

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Aplicações da Espectroscopia de Infravermelho Próximo
na Monitorização de Processos Farmacêuticos**

Diogo Faria Magalhães

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Química Tecnológica

2014

- PÚBLICA -

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Aplicações da Espectroscopia de Infravermelho Próximo
na Monitorização de Processos Farmacêuticos**

Diogo Faria Magalhães

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Química Tecnológica

2014

Orientadores:

Prof. Fernando José Vieira dos Santos (FCUL)

Dr.^a Dália Maria Dias Barbosa (Cipan)

“He succeeded in being considered totally uninteresting. People left him alone. And that was all he wanted.”

Patrick Süskind, *Perfume: The Story of a Murderer*

Agradecimentos

A elaboração da minha Dissertação só foi possível graças à colaboração de várias pessoas que me apoiaram desde o início do Mestrado até ao final do Estágio Curricular.

A Eng^a Iva Vinhas que me ajudou desde o início a tentar perceber o funcionamento da Cipan e da técnica usada neste trabalho.

A Dr^a Dália Barbosa que, apesar de toda a reviravolta que a Cipan sofreu, sempre me apoiou em tudo o que necessitasse.

O Professor Fernando Santos por me ajudar em todas as dúvidas na realização da Dissertação.

A todos os funcionários da Cipan que me ajudaram neste ano, pois foi uma nova fase da minha vida e, apesar de não me conhecerem, sempre me deram um sorriso e força para conseguir um bom trabalho.

A todos os meus amigos... aqueles que surgiram nesta nova fase e tornaram este percurso mais fácil de se fazer, aqueles que estão comigo desde sempre, por me conhecerem melhor que ninguém e saberem sempre as palavras certas para mim, a todos eles que sempre me apoiaram, sempre me incentivaram a continuar o trabalho, sempre me aconselharam da melhor maneira e que sempre estiveram lá para mim, um grande obrigado.

E por último mas não menos importante, um especial obrigado aos meus pais, que me acompanharam em toda a minha vida pessoal e académica e que agora lhes dedico este trabalho, pois sem eles, nada disto seria possível.

Resumo

O presente trabalho teve como objectivo testar a versatilidade da Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIRS), num contexto de monitorização de processos farmacêuticos. A actividade experimental foi realizada nos laboratórios de Investigação e Desenvolvimento da empresa Cipan. De forma a simplificar a compreensão do trabalho, este foi subdividido em quatro partes, consoante o tipo de amostra presente e o seu fim com a técnica.

Na parte A, referente às amostras do composto A para medição da humidade, foi construído um modelo com 18 factores, usando a região espectral entre 9000 cm^{-1} e 3800 cm^{-1} . O seu SEP (Erro Padrão de Previsão) foi de $0,087\text{ mg/mL}$ e o R^2 (coeficiente de correlação linear) foi de $0,993$.

Na parte B, referente às amostras do composto B para medição da humidade, foi construído apenas um modelo com 10 factores, usando a região espectral entre 12000 cm^{-1} e 4500 cm^{-1} . O seu SEP foi de $0,029\text{ mg/mL}$ e o R^2 foi de $0,999$.

Na parte C, referente às amostras resultantes de vários processos fermentativos para medição do substrato (composto C) e produto (composto D), foram construídos 9 modelos variando a região espectral entre $9000\text{ cm}^{-1} - 8500\text{ cm}^{-1}$ e $6400\text{ cm}^{-1} - 5400\text{ cm}^{-1}$. O modelo escolhido foi o D com um SEP de $6,71\text{ mg/mL}$ e o R^2 de $0,976$ para o compost C e para o compost D o SEP foi de $6,94\text{ mg/mL}$ e o R^2 foi $0,991$.

Na parte D, referente ao isolamento/concentração do produto resultante das fermentações, o trabalho foi dividido em seis partes: a A, B e C, D, E, F e G.

A técnica de NIRS mostrou ser uma alternativa aos métodos de referência usados, pois além de ter uma exactidão semelhante, é mais rápida, não necessita de preparação de amostras e não recorre a solventes.

Palavras-chave

Espectroscopia, Infravermelho Próximo, Quimiometria, Indústria Farmacêutica, Fermentação, Isolamento, Análise Qualitativa e Quantitativa.

Abstract

This work has the objective to test the versatility of the Near-Infrared Spectroscopy, in the context of monitoring pharmaceutical processes. The experimental activity was held in the Research and Development laboratories at the Cipan company. In order to simplify the understanding of the work, this was divided into four parts, depending on the type of sample and its propose with the NIR spectroscopy.

In the part A, referent to the samples of the compound A for measuring moisture, it was built one model with 18 factors, varying the spectral range between 9000 cm^{-1} and 3800 cm^{-1} . The SEP (Standard Error of Prediction) was $0,087\text{ mg/mL}$ and the R^2 (linear correlation coefficient) was $0,993$.

In the part B, related to the samples of the compound B for measuring moisture, it was built one model with 10 factors, varying the spectral range between 12000 cm^{-1} e 4500 cm^{-1} . The SEP was $0,029\text{ mg/mL}$ and the R^2 was $0,999$.

In the part C, referent to samples derived from various fermentation processes for measuring substrate (compound C) and product (compound D), nine models were built, varying the spectral range between 9000 cm^{-1} and 8500 cm^{-1} and 6400 cm^{-1} and 5400 cm^{-1} . The chosen model was the D with a SEP of $6,71\text{ mg/mL}$ and a R^2 of $0,976$ to compound C and to compound D the SEP was $6,94\text{ mg/mL}$ and the R^2 was $0,991$.

In the part D, referent to isolation / concentration of the product resulting from the fermentation, the work was divided into six parts: A, B and C, D, E, F and G.

The NIRS technique proved to be an effective alternative to the reference methods used, because because in addition to having a similar accuracy, is quicker, requires no sample preparation and does not use solvents.

Key-words

Spectroscopy, Near Infrared, Chemometrics, Pharmaceutical Industry, Fermentation, Isolation, Qualitative and Quantitative Analysis.

Índice

A-	Introdução	1
1.	Evolução histórica	1
2.	Espectroscopia de Infravermelhos próximo, um método em ascensão	2
2.1	Vantagens e Desvantagens	3
2.2	Região espectral NIR	4
2.3	Princípios teóricos	7
2.3.1	Teoria da espectroscopia vibracional	9
2.4	Factores que afectam os espectros	10
3.	Instrumentação	11
3.1	Métodos de Amostragem	12
3.2	Métodos de medição	13
4.	Implementação de um método analítico	16
5.	Quimiometria	18
5.1	Análise Univariada e Multivariada	18
5.1.1	Calibrações Quantitativas	19
5.1.1.1	Calibrações e Diagnósticos	20
5.1.1.3	Seleção de regiões espectrais	25
5.1.1.4	Detecção de outliers	26
5.1.2	Calibrações Qualitativas	27
5.2	Avaliação dos Métodos de Calibração	28
B-	Materiais e Métodos	33
1.	Sistema NIRS	33
1.1	Amostras sólidas	33
1.2	Amostras líquidas	34
2.	Procedimento Experimental	34
3.	Materiais e Métodos de Referência	35
3.1	Composto A	35
3.2	Composto B	35
3.3	Fermentação	36
3.4	Isolamento/Concentração do produto da fermentação	36
4.	Tratamento dos Dados	37

C- Discussão de Resultados	38
Parte A- Composto A.....	39
1. Introdução.....	39
1.1 A família do composto A	39
1.2 Composto A.....	40
1.3 Ficha de Segurança.....	41
2. Parte experimental.....	42
2.1 Instrumentação	42
2.1.1 Espectroscopia NIR.....	42
2.1.2 Técnica Instrumental de referência – Método de Karl-Fischer.....	43
2.1.3 Programas para aquisição dos espectros.....	43
3. Discussão dos resultados	44
3.1 Desenvolvimento do Método	44
3.2 Validação do Método	48
3.2.1 Especificidade.....	48
3.2.2 Linearidade e Gama de trabalho.....	49
3.2.3 Exactidão	51
3.2.4 Precisão	51
Repetibilidade	51
Precisão Intermédia	52
3.2.5 Robustez.....	52
3.2.6 Validação Externa.....	54
Parte B – Composto B	55
1. Introdução.....	55
1.1 Composto B	55
1.2 Ficha de Segurança.....	55
2. Parte experimental.....	56
2.1 Instrumentação	56
2.1.1 Espectroscopia NIR.....	56
2.1.2 Técnica Instrumental de referência – Método de Karl-Fischer.....	56
2.1.3 Programas para aquisição dos espectros.....	57
3. Discussão dos resultados	57
3.1 Desenvolvimento do Método	57
3.2 Validação do Método	61

3.2.1	Especificidade.....	61
3.3	Linearidade e Gama de trabalho.....	62
3.4	Exactidão.....	64
3.5	Precisão.....	64
	Repetibilidade.....	64
	Precisão Intermédia.....	65
3.6	Robustez.....	65
3.7	Validação Externa.....	66
Parte C - Fermentações.....		67
1.	Introdução.....	67
1.1	A Fermentação.....	68
1.1	Processos Fermentativos.....	69
1.1.1	Química dos processos fermentativos.....	69
1.1.2	Cinética dos Processos Fermentativos.....	69
1.2	Desafios de monitorização de processos fermentativos com o NIRS.....	72
2.	Parte experimental.....	73
2.1	Instrumentação.....	74
2.1.1	Espectroscopia NIR.....	74
2.1.2	Técnica Instrumental de referência – Cromatografia Iónica.....	74
2.1.3	Programas para aquisição dos espectros.....	75
2.1.4	Ensaios de Fermentação e Amostragem.....	75
3.	Discussão de Resultados.....	76
3.1	Desenvolvimento do método.....	76
3.2	Validação Externa.....	79
4.	Estratégia de análise NIRS.....	82
Parte D - Isolamento do Produto das Fermentações.....		83
1.	Introdução.....	83
1.1	Síntese do composto D.....	83
1.2	Etapas do processo do isolamento/concentração do composto D.....	84
2.	Parte experimental.....	86
2.1	Instrumentação.....	86
2.1.1	Espectroscopia NIR.....	86
2.1.2	Técnica Instrumental de referência – Cromatografia Iónica.....	86
2.1.3	Programas para aquisição dos espectros.....	87

