo matemático utilizado

A partir dos valores médios dos componentes vermelho (R), Verde (G) e azul (B) é definido um vetor posição no espaço tri-dimensional RGB. Para o cálculo da norma desse vetor posição é necessário subtrair a contribuição da prova em branco dos padrões ou amostras, como ilustrado na Ilustração 2.1.

Para este vetor posição, sua norma “|| ||” é calculada pela distância euclidiana no espaço:

$$\|V\| = \sqrt{\bar{R}_{S-b}^2 + \bar{G}_{S-b}^2 + \bar{B}_{S-b}^2} \quad (51)$$

onde $\bar{R}_{S-b}$, $\bar{G}_{S-b}$ e $\bar{B}_{S-b}$ são os valores líquidos obtidos depois de retirar a contribuição do branco.

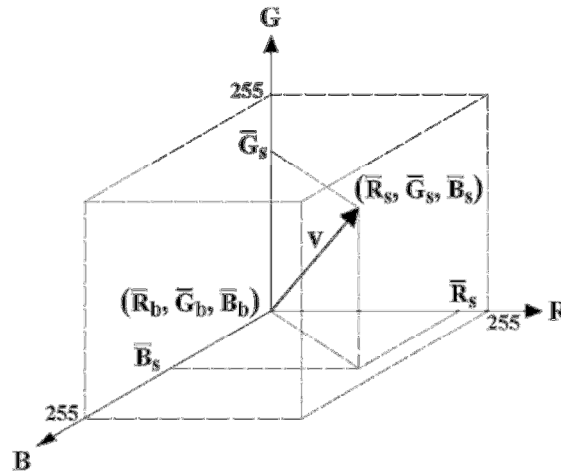


Ilustração 2.1. Espaço RGB ilustrando um vetor posição de uma imagem digital.

Considerando que o número de fótons que atingem o fototransdutor da *webcam* é proporcional à intensidade de emissão (I), a equação seguinte é válida

$$\|V\| = K_1 I \quad (52)$$

Assumindo que há um mesmo coeficiente de proporcionalidade associado aos três componentes R, G e B, pois seus valores são normalizados na escala (0 - 255), a **Equação 50** pode ser reescrita como:

$$\|V\| = \sqrt{K_2 \bar{R}_{S-b}^2 + K_2 \bar{G}_{S-b}^2 + K_2 \bar{B}_{S-b}^2} \quad (53)$$

Combinando as **Equações 50 e 51**, a seguinte expressão é obtida:

$$\|V\| = K_2 \sqrt{\bar{R}_{S-b}^2 + \bar{G}_{S-b}^2 + \bar{B}_{S-b}^2} = K_2 \|V\| = K_1 K_2 I \quad (54)$$

Considerando existe uma relação linear entre intensidade de emissão (I) e concentração de analito (C) dada por:

$$I = K_3 C \quad (53)$$

onde K_3 é coeficiente de proporcionalidade que depende especialmente das propriedades espectroscópicas do analito e das variáveis de atomização das amostras.

A combinação das **Equações 52 e 53** resulta em:

$$\|V\| = K C \quad (54)$$

onde $K = K_1 K_2 K_3$.

A **Equação 54** descreve então, uma relação linear entre a norma do vetor e a concentração do analito nas soluções de calibração e amostras. A norma do vetor V , $\|V\|$, é o valor adotado como resposta analítica empregada para a construção das curvas analíticas no método DIB-FES.

2.1.5. Cálculo dos limites de detecção e de quantificação

Para estimativa do Limite de Detecção, LOD e do Limite de Quantificação, LOQ foi preciso antes estimar o desvio padrão do branco (s_b) aplicando-se um procedimento desenvolvido por Lyra (2008) por meio da aplicação das equações de propagação de erros descritas em Skoog, Holler e Nieman (2002).

O desvio padrão do branco neste caso é dado por:

$$s_b = \sqrt{\frac{(\bar{R} s_{\bar{R}})^2 + (\bar{G} s_{\bar{G}})^2 + (\bar{B} s_{\bar{B}})^2}{\bar{R}^2 + \bar{G}^2 + \bar{B}^2}} \quad (55)$$

onde $s_{\bar{R}}$, $s_{\bar{G}}$ e $s_{\bar{B}}$ são os desvios padrão associados aos valores médios $\bar{R}_b$, $\bar{G}_b$ e $\bar{B}_b$ resultantes da imagem digital do branco, respectivamente.

Os valores de LOD e o LOQ são calculados usando as Equações 20 e 21.

2.1.6. Os analitos

2.1.6.1. Diclofenaco sódico

O diclofenaco de sódio é o sal de sódio do ácido 2 - [2 - [(2,6 - dicloro - fenil) - amino] - fenil - acético (Ilustração 2.2). Pertence ao grupo farmacoterapêutico dos antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) e possui pronunciadas propriedades antiinflamatória, anti-reumática, analgésica e antipirética (ROCHA et al., 2009).

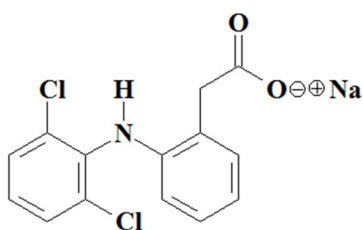


Ilustração 2.2. Fórmula estrutural do diclofenaco sódico.

No fígado o diclofenaco sódico inibe a biossíntese das prostaglandinas. A maioria das prostaglandinas é derivada enzimaticamente do ácido araquidônico pela via metabólica da cascata do ácido araquidônico a qual está associada aos processos inflamatórios (VOET, VOET e PRATT, 2002).

O diclofenaco sódico é comercializado na forma de: cápsulas (contendo 70 e 100 mg), comprimidos revestidos (contendo 50 e 100 mg), solução injetável (contendo 75 mg mL⁻¹), supositório (contendo 50 mg) e suspensão oral (contendo 2 e 15 mg mL⁻¹).

2.1.6.2. Dipirona sódica

A dipirona sódica é o sal de sódio do ácido [(2,3 - diidro - 1,5 - dimetil - 3 - oxo - 2 - fenil - 1H - pirazol - 4 - il) metil - amino] - metanossulfônico (Ilustração 2.3 (a)) e é largamente usada como droga analgésica e antipirética (PEZZA et al., 2000).

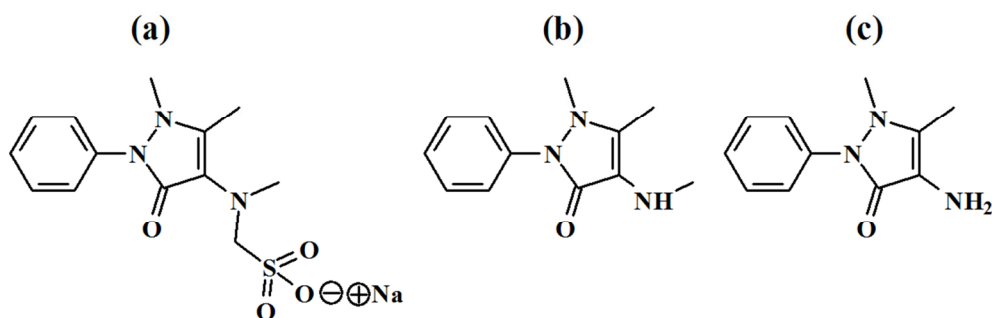


Ilustração 2.3. Fórmulas estruturais da: dipirona sódica (a) e seus produtos de hidrólise: 4-N-metil-amino-antipirina (4MAA) (b) e 4-amino-antipirina (4AA) (c).

No fígado a dipirona sódica é completamente hidrolisada em 4-N-metil-amino-antipirina (4MAA) (Ilustração 2.3 (b)) e 4-amino-antipirina (4AA) (Ilustração 2.3 (c)) que são os inibidores da enzimas ciclooxygenases (COX), diminuindo a biossíntese das prostaglandinas (mais precisamente a prostaglandina $F_{2\alpha}$) e tromboxanas, as quais sensibilizam os receptores mecânicos e químicos da dor.

A dipirona sódica é comercializada na forma de: cápsulas (contendo 200 e 500 mg), comprimidos revestidos (contendo 500 e 1000 mg), solução injetável (contendo 500 mg mL⁻¹), supositório (contendo 300 e 1000 mg) e solução oral (contendo 50 e 500 mg mL⁻¹).

2.1.6.3. Gluconato de cálcio

O gluconato de cálcio é o sal de cálcio do ácido (2R, 3S, 4R, 5R) - 2,3,4,5,6 - pentahidroxi - hexanóico (Ilustração 2.4) e é usado no tratamento da hipoglicemia em condições onde se requer o aumento da concentração de cálcio no plasma sanguíneo, como por exemplo em transfusões de sangue (ARYIAN e SOSA, 2004).

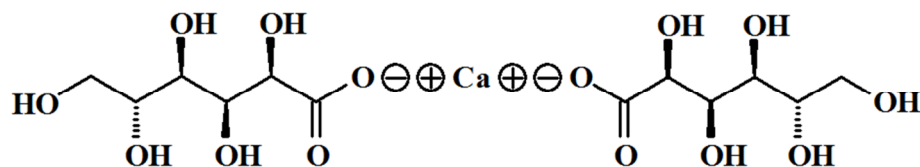


Ilustração 2.4. Fórmula estrutural do gluconato de cálcio.

O gluconato de cálcio é comercializado na forma de: solução injetável (contendo 10% m v⁻¹) e gel dermatológico (contendo 2,5% m v⁻¹). Esta última forma é utilizada no tratamento de queimaduras causadas pelo HF.

2.2. Métodos oficiais

Entre as farmacopéias pesquisadas, a brasileira foi adotada como referência, pois é a única que descreve simultaneamente os métodos para a determinação dos três analitos de interesse.

A determinação de diclofenaco sódico é feita por diluição da amostra em metanol e medidas de absorbância são realizadas em 258 nm contra metanol como branco.

Na determinação de dipirona sódica a amostra é diluída em água e titulada em meio ácido acético contra uma solução padrão de iodo utilizando amido como indicador. A temperatura durante a titulação não deve ser maior que 15 °C.

Na determinação de gluconato de cálcio a amostra é diluída em água e titulada em meio bastante alcalino contra uma solução padrão de ácido etileno diamino tetra acético, EDTA (do inglês: *ethylene diamine tetra acetic acid*) utilizando calcon como indicador.

2.3. Experimental

2.3.1. Reagentes, soluções padrão e amostras

Para a preparação das soluções padrão estoque de cada analito de interesse foram utilizados os seguintes reagentes de grau analítico: diclofenaco sódico (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos), dipirona sódica (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos) e gluconato de cálcio (Aldrich, Milwaukee, Estados Unidos) e HNO_3 (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos).

A água utilizada para a preparação da solução de HNO_3 foi recém-destilada e deionizada por um sistema Milli-Q Plus (Millipore 18,2 $\text{M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

As soluções padrão estoque na concentração de 500 mg L^{-1} de diclofenaco sódico e dipirona sódica e de 2000 mg L^{-1} de gluconato de cálcio foram preparadas dissolvendo-se uma massa adequada dos reagentes com solução de HNO_3 1% (m v^{-1}) (o gluconato foi dissolvido mediante aquecimento) e o volume foi aferido a 250 mL em um balão volumétrico com a mesma solução. Embora a dissolução dos três analitos em água seja recomendada pela Farmacopéia Brasileira, optou-se pela dissolução em HNO_3 a fim de evitar qualquer hidrólise que por ventura possa ocorrer.

As soluções de trabalho de diclofenaco sódico (24,9 – 124,5 mg L^{-1}), dipirona

sódica ($27,5 - 137,5 \text{ mg L}^{-1}$) e gluconato de cálcio ($282,0 - 1410,0 \text{ mg L}^{-1}$) foram preparadas por diluição adequada com solução de HNO_3 1% (m v^{-1}) a partir de suas respectivas soluções padrão estoques em cinco níveis de concentração.

As faixas de trabalho das concentrações dos analitos foram definidas de acordo com a equivalência molar entre a molécula do fármaco e o metal presente em sua fórmula. As seguintes razões estequiométricas entre o cátion metálico e o ânion orgânico foram utilizadas: diclofenaco de sódico (1:1), dipirona sódica (1:1) e gluconato de cálcio (1:2). Em outras palavras as faixas de trabalho do diclofenaco sódico e da dipirona sódica equivalem a uma faixa de ($1,00 - 9,00 \text{ mg L}^{-1}$) em termos de sódio e a faixa do gluconato de cálcio equivale a uma faixa de ($26,2 - 131,3 \text{ mg L}^{-1}$) em termos de cálcio.

Deve-se enfatizar que nas soluções injetáveis existe apenas o analito e a água de diluição. Mesmo em altas concentrações os analitos presentes não provocam alterações apreciáveis nas propriedades físicas da água e nenhum efeito de matriz será observado. Além disso, a ausência de outros metais na amostra é a garantia de que nenhuma interferência espectral será observada.

Amostras de injetáveis de diclofenaco sódico contendo 75 mg 3mL^{-1} (25 mg mL^{-1}), dipirona sódica contendo $1\text{g } 2\text{mL}^{-1}$ (500 mg mL^{-1}) e gluconato de cálcio contendo 10% (m v^{-1}) foram adquiridas em farmácias da cidade de João Pessoa – PB. Para cada analito foram analisadas cinco amostras.

2.3.2. Equipamentos

Um fotômetro de chama Digimed modelo NK-2004 foi utilizado como meio de excitação do sódio e do cálcio presentes nas soluções padrão e amostras.

Uma balança analítica Scientech modelo SA120 foi utilizada na medição de massas dos reagentes para preparação das soluções.

Uma *webcam* Creative Instant com resolução espacial de 352×288 pixels e taxa de aquisição de $30 \text{ quadros s}^{-1}$ foi utilizada para aquisição das imagens referentes à emissão das misturas e amostras na chama.

2.3.2.1. Sistema de aquisição de imagens

É composto de uma caixa de madeira medindo aproximadamente $10 \times 16 \times 18 \text{ cm}^3$ com paredes internas pintadas de preto (Ilustração 2.5).

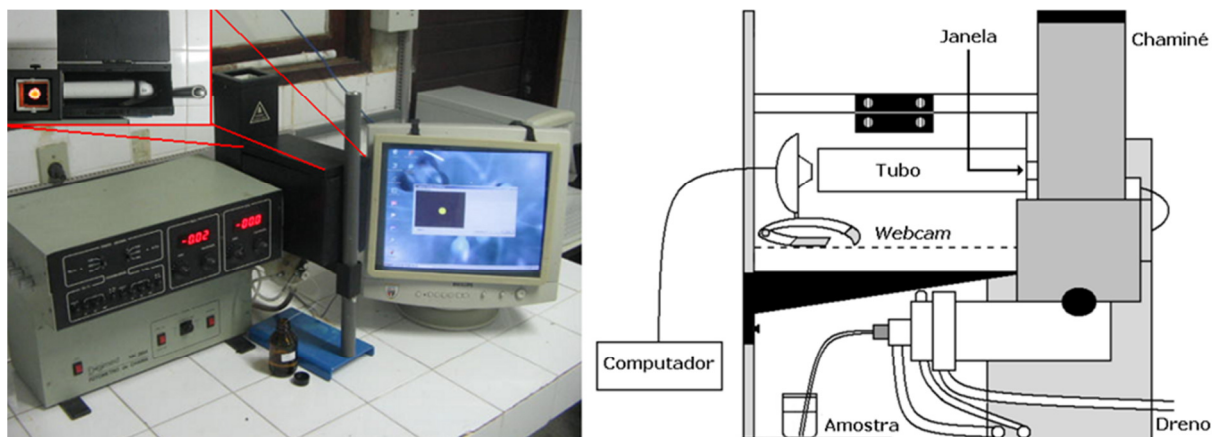


Ilustração 2.5. Foto do módulo de aquisição de imagens e seu diagrama esquemático ao lado.
Fonte: LYRA, 2008.

A extremidade da caixa de madeira se encaixa na janela de observação do fotômetro de chama. Nesta extremidade da caixa de madeira foi feito um orifício com um diâmetro de aproximadamente 1,5 cm. A partir deste orifício é possível observar a região oxidante da chama. Na janela de observação foi acoplado um tubo (de 4,0 cm de diâmetro interno e 13,5 cm de comprimento) com as paredes internas opacas a fim de evitar o efeito de reflexão especular.

Na outra extremidade do tubo está a *webcam*, a qual se conecta à porta de entrada do barramento serial universal, USB (do inglês: *Universal Serial Bus*) de um micro computador Pentium III 650 MHz e conllustraçãoda para captar imagens de 24-bits (aproximadamente 16,7 milhões de cores) (BERNS, 2000 e GELADI e GRAHN, 1996).

2.3.3. Programas computacionais utilizados

2.3.3.1. Desenvolvimento dos modelos de calibração univariada

Todos os modelos de calibração univariada foram desenvolvidos utilizando Origin 8 da OriginLab®, bem como a elaboração dos gráficos utilizados neste trabalho.