2.1.4	Ensaio de Isolamento/Concentração e Amostragem	87
3.	Discussão de Resultados	88
Etapa A	90
3.1	Desenvolvimento do método.....	90
3.2	Validação Externa.....	91
Etapa B e C	92
3.1	Desenvolvimento do método.....	92
3.2	Validação Externa.....	93
Etapa D	94
3.1	Desenvolvimento do método.....	94
3.2	Validação Externa.....	95
Etapa E	96
3.1	Desenvolvimento do método.....	96
3.2	Validação Externa.....	97
Etapa F	98
3.1	Desenvolvimento do método.....	98
Águas-mães	99
3.1	Desenvolvimento do método.....	99
3.2	Validação Externa.....	100
D-	Conclusões.....	101
E-	Perspectivas futuras	102
F-	Referências Bibliográficas	103
G-	Bibliografia	105
Anexos	106

Lista de Figuras

Figura 1 – Evolução do NIRS ao longo dos anos.....	1
Figura 2 - Espectro electromagnético	4
Figura 3 - Espectro NIR de alguns solventes	5
Figura 4 - Características químicas e físicas da região espectral de NIR que variam com o comprimento de onda.....	6
Figura 5 - Bandas analíticas e posições relativas dos picos mais proeminentes na absorção infravermelha.....	7
Figura 6 - Modos vibracionais das moléculas pertencentes ao grupo AX ₂	8
Figura 7 - Deformações angulares.....	9
Figura 8 - Configuração básica de um espectrómetro de NIR.....	11
Figura 9 - Esquema dos modos de medição do NIRS.	12
Figura 10 - Modos de medição do NIR: (A/B) – transmitância, (C) – reflectância difusa e (D/E) – transreflectância.....	15
Figura 11 - Tipos de calibrações e diagnósticos existentes para o tratamento dos dados.....	20
Figura 12 - Pré-processamentos existentes para tratamento dos dados.	23
Figura 13 - Explicação gráfica do tipo de resultados que se obtém com o método de Mahalanobis (X assinala o ponto médio).....	27
Figura 14 - Esquema representativo da cromatografia iónica	36
Figura 15 - Sequência de etapas envolvidas no processo de análise e desenvolvimento do modelo de calibração.....	37
Figura 16 - Esquema representativo dos quatro trabalhos realizados com o NIR.....	38
Figura 17 - Pictograma de perigo (atenção).....	41
Figura 18 - Espectros de duas amostras do composto A com diferentes teores de humidade.	44
Figura 19 – Análise de PCA das amostras de calibração para o composto A.....	45
Figura 20 - Concentração Prevista vs Concentração Actual para o composto A.	46
Figura 21 - Resíduo da amostra vs Influência da amostra para as amostras do composto A.....	46
Figura 22 - Análise PCA para todas as amostras (calibração, validação e quatro amostras extra).	49
Figura 23 - Valores de humidade pelo método de referência versus os valores previstos pelo NIRS para as amostras do composto A.	50
Figura 24 - Parâmetros a estudar para as 8 amostras.	53
Figura 25 - Pictogramas de perigo (Inflamável, tóxico e inalação.....	55

Figura 26 - Espectros de duas amostras do composto B com diferentes teores de humidade..	58
Figura 27 - Análise de PCA para as amostras do composto B.	58
Figura 28 - Concentração Prevista vs Concentração Actual para o composto B.	59
Figura 29 - Resíduo da amostra vs Influência da amostra para as amostras em estudo.	60
Figura 30 - Análise PCA para todas as amostras do composto B (calibração, validação e quatro amostras extra).	62
Figura 31 - Valores de humidade pelo método de referência versus os valores previstos pelo NIRS para as amostras do composto B.	63
Figura 32 - Esquema geral da fermentação.	68
Figura 33 - Curvas de ajuste para uma cinética fermentativa idealizada. X, P e S correspondem a concentração das células, produto e substrato, respectivamente	70
Figura 34 - Curva de crescimento típica de um microorganismo em cultivo descontínuo.....	71
Figura 35 - a) Processo normal de Fermentação; b) Processo manipulado de Fermentação. ...	76
Figura 36 - Espectros de fermentação usados para a calibração.....	77
Figura 37 - Espectros da fermentação processados com a 1ª derivada.	78
Figura 38 - Estratégias de análise de fermentações pelo NIRS a (a) escala laboratorial, (b) sistemas de análise rápida em linha, e (c) sistema de análise directa em linha	82
Figura 39 - Etapas do processo de concentração e isolamento do produto das fermentações.	84
Figura 40 – Análise PCA das amostras resultantes da etapa A.	90
Figura 41 – Análise PCA para as amostras resultantes da etapa B e C.	92
Figura 42 – Análise PCA para as amostras resultantes da etapa D.	94
Figura 43 – Análise PCA para as amostras resultantes da etapa E.	96
Figura 44 – Análise PCA para as amostras resultantes da etapa F.....	98
Figura 45 – Análise PCA para as amostras resultantes da etapa G.....	99

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Comprimentos de onda e número de ondas de algumas bandas no IV para compostos orgânicos e de enxofre	5
Tabela 2 – Informações de segurança sobre os reagentes	31
Tabela 3 – Condições de funcionamento dos equipamentos NIR	34
Tabela 4 – Resultados do modelo de calibração PLS desenvolvido para a determinação da humidade do composto A	45
Tabela 5 – Testes de especificidade para diferentes amostras	48
Tabela 6 – Parâmetros da regressão para a verificação da linearidade	50
Tabela 7 – Valores de PG e F para o teste das duas amostras	52
Tabela 8 – Resultados da precisão intermédia (Si – Desvio padrão da precisão intermédia; RSD – Desvio padrão relativo)	52
Tabela 9 – Parâmetros a estudar	53
Tabela 10 – Parâmetros estudados	53
Tabela 11 – Efeitos dos parâmetros estudados	53
Tabela 12 – Parâmetros da validação externa	54
Tabela 13 – Resultados do modelo de calibração PLS desenvolvido para a determinação da humidade do composto B	59
Tabela 14 – Testes de especificidade para diferentes amostras	61
Tabela 15 – Parâmetros da regressão para a verificação da linearidade	63
Tabela 16 – Valores de PG e F para o teste das duas amostras	64
Tabela 17 – Resultados da precisão intermédia	65
Tabela 18 – Parâmetros a estudar	66
Tabela 19 – Efeito do parâmetro estudado	66
Tabela 20 – Parâmetros da validação externa	66
Tabela 21 – Resultados das calibrações para os nove modelos	79
Tabela 22 – Resultados para a calibração e validação externa para os nove modelos	81
Tabela 23 – Resultado da calibração para o processo da etapa A	90
Tabela 24 – Resultados da calibração e da validação externa para as amostras da etapa A	91
Tabela 25 – Resultado da calibração para o processo da etapa B e C	93
Tabela 26 – Resultados da calibração e da validação externa para as amostras da etapa B e C	93
Tabela 27 – Resultado da calibração para o processo da etapa D	94
Tabela 28 – Resultados da calibração e da validação externa para as amostras da etapa D	95
Tabela 29 – Resultado das calibrações para o processo da etapa E	97

Tabela 30 – Resultados das calibrações e das validações externas para as amostras da etapa E	97
Tabela 31 – Resultado da calibração para as amostras das águas-mães.....	99

Abreviaturas

7HT – 7-hidrazino-tetraciclina

ACN - Acetonitrilo

API – Ingrediente Farmacêutico Activo

ATP – Adenosina Trifosfato

Cipan – Companhia Industrial Produtora de Antibióticos

CA – Concentrado da etapa A

CB – Concentrado da etapa B

DMF – Dimetilformamida

DOT.B – 6-desmetil-6-deoxitetraciclina

EMA – Agência Europeia de Medicamentos

FDA – Food and Drug Administration

GC – Cromatografia Gasosa

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IC – Cromatografia Iônica

ICH – Conferência Internacional sobre Harmonização

IV - Infravermelho

KF – Karl-Fischer

MIR – Infravermelho Médio

MIRS – Espectroscopia de Infravermelho Médio

MLR – Regressão Linear Múltipla

MSC – Correção da Dispersão Múltipla

NIR – Infravermelho Próximo

NIRS – Espectroscopia de Infravermelho Próximo

PA – Permeado da etapa A

PAT – Tecnologia Analítica de Processos

PB – Permeado da etapa B

PC – Componentes Principais

PCA – Análise dos Componentes Principais

PCR – Regressão dos Componentes Principais

PLS – Regressão dos Mínimos Quadrados Parciais

PRESS – Soma Residual dos Quadrados dos Erros de Previsão

R^2 – Coeficiente de Correlação Linear

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMSD – Raiz do Valor Quadrático Médio

SECV – Erro Padrão de Validação Cruzada

SEL – Erro Padrão de Laboratório

SEP – Erro Padrão de Previsão

SNV – Padrão Normal de Variação

UV – Ultravioleta

A empresa - Cipan

Após a guerra, o mundo procura refazer-se e os mercados sofrem de enormes necessidades em todos os campos. No mundo farmacêutico a concorrência é então quase nula, e o consumo de medicamentos só pode aumentar. O mercado oferece então oportunidades inexploradas.

Em 1947, a Atral resumia-se a uma modesta farmácia, no então bairro pobre de Alcântara em Lisboa. Superada uma pequena crise financeira inicial, em 1949 a vida da empresa ganha um novo fôlego, contractando técnicos, aumentando o volume de facturação, percorrendo todos os continentes e iniciando um sólido movimento de exportação.

No ano de 1956, as necessidades em matérias-primas eram tais, que começou a pensar-se no respectivo fabrico. A aprovação das instalações fabris Atral pela FDA e exportação de quantidades importantes de produtos semiterminados para os EUA via ilhas Virgins, em 1958.

A construção do complexo fabril Cipan é terminada em 1963, tornando possível a produção de antibióticos. Em 1965 há a aprovação pela autoridade dos E.U.A (FDA) da introdução no mercado dos produtos Cipan.

Com o aumento da produção, a empresa sentiu a necessidade de expansão, entrando em países como o Brasil, Finlândia e Espanha. Em 1987, as produções da Cipan englobam 8 antibióticos por fermentação (Eritromicina, Democlociclina, Doxiciclina, Penincilina, Gentamicina e Lincomicina) e 4 por semi-síntese (Amoxicilina, Ampicilina, Cefalosporina e Minociclina).

Em 2006 a empresa GSfarma entra no grupo farmacêutico, ficando assim constituído pela Atral, Cipan, Prinmon, Vida, GSfarma, Mediscript e Mediquímica.

Para 2015 a empresa tem o objectivo de se tornar o maior e melhor grupo químico-farmacêutico português no mercado nacional e internacional, reconhecido como um parceiro científico, tecnológico e comercial de excelência.

A- Introdução

1. Evolução histórica

A radiação Infravermelha foi descoberta em 1800 por Frederick Herschel numa experiência onde pretendia medir a temperatura do espectro visível. Herschel usou um prisma de vidro onde a luz solar o atravessava, decompondo-a em todas as cores do espectro. Com a ajuda de uns termómetros, mediu o calor relativo das diferentes cores. A temperatura mais alta foi encontrada no termómetro de referência deixado depois da extremidade vermelha do espectro de radiação visível, descobrindo assim o que hoje é chamado de radiação infravermelho próximo (Ceitil, 2007).

O primeiro espectrofotómetro NIR apareceu em 1954. Foi o interesse pela indústria de plásticos Inglesa, conjuntamente com o sector agrícola, que impulsionaram o desenvolvimento e modernização dos instrumentos de NIR. Em 1960, Karl Norris, começou por investigar novos métodos de determinar a humidade em produtos agrícolas. O primeiro resultado, publicado em 1965, descrevia um modelo de dois comprimentos de onda para correlacionar os dados espectrais para a concentração do analito. Foi só em 1980 que os instrumentos NIR se tornaram disponíveis. Uma década depois, a introdução das fibras ópticas e a evolução do microprocessador permitiu tornar o NIRS uma técnica aceite para monitorização e controlo dos processos industriais (Ceitil, 2007)

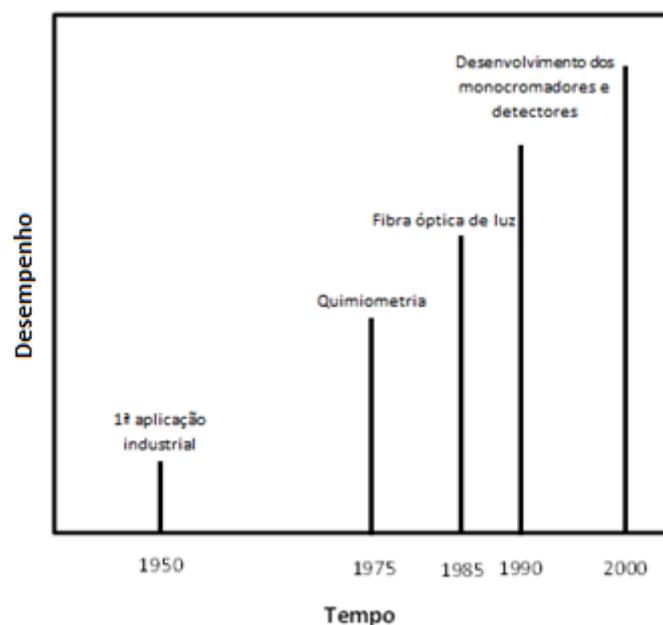


Figura 1 – Evolução do NIRS ao longo dos anos. Adaptado de (Leitão, 2012).

2. Espectroscopia de Infravermelhos próximo, um método em ascensão

Existem várias técnicas de espectroscopia que têm sido aplicadas para diversos processos analíticos, tais como a espectroscopia de infravermelho próximo, a espectroscopia de infravermelho médio (MIRS) e a espectroscopia Raman. Porém, nos últimos anos, devido à sua versatilidade analítica, a espectroscopia NIR tem despertado grande interesse num contexto PAT na indústria farmacêutica, devido às suas vantagens como ferramenta analítica (Ceitil, 2007).

Durante muitos anos, as principais aplicações da espectroscopia de infravermelho próximo têm sido à escala laboratorial, isto é, como substituto dos métodos analíticos convencionais (métodos de referência). Contudo, hoje em dia o NIRS é considerado como uma das ferramentas fundamentais da iniciativa PAT, largamente reconhecida como um método analítico poderoso para análises farmacêuticas e químicas, devido à sua potencialidade em medições qualitativas (e.g., identificação) e quantitativas (i.e., doseamento), rápidas e não destrutivas num processo (Ceitil, 2007).

Existem ainda outras técnicas espectroscópicas que podem ser usadas para realizar funções como o NIRS, tais como o Ultravioleta/Visível, a RMN e a Espectrometria de Massa. A espectroscopia UV-VIS é usada para determinação quantitativa de iões nos metais de transição, compostos orgânicos e macromoléculas, a RMN é geralmente usada no campo da petroquímica e a espectrometria de massa é usada para identificar diferentes moléculas que compõem uma substância, através da relação massa/carga dos seus iões (Pereira, 2011). Contudo, estas técnicas descritas têm vindo a ser substituídas pela espectroscopia NIR, face às vantagens que esta apresenta.

2.1 Vantagens e Desvantagens

Uma das principais vantagens do uso de NIRS é o facto de não necessitar de preparação da amostra, poupando tempo e reagentes. É uma técnica não destrutiva e não invasiva (adequado para uso *in-process*), tem uma aplicação quase universal (qualquer molécula que contenha as ligações C-H, N-H, S-H ou O-H pode ser analisada) e o tempo de análise pode ser de apenas alguns segundos (Ceitil, 2007).

Contudo, até recentemente, eram poucas as indústrias que recorriam a esta técnica em análises de rotina, porque os espectros de NIR são complexos e não são de interpretação directa. Isto deve-se ao facto das bandas de absorção serem geralmente sobrepostas e podendo aparecer não-específicas e mal entendidas, ou seja, necessitam de um pré-processamento para que as diferenças espectrais sejam sobressaídas, visto que à 1ª vista pode não ser possível detectar. Além do mais, o desenvolvimento de modelos de calibração requer pessoas experientes na aplicação de ferramentas matemáticas avançadas.

Geralmente, a espectroscopia de infravermelho próximo é uma técnica secundária. Assim, para métodos quantitativos, deve existir um método preciso para medir a propriedade de interesse e o erro do método de referência deve ser sempre conhecido.

Contudo, através da aplicação do algoritmo da transformada de Fourier à espectroscopia no infravermelho, algumas das desvantagens enumeradas são ultrapassadas, o que permite o desenvolvimento, com a utilização de técnicas quimiométricas, de metodologias de análise mais simples (Pereira, 2011).

2.2 Região espectral NIR

A região do infravermelho estende-se desde o final da região espectral visível (700 nm ou 14285 cm^{-1}) até ao início da região espectral do Infravermelho fundamental (2500 nm ou 4000 cm^{-1}) (Metrohm, 2013). Dentro do IV, podemos subdividir em 3 partes distintas (Pereira, 2011):

- Infravermelho longo (FIR): $4 \times 10^4 - 10^6\text{ nm}$
- Infravermelho médio (MIR): $2500 - 4 \times 10^4\text{ nm}$
- Infravermelho próximo (NIR): $780 - 2500\text{ nm}$

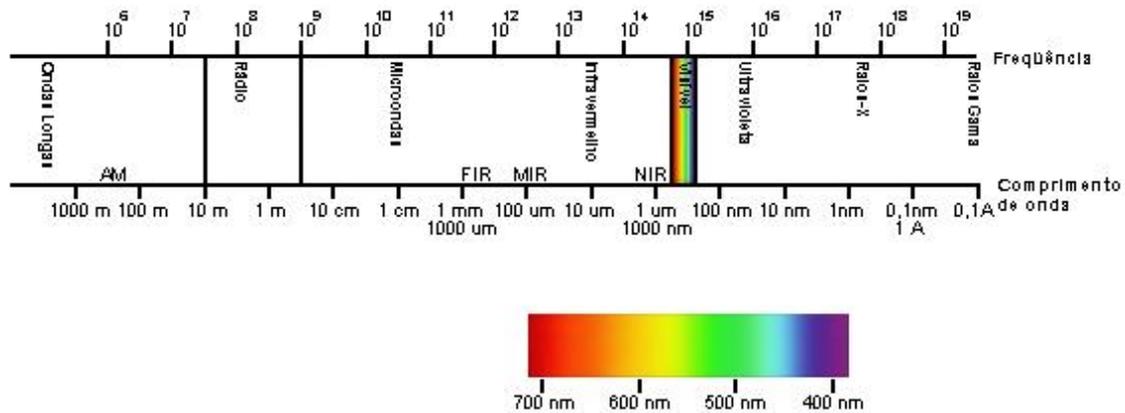


Figura 2 - Espectro electromagnético. Adaptado de (Costa, 2000)

A radiação NIR possui baixa energia e a sua interação com a matéria produz apenas transições e excitação dentro do mesmo estado fundamental de vibração (Paula F. Costa). As bandas de absorção mais proeminentes que ocorrem na região do NIR estão relacionadas com as alterações do momento dipolar de uma molécula (bandas de combinação, *overtones*). Por isso, moléculas diatómicas homonucleares não são detectáveis num espectro de NIR enquanto compostos com ligações químicas heteronucleares (C-H, N-H, O-H e S-H) são, em geral, facilmente detectados na região espectral NIR.

Assim, maior parte das espécies químicas e bioquímicas exibem bandas de absorção únicas na região espectral de NIR que podem ser usadas quer para propósitos qualitativos ou quantitativos (Metrohm, 2013).

Tabela 1 – Comprimentos de onda e número de ondas de algumas bandas no IV para compostos orgânicos e de enxofre. Adaptado de (Metrohm, 2013).