2.3.3.2. Na captura de imagens digitais

Escrito em ambiente Core Gear Rad Studio 2007 (Delphi 2007) da Borland®, o programa computacional chamado “Capturar Imagens da *WebCam*”, como o próprio nome já diz, é destinado à captura de imagens. Este programa é bastante simples e uma foto da tela do programa é mostrada na Ilustração 2.6.

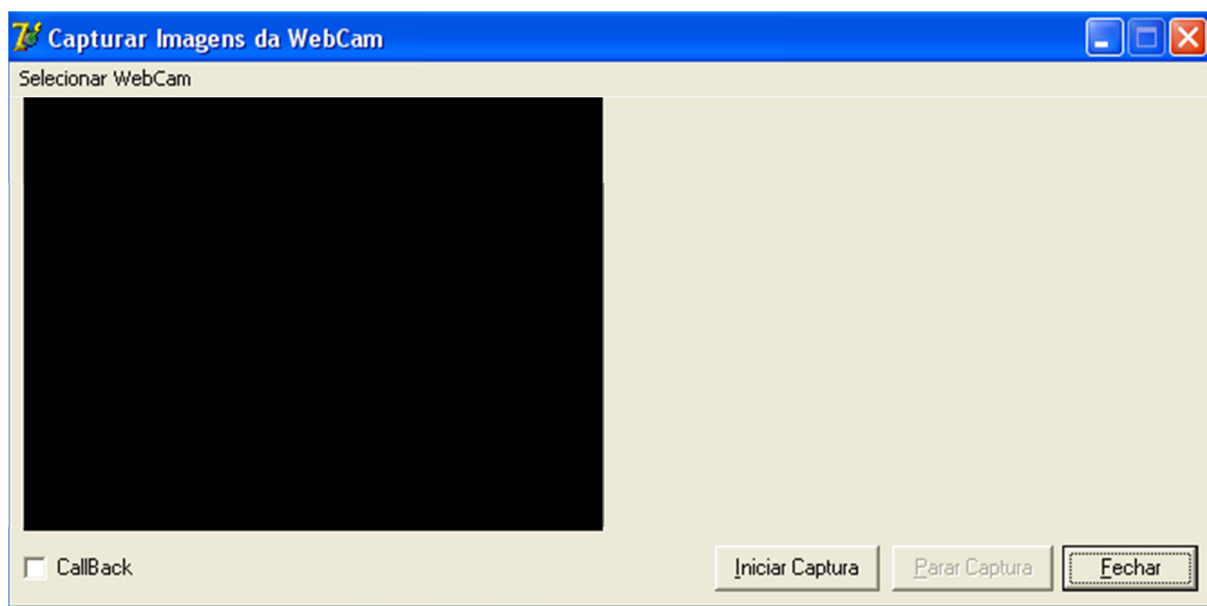


Ilustração 2.6. Foto da tela do programa de “Capturar Imagens da *webCam*”.
Fonte: LYRA, 2008.

O programa “Capturar Imagens da *WebCam*” reconhece rapidamente qualquer *webcam* que seja conectada ao microcomputador (independentemente do modelo e do fabricante) e o operador pode dar início à captura das imagens, independente do programa de gerenciamento fornecido pelo fabricante.

Na tela do programa (Ilustração 2.2) ao acionar o botão “Selecionar *Webcam*” o usuário pode selecionar a *webcam* de sua preferência (caso mais de uma esteja instalada no micro computador).

Após isto o operador pode dar início à captura de imagens através do acionamento do botão “Iniciar Captura”. Abre-se então uma janela para a seleção do diretório onde serão armazenadas as imagens digitais capturadas, bem como a nomeação do arquivo de imagem. Ao término das análises a captura de imagens é encerrada pelo acionamento do botão “Parar Captura” (Ilustração 2.6).

As imagens são armazenadas no formato de mapa de bits, BMP (do inglês: *Bit Map*). Neste tipo de formato de arquivo de imagem a qualidade máxima da imagem (16,7 milhões de cores) é preservada, pois não utiliza nenhum tipo de compressão de dados. Esta característica em particular não se observa em outros formatos de arquivo de imagens (TORRES, 2008).

2.3.3.3. No tratamento de imagens digitais

Também escrito em ambiente Core Gear Rad Studio 2007 (Delphi 2007) da Borland®, o programa computacional chamado “Cor Emissão” implementa a rotina de tratamento das imagens digitais e o algoritmo para obtenção da resposta analítica. O programa é simples e fácil de operar. Na Ilustração 2.7 é mostrada a foto da tela do mesmo.

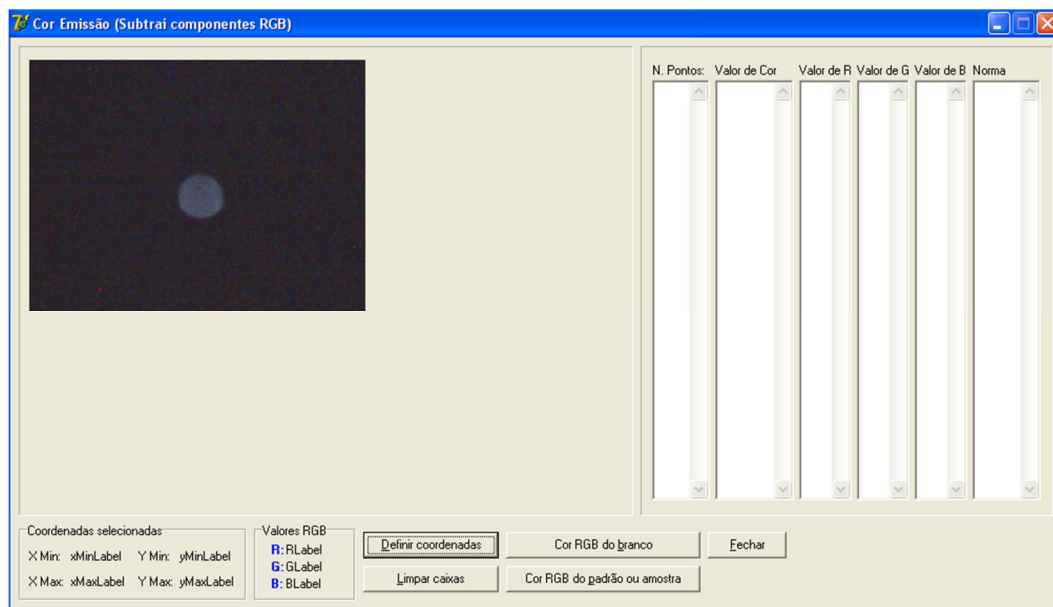


Ilustração 2.7. Foto da tela do programa “Cor Emissão”.
Fonte: LYRA, 2008.

Para o tratamento das imagens digitais é necessário que as imagens digitais capturadas estejam salvas no formato “BMP” tendo como justificativa o argumento de Torres (2008). Caso as imagens digitais estejam salvas num outro formato de arquivo de imagem, o programa mostrará uma caixa de mensagem indicando a incompatibilidade no formato dos arquivos. Por questões de organização é recomendado que todas as imagens estejam no mesmo diretório.

O programa Cor Emissão possui botões que ao serem acionados executam tarefas específicas.

Na Ilustração 2.3 existe a caixa denominada “N Pontos”, a qual está relacionada com o arquivo de imagem a ser analisado. A esta caixa é atribuído um número de ordem à medida que as imagens digitais são processadas.

A rotina de funcionamento do programa computacional “Cor Emissão” é esquematizada na Ilustração 2.4. O elemento de imagem, *pixel* (do inglês: *Picture*

Element) é a unidade fundamental que compõe a imagem digital, sendo que um conjunto de milhares de *pixels* forma a imagem inteira (BERNS, 2000).

As operações envolvendo os *pixels* são descritas abaixo:

1. **Definição das coordenadas da região de interesse nas imagens digitais:** ao acionar o botão “**Definir coordenadas**” abre-se uma janela na qual o operador seleciona o diretório destinado ao armazenamento das imagens digitais e o arquivo de imagem referente ao branco. Com o auxílio do *mouse* o usuário delimita a região de trabalho (25 x 25 *pixels*) e suas coordenadas ficam armazenadas na caixa “Coordenadas selecionadas”.
2. **Definição das componentes RGB do branco:** ao acionar o botão “Cor RGB do branco” abre-se novamente a janela do diretório da “etapa 1” para seleção das imagens digitais referentes ao branco. O programa faz uma varredura de todos os *pixels* da região selecionada na “etapa 1”, coluna por coluna, e calcula os valores médios de cada componente para o branco e os armazenam na caixa “valores RGB”.
3. **Definição das componentes RGB dos padrões ou amostra(s) e da norma do vetor:** ao acionar o botão “Cor RGB do padrão ou amostra” abre-se novamente a janela do diretório da “etapa 1” para seleção das imagens digitais associadas aos padrões ou amostra(s). O programa repete o procedimento realizado na “etapa 2” e dos valores médios das componentes R, G e B dos padrões ou amostra(s) são subtraídas, componente a componente, as médias das componentes R, G e B do branco. Os resultados das diferenças são finalmente utilizados no cálculo da norma de cada vetor associado. Os valores resultantes são armazenados, respectivamente, nas caixas “valor de R”, “valor de G”, “valor de B” e “Norma” (Ilustração 2.8).

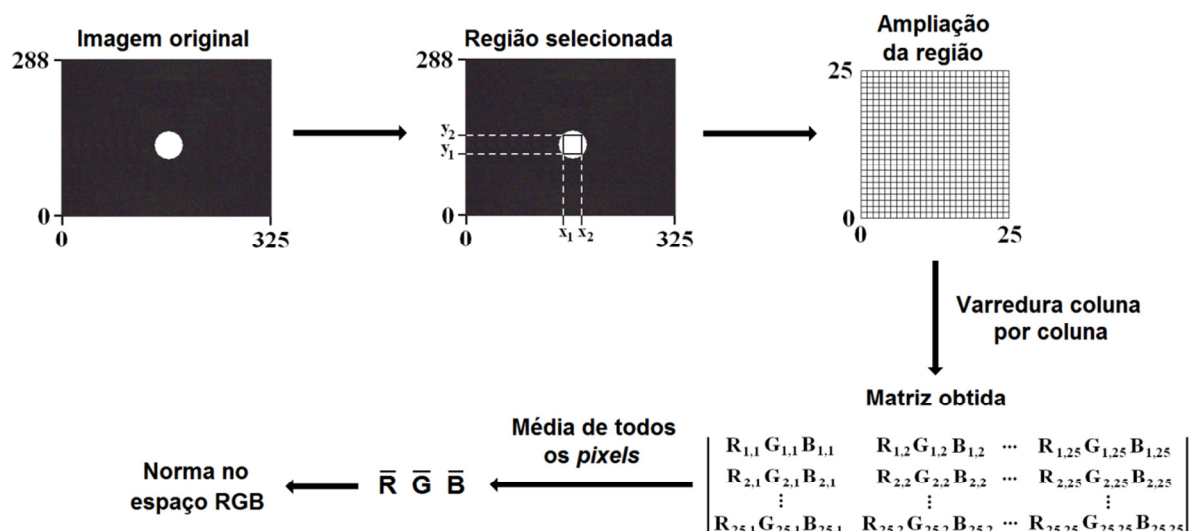


Ilustração 2.8. Diagrama esquemático simplificado da rotina do cálculo da norma do vetor pelo programa “Cor Emissão”. Adaptado de LYRA, 2011.

2.3.4. Tratamento das imagens digitais

As imagens digitais foram capturadas a uma altura de aproximadamente 2,5 cm acima do queimador. Esta região da chama é conhecida como região oxidante e nela ocorre o equilíbrio térmico e uma diminuição significativa das concentrações de radicais. Esta característica particular dessa região da chama é que a torna mais indicada para a realização de medidas (SKOOG, HOLLER e NIEMAN 2002).

A Ilustração 2.9 mostra a imagem digital da emissão do sódio para ilustrar a região usada no tratamento analítico, a qual é constituída de 25 x 25 *pixels*.

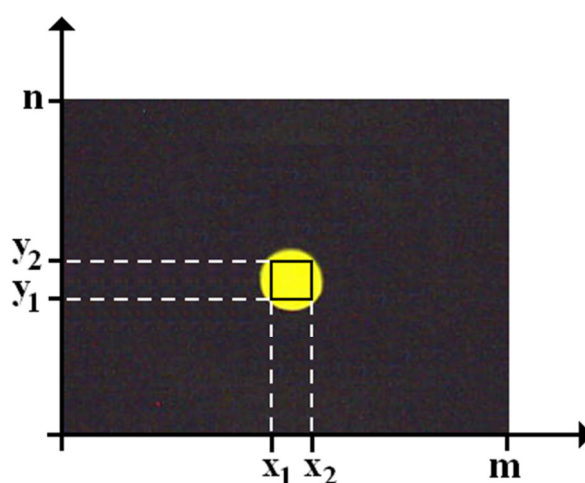


Ilustração 2.9. Imagem digital com $n \times m$ *pixels* obtida na determinação de sódio. x_1, x_2, y_1 e y_2 são coordenadas da região delimitada. Fonte: Lyra 2008.

2.3.5. Procedimento adotado

Como a matriz de uma solução injetável é constituída apenas pelo fármaco (princípio ativo) e pela água de diluição (veículo), pode-se então admitir que a mesma não apresenta diferenças significativas quando comparada com soluções padrão aquosas. Dessa forma, antes das análises todas as amostras foram diretamente diluídas com solução de HNO_3 1% de modo ao sinal analítico estar dentro da faixa linear de resposta. Cada amostra foi preparada em triplicatas autênticas

2.3.6. Testes de recuperação

Antes de toda a marcha analítica uma alíquota, da ordem de micro litros, da solução estoque do analito (contendo o mesmo na mesma forma em que se encontra na amostra) foi adicionada na amostra de modo que a diluição provocada fosse desprezível. A amostra então fortificada foi diluída de acordo com o procedimento descrito na seção anterior. As concentrações adicionadas teóricas para o diclofenaco sódico, a dipirona sódica e o gluconato de cálcio foram 10,1; 11,3 e 337,4 mg L^{-1} respectivamente.

2.3.7. O banco de dados

Nos métodos diretos de calibração univariada a matriz $\mathbf{y}$ corresponde à matriz dos valores associados à resposta analítica (propriedade observada). Neste caso, esta matriz corresponde à matriz dos valores baseados em RGB, isto é, $\mathbf{y}$ = valor baseado em RGB.

Dessa forma, a matriz $\mathbf{x}$ corresponde à matriz das concentrações dos analitos (variável independente) que serão utilizadas na construção do modelo de calibração univariada, isto é, $\mathbf{x} = C_{\text{diclofenaco sódico}}$, ou $\mathbf{x} = C_{\text{dipirona sódica}}$, ou $\mathbf{x} = C_{\text{gluconato de cálcio}}$.

2.4. Resultados e discussão

2.4.1. Os dados oriundos das imagens digitais

A faixa de valores médios das componentes R, G e B das imagens adquiridas das soluções padrão dos três analitos e do branco são mostrados na Tabela 2.3. Estes valores foram obtidos de acordo com o procedimento descrito na Seção 2.3.4.

Os valores apresentados mostram que para os três analitos existe uma contribuição significativa referente à auto-emissão da chama, uma vez que os valores de suas respectivas componentes R, G e B são muito maiores que zero. Caso não houvesse a contribuição da auto-emissão da chama, os valores das componentes R, G e B seriam zero, e a cor observada nas imagens digitais referentes ao branco seria o preto.

Ainda com relação à Tabela 2.3 os valores das componentes R, G e B mostram que não existe contribuição da componente B para os três analitos. Para o diclofenaco sódico e para a dipirona sódica existe igual contribuição das componentes R e G. Para o gluconato de cálcio existe uma contribuição maior da componente R quando comparada com a componente G. Em todos os casos as componentes que possuem contribuições significativas aumentam à medida que a concentração do analito aumenta.

Tabela 2.3. Valores de $\bar{R}$, $\bar{G}$ e $\bar{B}$ obtidos das imagens digitais capturadas para as soluções padrão.

Analito	Solução padrão (mg L⁻¹)	$\bar{R}$	$\bar{G}$	$\bar{B}$
Diclofenaco sódico	Branco	77	77	101
	24,9	113	113	101
	49,8	148	147	100
	74,7	183	183	100
	99,6	218	218	101
	124,5	252	253	100
Dipirona sódica	Branco	77	77	101
	27,5	113	113	101
	55,0	148	147	100
	82,5	183	183	101
	110,0	218	218	101
	137,5	252	253	101
Gluconato de cálcio	Branco	74	75	100
	282,0	109	93	101
	564,0	144	110	101
	846,0	179	128	100
	1128,0	214	146	101
	1410,0	249	163	101

2.4.2. Imagens digitais e o fenômeno de emissão de REM

Na Ilustração 2.10 são mostradas imagens digitais obtidas pela emissão de diferentes soluções padrão de diclofenaco sódico (a), dipirona sódica (b) e gluconato

de cálcio (c). A primeira imagem digital de cada sequência resulta da radiação de fundo emitida quando a solução do branco é aspirada para a chama do fotômetro.