Comprimento de onda (nm)	Número de onda (cm^{-1})	Comportamento
2500	4000	Alongamento da ligação S-H
2200-2460	4545-4065	Alongamento da ligação C-H
2000-2200	5000-4545	Alongamento da ligação N-H e O-H
1620-1800	6173-5556	Primeiro sobretom do alongamento da ligação C-H
1400-1600	7143-6250	Primeiro sobretom do alongamento da ligação N-H e O-H
1300-1420	7692-7042	Alongamento da ligação C-H
1100-1225	9091-8163	Segundo sobretom do alongamento da ligação C-H
1020-1060	9804-9434	Alongamento da ligação S=O
950-1100	10526-9091	Segundo sobretom do alongamento da ligação N-H e O-H
850-950	11765-10526	Terceiro sobretom do alongamento da ligação C-H
775-850	12903-11765	Terceiro sobretom do alongamento da ligação N-H
600-700	16667-14286	Alongamento da ligação C-S
450-550	22222-18182	Alongamento da ligação S-S

As bandas no infravermelho próximo são muito mais fracas que as vibrações fundamentais no infravermelho médio, de onde resultam (Farmacopeia Portuguesa VIII, 2005). Esta natureza fraca da absorção de NIR é uma vantagem analítica visto que permite uma análise directa de matrizes com absorções fortes com alta dispersão de luz, tais como lamas, suspensões, pastas e pós (S. Alison Arnold, 2002).

As bandas de absorção de NIR são amplas e muito sobrepostas. Quando os comprimentos de onda são longos, as bandas são fortes, nítidas e com melhores resoluções, contrariamente a comprimentos de onda menores (S. Alison Arnold, 2002).

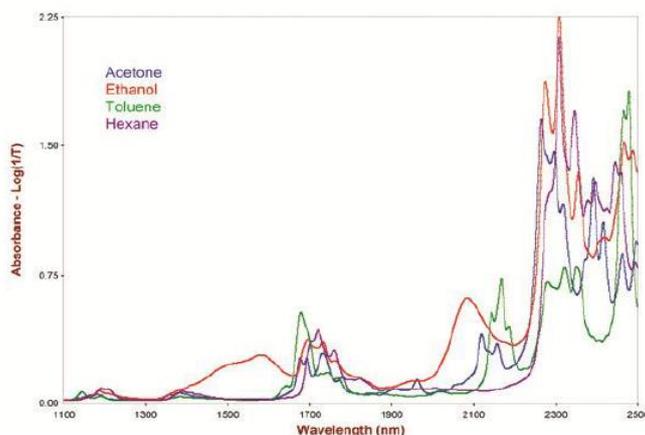


Figura 3 - Espectro NIR de alguns solventes (Metrohm, 2013).

Os espectros NIR, além de conterem informação sobre a composição química da amostra, também relacionam a informação física da mesma. Um exemplo é o tamanho das partículas, pois quanto mais grosseira estas forem, maior será a penetração de luz, logo maior será a absorvância. Ou seja, o tamanho das partículas produz uma linha de base desalinhada. (Metrohm, 2013).

Na região espectral do infravermelho próximo, com o aumento do comprimento de onda, aumenta também a absorvância e a eficiência da dispersão de luz, enquanto a sobreposição das bandas e a profundidade de penetração diminuem. Assim, a região espectral ideal para ser usada para a análise de uma amostra é determinada pela correspondência entre as propriedades espectrais da região NIR com a performance analítica requerida, as requisições de amostragem e as propriedades físicas da amostra (Metrohm, 2013).

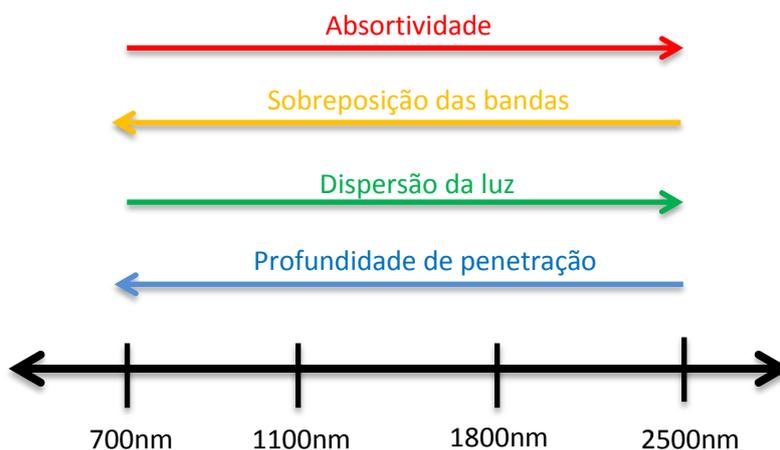


Figura 4 - Características químicas e físicas da região espectral de NIR que variam com o comprimento de onda. Adaptado de (Metrohm, 2013).

2.3 Princípios teóricos

O espectro do infravermelho longo é resultado das rotações moleculares induzidas pela incidência da radiação na amostra, enquanto o MIR provém das vibrações moleculares fundamentais. No caso do infravermelho próximo, as bandas de absorção são harmónicas ou combinações das bandas fundamentais do MIR (Pereira, 2011).

A radiação ao incidir na molécula provoca a excitação dos modos vibracionais, correspondendo à diferença de dois níveis energéticos. Assim é possível que ocorra absorção por parte da molécula. Deste modo, as absorções ocorrem a um determinado comprimento de onda, correspondendo à energia que permite a transição (Almeida, 2009).

Comparando os espectros, a espectroscopia NIR apresenta sobreposições e bandas de combinações enquanto na espectroscopia MIR surgem com picos definidos e com interpretação directa. Isto deve-se ao facto de na espectroscopia MIR apenas ocorrerem transições de vibração fundamental. No caso da espectroscopia NIR, como os espectros são complexos, é necessário recorrer a métodos estatísticos, realizando uma calibração multivariada, que utiliza vários comprimentos de onda na determinação de uma propriedade (Almeida, 2009).

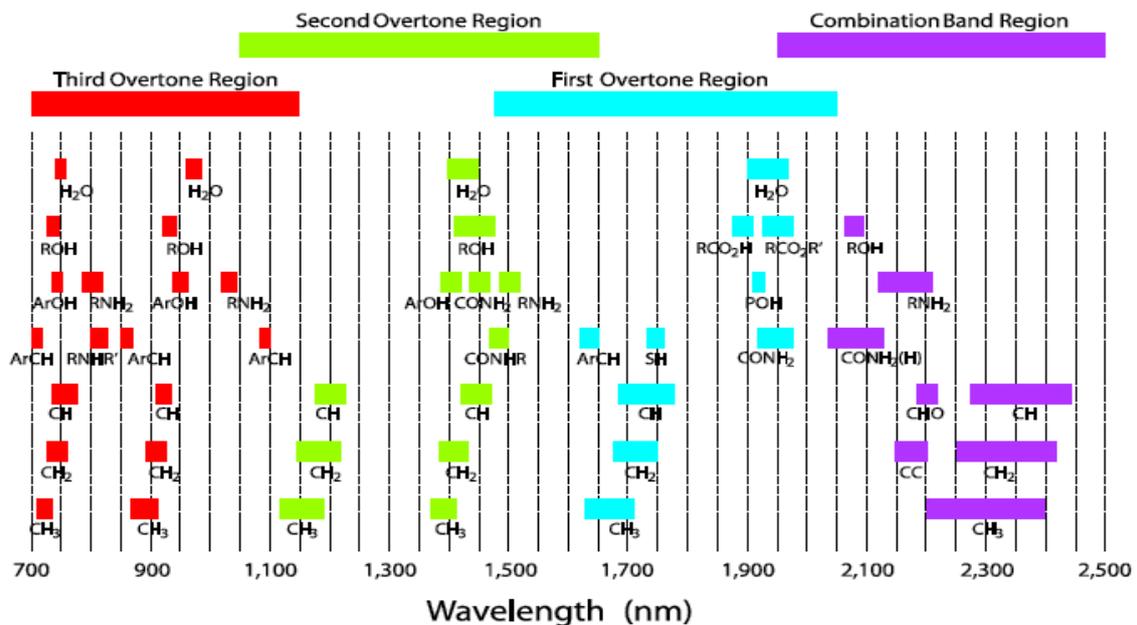


Figura 5 - Bandas analíticas e posições relativas dos picos mais proeminentes na absorção infravermelha (Metrohm, 2013).

Nas moléculas, os átomos estão em constante movimento, podendo deslocar-se momentaneamente da posição de equilíbrio, distorcendo a molécula. São designados movimentos vibracionais (Costa, 2000).

Dependendo da geometria e do número de átomos que as constituem, as moléculas têm diferentes formas de vibração permitidas. Por exemplo, para uma molécula poliatômica com n átomos existem $3n-6$ modos vibracionais, que se podem agrupar em duas grandes classes, de acordo com o tipo de alteração que causam (Costa, 2000):

- **Vibração de Extensão** (Stretching) – Altera a distância interatômica
- **Vibração Angular** (Bending) – Altera o ângulo interatômico

Tomando como exemplo uma molécula triatômica do tipo AX_2 , têm-se os seguintes modos vibracionais.

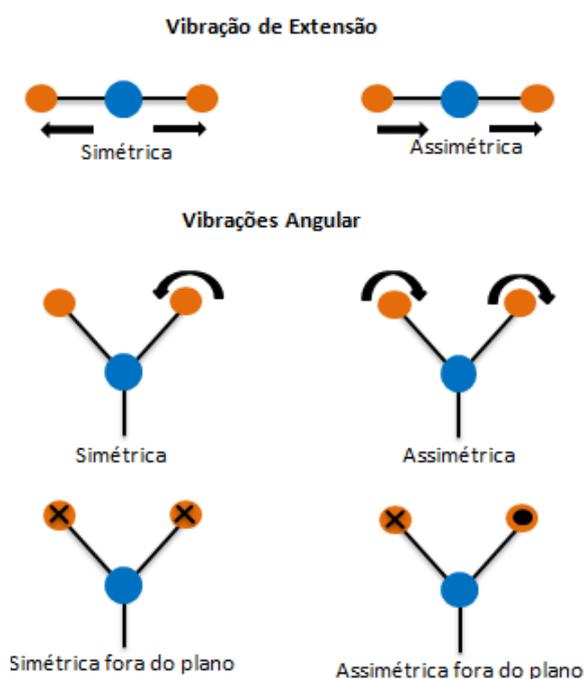


Figura 6 - Modos vibracionais das moléculas pertencentes ao grupo AX_2 .

As vibrações resultantes do processo de NIRS são classificadas em duas categorias, sendo estas as de **alongamento** (stretching), caso se movam sobre o eixo de ligação, podendo ser simétricas ou assimétricas (Figura 6) e as de **deformação angular** (bending), cujo ângulo de ligação entre os átomos é modificado, podendo apresentar-se como uma tesoura, baloiço, oscilar e torção, dependendo do movimento efectuado (Leitão, 2012).

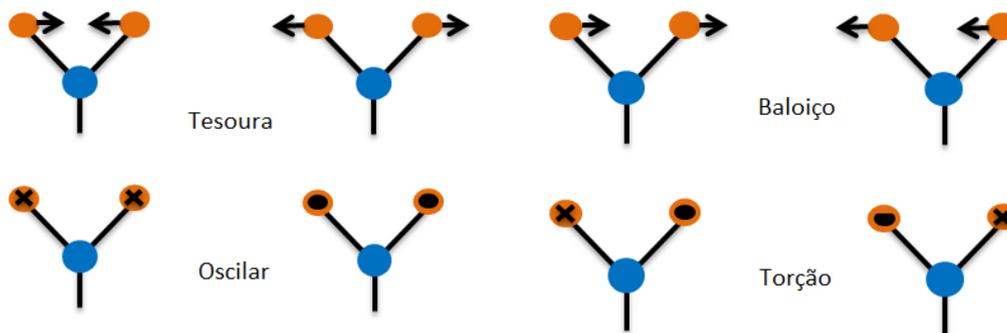


Figura 7 - Deformações angulares.

2.3.1 Teoria da espectroscopia vibracional

Para explicar o comportamento vibracional das moléculas existem vários modelos, contudo este comportamento é descrito pelo modelo do oscilador harmónico linear.

Segundo este modelo, a energia vibracional de um determinado sistema é uma função quadrática da distância entre os átomos, sendo a oscilação entre eles, simétrica. O modelo considera que a ligação entre os átomos é feita por uma mola, em que a frequência de vibração da mola (ν) é descrita pela lei de Hooke e representada pelas seguintes equações (Almeida, 2009).

$$(1) \nu_{vib} = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \qquad (2) \mu = \frac{m \cdot M}{m + M}$$

ν – Frequência de ligação da banda de absorção

k – Constante da força da ligação

μ - Diminuição da massa dos átomos ligados

m e M – Massas dos átomos presentes na ligação

Este modelo só permite a transição entre níveis vibracionais adjacentes, dado que todos os níveis estão igualmente espaçados, e estas transições têm de respeitar os critérios de simetria (Almeida, 2009).

2.4 Factores que afectam os espectros (Farmacopeia Portuguesa VIII, 2005)

- Temperatura da amostra

É importante para as soluções aquosas, nas quais uma diferença de alguns graus pode produzir alterações substanciais no espectro e também nas amostras sólidas e pós que contenham água.

- Solventes residuais e Humidade

A humidade e os solventes residuais presentes nas amostras (pontes de hidrogénio) são responsáveis por bandas de absorção significativas na região do infravermelho próximo. São, de facto, a banda mais facilmente perceptível dos espectros NIR.

- Espessura da amostra

Este factor é importante a controlar nas amostras sólidas. Deve ser controlado, quer no modo de transmitância, usando um comprimento óptico fixo, bem como no modo de reflectância, onde se deve controlar a profundidade de penetração da luz. Contudo não é um dos factores prioritários aquando a aquisição dos espectros.

- Propriedades ópticas da amostra

No caso dos sólidos, a superfície e espalhamento da amostra devem ser tomadas em conta, pois a morfologia da superfície e o índice de refração afectam as propriedades de dispersão de materiais sólidos. O grau de compactação ou dimensões variáveis das partículas ou acabamento da superfície podem causar diferenças significativas entre os espectros.

- Polimorfismo

As variações da estrutura cristalina de amostras com a mesma composição química influenciam o espectro obtido. Diferentes polimorfos ou formas sólidas amorfas podem ser distinguidos pelos espectros obtidos, bem como diferentes estados de hidratação cristalina ou estados de solvatação do mesmo material podem resultar em espectros próprios.

- Idade das amostras

Pode manifestar alterações físicas, químicas e ópticas, pelo que se deve dar atenção às amostras e padrões utilizados, pois estes podem não ser adequados a uma correcta análise espectral.

3. Instrumentação

Um espectrómetro de NIR é composto por uma fonte de luz, um sistema óptico, um suporte para amostra (ou uma interface para a apresentação da amostra) e um detector.

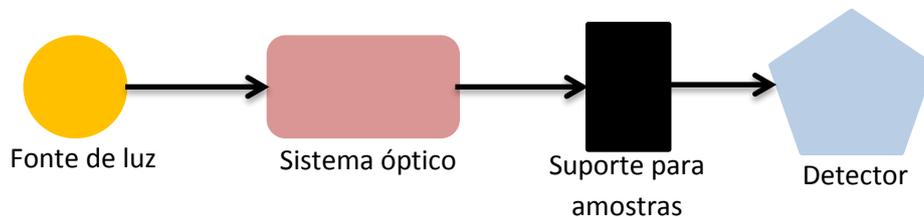


Figura 8 - Configuração básica de um espectrómetro de NIR.

- A **fonte de luz** pode ser uma lâmpada de halogéneo, quartzo ou LED's. Normalmente é usada uma lâmpada halogénea de tungsténio, visto que é pequena e robusta.
- O **sistema óptico** decompõe o feixe de luz policromático em comprimentos de onda discretos. Este deve proporcionar uma largura de banda estreita em relação à banda de absorção a ser medida e uma elevada intensidade em toda a gama de comprimento de onda analisada (Pereira, 2011).
- O **acessório de amostra** depende do tipo de amostra, podendo ser sólida, líquida ou gasosa. O facto de não haver um pré-tratamento das amostras para obtenção dos seus espectros, permite ter uma gama variada de acessórios adaptáveis a cada situação.
- Os **detectores** normalmente usados incluem os de semicondutor, sulfureto de chumbo (PbS) e índio-gálio-arsénio (InGaAs). Os detectores de semicondutor são rápidos, silenciosos, pequenos e altamente sensíveis da região visível até 1100 nm. Os detectores de PbS são mais lentos, mas muito populares visto que têm alta durabilidade, baixo preço e são sensíveis desde 1100 nm até 2500 nm. Os detectores de InGaAs são os mais caros, pois combinam as características de velocidade e tamanho do detector de silicone com o alcance do comprimento de onda do detector de PbS (Reich, 2005).

3.1 Métodos de Amostragem

Quando se pretende adquirir os espectros NIR de uma amostra, é necessário retirar uma quantidade do local onde se está a desenvolver o processo. Para tal, existem diferentes métodos de amostragem:

- **Off-line:** Amostragem manual com transporte para o laboratório;
- **At-line:** A amostra é adquirida manualmente e analisada na proximidade da corrente do processo;
- **In-situ:** Uma sonda é inserida no recipiente em contacto directo com o meio para realizar a medição;
- **On-line:** A amostra é desviada do processo de fabrico, é medida automaticamente e pode voltar ao mesmo;
- **In-line:** A medição é realizada automaticamente e a amostra não é removida da corrente do processo.

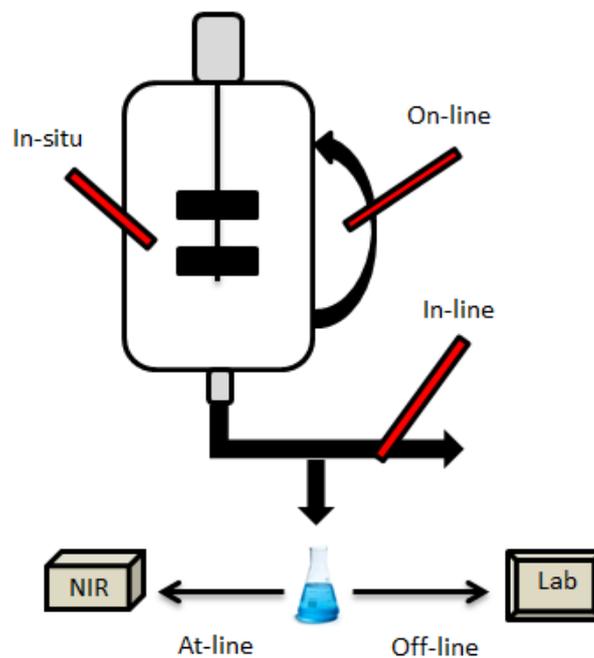


Figura 9 - Esquema dos modos de medição do NIRS. Adaptado de (Ceitil, 2007).

3.2 Métodos de medição

O modo apropriado de medição NIR é ditado pelas propriedades ópticas da amostra. Os materiais transparentes são normalmente medidos em transmitância (Figura 10A) e os líquidos túrbidos ou semi-sólidos e sólidos podem ser medidos transmitância difusa (Figura 10B), reflectância difusa (Figura 10C) ou transflectância (Figura 10D/E), dependendo das suas absorções características de dispersão (S. Alison Arnold, 2002).

- Medição por transmissão

A transparência (T) é uma medida do decréscimo da intensidade da radiação a determinados comprimentos de onda, após passagem da radiação através da amostra. A amostra é atravessada pelo feixe óptico entre a fonte e o detector. O resultado pode ser apresentado directamente em termos de transparência (T) e/ou de absorvância (A) (Costa, 2000).

$$(3) T = \frac{I}{I_0}$$

Com,

I_0 – Intensidade da radiação incidente

I – Intensidade da radiação transmitida

$A = -\log_{10} T = \log_{10} (1/T) = \log_{10} (I_0/I)$

A medida de transparência depende do espectro da transparência de fundo, necessário para o cálculo. A referência de fundo, normalmente, é uma célula vazia, um solvente branco ou, em casos particulares, uma amostra de referência. O método aplica-se geralmente aos líquidos, diluídos ou não, às dispersões, às soluções e aos sólidos (Farmacopeia Portuguesa VIII, 2005).