Além disso, observa-se que a intensidade da radiação de cada analito aumenta nitidamente com o aumento de sua concentração nas soluções de calibração dos três analitos.

Os valores médios das componentes R, G e B das imagens digitais da chama são apresentados na Tabela 2.1 e indicam que apenas as componentes R e G aumentam com o aumento da concentração do analito.

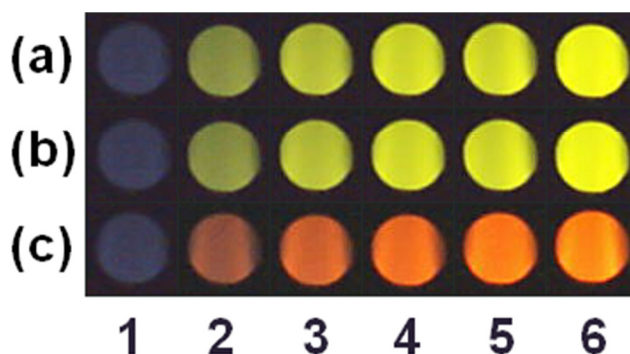


Ilustração 2.10. Imagens digitais da emissão de: (a) diclofenaco sódico ($24,9 - 124,5 \text{ mg L}^{-1}$), (b) dipirona sódica ($27,5 - 137,5 \text{ mg L}^{-1}$) e (c) gluconato de cálcio ($282,0 - 1410,0 \text{ mg L}^{-1}$).

Em chamas de butano-ar, bandas de emissão são encontradas na região visível do espectro eletromagnético devido à presença de radicais CH e CN e moléculas de C_2 (SKOOG, HOLLER e NIEMAN 2002). Estas emissões são significativas e constantes. Tal afirmação pode ser comprovada na Tabela 2.3 onde esta contribuição está relacionada com valores diferentes de zero para as componentes R, G e B do branco e por valores praticamente constantes da componente B.

Na emissão do diclofenaco sódico e da dipirona sódica observa-se a cor secundária amarelo, resultante da mistura equitativa das cores primárias: vermelho e verde (BERNS, 2000). Essa REM correspondente à cor amarelo é oriunda das transições eletrônicas dos estados excitados 3p (termos espectroscópicos $^2\text{P}_{1/2}$ e $^2\text{P}_{3/2}$) para o estado fundamental 3s (termo espectroscópico $^2\text{S}_{1/2}$) em 589,0 e 589,6 nm (duplete D) no espectro do sódio (Ilustração 2.11 (a)). Este duplete corresponde às raias de ressonância do espectro de emissão do sódio (SKOOG, HOLLER e NIEMAN 2002).

Com relação ao gluconato de cálcio observa-se a emergência da cor terciária laranja que é resultante da mistura de cores vermelho e amarelo, isto equivale a uma mistura das cores primárias vermelho e verde com uma proporção maior de vermelho. Esta cor é referente à REM emitida por radicais CaOH, tipicamente produzidos em chamas com temperaturas relativamente baixas oriundas da queima de hidrocarbonetos, a exemplo da chama de butano-ar. Como resultado, observa-se uma banda no espectro de emissão de CaOH, ilustrado na Ilustração 2.11 (b), cujo comprimento de onda máximo se encontra em torno de 555 nm (SKOOG, HOLLER e NIEMAN 2002).

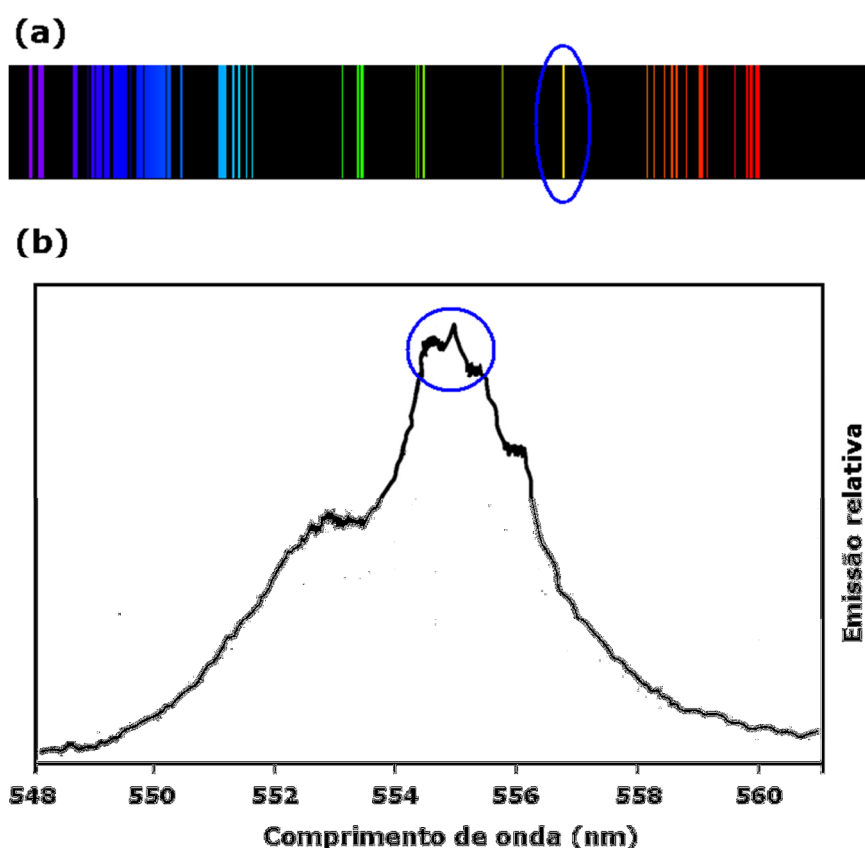


Ilustração 2.11. Espectros de emissão em uma chama butano-ar de: (a) sódio e (b) banda de emissão do radical CaOH. Em destaque, são mostradas: (a) a raia de ressonância do sódio e (b) o pico correspondente ao comprimento de onda máximo da banda de emissão do radical CaOH.

Adaptado de LYRA, 2008

2.4.3. Relação entre $\|V\|$ e os valores experimentais de $\bar{R}_{s-b}$, $\bar{G}_{s-b}$ e $\bar{B}_{s-b}$

A Ilustração 2.12 (a) revela que os vetores $\mathbf{v}_1$ a $\mathbf{v}_5$, associados a cada imagem digital das soluções de calibração diclofenaco sódico e dipirona sódica estão localizados na mesma reta suporte. Os valores $\bar{R}_s$ e $\bar{G}_s$ apresentam contribuições similares para a norma dos vetores $\mathbf{v}_1$ a $\mathbf{v}_5$ e, conseqüentemente, estes vetores

estão sobre a linha bissetriz entre os eixos $\bar{R}_{s-b}$ e $\bar{G}_{s-b}$. Isto significa que não há diferenças significativas entre os valores $\bar{B}_s$ e $\bar{B}_b$, isto é, os valores $\bar{B}_{s-b}$ são próximos de zero.

Na Ilustração 2.12 (b) é mostrado que os valores $\bar{R}_s$ e $\bar{G}_s$, associados às imagens digitais das soluções de calibração de gluconato de cálcio também contribuem para a norma do vetor. Todavia, neste caso apresentam proporções diferentes. Em função disso, a reta suporte onde os vetores $\mathbf{v}_1$ a $\mathbf{v}_5$ estão localizados apresenta direção próxima ao eixo $\bar{R}_{s-b}$ como consequência da contribuição maior desta componente.

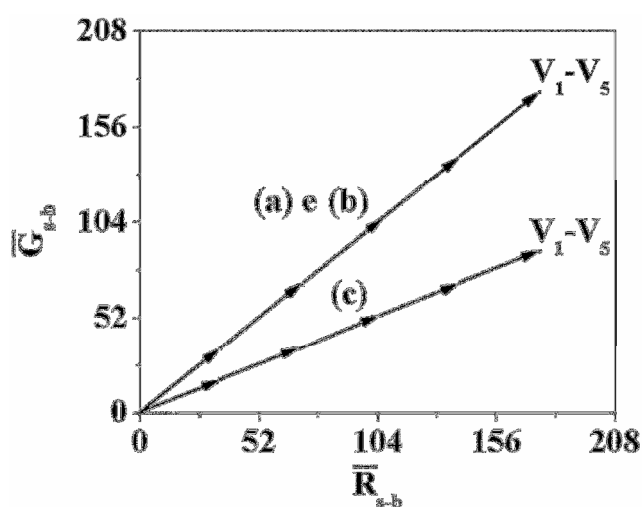


Ilustração 2.12. Norma dos vetores $\mathbf{v}_1 - \mathbf{v}_5$ de cada solução de calibração e os valores $\bar{R}_{s-b}$, $\bar{G}_{s-b}$ e $\bar{B}_{s-b}$ para cada imagem digital de: (a) diclofenaco sódico, (b) dipirona sódica e (c) gluconato de cálcio.

2.4.4. Curvas analíticas e validação

A fim de validar os modelos de calibração obtidos foi elaborado um planejamento experimental constituído de réplicas autênticas de cada solução padrão, qual foi realizado como descrito a seguir:

Para cada um dos três analitos foram preparadas três soluções estoques de como descrito na seção 2.2.1 e a partir de cada das três soluções estoque se preparou cinco soluções de trabalho totalizando 15 soluções (3 em cada nível de concentração proveniente de cada uma das soluções estoque).

De posse dessas soluções, foram realizadas as medidas analíticas para serem submetidas à ANOVA com vistas à validação dos modelos para sua posterior utilização na determinação dos analitos em amostras reais. A construção das curvas analíticas e dos modelos de calibração foram feitas a partir da média das 3 réplicas autênticas.

A Tabela 2.4 apresenta os coeficientes dos modelos, obtidos por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, que descrevem as curvas analíticas mostradas na Ilustração 2.13. Na Tabela 2.4, também são apresentados os limites dos intervalos de confiança para os valores populacionais dos coeficientes dos modelos, os quais foram obtidos considerando o nível de 95% de confiança. Como apenas para o parâmetro β os intervalos de confiança não contêm o “zero”, este parâmetro estimado para todos os modelos de calibração é estatisticamente significativo.

Tabela 2.4. Intervalo de confiança (ao nível de 95%) para os coeficientes do modelo do método DIB-FES.

Intervalo de confiança dos coeficientes do modelo ($\hat{y} = a + bx$)		
Analito	$a \pm t_{13} \cdot s(a)$	$b \pm t_{13} \cdot s(b)$
Diclofenaco sódico	$0,01 \pm 7,0$	$1,98 \pm 0,08$
Dipirona sódica	$-0,04 \pm 2,0$	$1,81 \pm 0,02$
Gluconato de cálcio	$-0,02 \pm 1,6$	$1,4 \times 10^{-1} \pm 1,7 \times 10^{-3}$

A Ilustração 2.13 mostra que as curvas analíticas exibem um comportamento linear entre a resposta analítica e a concentração dos analitos em suas soluções de calibração. Essa inferência, baseada inicialmente em uma inspeção visual, é confirmada mediante a análise gráfica dos resíduos deixados pelos modelos e, principalmente, pela aplicação da ANOVA descrita na Seção 2.2.6.

O gráfico dos resíduos deixados pelos modelos de calibração também são apresentados na Ilustração 2.13. Como se pode observar, os resíduos se distribuem de maneira aleatória, isto é, não exibem nenhuma estrutura sistemática que evidencie uma eventual falta de ajuste. Não obstante, a análise dos gráficos dos resíduos constitui um critério subjetivo e, por isso, esse procedimento é insuficiente para concluir que os modelos não apresentam falta de ajuste. Para isso, recorreu-se à ANOVA e aplicou-se o teste F para verificar se existe falta de ajuste e avaliar a significância estatística da regressão (Seção 2.1.6).

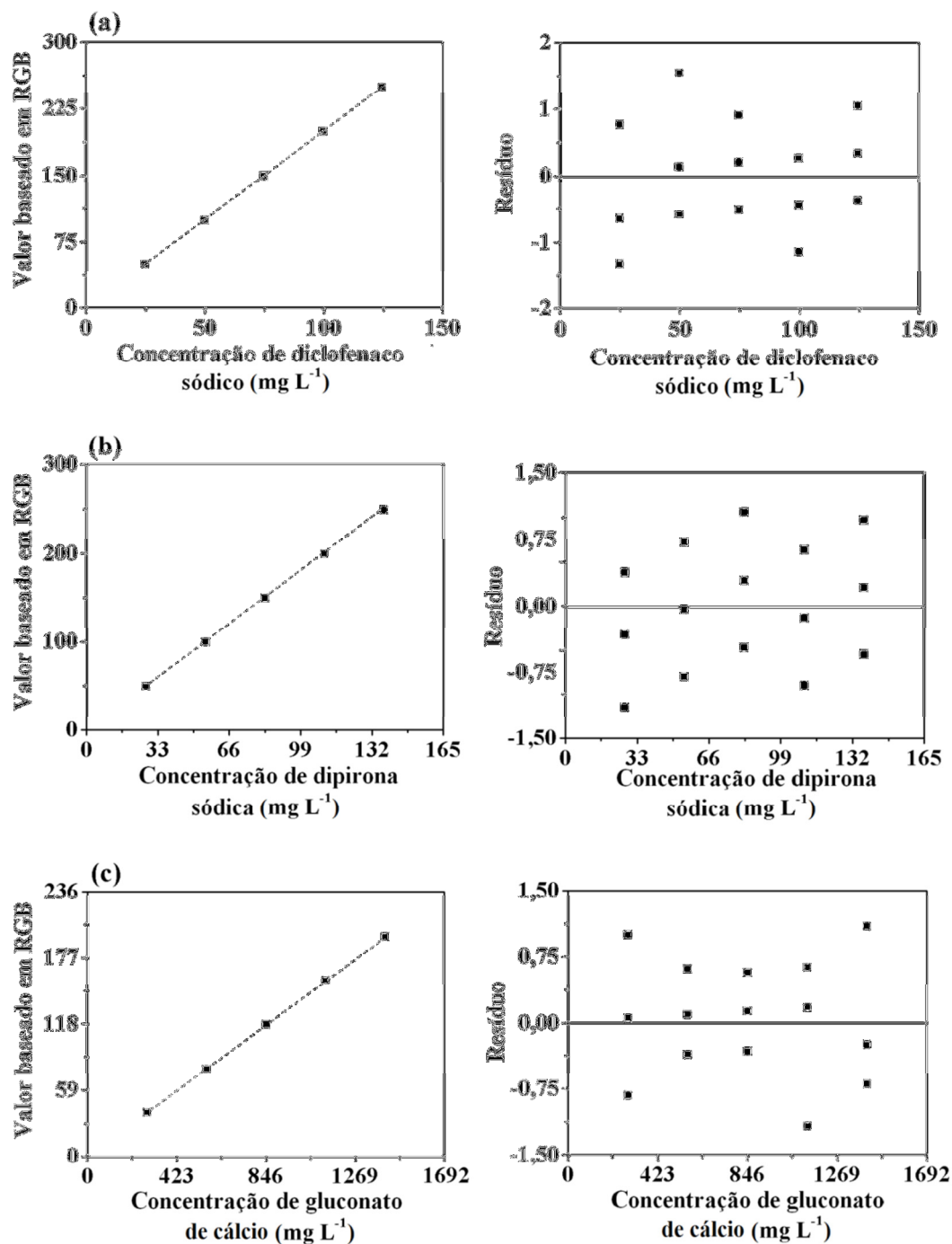


Ilustração 2.13. Curvas analíticas DIB-FES e resíduos deixados pelos modelos lineares para os três analitos determinados: (a) diclofenaco sódico, (b) dipirona sódica e (c) gluconato de cálcio.

Os resultados da ANOVA, utilizada para a validação dos modelos de calibração baseados nos métodos DIB-FES são apresentados nas Tabelas 2.4. Os graus de liberdade mostrados também na Tabela 2.4 foram definidos em função de:

- ✚ **Número de coeficientes do polinômio** = 2 (polinômio de primeiro grau, $\hat{y} = a + bx$);
- ✚ **Número total de medidas** = 15 (3 réplicas autênticas em 5 níveis de concentração dos analitos);
- ✚ **Número de níveis da variável independente x** = 5 (níveis de concentração do analito).

Definidos os graus de liberdade, as médias quadráticas foram calculadas a partir das somas quadráticas de acordo com as equações na Tabela 2.2 (Seção 2.1.3) e os valores obtidos são mostrados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5. Análise de variância para o ajuste do modelo linear ($\hat{y} = \alpha + \beta x$) das curvas analíticas (Ilustração 2.13).