- Medição por reflexão difusa

Este método permite à medida da reflectância (R) uma relação entre a intensidade da luz reflectida pela amostra (I) e a reflectida por uma superfície reflectora de fundo ou de referência (I_r). A radiação no NIR pode penetrar até uma profundidade substancial no interior da amostra, onde pode ser absorvida pelas combinações de vibrações e ressonâncias parciais das substâncias em análise presentes na amostra. A radiação não absorvida é reflectida pela amostra para o detector (Costa, 2000).

Os espectros, com este método, são geralmente obtidos por cálculo e transposição gráfica do $\log (1/R)$ em função do comprimento de onda ou dos números de onda.

$$(4) R = \frac{I}{I_r}$$

Com,

I – Intensidade da luz reflectida de modo difuso pela amostra

I_r – Intensidade da luz reflectida pela superfície reflectora de fundo ou de referência

$$AR = \log_{10} (1/R) = \log_{10} (I_r/I)$$

Aplica-se geralmente aos sólidos. As condições de medição devem ser tão reprodutíveis quanto possível, de amostra para amostra. Apenas os espectros medidos em relação a um fundo, possuindo as mesmas propriedades ópticas, podem ser comparados uns com os outros (Farmacopeia Portuguesa VIII, 2005).

- Medição por transflectância

Este método combina a transparência e a reflectância. Quando se mede a reflectância (T^*), o feixe de radiação incidente entra pela face transparente do suporte, atravessa a amostra e é reflectida pela outra face do suporte. De seguida a radiação retorna atravessando de novo a amostra e é captada pelo detector. O caminho óptico resultante é o dobro do espaço entre as faces do suporte (Costa, 2000).

$$(5) T^* = \frac{I}{I_T}$$

Com,

I_T – Intensidade da radiação transflectida, sem amostra

I – Intensidade da radiação transmitida, medida na amostra

$$A^* = \log_{10} (1/T^*)$$

Esta configuração pode ser adoptada para um aparelho com os sistemas de reflectância e de fibra óptica, nos quais a fonte e o detector se situam no mesmo lado da amostra. A amostra é examinada numa célula munida de um espelho ou de um reflector de dispersão apropriado, metálico ou de uma substância inerte, que não absorva na região do infravermelho próximo (Farmacopeia Portuguesa VIII, 2005).

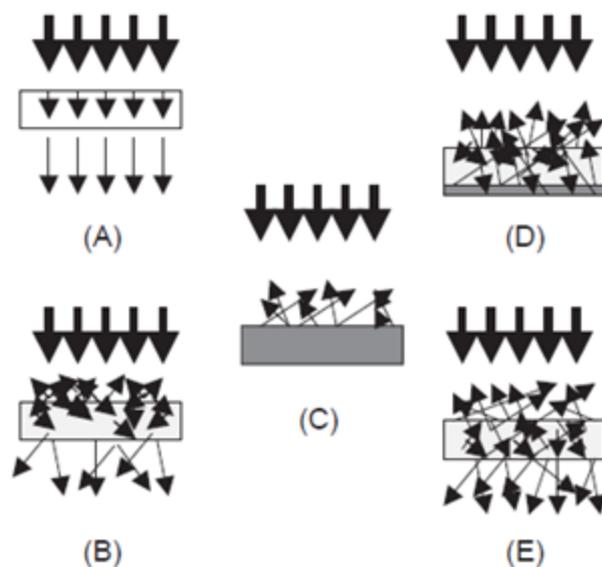


Figura 10 - Modos de medição do NIR: (A/B) – transmitância, (C) – reflectância difusa e (D/E) – transfectância (Reich, 2005).

Para fazer boas medições dos espectros NIR, é necessário que a apresentação das amostras seja apropriada, especialmente quando se trata de amostras sólidas. O efeito de dispersão da luz, induzida por variações na densidade de empacotamento das amostras, pode causar grandes fontes de erro nos espectros (S. Alison Arnold, 2002).

4. Implementação de um método analítico

Assim como a maioria dos equipamentos de medida, os aparelhos de NIR necessitam de uma calibração prévia. No entanto, estabelecer correlações nestes equipamentos nem sempre é fácil, visto que os espectros são muito complexos e sensíveis a variações exteriores, fazendo com que seja necessário um grande número de amostras e um adequado pré-processamento (Costa, 2000).

Após desenvolver o modelo de calibração, é necessário avaliar a sua capacidade preditiva e a reprodutibilidade. A este processo denomina-se de validação externa.

O sucesso da técnica depende das etapas de construção dos modelos de calibração (pré-processamentos correctos) e da capacidade preditiva destes (Costa, 2000).

Passo 1: Selecção das amostras para a calibração

As amostras devem ser representativas da variabilidade do processo, de modo a obter resultados robustos. Nos modelos quantitativos, as amostras devem cobrir a gama pretendida para o parâmetro a quantificar (exemplo: concentração).

Passo 2: Método de referência

O desenvolvimento de modelos quantitativos requer o conhecimento prévio dos valores das variáveis em estudo, determinados pelos métodos de referência. O método de referência depende do parâmetro que se pretende analisar (exemplo: KF, GC, IC, HPLC, etc.).

Passo 3: Determinação da equação de calibração

Uma vez obtidos os espectros e os valores do método de referência, determina-se a equação de regressão que estabelece a melhor correlação entre eles, recorrendo para isso a técnicas de quimiometria. É necessário assegurar que o conjunto de amostras da calibração é representativo da variação nas propriedades da amostra para ser encontrada em lotes de produtos típicos. Depois, uma variedade de pré-processamentos e zonas espectrais podem ser usadas para determinar o modelo ideal de determinação do parâmetro em estudo nas amostras.

Passo 4: Validação

Uma vez construído o modelo de calibração, é necessário testar a sua capacidade preditiva. Para tal, um novo conjunto de amostras é analisado quer pelo método de referência quer pelo NIR. A quantidade de amostras do conjunto de validação deve corresponder a 1/3 do conjunto de calibração.

As novas amostras são analisadas nas mesmas condições que as do conjunto de treino. Após traçar o espectro, o equipamento NIR calcula, a partir do modelo de calibração, o resultado (valor previsto). As respostas são posteriormente avaliadas em termos de reprodutibilidade e precisão.

O coeficiente de correlação (R^2), o erro padrão de previsão (SEP), e o declive e a intersecção com y da linha de regressão são usadas para averiguar se é adequado o método de calibração.

5. Quimiometria

A quimiometria pode ser definida como uma disciplina química que usa matemática e estatística que relaciona as medidas efectuadas num sistema com o estado do mesmo, permitindo saber o máximo de informação química relevante através da análise de dados químicos (Costa, 2000).

Os espectros de absorção de NIR são geralmente complexos e possuem uma ampla sobreposição das bandas. Além disso, as propriedades químicas, físicas e estruturais de todas as espécies presentes na amostra influenciam o espectro medido. Ao medir várias amostras numa série, se estas apresentarem pequenas diferenças entre elas, podem causar pequenas diferenças espectrais. Isto significa que os dados de absorção de NIR obtidos são dependentes de mais do que uma variável simultaneamente.

A quimiometria é assim usada para filtrar informação que se correlaciona com uma certa propriedade de uma grande quantidade de dados. Na análise NIR qualitativa e quantitativa, a parte relevante dos dados multivariados dos espectros é extraída sem perder informação importante, livrando-se de informação indesejada (interferências ou ruído).

5.1 Análise Univariada e Multivariada

Geralmente, a calibração univariada é a análise mais utilizada para processos de calibração. Para obter resultados exactos é impreterível que o sinal medido não apresente uma contribuição de outros analitos, assim como necessita que exista uma relação entre o sinal medido e a concentração do analito (Pereira, 2011).

A calibração multivariada, por outro lado, permite a análise de toda a informação obtida e apresenta vantagens em relação à calibração univariada. Permite reduzir o ruído, a interferência no sinal, a possibilidade de melhorar o modelo através dos parâmetros obtidos, assim como o controlo de *outliers* (Pereira, 2011).

Os métodos de análise distinguem-se em dois grandes grupos: os que estabelecem calibrações qualitativas e os que determinam correlações quantitativas.

5.1.1 Calibrações Quantitativas

Este tipo de calibração permite relacionar os dados ópticos (espectros) com os dados dos métodos de referência, isto é, consiste em estabelecer uma relação linear univariável entre o parâmetro em estudo e o sinal directamente relacionado com ele, produzido pelo equipamento NIR:

$$(6) \quad C = B_i A + B_0$$

Com,

C – Característica de interesse

A – Sinal do aparelho

B_i – Coeficiente da combinação linear

É o modelo de regressão mais simples e rápido. O coeficiente B_i é determinado pelo método dos mínimos quadráticos. O parâmetro A é a absorvância do composto de interesse a um determinado comprimento de onda e C a sua concentração, baseando-se o modelo na lei de Lambert-Beer, que postula a proporcionalidade directa entre a propriedade da amostra e a sua absorvância. Para obter bons resultados com este modelo, é necessário que existam bandas específicas que não sejam sujeitas a interferências da matriz (Costa, 2000).

Contudo, há a dificuldade de seleccionar a banda correspondente à característica da amostra, pois cada uma requer um comprimento de onda específico e portanto, um modelo próprio.

A solução é a aplicação de métodos multivariáveis, ou seja, incluir mais informação, onde em vez de um determinado comprimento de onda, se utilizam várias zonas espectrais. Assim, os modelos obtidos apresentam a vantagem de poderem calibrar vários parâmetros de interesse em simultâneo e permitirem uma melhor análise do problema, sendo, em geral, mais precisos, estáveis e robustos (Costa, 2000).

5.1.1.1 Calibrações e Diagnósticos

Existem vários tipos de calibrações possíveis de construir, entre as quais destacam-se:

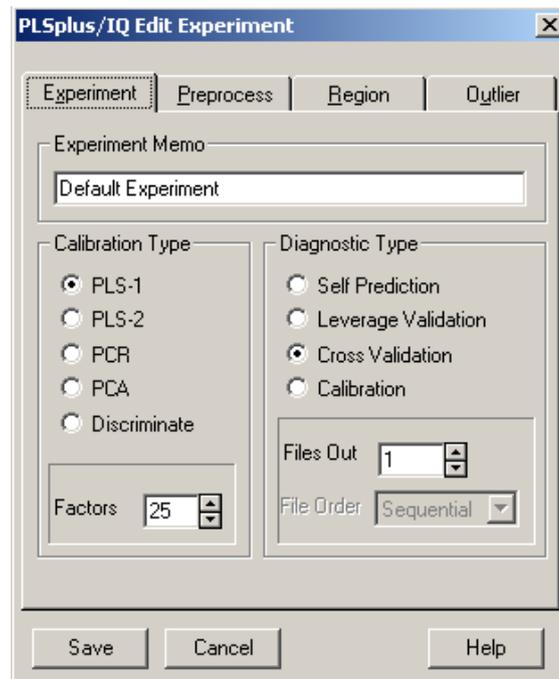


Figura 11 - Tipos de calibrações e diagnósticos existentes para o tratamento dos dados.

a) PCA – Análise de Componentes Principais

Baseia-se no cálculo de um novo conjunto de variáveis, designadas factores ou componentes principais (PC), que são combinações lineares das variáveis originais, forçadas a serem linearmente independentes. Deste princípio resulta, em termos práticos, que a contribuição de um factor para o modelo não é afectada pela presença ou ausência de qualquer outro (Thermo Galatic, 2002). O que torna o PCA diferente é o facto de considerar exclusivamente as variáveis que caracterizam o sistema (amostras), não as relacionando com informações exteriores (Costa, 2000).

O algoritmo de PCA decompõe a matriz das observações de forma a capturar as principais tendências/padrões nos dados, criando um novo espaço subdimensional onde as variáveis originais são projectadas. A representação gráfica das novas variáveis, *scores* e *loadings*, permite uma supervisão do problema de uma forma simples e rápida (Costa, 2000).

Cálculo do número de Componentes Principais

O número de componentes principais é, em geral, escolhido com base no valor do PRESS, somatório dos erros de previsão das observações ou dos valores analíticos pelo modelo de PCA ou PLS, respectivamente. Quanto menor for o PRESS, para o mesmo número de PC, então melhor o modelo (Thermo Galatic, 2002).

Geralmente, o número máximo de componentes principais que um modelo pode usar é igual à metade do número de observações.

$$(7) \quad \text{PRESS} = \sum_{i=1}^n (C_r - C_p)^2$$

Onde,

C_p – Concentração prevista

C_r – Concentração real

n – nº de amostras

b) PCR – Regressão dos Componentes Principais

Baseia-se na aplicação do modelo de MLR às novas variáveis calculadas a partir das originais, por aplicação da técnica PCA. Este método, em vez de decompor a matriz X (variáveis independentes) e Y (variáveis dependentes), decompõe apenas a matriz X. O algoritmo usado em PCR decompõe a matriz X tal como o PCA e relaciona os resultados do PCA aos dados das propriedades de interesse. Ou seja, é um modelo construído em duas fases; primeiro comprime os dados espectrais por PCA e depois realiza, sobre as novas variáveis, a regressão linear contra os dados analíticos (Costa, 2000).

c) PLS – Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

Este método é também uma técnica de decomposição espectral, mas usa a informação analítica nesse processo, ou seja, realiza em simultâneo a compressão dos dados e a sua regressão contra os valores analíticos. Assim, os espectros onde os constituintes estão mais concentrados, têm maior peso na calibração (Costa, 2000).

Uma vantagem destes métodos, em particular do algoritmo de PLS, é a possibilidade de diagnosticar de forma fácil a presença de *outliers*. Estes podem ser identificados pela observação dos resíduos, através da observação das amostras com valores de resíduos superiores aos da média do conjunto de calibração (Thermo Galatic, 2002).

Relativamente ao **tipo de diagnóstico** aplicado nas calibrações usadas, os mais comuns são:

d) Auto-previsão

É o método mais simples e rápido, contudo não é o melhor uma vez que todos os espectros do conjunto de calibração são utilizados na construção do modelo e depois previstos pelo mesmo. Como resultado, o PRESS diminui sempre com o aumento do número de componentes principais, ou seja, não existe reconhecimento de ruído e toda a informação é aparentemente importante (Costa, 2000).

e) Validação Cruzada

Consiste numa validação cruzada em que se exclui, iterativamente, uma (ou mais) amostra(s) do conjunto de calibração, e após construção do modelo, prevê-se o valor analítico da(s) mesma(s), de forma a minimizar o erro de previsão. Assim, o PRESS começa inicialmente por diminuir até chegar a um mínimo. A partir daí o acréscimo de componentes principais leva ao seu aumento, o que significa que esses novos PC já não têm relação com dados, estão a modelar ruído, fenómeno que se designa correctamente por *Overfitting* (Costa, 2000).

5.1.1.2 Pré-processamento dos dados

O objectivo desta etapa é anular interferências que não estão relacionadas com os parâmetros de interesse de forma a minimizar erros e aumentar a linearidade entre as variáveis em estudo. Assim, foram desenvolvidos vários métodos que removem/minimizam tais efeitos, sendo, na sua maioria, específicos para cada tipo de interferência, podendo actuar sobre comprimentos de onda individuais (Normalização) ou utilizar múltiplos (Derivação) (Costa, 2000).

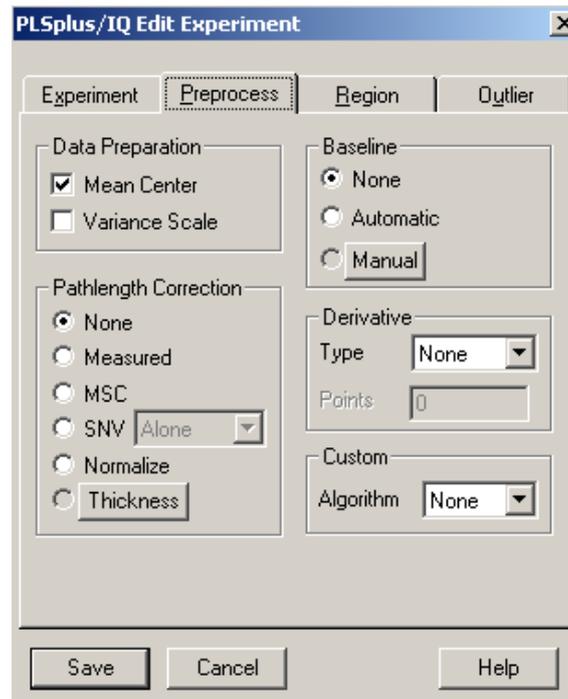


Figura 12 - Pré-processamentos existentes para tratamento dos dados.

Para a **preparação de dados**, existem duas opções:

a) Média Central

É quase sempre usado quando é necessário o cálculo de uma calibração multivariada. Consiste no cálculo de um espectro médio do conjunto de calibração seguida da sua subtração a cada um dos espectros, de forma a evidenciar as diferenças entre eles, removendo um padrão comum (Thermo Galactic, 2002).

b) Variação da Escala

É usado para enfatizar pequenas variações nos dados, dando a todos os valores um “peso” igual. É calculado dividindo a resposta a cada ponto de dados espectrais pelo desvio padrão das respostas de todos os dados de treino até aquele ponto (Thermo Galactic, 2002).

Para a **correção do percurso óptico (dispersão da luz)**, os pré-tratamentos usados são:

a) Medido

É útil em casos onde o percurso óptico das amostras é de aquisição fácil. Pode ser usado para corrigir amostras onde o percurso óptico das “desconhecidas” ou não pode ser medido ou é esperado que variem substancialmente durante um período de tempo. Contudo, medir com precisão o percurso óptico de cada amostra torna-se um processo moroso (Thermo Galatic, 2002).

b) MSC – Correção da Dispersão da Luz

Assume que a dispersão com o comprimento de onda é independente da absorção dos constituintes. É semelhante a uma normalização, mas em vez de calcular uma linha de base arbitrária, calcula um espectro médio, que considera como “ideal” a lineariza cada espectro em função deste (Thermo Galatic, 2002). É normalmente usado em amostras sólidas.

c) SNV – Variação Normal Padrão

Este método é calculado em duas partes. O SNV é aplicado primeiro para corrigir os efeitos das interferências multiplicativas da dispersão e do tamanho da partícula, semelhante ao MSC. Depois o segundo algoritmo é aplicado para remover as variações adicionais na linha de base (Thermo Galatic, 2002).

d) Normalizar

Consiste em calcular a absorvância média de cada espectro, subtrai-la à absorvância a cada comprimento de onda, e dividir o resultado pelo desvio padrão dos valores de absorvância. É uma ferramenta particularmente indicada em calibrações qualitativas (Thermo Galatic, 2002). É normalmente usado em amostras líquidas.

e) Espessura

Deve existir uma banda isolada em cada espectro que seja notável de um constituinte que não varie a concentração em todas as amostras, para ambas as amostras de calibração e previsão (Thermo Galatic, 2002). Uma vez que a banda espectral escolhida é assumida como sendo invariável em todas as amostras, um aumento ou diminuição da absorção dessa banda no espectro pode ser assumido como sendo inteiramente devido a um aumento ou diminuição do percurso óptico da amostra (Thermo Galatic, 2002).

As alterações na **linha de base** podem ser provocadas por variações ambientais, do aparelho ou no manuseamento da amostra. Para corrigir tais variações, existem os seguintes métodos:

a) Manual

Consiste em escolher dois pontos da linha de base, normalmente um em cada extremo da região espectral, e definir uma recta, que depois será subtraída ao espectro. O principal problema é a selecção desses dois pontos que devem ser em zonas de não absorção (Costa, 2000).

b) Primeira e Segunda Derivada

É um dos melhores métodos na remoção de problemas da linha de base. A 1ª derivada de um espectro é uma medida do declive da curva espectral em cada ponto. A inclinação da curva não é afectada pelos deslocamentos da linha de base do espectro e, assim, a primeira derivada é um método muito eficaz para remover os efeitos de base. Tem a desvantagem de os espectros resultantes serem complexos (Costa, 2000).