Analito	Fonte	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)
Diclofenaco sódico	Regressão	1	$7,33 \times 10^4$
	Residual	13	0,74
	Falta de ajuste	3	0,65
	Erro puro	10	0,76
Dipirona sódica	Regressão	1	$7,47 \times 10^4$
	Residual	13	0,77
	Falta de ajuste	3	1,22
	Erro puro	10	0,64
Gluconato de cálcio	Regressão	1	$4,64 \times 10^4$
	Residual	13	0,49
	Falta de ajuste	3	0,46
	Erro puro	10	0,50
Analito	MQ _{Falta de ajuste} / MQ _{Erro puro}		MQ _{Regressão} / MQ _{Residual}
Diclofenaco sódico	0,85		$9,90 \times 10^4$
Dipirona sódica	1,90		$9,70 \times 10^4$
Gluconato de cálcio	0,92		$9,47 \times 10^4$
F _{tab} (95%)	3,71 (3/10)*		4,67 (1/13)*

*Os números entre parênteses indicam os graus de liberdade de cada MQ.

Após o cálculo das médias quadráticas, estes valores foram utilizados nos testes de falta de ajuste e significância de regressão, cujos resultados encontram-se também na Tabela 2.5. Para todos os casos, os valores de $MQ_{\text{Falta de ajuste}}/MQ_{\text{Erro puro}}$ são menores que o ponto da distribuição F , ao nível de 95% confiança, considerando os mesmos graus de liberdade. Dessa forma, não há evidência de falta de ajuste para um modelo linear.

Além disso, a Tabela 2.5 revela que as regressões lineares são altamente significativas. De fato, os valores de $MQ_{\text{Regressão}}/MQ_{\text{Residual}}$ são muito maiores que o ponto da distribuição F , considerando-se os mesmos graus de liberdade e o nível de 95% de confiança. Uma vez que os modelos lineares não apresentam evidência estatística de falta de ajuste e resultam de regressões altamente significativas, as curvas analíticas correspondentes podem ser usadas para fins de quantificação (BARROS NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2007 e DRAPER e SMITH, 1998).

2.4.5. Análise do desempenho do método DIB-FES

A avaliação do desempenho do método DIB-FES são os mesmos descritos na seção 1.5. Entretanto, como a DIB-FES se baseia num método analítico que não utiliza os procedimentos químicos tradicionais (reações químicas) o conceito de seletividade não se aplica neste caso. Devido à aplicabilidade do método, fatores influentes não são observados e assim o conceito de robustez também não pode ser aplicado.

Com relação à faixa de trabalho e a linearidade, os resultados são mostrados na Tabela 2.6.

Tabela 2.6. Faixa de trabalho e linearidade para os três analitos usando o método DIB-FES.

Analito	Faixa de trabalho (mg L^{-1})	Linearidade (mg L^{-1})
Diclofenaco sódico	2,1 - 124,5	24,9 - 124,5
Dipirona sódica	3,0 - 137,5	27,5 - 137,5
Gluconato de cálcio	8,4 - 1410,0	282 - 1410,0

Para a estimativa do LOD e LOQ, 30 imagens digitais do branco para cada analito foram capturadas. Para isso, os valores de s_R , s_G e s_B foram obtidos a partir das imagens digitais do branco e usados no cálculo de s_b . Os resultados são apresentados na Tabela 2.7.

Tabela 2.7. LOD e LOQ para os três analitos usando o método DIB-FES.

Analito	LOD (mg L^{-1})	LOQ (mg L^{-1})
Diclofenaco sódico	0,6	2,1
Dipirona sódica	0,9	3,0
Gluconato de cálcio	2,5	8,4

Em relação à sensibilidade, observa-se na Tabela 2.4 e na Ilustração 2.10 que o método DIB-FES apresenta uma sensibilidade analítica (definida pelo valor de

b) alta para os três analitos. Essa característica vantajosa pode ser atribuída à natureza da detecção trivariada (sistema de cores RGB) inerente à *webcam*, proporcionando respostas analíticas com sensibilidade maior.

Uma vez validados os modelos de calibração, as curvas analíticas DIB-FES foram usadas para a determinação de diclofenaco sódico, dipirona sódica e gluconato de cálcio em injetáveis. A Tabela 2.8 mostra os resultados obtidos. Pode-se observar a similaridade entre os resultados obtidos por ambos os métodos como comprovado pelos altos valores de tendência. De fato, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi verificada entre os resultados aplicando o teste *t* emparelhado ao nível de 95% de confiança.

A Tabela 2.8 mostra também que o método DIB-FES apresenta precisão melhor (em termos de repetitividade) que o método de referência, como revelado pelos menores valores de RSD conjunto ($n = 3$). Essa precisão satisfatória também pode ser atribuída à natureza multivariada do sinal monitorado em determinações analítica baseadas em imagens digitais RGB.

Com relação à exatidão e a presença de interferentes, o método DIB-FES foi também avaliado pela realização de testes de recuperação e os resultados também são mostrados na Tabela 2.8. O método DIB-FES é adequado para análises dos analitos escolhidos na matriz analisada, pois as taxas de recuperação obtidas nas análises estão entre 97 e 104%.

Com base nos resultados e nos critérios de aceitação descritos na seção 1.5 pode-se afirmar que o método DIB-FES para a determinação indireta de diclofenaco sódico, dipirona sódica e gluconato de cálcio em soluções injetáveis está validado.

Tabela 2.8. Resultados da determinação indireta de diclofenaco sódico, dipirona sódica e gluconato de cálcio em amostras de soluções injetáveis.

Amostras	DIB-FES	Referência	Tendência (%)	Recuperação (%)*
Diclofenaco sódico	mg mL ⁻¹			
(1)	25,1 ± 0,2	25,0 ± 0,4	100,4	98 ± 2
(2)	25,0 ± 0,2	24,8 ± 0,5	100,8	102 ± 2
(3)	24,9 ± 0,1	25,0 ± 0,5	99,6	100 ± 2
(4)	25,0 ± 0,1	24,9 ± 0,4	100,4	98 ± 2
(5)	24,9 ± 0,2	24,9 ± 0,3	100,0	104 ± 2
RSD conjunto (%)	0,2	0,4	-	-
Dipirona sódica	mg mL ⁻¹			
(1)	496,9 ± 1,4	493,8 ± 8,2	100,6	97 ± 3
(2)	501,6 ± 3,6	498,6 ± 16,4	100,6	99 ± 2
(3)	496,9 ± 4,9	498,6 ± 8,2	99,7	99 ± 3
(4)	496,1 ± 2,4	498,1 ± 14,2	99,6	102 ± 2
(5)	500,8 ± 2,4	502,0 ± 8,2	99,8	103 ± 3
RSD conjunto (%)	3,2	8,6	-	-
Gluconato de cálcio	% (m v ⁻¹)			
(1)	9,90 ± 0,02	9,86 ± 0,04	100,4	98 ± 3
(2)	9,80 ± 0,02	9,81 ± 0,04	99,9	100 ± 2
(3)	9,98 ± 0,02	9,91 ± 0,02	100,7	101 ± 1
(4)	9,99 ± 0,02	9,96 ± 0,05	100,3	103 ± 2
(5)	9,94 ± 0,02	9,97 ± 0,02	99,7	98 ± 2
RSD conjunto (%)	0,02	0,04	-	-



Rebanho na Trilha - Marie Diéterle

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE SÓDIO E CÁLCIO EM LEITE EM PÓ

3. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE SÓDIO E CÁLCIO EM LEITE EM PÓ

3.1. Considerações gerais

Embora a FES seja uma técnica analítica bastante simples e consolidada (similarmente à FAAS e ICP-OES), ela não está livre de interferências químicas, matriciais e espectrais. Um exemplo clássico de interferência espectral ocorre na determinação de sódio na presença de cálcio. A intensidade da banda de emissão do radical CaOH produzido na chama ar-butano não é desprezível na região em torno das raías de ressonância (duplete D) do sódio, produzindo erros positivos.

A solução para este problema é dissociação do radical CaOH. Entretanto a chama ar-butano que é utilizada na FES não é suficientemente energética para tal. Recomenda-se então uma chama mais energética como a chama ar-acetileno utilizada na FAAS, pois sua temperatura é alta o suficiente para dissociar o radical CaOH, produzindo o cálcio atômico e eliminando essa interferência.

Para a determinação de sódio e cálcio vários métodos podem ser utilizados de acordo com a Tabela 3.1. É importante destacar que entre todos os métodos mencionados nela, apenas a IEC, CE, ICP-OES e ICP-MS permitem a determinação simultânea de sódio e cálcio.

Tabela 3.1. Métodos descritos na literatura para a determinação de sódio e cálcio.

Método	Sódio	Cálcio
Gravimetria ¹	Sim	Sim
Titrimetria ¹	Não	Sim
Cromatografia de troca iônica (IEC) ¹	Sim	Sim
Eletroforese Capilar (CE) ²	Sim	Sim
Coulometria ¹	Não	Sim
Potenciometria ¹	Sim	Sim
Voltametria ¹	Não	Sim
Espectrometria UV-Vis ¹	Sim	Sim
Espectrofluorimetria ¹	Não	Sim
Espectrometria de Emissão em Chama (FES) ¹	Sim	Sim
Espectrometria de Absorção atômica em Chama (FAAS) ¹	Sim	Sim
Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) ¹	Sim	Sim
Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS) ³	Sim	Sim

Fonte: ¹ JEFFERY et al., 1982.

² JAGER e TAVARES, 2001.

³ RAO e TALLURI, 2007 e PATTERSON et al., 2007.

Com base em características tais como: frequência analítica, faixa linear, LOD e LOQ, os métodos espectrométricos são frequentemente escolhidos como métodos oficiais. Entretanto deve-se levar em conta que estes não estão livres de interferências e seus instrumentos são caros. Uma alternativa é o uso de instrumentos mais baratos como fotômetros de chama.

3.1.1. Determinações simultâneas utilizando FES

Conforme mencionado na seção 1.1 os fotômetros de chama comerciais possuem filtros de interferência individuais (Li, Na, K e Ca). Uma vez que para cada um desses filtros existe um sistema eletrônico independente, todos podem ser utilizados ao mesmo tempo e assim é possível realizar determinações simultâneas.

A Ilustração 3.1 mostra os espectros de transmissão dos filtros de interferência do fotômetro de chama Digimed modelo NK-2004 utilizado neste trabalho.

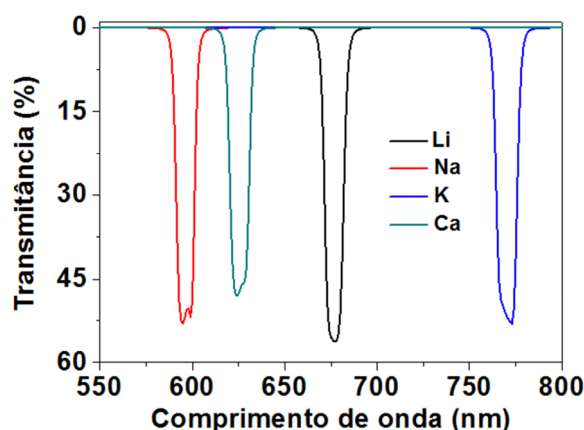


Ilustração 3.1. Espectros de transmissão dos filtros de interferência do fotômetro de chama utilizado.

Conforme mostrado na Ilustração 3.1 cada filtro de interferência possui uma janela espectral bem definida e dessa forma não é possível que um determinado elemento seja determinado utilizando um filtro de interferência que não seja o seu próprio. Isto se deve a dois fatos:

- ✚ Para os metais que não formam espécies moleculares na chama, os comprimentos de onda de suas respectivas raías de ressonância não estão contidos nas janelas espectrais do filtro de interferência de outro metal que não seja o seu próprio. Dessa forma não é possível realizar medidas da emissão de um determinado metal utilizando o filtro de interferência de outro metal.
- ✚ Para os metais que formam espécies moleculares na chama, espectros de bandas alargadas são observados, mas os comprimentos de onda referentes aos máximos de emissão também não estão contidos nas janelas espectrais do filtro de interferência de outros metais. Entretanto por se tratar de um espectro de bandas existe uma emissão não desprezível nesta janela (sobreposição espectral) que a literatura não relata de que tipo é esta interferência espectral.

3.1.2. Leite em pó

É o produto obtido por desidratação do leite de vaca integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados (MAPA, 1997).

O leite é composto quimicamente por triacilgliceróis (especialmente dos ácidos palmítico e oleico), vitaminas (A, D, E e K), proteínas (caseína, albuminas e globulinas), enzimas (lipases, proteinases, oxidoredutases, fosfatases, catalase e peroxidase), lactose e minerais (cloro, fósforo, potássio, sódio, cálcio e magnésio em teores apreciáveis e ferro, alumínio, bromo, zinco e manganês em teores baixos (SILVA, 1997).

Entre os minerais presentes no leite é importante o monitoramento dos teores presentes de potássio, sódio, cálcio e magnésio em função da relação direta que os mesmos possuem com o estado nutricional e salutar dos rebanhos bovinos. Quando as vacas leiteiras estão com o tecido mamário inflamado (mastite), observa-se no leite um decréscimo nos teores de potássio, cálcio e magnésio e um aumento no teor de sódio (SCHULTZ, 1977).

Nas amostras de leite em pó analisadas neste trabalho o teor de sódio varia entre 3,00 e 5,50 mg g⁻¹ e o teor de cálcio varia entre 8,50 e 15,0 mg g⁻¹. Tais informações foram obtidas a partir das embalagens das amostras.

3.1.3. Validação de modelos de calibração multivariada

3.1.3.1. Avaliação da calibração

Após o desenvolvimento dos modelos de calibração, estes são utilizados para a previsão da concentração dos analitos nas próprias misturas de calibração e os resultados são comparados. A partir dos valores de concentração prevista e valores de contração real é calculado o coeficiente de correlação (ou simplesmente correlação) entre os mesmos utilizando a **Equação 56**:

$$r(c_{\text{cal}}^{\text{real}}, c_{\text{cal}}^{\text{prevista}}) = \frac{1}{N_{\text{amostra}} - 1} \sum_{i=1}^{N_{\text{amostras}}} \left(\frac{c_{i,\text{cal}}^{\text{real}} - \bar{c}_{\text{cal}}^{\text{real}}}{s_{c_{\text{real}}}} \right) \left(\frac{c_{i,\text{cal}}^{\text{prevista}} - \bar{c}_{\text{cal}}^{\text{prevista}}}{s_{c_{\text{prevista}}}} \right) \quad (56)$$

onde: $c_{\text{cal}}^{\text{real}}$ = concentração real das amostras do conjunto de calibração.

$c_{\text{cal}}^{\text{prevista}}$ = concentração prevista das amostras do conjunto de calibração.

$c_{i,\text{cal}}^{\text{real}}$ = concentração real da i-ésima amostra do conjunto de calibração.

$c_{i,\text{cal}}^{\text{prevista}}$ = concentração prevista da i-ésima amostra do conjunto de calibração.

$\bar{c}_{\text{cal}}^{\text{real}}$ = concentração real média do conjunto de calibração.

$\bar{c}_{\text{cal}}^{\text{prevista}}$ = concentração prevista média do conjunto de calibração.

N_{amostra} = número de amostras do conjunto de calibração.

$s_{c_{\text{real}}}$ = desvio padrão da concentração real das amostras do conjunto de calibração.

$s_{c_{\text{prevista}}}$ = desvio padrão da concentração prevista das amostras do conjunto de calibração.

O coeficiente de correlação varia entre -1 e 1 com três valores notáveis (BARROS NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2007):

- ✚ -1 indica que as variáveis possuem relação linear inversa;
- ✚ 0 indica ausência de relação linear;
- ✚ 1 indica que as variáveis possuem relação linear direta.

Entretanto análise do valor de correlação deve ser feita com bastante cautela. Seu valor não pode e não deve ser utilizado sozinho para inferir sobre a qualidade do modelo de regressão. Para tal deve-se utilizar outras métricas em conjunto.

A partir das diferenças entre as concentrações reais e as concentrações previstas para os conjuntos de calibração de cada analito é calculada a raiz média quadrática do erro de calibração, RMSEC (do inglês: *Root Mean Square Error of Calibration*) de acordo com a **Equação 57**:

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_{amostras}} (c_{i,cal} - \hat{c}_{i,cal})^2}{N_{amostra}}} \quad (57)$$

onde: $c_{i,cal}$ = concentração real da i-ésima amostra do conjunto de calibração.

$\hat{c}_{i,cal}$ = concentração prevista da i-ésima amostra do conjunto de calibração.

$N_{amostra}$ = número de amostras do conjunto de calibração.

Um modelo de calibração de boa qualidade deve apresentar um baixo valor de RMSEC e um alto valor de coeficiente de correlação (próximo a 1) (TIAN et al., 2007) podendo ser então utilizado para estimar a concentração do analito no conjunto de misturas que não participaram da etapa de calibração (conjunto de previsão).

3.1.3.2. Avaliação da previsão

Após a utilização do modelo de calibração desenvolvido no conjunto de previsão é preciso avaliar se a previsão foi satisfatória ou não de acordo com alguns critérios estabelecidos. Esta avaliação é feita com base na análise de gráficos e parâmetros que são conhecidas com ferramentas de diagnóstico. Nenhuma delas isoladamente é suficiente para avaliar a exatidão e capacidade preditiva dos modelos, sendo necessária uma análise conjunta de várias ferramentas de diagnóstico.

Inicialmente é plotado o gráfico de concentração prevista versus concentração real para o conjunto de previsão. Neste gráfico, para um modelo com previsão de qualidade, os pontos referentes às amostras deverão estar localizados sobre a reta bissetriz entre os eixos das ordenas e abscissas.

A partir dos dados deste gráfico é calculado o coeficiente de correlação utilizando a **Equação 58**:

$$r(c_{\text{prev}}^{\text{real}}, c_{\text{prev}}^{\text{prevista}}) = \frac{1}{N_{\text{amostra}} - 1} \sum_{i=1}^{N_{\text{amostras}}} \left(\frac{c_{i,\text{prev}}^{\text{real}} - \bar{c}_{\text{prev}}^{\text{real}}}{s_{c_{\text{real}}}} \right) \left(\frac{c_{i,\text{prev}}^{\text{prevista}} - \bar{c}_{\text{prev}}^{\text{prevista}}}{s_{c_{\text{prevista}}}} \right) \quad (58)$$

onde: $c_{\text{prev}}^{\text{real}}$ = concentração real das amostras do conjunto de previsão.

$c_{\text{prev}}^{\text{prevista}}$ = concentração prevista das amostras do conjunto de previsão.

$c_{i,\text{prev}}^{\text{real}}$ = concentração real da i-ésima amostra do conjunto de previsão.

$c_{i,\text{prev}}^{\text{prevista}}$ = concentração prevista da i-ésima amostra do conjunto de previsão.

$\bar{c}_{\text{prev}}^{\text{real}}$ = concentração real média do conjunto de previsão.

$\bar{c}_{\text{prev}}^{\text{prevista}}$ = concentração prevista média do conjunto de previsão.

N_{amostra} = número de amostras do conjunto de previsão.

$s_{c_{\text{real}}}$ = desvio padrão da concentração real das amostras do conjunto de previsão.

$s_{c_{\text{prevista}}}$ = desvio padrão da concentração prevista das amostras do conjunto de previsão.

A partir das concentrações previstas e reais de cada amostra do conjunto de previsão são calculados os resíduos (de concentração) deixados pela previsão do modelo de acordo com a **Equação 59**:

$$\epsilon_c = C_R - C_P \quad (59)$$

onde: ϵ_c é o resíduo (de concentração).

C_P é a concentração prevista para uma dada amostra.

C_R é a concentração real para uma dada amostra.

A partir destes resíduos para cada amostra do conjunto de previsão é calculada a raiz média quadrática do erro de previsão, RMSEP (do inglês: *Root Mean Square Error of Prediction*) utilizando a **Equação 60**:

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_{\text{amostras}}} (c_{i,\text{prev}} - \hat{c}_{i,\text{prev}})^2}{N_{\text{amostras}}}} \quad (60)$$

onde: $c_{i,\text{prev}}$ = concentração real da i-ésima amostra do conjunto de previsão.

$\hat{c}_{i,\text{prev}}$ = concentração prevista da i-ésima amostra do conjunto de previsão.

N_{amostra} = número de amostras do conjunto de calibração.

O RMSEP é um parâmetro global que incorpora tanto erros sistemáticos quanto aleatórios (VALDERRAMA, BRAGA e POPPI, 2009).

Algumas vezes a raiz quadrada do RMSEP, isto é, o erro médio da estimativa da propriedade de interesse (neste caso a concentração do analito) é referido como uma estimativa da exatidão em calibração multivariada (VALDERRAMA, BRAGA e POPPI, 2009).

Um modelo com previsão de boa qualidade deve apresentar um alto valor de coeficiente de correlação, um baixo valor de RMSEP e a diferença entre RMSEP e RMSEC deve ser também baixa (TIAN et al., 2007).

Ainda com relação aos resíduos das amostras do conjunto de previsão, eles agora são plotados em função de sua ordem no planejamento experimental e assim um novo gráfico é plotado: resíduo versus a ordem das amostras. Esta forma de organização dos resíduos permite que seja revelada qualquer estrutura nos resíduos que por ventura tenha sido mascarada no gráfico de concentração prevista versus concentração real. A identificação de estrutura nos resíduos é um processo subjetivo, e para evitar erros de julgamento (por informação a priori ou não) deve-se fazer um teste mais rigoroso.

Voltando ao gráfico de concentração real versus concentração prevista é feita a regressão linear dos resultados usando o método OLS, que deve fornecer uma linha reta com intercepto aproximadamente igual a 0 e inclinação aproximadamente igual a 1 se os resultados não são estatisticamente diferentes a um dado nível de confiança (RIU e RIUS, 1996). É então realizado um teste estatístico conjunto para o intercepto e para a inclinação da regressão linear entre os valores ao gráfico de concentração real versus concentração prevista. O teste consiste em verificar a presença do ponto teórico (inclinação = 1, intercepto = 0) dentro dos limites da região elíptica de confiança conjunta, EJCR (do inglês: *Elliptical Joint Confidence Region*) definida pela **Equação 61** (GOICOECHEA e OLIVIERI, 2002):

$$N_{am} (a - \hat{a})^2 + 2(\sum C_{Real})(a - \hat{a})(b - \hat{b}) + (\sum C_{Real})^2 (b - \hat{b})^2 = 2 s^2 F_{\alpha(2, N_{am}-2)} \quad (61)$$

onde: a e $\hat{a}$ são os interceptos real e estimado, respectivamente.

b e $\hat{b}$ são as inclinações real e estimada, respectivamente.

C_{Real} é a concentração real das amostras.

s^2 é a variância do valor médio das concentrações reais das amostras.

N_{am} é o número de amostras do conjunto de previsão.

$F_{\alpha(2, N_{am}-2)}$ é o valor do ponto da distribuição F com 2 e $N_{am} - 2$ graus de liberdade.

α é o nível de confiança (geralmente 95%).

Caso o ponto teórico ($a = 0$ e $b = 1$) esteja dentro da EJCR, pode-se concluir que diferenças significativas entre os valores de concentração prevista e os valores de concentração real são estatisticamente desprezíveis. Esse teste permite acessar a exatidão de um modelo (VALDERRAMA, BRAGA e POPPI, 2009).

3.1.3.3. Critérios para aceitação de um modelo de calibração multivariada

Após a análise das ferramentas de diagnóstico é que se estabeleçam os critérios de aceitação. Neste trabalho, os critérios de aceitação dos parâmetros de validação, quando aplicáveis, são descritos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Critérios de aceitação de um modelo de calibração multivariada usados neste trabalho.

Etapas	Parâmetro	Critério adotado
Calibração	Correlação	Próximo a 1
	RMSEC	Baixo
Previsão	Correlação	Próximo a 1
	RMSEP	Baixo
	RMSEP - RMSEC	Baixo
	Gráfico $C_P \times C_R$	Pontos sobre a bissetriz dos eixos
	Gráfico $\epsilon_c \times$ amostras	Distribuição aleatória em torno de zero
	EJCR	Ponto teórico dentro da elipse

Se todos os critérios adotados são atendidos, pode-se afirmar que um modelo de calibração multivariada está validado. Dessa forma o mesmo poderá ser utilizado na previsão de amostras reais.

3.2. Métodos oficiais

Para a determinação de metais em alimentos no Brasil, a FAAS é o método oficial (IAL, 2008).

Para a realização da análise das amostras por FAAS é preciso antes realizar a abertura das amostras. Para tal, dois procedimentos são igualmente recomendados: a digestão por via úmida com HNO_3 e H_2O_2 concentrados em forno de micro-ondas e a digestão por via seca, na qual a amostra é aquecida em bico de Bunsen seguida de calcinação a $550\text{ }^\circ\text{C}$ por 4 horas em forno mufla.

Após a digestão por via úmida, o volume final desejado é aferido com água deionizada. Caso a digestão por via seca seja escolhida, as cinzas são dissolvidas em 1 mL de HNO_3 concentrado e o volume final desejado é aferido com água deionizada. Após esta etapa a amostra segue para a determinação dos metais de interesse.

Na determinação de sódio e cálcio em leite em pó o IAL recomenda a FAAS com chama ar-acetileno e medidas de absorbância em 589,0 nm para o sódio e 422,7 nm para o cálcio.

Para as medidas de sódio por FAAS é necessário adicionar um tampão de ionização (K^+ 0,1 – 1,0 % m v^{-1}) às soluções do branco, padrões e amostras. Neste trabalho a concentração final de K^+ utilizada foi 1,0 % m v^{-1} .

Para as medidas de cálcio por FAAS, além da adição do tampão de ionização é necessário também adicionar um agente de libertação (0,1 - 1,0 % m v^{-1} de La^{+3} ou Sr^{2+}) às soluções do branco, padrões e amostras para eliminar a interferência de íons AlO_2^- , PO_4^{3-} e SO_4^{2-} sobre o sinal de absorção do cálcio. Em virtude do preço elevado dos compostos de lantânio, neste trabalho optou-se pelo uso do $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ de modo que a concentração final de Sr^{2+} foi 1,0 % m v^{-1} .

As concentrações utilizadas na construção das curvas analíticas de sódio e cálcio, bem como as condições operacionais de operação do instrumento seguiram as recomendações do fabricante do equipamento. As medidas foram realizadas em triplicatas autênticas para posterior validação das curvas analíticas por intermédio da ANOVA.

3.3. Experimental

3.3.1. Reagentes, soluções padrão e amostras

Para a preparação das soluções padrão estoque de cada analito de interesse e outras, foram utilizados os seguintes reagentes de grau analítico: Na_2CO_3 (Merck, Darmstadt, Alemanha), CaCO_3 (Merck, Darmstadt, Alemanha), Li_2CO_3 (Merck, Darmstadt, Alemanha), EDTA ácido (Vetec, São Paulo, Brasil), NH_4OH (Vetec, São Paulo, Brasil) e HNO_3 (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A água utilizada para a preparação de todas as soluções deste trabalho foi sempre recém-destilada e deionizada por um sistema Milli-Q Plus (Millipore $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

As soluções padrão estoque na concentração de $50,00 \text{ mg L}^{-1}$ de Na^+ e $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Li^+ e Ca^{2+} foram preparadas dissolvendo-se a massa adequada de seus respectivos carbonatos (secos em estufa a 150°C por 2 horas) em um volume mínimo de HNO_3 concentrado (adição até não haver mais liberação de CO_2) e adição de 200 mL de água deionizada. Em seguida, as soluções foram aquecidas até a ebulição para eliminação do CO_2 residual e, após resfriamento, o volume foi aferido a 1,0 L em um balão volumétrico com água deionizada.

A solução tampão de amoniacal do EDTA, $(\text{NH}_4)_4\text{EDTA}$ (agente de liberação), $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução de 0,2922 g de EDTA ácido em 700 mL de água deionizada, seguida de adição de NH_4OH concentrado até $\text{pH} = 10,0$ e o volume foi aferido a 1,0 L em balão volumétrico com água deionizada.

As misturas de Na^+ e Ca^{2+} foram preparadas por diluições adequadas com água deionizada a partir de suas soluções estoque e divididas em dois conjuntos de acordo com um planejamento fatorial completo (BARROS NETO, SCARMÍNIO E BRUNS, 2007): calibração (5^2) e previsão (4^2) cujos níveis de concentração dos analitos em cada mistura são apresentados na Tabela 3.3. Estes níveis de concentração para o conjunto de calibração foram selecionados com base no estudo descrito na seção 3.4.1. Os níveis de concentração para o conjunto de previsão foram determinados como sendo os pontos médios dos níveis utilizados no conjunto de calibração de modo que o mesmo fosse mais interno com relação ao conjunto de calibração a fim de evitar extrapolações.

Às mesmas misturas também foram adicionadas uma alíquota da solução tampão de EDTA amoniacal, correspondentes a 1/10 do volume final de aferição

antes da aferição do volume. Desta forma, a interferência de íons PO_4^{3-} e SO_4^{2-} sobre o sinal de emissão do radical CaOH é minimizada.

Oito amostras de leite em pó integral de marcas diferentes foram adquiridas em supermercados da cidade de João Pessoa – PB.

Papel filtro faixa azul (filtração lenta) Nalgon com poros de $2,0 \mu\text{m}$, teor de cinzas = $0,00009\text{g}$ e $d = 80\text{g m}^{-2}$ foi utilizado para filtração das amostras.

Tabela 3.3. Níveis de concentração das misturas.

Misturas de calibração (MC)	Analito	Níveis de concentração (mg L ⁻¹)					
		-2	-1	0	1	2	
	Na ⁺	0,28	0,84	1,40	1,96	2,52	
	Ca ²⁺	2,00	6,00	10,0	14,0	18,0	
	Ca ²⁺	Misturas	Na ⁺				
			-2	-1	0	1	2
		-2	MC 1	MC 6	MC 11	MC 16	MC 21
		-1	MC 2	MC 7	MC 12	MC 17	MC 22
		0	MC 3	MC 8	MC 13	MC 18	MC 23
		1	MC 4	MC 9	MC 14	MC 19	MC 24
2		MC 5	MC 10	MC 15	MC 20	MC 25	
Misturas de previsão (MP)	Analito	Níveis de concentração (mg L ⁻¹)					
		-1,5	0,5	0,5	1,5		
	Na ⁺	0,56	1,12	1,68	2,24		
	Ca ²⁺	4,00	8,00	12,0	16,0		
	Ca ²⁺	Misturas	Na ⁺				
			-1,5	0,5	0,5	1,5	
		-1,5	MP 1	MP 5	MP 9	MP 13	
		-0,5	MP 2	MP 6	MP 10	MP 14	
		0,5	MP 3	MP 7	MP 11	MP 15	
		1,5	MP 4	MP 8	MP 12	MP 16	

3.3.2. Equipamentos

O fotômetro de chama, a balança analítica e a *webcam* já foram descritos na seção 2.3.2.

Um forno mufla Lavoisier modelo 400C foi utilizado para a calcinação das amostras.

Um espectrofotômetro de absorção atômica Shimadzu modelo AA-6300 (com os modos de absorção em chama e absorção em forno de grafite) foi utilizado para a determinação dos valores de referência de sódio e cálcio nas amostras reais.

Uma lâmpada de cátodo oco de sódio da marca Hamamatsu Photonics, operando a uma corrente de 10 mA foi utilizada como fonte de radiação para a

medidas de sódio por FAAS. A correção da radiação de fundo foi realizada por intermédio da auto-reversão da lâmpada de cátodo oco.

Uma lâmpada de cátodo oco de cálcio da marca Hamamatsu Photonics, operando a uma corrente de 10 mA foi utilizada como fonte de radiação para a medidas de cálcio por FAAS. A correção da radiação de fundo foi realizada por intermédio de uma lâmpada de deutério (correção com fonte contínua).

3.3.2.1. Sistema de aquisição de imagens

Descrito anteriormente na seção 2.3.2.1.

3.3.3. Programas computacionais utilizados

3.3.3.1. No desenvolvimento dos modelos de calibração MLR

Todos os modelos de calibração multivariada foram desenvolvidos utilizando Matlab 2008a da Mathworks®, bem como a elaboração dos gráficos utilizados neste trabalho.

2.3.3.2. Na captura de imagens digitais e no tratamento de imagens digitais

Descritos anteriormente nas seções 2.3.3.2 e 2.3.3.3 respectivamente.

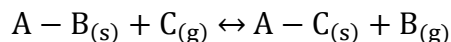
3.3.4. A escolha entre agente de liberação e de proteção

Íons AlO_2^- , PO_4^{3-} e SO_4^{2-} presentes nas cinzas das amostras reagem com os íons Ca^{2+} para formar espécies refratárias na chama diminuindo o sinal de emissão do radical CaOH na chama ar-butano. Estas espécies são provavelmente $\text{Ca}(\text{AlO}_2)_2$, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ e CaS_2O_7 (BACKER e JOHNSON, 1954 e JEFFERY et al., 1982). Este tipo de interferência é conhecido com interferência química.

Na FES, para eliminar este tipo de interferência, a literatura reporta três alternativas (JEFFERY et al., 1982):

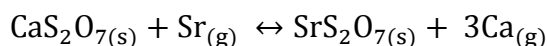
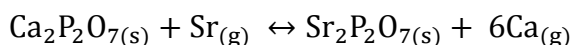
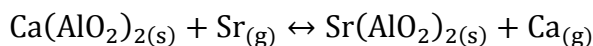
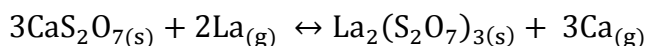
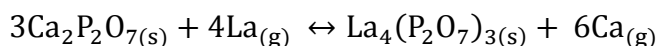
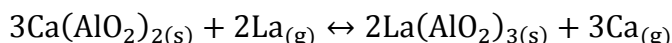
1. Uso de um agente de liberação;
2. Uso de um agente protetor;
3. Procedimentos de separação.

O agente de liberação é uma substância que reage com o interferente na chama produzindo um composto mais estável quando comparado com seu respectivo composto de cálcio de acordo com a reação genérica:



De acordo com o princípio de Le Châtelier um excesso de agente de liberação levará uma maior quantidade de átomos metálicos gasosos (B). Este efeito será especialmente ativo se A – C for estável.

Para a determinação de cálcio em FES na presença de AlO_2^- , PO_4^{3-} e SO_4^{2-} os agentes de liberação recomendados pelos fabricantes de instrumentos para FES e FAAS são compostos de lantânio e estrôncio (JEFFERY et al., 1982) cujas reações que ocorrem na chama são mostradas abaixo:



A possibilidade do uso de sais de lantânio e de estrôncio foi descartada imediatamente, pois ambos os metais emitem radiação na região visível do espectro eletromagnético quando excitados numa chama ar-butano, além do elevado custo de seus compostos.

O agente de proteção é uma substância que reage com o analito ainda na amostra produzindo um complexo que é muito mais estável que o seu respectivo composto refratário e é facilmente decomposto na chama para produzir átomos gasosos do analito. Para a determinação de cálcio em FES na presença de AlO_2^- , PO_4^{3-} e SO_4^{2-} os agentes de proteção recomendado é o EDTA (JEFFERY et al., 1982). Entretanto o EDTA é comercializado na forma de ácido ou na forma do sal dissódico.

Em virtude de o sódio ser um dos analitos, o sal dissódico do EDTA não pode ser utilizando, restando assim apenas o EDTA ácido. Porém a solubilidade do EDTA

ácido em água é baixa. O problema da baixa solubilidade do EDTA ácido em água é facilmente superável, uma vez que a solubilidade de ácidos orgânicos fracos aumenta consideravelmente em meio alcalino. Dessa forma, o EDTA ácido é facilmente solubilizado por uma solução alcalina.

O NH_4OH concentrado foi a base escolhida para solubilização do EDTA ácido por não introduzir cátions metálicos na amostra. O NH_4OH foi adicionado em excesso até $\text{pH} = 10,0$ a fim de se obter a solução tampão $(\text{NH}_4)_4\text{EDTA} / \text{NH}_4\text{OH}$, pois a complexação entre os íons Ca^{2+} e o EDTA^{4-} ocorre em $\text{pH} > 10,0$ (JEFFERY et al., 1982).

Os procedimentos de separação podem ser utilizados tanto para o analito quanto para os interferentes. Entre esses procedimentos pode-se citar: a extração por solvente, a precipitação e a cromatografia (MARCZENKO e BALCERZAK, 2000).

3.3.5. Procedimento adotado

Neste trabalho a abertura das amostras foi feita por via seca. Entre 40 e 50 mg de amostra foi transferida para um cadinho de porcelana. Em seguida a amostra foi aquecida suavemente em um bico de Bunsen, tomando os devidos cuidados para evitar o aparecimento de chamas. Após isto, os resíduos da amostra foram calcinados em mufla a $550\text{ }^\circ\text{C}$ por um período de quatro horas. Após a calcinação da amostra as cinzas foram dissolvidas em 1 mL de HNO_3 concentrado.

Em virtude da presença de íons AlO_2^- , PO_4^{3-} e SO_4^{2-} nas cinzas das amostras, a solução tampão de $(\text{NH}_4)_4\text{EDTA}$ também foi adicionada (na mesma proporção usada para as misturas de calibração e previsão).

Por fim, o precipitado obtido foi filtrado em papel de filtração lenta e o volume de cada filtrado obtido foi aferido a 100 mL em balão volumétrico com água deionizada. As oito amostras foram preparadas em triplicatas autênticas.

3.3.6. Testes de recuperação

Antes de toda a marcha analítica uma alíquota, da ordem de micro litros, das soluções estoque de sódio e cálcio (na mesma forma em que se encontra na amostra) foi adicionada na amostra. A amostra então fortificada foi submetida à digestão por via seca e diluída de acordo com o procedimento descrito na seção anterior. As massas adicionada teóricas para o sódio e cálcio foram 0,05 e 0,5 mg respectivamente.

3.3.7. O banco de dados

Nos métodos inversos de calibração multivariada a matriz $\mathbf{Y}$ corresponde à matriz dos valores associados à propriedade a ser estimada. Neste trabalho, esta matriz corresponde a matriz das concentrações de sódio e cálcio, isto é, $\mathbf{Y} = C_{Na}$ ou $\mathbf{Y} = C_{Ca}$ uma vez que os modelos de calibração são construídos separadamente.

Dessa forma, a matriz $\mathbf{X}$ corresponde à matriz das variáveis que serão utilizadas na construção do modelo de calibração multivariada para estimativa dos valores da matriz $\mathbf{Y}$. Na DIB-FES as variáveis utilizadas foram os valores das componentes R, G e B, isto é, $\mathbf{X} = [R_{mist} \ G_{mist} \ B_{mist}]$.

As matrizes utilizadas possuem as seguintes dimensões: $\mathbf{X}_{cal} = (25 \text{ misturas} \times 3 \text{ variáveis})$, $\mathbf{X}_{prev} = (16 \text{ misturas} \times 3 \text{ variáveis})$, $\mathbf{Y}_{cal} = (25 \text{ misturas} \times 1 \text{ variável})$ e $\mathbf{Y}_{prev} = (25 \text{ misturas} \times 1 \text{ variável})$.

Para o desenvolvimento dos modelos de calibração MLR, os dados brutos foram utilizados, pois as três variáveis possuem a mesma variação absoluta (0 – 255) e assim não haverá nenhum favorecimento a nenhuma variável.

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. Influência da emissão de diferentes metais sobre a cor da chama

Considerando que o fenômeno de auto-emissão da chama na região visível do espectro eletromagnético é significativa e constante, é razoável admitir que a cor predominante na chama seja aquela oriunda da emissão de um determinado metal (caso este seja capaz de emitir REM na região visível do espectro eletromagnético). Caso dois ou mais metais estejam presentes na chama, é esperado que a cor resultante seja uma combinação das cores individuais de cada metal.

A fim de verificar a consistência do argumento acima, foi realizado o seguinte estudo: a partir das soluções estoque de Li^+ , Na^+ e Ca^{2+} foi preparado um conjunto de misturas binárias com esses três metais: $(Na^+ + Li^+)$, $(Na^+ + Ca^{2+})$, $(Ca^{2+} + Li^+)$ e $(Ca^{2+} + Na^+)$ com concentrações adequadas para que nenhum dos componentes R, G e B nas imagens digitais atinja o valor máximo de sua escala (255). Quando isto ocorre diz-se que o componente está saturado.

Essas misturas foram preparadas de modo que a concentração de um metal se mantivesse constante enquanto que a concentração do outro variava. Os níveis de concentração utilizados nesse estudo são apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Níveis de concentração (mg L^{-1}) das misturas binárias utilizadas no estudo Influência da emissão de diferentes metais sobre a cor da chama.

Níveis	-2	-1	0	1	2
Na^+	0,70	1,40	2,10	2,80	3,50
Ca^{2+}	2,00	6,00	10,0	14,0	18,0
Concentrações adicionadas (mg L^{-1})					
Li^+	2,00	Na^+	2,00	Ca^{2+}	10,0

Após a preparação das misturas, as imagens digitais das mesmas foram capturadas e estão dispostas na Ilustração 3.2. Para estas imagens digitais observou-se a variação das componentes R, G e B como mostrada na Ilustração 3.3. A primeira imagem em cada sequência (marcada com a letra L) refere-se à solução em branco. A razão dessa representação (L ao invés de B) objetiva não fazer confusão com o componente B. Em inglês o termo utilizado para designar a prova em branco é *blank*, e por isso utilizou-se a letra L para tal representação.

A composição de cada mistura binária é mostrada na Tabela 3.5.

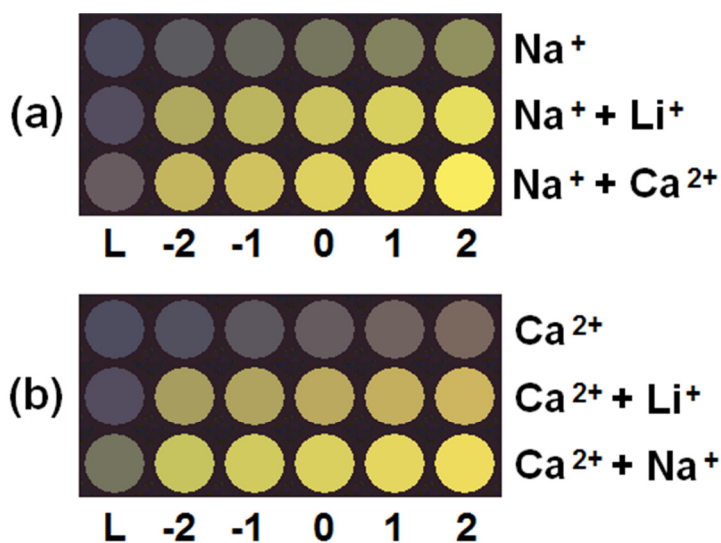
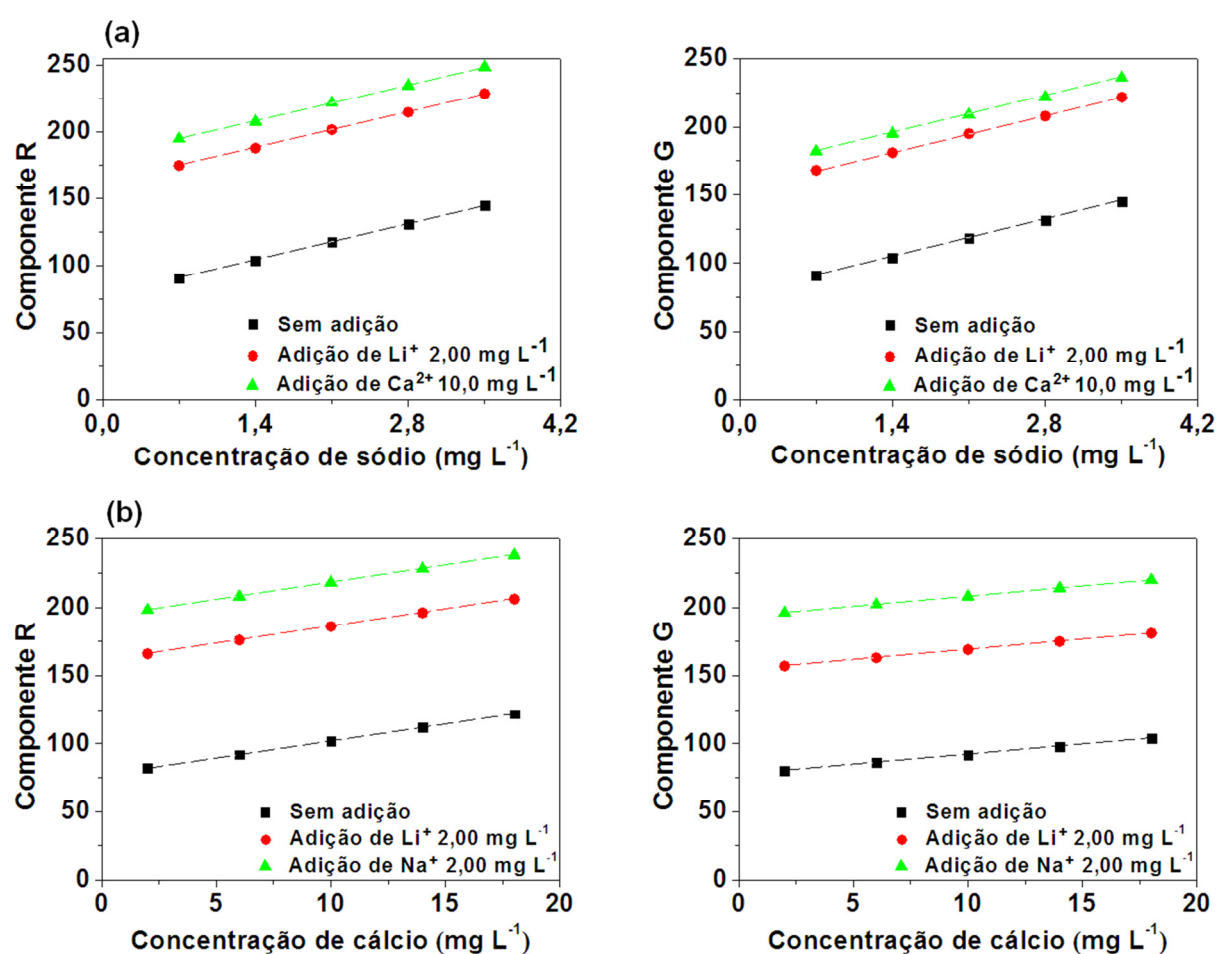
**Ilustração 3.2.** Imagens digitais da emissão de das misturas de: (a) sódio e (b) cálcio.

Tabela 3.5. Composição das misturas binárias da Ilustração 3.2.

Composição	Níveis de concentração (mg L^{-1})					
	L	-2	-1	0	1	2
Na^+	0,00	0,70	1,40	2,10	2,80	3,50
Na^+	0,00	0,70	1,40	2,10	2,80	3,50
Li^+	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Na^+	0,00	0,70	1,40	2,10	2,80	3,50
Ca^{2+}	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Ca^{2+}	0,00	2,00	6,00	10,0	14,0	18,0
Ca^{2+}	0,00	2,00	6,00	10,0	14,0	18,0
Li^+	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Ca^{2+}	0,00	2,00	6,00	10,0	14,0	18,0
Na^+	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

**Ilustração 3.3.** Efeito da adição de metais sobre as componentes R e G das imagens digitais das misturas de: (a) sódio e (b) cálcio.

Para todas as imagens digitais da Ilustração 3.2 a componente B possui contribuição apenas do fenômeno de auto-emissão da chama (constante). Dessa forma as discussões posteriores serão feitas apenas para os componentes R e G.

No primeiro conjunto de imagens da Ilustração 3.2 tem-se como emissão principal a emissão do sódio. Na emissão do sódio (primeira sequência de imagens digitais da Ilustração 3.2 (a)) os componentes R e G possuem contribuição do fenômeno de auto-emissão da chama (constante) e da emissão do sódio (variável com a concentração do mesmo).

Com a adição de lítio e cálcio (segunda e terceira sequências de imagens digitais da Ilustração 3.2 (a)) às soluções padrão de sódio, as imagens digitais das misturas apresentam diferenças notórias quando comparadas com as imagens digitais de mesma concentração de sódio sem a adição de lítio e cálcio (primeira sequência de imagens digitais da Ilustração 3.2 (a) respectivamente).

Essas diferenças são devidas ao aumento de fenômenos que contribuem para os componentes R e G: em ambos componentes existe a contribuição da auto-emissão da chama, da emissão do sódio e da emissão do metal adicionado. Como consequência um aumento constante dos valores dos componentes R e G é observado (Ilustração 3.3 (a)).

No segundo conjunto de imagens da Ilustração 3.2 tem-se como emissão principal a emissão do radical CaOH . Na emissão do radical CaOH (primeira sequência de imagens digitais da Ilustração 3.2 (a)) os componentes R e G possuem contribuição do fenômeno de auto-emissão da chama (constante) e da emissão do radical CaOH (variável com a concentração do mesmo).

Com a adição de lítio e sódio (segunda e terceira sequências de imagens digitais da Ilustração 3.2 (b) respectivamente) às soluções padrão de cálcio, as imagens digitais das misturas apresentam, assim como no primeiro conjunto de imagens, diferenças notórias quando comparadas com as imagens digitais de mesma concentração de cálcio sem a adição de lítio e sódio (primeira sequência de imagens digitais da Ilustração 3.2 (b)).

Essas diferenças são devidas ao aumento de fenômenos que contribuem para os componentes R e G: para ambos os componentes existe a contribuição da auto-emissão da chama, da emissão do radical CaOH e da emissão do metal adicionado. Entretanto essa diferença é mais pronunciada para o componente R que para o G (Ilustração 3.3 (c)).

3.4.2. Desenvolvimento e validação dos modelos de calibração MLR

As imagens digitais obtidas a partir das misturas e que forneceram os dados referentes às matrizes $\mathbf{X}_{\text{cal}}$ e $\mathbf{X}_{\text{prev}}$ são mostradas na Ilustração 3.4. Testes para verificação de correlação entre as variáveis da matriz $\mathbf{X}$ não foram realizados uma vez que todas são ortogonais entre si e assim formam uma base canônica no espaço $\Re^3$ (BOLDRINI, 1980).

A fim de verificar a existência de multicolinearidade entre as variáveis, foi calculado o fator de inflação da variância, VIF para cada uma das variáveis e os resultados são mostrados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6. Valores de VIF para as variáveis da matriz $\mathbf{X}$.

Variável	VIF
R_{mist}	9,06
G_{mist}	9,02
B_{mist}	Não definido

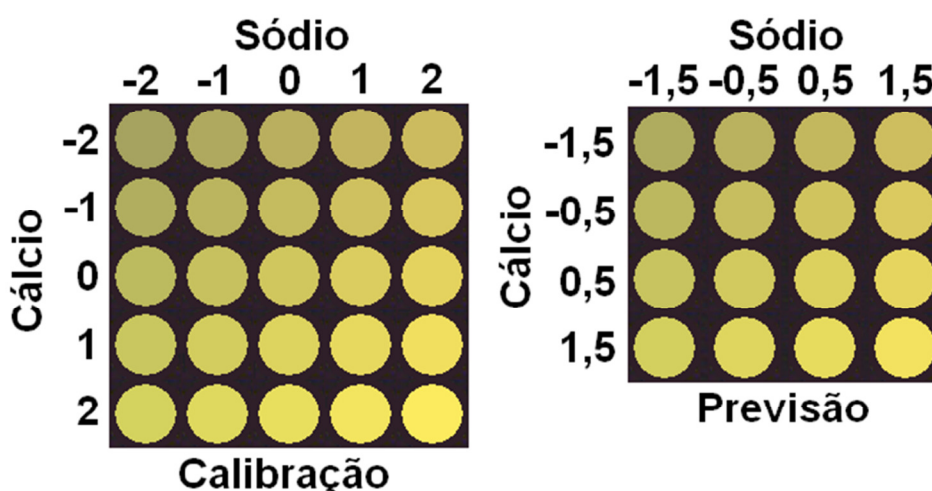


Ilustração 3.4. Imagens digitais referentes aos conjuntos de calibração e previsão. A disposição das imagens segue exatamente a mesma disposição das misturas na Tabela 3.2.

Os valores de VIF abaixo de 10 para as variáveis R_{mist} e G_{mist} indicam não-multicolinearidade (GIACOMELLI et al., 1998). Para a variável B_{mist} o valor de VIF não foi calculado uma vez que a mesma possui informação apenas referente ao fenômeno de auto-emissão da chama a qual é constante.

O desenvolvimento dos modelos de calibração MLR é feito por meio das **Equações 19 e 20**. A avaliação da qualidade dos mesmos foi realizada a partir dos valores de: coeficiente de correlação de calibração e RMSEC cujos valores são apresentados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. Valores dos parâmetros de avaliação qualidade dos modelos de calibração MLR.

Analito	Na⁺	Ca²⁺
Coeficiente de correlação de calibração	0,9999	0,9998
RMSEC (mg L ⁻¹)	$7,59 \times 10^{-7}$	$5,67 \times 10^{-6}$

Os valores apresentados na tabela acima indicam uma boa concordância entre os valores de concentração previstos e os valores de referência para os conjuntos de calibração de ambos os metais, como revelados pelos baixos valores de RMSEP e valores de coeficiente de correlação de calibração próximos a 1. Estes resultados são um indicativo de boa qualidade dos modelos de calibração MLR.

Após verificação desses indicativos os modelos de calibração, foram utilizados no conjunto de previsão constituído por 16 misturas sintéticas (descritas na seção 3.2.1) e os resultados são mostrados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8. Resultados da determinação de Na e Ca em amostras sintéticas (conjunto de previsão) utilizando os modelos de calibração MLR.

Amostras	C_{Na⁺} (mg L⁻¹)		C_{Ca²⁺} (mg L⁻¹)	
	Real	Prevista	Real	Prevista
1	0,56	0,56	4,00	3,89
2	0,56	0,56	8,00	8,15
3	0,56	0,55	12,0	11,95
4	0,56	0,58	16,0	16,03
5	1,12	1,10	4,00	4,08
6	1,12	1,12	8,00	7,95
7	1,12	1,11	12,0	11,85
8	1,12	1,13	16,0	16,1
9	1,68	1,70	4,00	4,00
10	1,68	1,68	8,00	8,00
11	1,68	1,69	12,0	12,1
12	1,68	1,67	16,0	15,9
13	2,24	2,25	4,00	3,95
14	2,24	2,23	8,00	8,05
15	2,24	2,22	12,0	12,0
16	2,24	2,24	16,0	16,0

As ferramentas de diagnóstico para avaliação da previsão de amostras são: coeficiente correlação de previsão, RMSEP, gráfico de concentração real versus concentração prevista, gráfico de resíduo versus ordem das amostras e EJCR. Os valores de correlação de previsão e RMSEP são apresentados na Tabela 3.9:

Tabela 3.9. Valores de correlação e RMSEP referentes à previsão das amostras sintéticas utilizando os modelos de calibração MLR.

Analito	Na⁺	Ca²⁺
Coeficiente de correlação de previsão	0,9998	0,9999
RMSEP (mg L ⁻¹)	$1,12 \times 10^{-2}$	$8,08 \times 10^{-2}$
(RMSEP - RMSEC) (mg L ⁻¹)	$1,11 \times 10^{-2}$	$8,07 \times 10^{-2}$

Os valores de coeficiente de correlação de previsão próximos a 1 indicam relação direta entre as concentrações previstas e as concentrações reais para as amostras do conjunto de previsão. Os valores baixos de RMSEP e a pequena diferença entre RMSEP e RMSEC são um bom indicativo da exatidão do modelo, mas não informam sobre a existência de erros sistemáticos (TIAN et al., 2007).

No gráfico das concentrações previstas versus concentrações conhecidas (Ilustração 3.8 (a1) e (a2)), pode-se observar uma boa concordância entre os valores previstos e os de referência para ambos os metais, uma vez que estes valores estão praticamente sobre a bissetriz do referido gráfico.

A boa concordância apresentada no gráfico acima é corroborada pelos gráficos: de resíduo versus ordem das amostras (Ilustração 3.8 (b1) e (b2)). Nestes gráficos, os resíduos se distribuem aleatoriamente em torno de zero, evidenciando que os erros observados são de natureza aleatória para ambos os metais.

A fim de se obter mais informações sobre a exatidão dos modelos de calibração MLR desenvolvidos, a regressão das concentrações reais versus as previstas foi aplicada. O intercepto e a inclinação estimados ($\hat{a}$ e $\hat{b}$ respectivamente) foram comparados com seus valores ideais (0 e 1 respectivamente) usando o teste da EJCR (Ilustração 3.8 (c1) e (c2)). Como visto, as elipses contem o ponto teórico ($a = 0$ e $b = 1$) indicando que erros constantes e proporcionais não estão presentes e assim uma habilidade preditiva excelente.

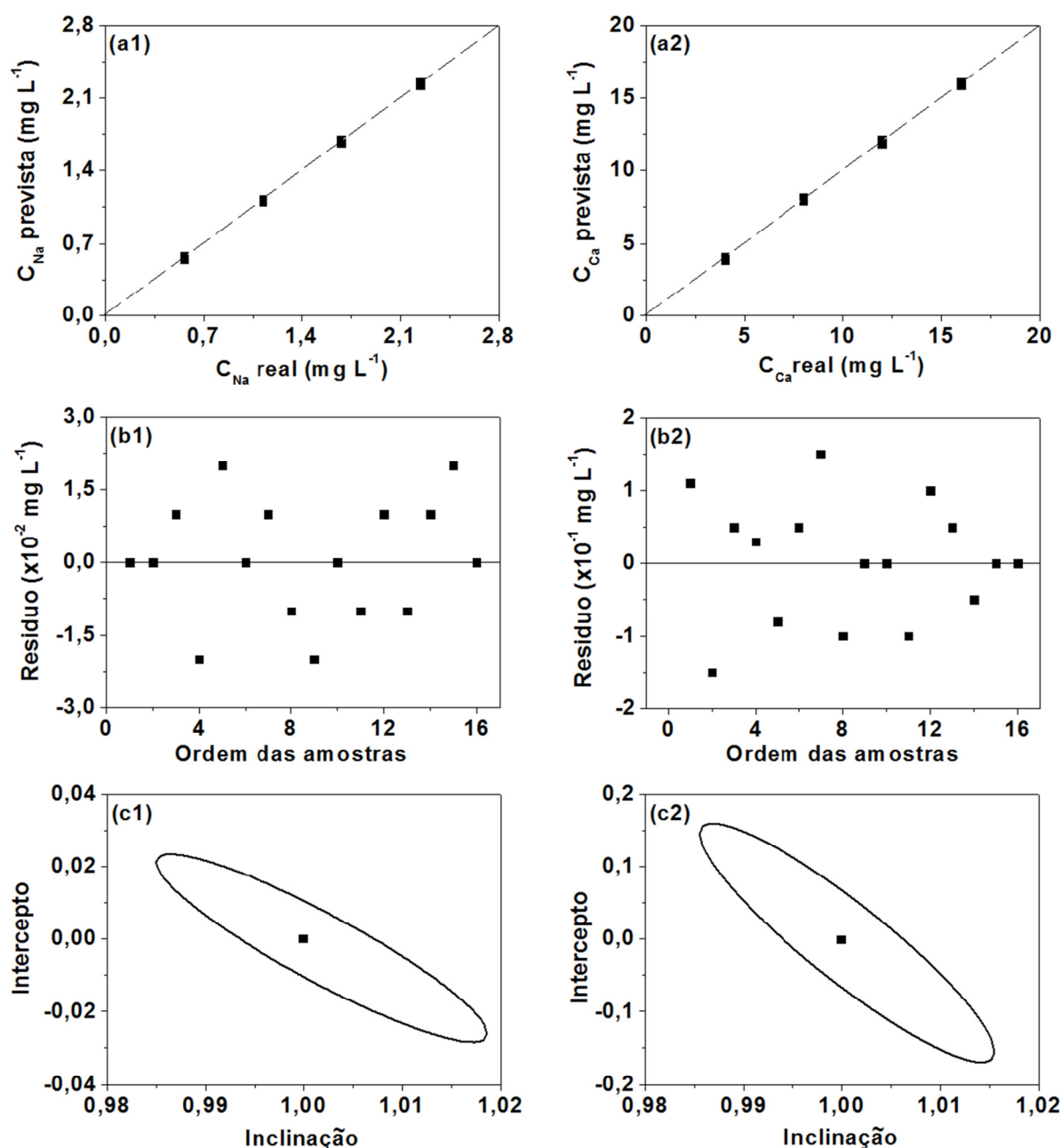


Ilustração 3.5. Ferramentas de diagnóstico: (a) gráfico de concentração prevista versus concentração real, (b) gráfico de resíduo versus ordem das amostras e (c) EJC.

Em função dos resultados sumarizados acima, pode-se considerar validada a previsão dos modelos MLR e os mesmos podem ser utilizados na determinação de sódio e cálcio em amostras reais de leite em pó. A tabela 3.10 mostra os resultados obtidos. Pode-se observar a similaridade entre os resultados obtidos por ambos os métodos como comprovado pelos altos valores de tendência e pelo baixo valor de RMSEP. De fato, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi verificada entre os resultados aplicando o teste t emparelhado ao nível de 95% de confiança.

A Tabela 3.10 mostra também que os modelos de calibração MLR apresentam precisão melhor (em termos de repetitividade) que o método de referência (FAAS), como revelado pelos menores valores de RSD conjunto ($n = 3$) para ambos os analitos.

Com relação à exatidão e a presença de interferentes, os modelos de calibração multivariada foram também avaliados pela realização de testes de recuperação e os resultados também são mostrados na Tabela 3.10. Os modelos de calibração multivariada são adequados para análises dos analitos escolhidos na matriz analisada, pois as taxas de recuperação obtidas nas análises estão entre 98 e 103%.

Com base nos resultados e nos critérios de aceitação descritos na seção 1.5 pode-se afirmar que os modelos de calibração multivariada para a determinação de sódio e cálcio em amostras de leite em pó estão validados.

Tabela 3.10. Resultados da determinação simultânea de sódio e cálcio em amostras de leite em pó.

Amostras	MLR	Referência	Tendência (%)	Recuperação (%)
Na⁺	mg g⁻¹			
(1)	5,47 ± 0,04	5,35 ± 0,11	102,2	101 ± 1
(2)	3,02 ± 0,07	3,08 ± 0,12	98,0	99 ± 2
(3)	3,73 ± 0,05	3,69 ± 0,12	101,1	101 ± 2
(4)	3,30 ± 0,03	3,35 ± 0,11	98,5	102 ± 3
(5)	3,74 ± 0,06	3,69 ± 0,12	101,3	98 ± 3
(6)	3,65 ± 0,04	3,70 ± 0,12	98,6	102 ± 3
(7)	3,54 ± 0,07	3,50 ± 0,11	101,1	99 ± 1
(8)	4,54 ± 0,06	4,60 ± 0,13	98,7	98 ± 4
R.S.D. conjunto (%)	1,41	3,00	-	-
RMSEP	0,05	-	-	-
Ca²⁺	mg g⁻¹			
(1)	15,0 ± 0,1	15,1 ± 0,1	99,3	99 ± 1
(2)	9,18 ± 0,05	9,08 ± 0,15	101,1	101 ± 1
(3)	9,06 ± 0,06	9,12 ± 0,13	99,3	98 ± 2
(4)	8,93 ± 0,04	8,88 ± 0,14	100,6	102 ± 1
(5)	9,04 ± 0,05	9,12 ± 0,15	99,1	99 ± 3
(6)	9,22 ± 0,07	9,14 ± 0,13	100,9	103 ± 2
(7)	8,56 ± 0,03	8,65 ± 0,14	99,0	100 ± 2
(8)	10,1 ± 0,1	10,0 ± 0,2	101,0	101 ± 1
R.S.D. conjunto (%)	0,55	1,41	-	-
RMSEP	0,09	-	-	-



Dançarinas de Flamenco (n°62/2006) - Renata Domagalska

CAPÍTULO 4

CONCLUSÃO

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi demonstrada a potencialidade do uso de imagens digitais obtidas com uma *webcam* na FES para a determinação indireta de fármacos em injetáveis e para a determinação simultânea de sódio e cálcio em amostras de leite em pó. Na DIB-FES a cor da chama possui a contribuição referente ao fenômeno de auto-emissão da chama, a contribuição referente à combustão da matéria orgânica presente na matriz da amostra e a contribuição referente à emissão do(s) metal(is) presente(s). No entanto a contribuição dominante sempre é a da emissão de REM pelo(s) analito(s).

As afirmações do parágrafo anterior são válidas apenas se as imagens digitais da chama forem capturadas na sua região oxidante.

A DIB-FES se mostrou promissora para a determinação indireta de qualquer substância orgânica (fármaco ou não) desde que esta esteja na forma de um sal orgânico cujo cátion seja capaz de emitir REM na região visível.

A determinação de fármacos utilizando a DIB-FES pode ser uma boa alternativa para formulações na forma de solução injetável. Em formulações na forma de comprimidos, loções e cremes existem na composição do veículo outras substâncias orgânicas (excipientes) que na chama aumentarão a contribuição referente à combustão da matéria orgânica na chama, produzindo um efeito não modelado nas soluções de calibração e como consequência haverá a presença de erros sistemáticos nos resultados. Uma solução seria o emprego do método de adição de analito.

O desenvolvimento de modelos de calibração univariada, bem como a sua validação foi possível devido ao planejamento experimental criterioso.

Em termos de figuras de mérito a DIB-FES apresentou um desempenho satisfatório nas duas aplicações. Uma atenção especial deve ser dada à precisão e a exatidão dos resultados os quais foram comprovadas por baixos valores de R.S.D. conjunto (sempre menores quando comparados com os métodos de referência) e por altas taxas de tendência e recuperação.

Usando uma *webcam* como detector de REM na região visível do espectro eletromagnético, a DIB-FES no domínio multivariado oferece uma alternativa simples e economicamente viável frente à FES convencional na solução da problemática da interferência espectral tratada nesse trabalho.

A dispensa do uso de seletores de radiação pode reduzir os custos de construção e manutenção da instrumentação para os métodos de emissão em chama.

Apesar desta ausência, que torna a resposta analítica da *webcam* sujeita à interferência espectral, este problema foi contornado empregando métodos multivariados de calibração com modelagem explícita do interferente (cálcio).

A adição do agente de libertação ((NH₄)₄EDTA) tamponado e em baixa concentração e de modo a garantir a complexação do cálcio mostrou-se adequado na solução do problema de interferência química.

O procedimento de abertura das amostras de leite em pó garantiu que o ambiente químico das amostras (matriz) se aproximasse do ambiente químico das misturas de calibração e previsão, de modo a não haver interferência de matriz.

Os resultados obtidos indicam que os modelos de calibração multivariada construídos foram capazes de separar, a partir de uma simples imagem digital, a informação oriunda de cada analito mesmo com a ocorrência de interferência espectral.

Para a indústria farmacêutica a DIB-FES é indicada para o controle de qualidade na linha de produção, mas não para verificação de possíveis adulterações devido ao baixo poder discriminante dos íons associados (cátions). Isto se deve basicamente à espécie responsável pelo sinal analítico (metal), pois qualquer outro sal orgânico contendo o mesmo metal produzirá o mesmo efeito na chama já que se trata do mesmo metal.

4.1. Propostas futuras

O uso de uma *webcam* como detector na captura de sinais (ou seja, imagens digitais) ainda não foi utilizada na exploração da resolução espacial das imagens digitais, sendo então proposta para trabalhos futuros. Tal exploração permitiria a realização de análises multi-analitos com apenas uma imagem digital. Um exemplo deste tipo de aplicação seria o desenvolvimento de fotômetros de emissão em chama com mais de uma fonte de excitação miniaturizada. Desse modo, torna-se possível monitorar simultaneamente radiações emitidas por mais de um analito e/ou amostra, provenientes de mais de uma fonte de excitação.

Outra proposta de continuidade consiste na possibilidade de desenvolvimento de fotômetros de emissão em chama miniaturizados com um programa de captura

de imagens e processamento em tempo real, para tornar desnecessário o uso de filtros de interferência para cada metal.

Por fim, outra proposta futura de trabalho consiste no desenvolvimento de método de adição de padrão multivariado, o qual seria capaz de resolver o problema das interferências espectrais e de matriz.



Berthe Morisot - Leitura

CAPÍTULO 5

REFERÊNCIAS

5. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de calibração e de ensaios. Rio de Janeiro, 2001.

ALPDOĞAN, G.; SUNGUR, S. Indirect determination of some analgesic-Inflammatory drugs by AAS, Analytical Letters, **14: 2799, 1999**

ARYIAN, C. E.; SOSA, J. A., Assessment and management of patients with abnormal calcium, Critical Care Medicine, **32: S146, 2004**

ATARI, N. A.; SVENSSON, G. K., A high-resolution digital dosimetric system for spacial characterization of radiation fields using a thermoluminescent CaF₂:Dy crystal, Medical Physics, **13: 354, 1986**

BACKER, G. L.; JOHNSON, L. H. Effects of Anions on Calcium Flame Emission in Flame Photometry, Analytical Chemistry, **26: 465, 1954**

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 3ª Ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2007

BARWOOD, H., Digital near-infrared (NIR) cathodoluminescence (CL) imaging and image processing, American Mineralogist, **92: 261, 2007**

BERNS, R.S. **Principles of colour technology**. 3rd Ed., New York: Wiley, 2000

BOLDRINI, J. L.; COSTA, S. I. R.; FIGUEIREDO, V. L.; WETZLER, H. G. **Álgebra Linear**. 3ª Ed., São Paulo: Harper & Row do Brasil, 1980.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Fundação Oswaldo Cruz. **Farmacopéia Brasileira**. Vol. 2, 5ª Ed. Brasília: Anvisa , 2010

BRITISH pharmacopoeia 2010. London: The Stationary Office, 2010

BUREL, L.; GIAMARCHI, P.; STEPHAN, L.; LIJOUR, Y.; LE BIHAN, A. Molecular and atomic ultra-trace analysis by laser induced fluorescence with OPO system and ICCD camera, *Talanta*, **60: 295, 2003**

BURNS, D. T; DANZER, K.; TOWNSHEND, A., Use of terms “recovery” and “apparent recovery” in analytical procedures. *Pure and Applied Chemistry*, **74: 2205, 2002**

CARLSSON, A. E.; SHAH, A. D.; ELKING, D.; KARPOVA, T. S.; COOPER, J. A., Quantitative analysis of actin patch movement in yeast, *Biophysical Journal*, **82: 2333, 2002**

COHEN, A. S.; DUBIKOVSKAYA, E. A.; RUSH, J. S.; BERTOZZI, C. R., Real-time bioluminescence imaging of glycans on live cells. *Journal of the American Chemical Society*, **132: 8563, 2010**

DAVIDIAN, M.; HAALAND, P. D., Regression and calibration with nonconstant error variance, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **9: 231, 1990**

DRAPER, N. R. e SMITH, H. **Applied regression Analysis**. 3rd Ed., New York: John Wiley & Sons Inc., 1998.

EURACHEM NETHERLAND, Seleção, uso e interpretação de programas de ensaio de proficiência (EP) por laboratórios. Tradução: ANVISA-SENAI. Brasília, 2005.

FAJARDO, C. M.; SMITH, J. D.; SICK, V., PIV, high-speed PLIF and chemiluminescence imaging for near-spark-plug investigations in IC engines, *Journal of Physics: Conference Series*, **45: 19, 2006**

FARHAT, S. A.; NG, W. B.; ZHANG, Y., Chemiluminescent emission measurement of a diffusion flame jet in a loudspeaker induced standing wave, *Fuel*, **84: 1760, 2005**

FILGUEIRAS, C. A. L., A espectroscopia e a química: da descoberta de novos elementos ao limiar da teoria quântica, *Química Nova na Escola*, **3: 22, 1996**

FOCA, G.; MASINO, F.; ANTONELLI, A.; ULRICI, A., Prediction of composal and sensory characteristics using RGB digital images and multivariate calibration techniques, *Analytica Chimica Acta*, **706: 238, 2011**

FRASER, B.; MURPHY, C.; BUNTING, F. **Real world color management**. 2nd Edition. United States of America: Peachpit Press, 2005.

GELADI, P.; GRAHN, H. **Multivariate image analysis**. 2nd Ed. New York: Wiley, 1996.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G., **Goodman e Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 10^a Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

GALVÃO, R. K. H.; ARAÚJO, M. C. U. Linear regression modelling: Variable selection. In B. Walczak, R. T. Ferré, S. Brown (Eds). **Comprehensive chemometrics: chemical and biochemical data analysis**. Vol. 3, 1st Ed. Amsterdam: Elsevier, 2009.

GIACOMELLI, L.; BOGGETTI, H.; AGNELLI, H.; ANUNZIATA, J.; SILBER, J. J.; CATTANA, R. Relevant physicochemical factors in chromatographic separation of *Alternaria alternata* mycotoxins. *Analytica Chimica Acta*, **370: 79, 1998**

GOICOECHEA, H. C.; OLIVIERI, A. C., Chemometric assisted imultaneous spectrophotometric determination of four-component nasal solutions with a reduced number of calibration samples, *Analytica Chimica Acta*, **453: 289, 2002**

HEMMATEENEJAD, B.; MOBARAKI, N.; SHAKERIZADEH-SHIRAZI, F.; MIRI, R., Multivariate image analysis-thin layer chromatography (MIA-TLC) for simultaneous determination of co-eluting components, *Analyst*, **135: 1747, 2010**

HUBNER, T.; WILL, S.; LEIPERTZ, A., Sedimentation image analysis (SIA) for the simultaneous determination of particle mass density and particle size, *Particle & Particle System Characterization*, **18: 70, 2001**

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 1ª Edição digital. São Paulo: 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **DOQ-CGCRE-008**: Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro, 2010.

ISSA, M. M.; NEJEM, R. M.; AL-KHOLY, M.; EL-ABADIA, N. S.; HELLES, R. S.; SALEH, A. A., An indirect atomic absorption spectrometric determination of ciprofloxacin, amoxicillin and diclofenac sodium in pharmaceutical formulaions, Journal of the Serbian Chemical Society, **73: 569, 2008**

IUPAC, Nomenclature, Symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-II. Data interpretation. Pure and Applied Chemistry, **45: 99, 1976**

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M., Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações, Química Nova, **24: 363, 2001**

JARREL, R. F., A brief history of atomic spectrochemical analysis: 1666-1950, Journal of Chemical Education, **77: 573, 2000**

JEFFERY, G. H.; BASSET, J.; MENDHAM, J. e DENNEY, R. C. **Voguel: Análise Química Quantitativa**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1982.

KRAGER, A. E.; WEISS, R.; GESTELAND, R. F., Line scanning system for direct digital chemiluminescence imaging of DNA sequencing blots, Analytical Chemistry, **65: 1785, 1993**

KHOURY, M. K.; PARKER, I.; ASWAD, D. W., Acquisition of chemiluminescent signals from immunoblots with a digital single-lens reflex camera, Analytical Biochemistry, **397: 129, 2010**

KIM, Y.; KO, S. O.; LEE, J. H., Microfluidic device capable of sensing ultrafast chemiluminescence, Talanta, **78: 998, 2009**

KIMURA, F.; McCANN, J.; KHALIL, G. E.; DABIRI, D.; XIA, Y.; CALLIS, J. B., Simultaneous velocity and pressure measurements using luminescent microspheres, *Review of Scientific Instruments*, **81: 064101, 2010**

KLODWIG, U.; MÄCHTLE, W., On-line digitalization of Schlieren pictures inside the analytical ultracentrifuge, *Colloid & Polymer Science*, **267: 1117, 1989**

KOARASHI, J.; SAITO, F.; AKIYAMA, K.; RAHMAN, N. M.; IIDA, T., A new digital autoradiographical method for identification of Pu particles using an imaging plate, *Applied Radiation and Isotopes*, **65: 413, 2007**

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**, Volume II, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LAWRENCE, J. R.; NEU, T. R.; SWERHONE, G. D. W., Application of multiple parameter imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components in microbial biofilms, *Journal of Microbiological Methods*, **32: 253, 1998**

LEITE, F. **Validação em análise química**. 5ª Ed. Campinas: Editora Átomo, 2008.

LOPEZ-MOLINERO, A.; LIÑAN, D.; SIPIERA, D.; FALCON, R., Chemometric interpretation of digital image colorimetry: Application for titanium determination in plastics, *Microchemical Journal*, **96: 380, 2010**

LUO, L.; ZHANG, Z.; LIFENG, M., Determination of recombinant human tumor necrosis factor- α in serum by chemiluminescence imaging, *Analytica Chimica Acta*, **539: 277, 2005**

LYRA, W. S. *Espectrometria de emissão em chama baseada em imagens digitais*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, UFPB, 2008. Dissertação de mestrado, 89p

LYRA, W. S.; SANTOS, V. B.; DIONÍZIO, A. G. G.; MARTINS, V. L.; ALMEIDA, L. F.; GAIÃO, E. N.; DINIZ, P. H. G. D.; SILVA, E. C.; ARAÚJO, M. C. U., Digital image-based flame emission spectrometry, *Talanta*, **77: 1584, 2009**

LYRA, W. S.; SANCHES, F. A. C.; CUNHA, F. A. S.; DINIZ, P. H. G. D.; LEMOS, S. G.; SILVA, E. C.; ARAÚJO, M. C. U., Indirect determination of sodium diclofenaco, sodium dipyrone and calcium gluconate in injection drugs using digital image-based (webcam) flame emission spectrometry method, *Analytical Methods*, **3: 1975, 2011**

MAPA (1997) portaria nº 369 de 04/09/1997. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis> > Acesso em 11 de julho de 2012.

MALEKI, N.; SAVAFI, A.; SEDAGHATPOUR, F., Single-step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera, *Talanta*, **64: 830, 2004**

MATIAS, F. A. A.; VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M., Quantitative reflectance spot test for the determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical preparations, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **15: 327, 2004**

MARCH, C.; MANCLÚS, J. J.; ABAD, A.; NAVARRO, A.; MONTOYA, A., Rapid detection and counting of viable beer-spoilage lactic acid bacteria using a monoclonal chemiluminescence enzyme immunoassay and a CCD camera, *Journal of Immunological Methods*, **303: 92, 2005**

MARCZENKO, Z.; BALCERZAK, M. **Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2000

MONEMI, N.; RAMANATHAN, K.; LARSSON, P-O.; DANIELSSON, B.; BENGMARK, S.; KHAYYAMI, M., CCD-camera based capillary chemiluminescent detection of retinol binding protein, *Analytica Chimica Acta*, **387: 21, 1999**

MONTGOMERY, D.; PECK, E. **Introduction to linear regression analysis**. New York: John Wiley and Sons, 1982.

NAES, T.; MEVIK, B.H. Understanding the collinearity problem in regression and discriminant analysis. *Journal of Chemometrics*, **14: 413, 2001**

PATTERSON, K. Y.; VEILLON, C.; HILL, A. D.; MOSER-VEILLON, P. B.; O'HAVER, T.C., Measurement of calcium stable isotope tracers using cool plasma ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **14: 1673, 2007**

PEZZA, L.; TUBINO, M.; MELIOS, C. B.; PEZZA, H.R., Rapid spot test analysis for the detection of dipyrone in pharmaceutical preparations, *Analytical Sciences*, **16: 313, 2000**

PIMENTEL, M. F. e BARROS NETO, B. B., Calibração: uma revisão para químicos analíticos, *Química Nova*, **19: 268, 1996**

PORTICORVO, A.; DUNN, A. K., Simultaneous imaging of oxygen tension and blood flow in a animal using a digital micromirror device, *Optics Express*, **18: 8160, 2010**

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R., **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**, volume III, 3ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990.

RAO, R. N.; TALLURI, M. V. N. K., An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **43: 1, 2007**

RETONDO, C. G. e FARIA, P. **Química das Sensações**. Campinas: Editora Átomo, 2006.

RIU, J.; RIUS, X., Assessing the accuracy of analytical methods using linear regression with errors in both axes, *Analytical Chemistry*, **68: 1851, 1996**

ROCHA, R. S.; BEATI, A. A. G. F.; OLIVEIRA, J. G.; LANZA, M. R.V., Avaliação da degradação do diclofenaco sódico utilizando H₂O₂/fenton em reator eletroquímico, Química Nova, **32: 354, 2009**

SAVAFI, A.; MALEKI, N.; ROSTAMZADEH, A.; MAESUM, S., CCD camera full range pH sensor array, Talanta, **71: 498, 2007**

SCHULTZ, L. H., Somatic cell in milk – physiological aspects and relationship to amount and composition of milk, Journal of Food Protection, **40: 125, 1977**

SILVA, P. H. F., Leite: aspectos de composição e propriedades, Química Nova na Escola, **6: 3, 1997**

SILVA, A. P; ALVES, M. C. C., Como iniciar a validação de métodos analíticos. Disponível em: < <http://www.grupocalibracao.com.br/download> >. Acesso em: 17 de novembro de 2012.

SILVA JUNIOR, C. e SASSON, S. **Biologia**. Volume único. 4^a Ed. São Paulo: Saraiva, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN T. A. **Princípios de análise Instrumental**. 5^a Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SONG, Z.; ZHANG, N., In vitro detecting ultra-trace novalgin in medicine and human urine by chemiluminescence, Talanta, **60: 161, 2003**

STERNBERG, J.C.; STILLS, H.S.; SCHWENDEMAN, R.H., Spectrophotometric analysis of multicomponent systems using least squares method in matrix form: ergosterol irradiation system, Analytical Chemistry, **32: 84, 1960**

SU, C.; FU, C.; CHANG, Y.; NAIR, G. R.; YE, J.; CHU, I. –M.; WU, W., Simultaneous estimation of chlorophyll *a* and lipid contents in microalgae by three-color analysis, Biotechnology and Bioengineering, **99: 1034, 2008**

TASI – Technical Advisory Service for Images. An Overview of Color Management. Disponível em: <http://www.tasi.ac.uk/advice/managing/pdf/colour_manage.pdf>. Acesso em: 20 de setembro de 2012.

TIAN, H-q.; YING, Y-b.; LU, H-s.; Fu, X-p.; YU, H-y., Measurement of soluble solids content in watermelon by Vis/NIR diffuse transmittance technique, Journal of Zhejiang University SCIENCE B, **8: 105, 2007**

TRIGLAV, J.; van ELTEREN, J. T.; ŠELIH, V. S., Basic modeling approach to optimize elemental imaging by laser ablation ICPMS, Analytical Chemistry, **82: 8153, 2010**

TSE, T. B. –L.; CHAN, W. –T., Development and characterization of bottom-viewed inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, Spectrochimica Acta Part B, **63: 861, 2008**

TORRES, G. Formatos de arquivos gráficos. Disponível em : <<http://www.clubedohardware.com.br/artigos/952>>. Acesso em 17 de setembro de 2012.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 33th edn. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2010.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J., Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada, Química Nova, **32: 1278, 2009**

VERRI, G., The spatially resolved characterization of Egyptian blue, han blue and han purple by photo-induced luminescence digital imaging, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **394: 1011, 2009**

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

WANG, Z.; CHIN, S. Y.; CHIN, C. D.; SARIK, J.; HARPER, M.; JUSTMAN, J.; SIA, S. K., Microfluidic CD4⁺ T-cell counting device using chemiluminescent-based detection, *Analytical Chemistry*, **82: 36, 2010**

WEINERT, P. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R., A simplified reflectometric method for the rapid determination of dipyrone in pharmaceutical formulations, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **18: 846, 2007**

YEBRA, M. C., Continuous automatic determinations of organic compounds by flow injection-atomic absorption spectrometry, *Trends in Analytical Chemistry*, **19: 629 2000**