Os algoritmos mais comuns para o cálculo das derivadas de espectros são o Método de Gap e o Método de Savitsky-Golay. Em qualquer das situações, é necessário definir a janela de cálculo, isto é, a dimensão do intervalo de cálculo, normalmente em número de pontos.

5.1.1.3 Selecção de regiões espectrais

Os modelos multivariáveis permitem incluir a totalidade do espectro nos cálculos, mas por vezes essa não é a melhor opção, podendo mesmo otimizar-se a calibração ao excluirmos regiões que não acrescentam informação útil, por vezes mesmo apenas ruído, porque correspondem a:

- Regiões de pior desempenho do espectrofotómetro
- Zona em que os constituintes de interesse não absorvem
- Regiões de não linearidade

Para saber qual a zona espectral indicada, calcula-se o coeficiente de correlação linear entre os espectros para a calibração, para os vários comprimentos de onda, indicando, não só, o grau de correlação existente entre a absorvância das várias amostras, mas também do tipo de correlação, isto é, positiva ou negativa.

As zonas espectrais de grande correlação devem ser incluídas nos cálculos de calibração. A selecção espectral tem de ser muito cuidadosa porque, em geral, verifica-se que quanto mais informação espectral contiver o modelo, mais robusto e maior capacidade preditiva terá.

5.1.1.4 Detecção de outliers

Um *outlier* é uma amostra que apresenta características substancialmente diferentes das do conjunto de calibração. Tais diferenças são, normalmente, o resultado de medições/leituras incorrectas, que podem dever-se a:

- **Dados Analíticos:** Erro na técnica de calibração primária; Erro de transcrição de dados (Costa, 2000)
- **Dados Espectrais:** Erro do espectrofotómetro; Erro de manipulação da amostra; Variação das condições ambientais (Costa, 2000)

Podem ser detectados através das ferramentas de diagnóstico dos métodos multivariados, sendo o número típico e aceitável de *outliers* de 5% a 10% do conjunto da calibração, dependendo da complexidade das amostras (Costa, 2000). Visualmente também é possível de identificar um *outlier*, apesar de não ser o mais correcto. Quando um espectro apresenta um comportamento muito diferente dos restantes ou quando o seu “peso” é maior no grupo, pode considerar-se que essa amostra não pertence ao grupo de análise, podendo ser excluído.

Não é estritamente necessário excluir sempre os *outliers* para garantir que a calibração tenha uma boa capacidade preditiva. Existem formas de minimizar a contribuição dos outliers, tornando o modelo insensível a eles, por exemplo, atribuindo-lhes um menor peso em relação às restantes amostras.

5.1.2 Calibrações Qualitativas

Os algoritmos utilizados têm como objectivo reconhecer padrões entre as amostras, agrupando-as em classes de semelhança.

Traçando vários espectros da mesma amostra, eles nunca serão iguais, devido a variações ambientais, do aparelho, etc. Contudo, as intensidades relativas de cada comprimento de onda devem ser muito semelhantes. Matematicamente, este método desenvolve um modelo que caracteriza cada grupo com base na média e desvio-padrão das principais características espectrais que possuem (Costa, 2000).

A maioria dos métodos recorre ao PCA como técnica de compressão de dados. Neste caso, os scores podem ser usados nos métodos de discriminação, tal como são usados em vez da absorvância na construção da equação da calibração (Costa, 2000).

Uma das técnicas mais comuns na avaliação da semelhança espectral é a combinação de PCA com a **Distância de Mahalanobis**.

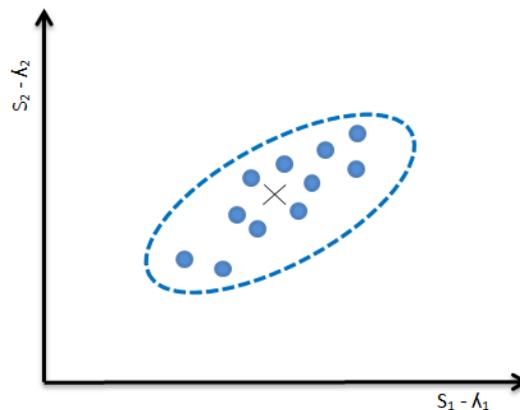


Figura 13 - Explicação gráfica do tipo de resultados que se obtém com o método de Mahalanobis (X assinala o ponto médio). Adaptado de (Ceitil, 2007).

O PCA reduz o número de variáveis, filtrando o ruído, e o método de Mahalanobis calcula o ponto médio de cada grupo, tendo também em conta a distribuição das amostras que o constituem, definindo um espaço multidimensional, cujas fronteiras determinam a gama de variação aceitável para uma amostra ser classificada como membro, i.e., define os agrupamentos com base na distância elíptica dos elementos ao centróide (Costa, 2000).

5.2 Avaliação dos Métodos de Calibração

Um bom método caracteriza-se por ser Preciso (reprodutível), Exacto (proximidade do valor do método de referência) e Robusto (insensível a variações externas).

Os principais indicadores da qualidade de um método de calibração são:

a) Número de componentes principais

Quanto menor for o número de PC, melhor, uma vez que significa que os primeiros componentes principais conseguem a maior parte da informação relevante, filtrando ao máximo o ruído.

b) SEP (Standard Error of Prediction)

Indica o valor do desvio médio das previsões em relação aos valores do método de referência. Quanto menor for a distância, mais próximos serão os valores previstos pelo NIR e do método de referência.

$$(8) \quad SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_{k_i} - Y_{p_i})^2}{n}}$$

c) R² (Coeficiente de Correlação Linear)

Indicador do grau de ajuste da equação de calibração obtida aos dados de referência. Quanto mais próximo for o valor de 1, melhor será a calibração, pois haverá maior linearidade.

6. Sectores Industriais e aplicações

- Biotecnologia

Quando se trata de bioreactores, o rendimento do produto pode ser aumentado através da previsão de analitos em tempo real, permitindo um controlo atempado e optimização do nível de nutrientes assim como a verificação da concentração. Quer as culturas de células de mamíferos quer microbianas têm de ser monitorizadas no laboratório com instrumentos de processo com exactidão e confiança nos métodos químicos (Metrohm, 2013).

- Química

O NIR é extremamente sensível à absorvância de O-H, portanto a determinação da humidade é uma aplicação comum. Adicionalmente é sensível à absorção de ligações N-H, C-H e S-H, para o qual a monitorização e determinação do ponto final da reacção são boas aplicações para processos e reacções de química orgânica.

As aplicações químicas comuns incluem a determinação do valor de ácido, número hidroxilo, conteúdo antioxidante e inibidor UV, ponto de fusão, análise de polímeros, identificação de plásticos, análise/determinação de álcoois (Metrohm, 2013).

- Petroquímica

Na petroquímica, a monitorização do processo de mistura com o NIR tem provado grandes poupanças na economia, visto que propriedades cruciais, tais como o conteúdo em água, densidade, viscosidade, conteúdo de aditivos, e o número hidroxilo podem ser medidos em menos de um minuto (Metrohm, 2013).

- Farmácia

O fabrico de produtos farmacêuticos, desde a identificação de matérias-primas até à medição da uniformidade do conteúdo de formas de doseamento farmacêuticas, pode ser assistido pela implementação de métodos NIR. As directrizes de saúde, FDA Americana e Europeia, aumentaram a carga de trabalho e rigor associado com inspecções, mistura e conteúdo de ensaios. Com a chegada de testes de conteúdo a 100% para receber as inspecções das matérias-primas na Europa e Canadá, a tecnologia NIR pode reduzir o tempo e o nível de habilitações requeridas para ao crescente desafio do crescimento (Metrohm, 2013).

- Polímeros

Como o NIR não precisa de preparação de amostras e é não-destrutivo, muitos atributos de polímeros e plásticos podem ser medidos rapidamente, para parâmetros quantitativos e qualitativos. A produção de termoplásticos, a pureza da matéria-prima e o conteúdo em água pode ser analisado com o NIRS. Aditivos como antioxidantes, inibidores UV e uns que prevêm a descoloração, são medidos através do NIR. É uma ferramenta excelente para determinar a entrada de matérias-primas e pontos finais de reacções, reduzindo o processamento a mais do produto e aumentando a consistência da produção (Metrohm, 2013).

- Papel e celulose

A indústria do papel e da celulose tem utilizado o NIRS por muitos anos, fornecendo informações quantitativas e qualitativas sobre materiais de madeira de entrada e conteúdo em lenhina. As análises NIR discriminatórias podem ser usadas para determinar espécies, madeiras resinosas. Os atributos comumente medidos do papel e da celulose são: conteúdo em lenhina, humidade, resina, brilho, espécies de madeira, etc (Metrohm, 2013).

- Educação

Apesar do NIR ser usado em aplicações relacionadas com a produção, foi encontrada grande utilidade em instalações de investigação e desenvolvimento. As indústrias farmacêuticas usam normalmente o NIR nas plantas piloto de operação para ajudar a evacuar processos diários. O trabalho tem como objectivo a compreensão da uniformidade da mistura, a secagem dos grânulos, previsão do perfil de dissolução e processos de liofilização (Metrohm, 2013).

- Têxteis

O NIRS tem sido usado na indústria têxtil para diferenciar tipos de fibras de reciclagem de tapetes. Uma mistura de análises de diferentes fibras poliméricas pode ser analisada através do NIR. Análises em tempo real das aplicações do álcool polivinílico (PVA) dimensionado para deformar o fio, tem sido feito com o NIR em processo *online*.

As fibras mais comuns detectadas pelo NIR são: algodão, acrílico, acetato, Kevlar, nylon-6, etc.

7. Ambiente e Segurança

A indústria trabalha com o objectivo de aumentar a produtividade, com o menor custo possível e usando processos seguros e flexíveis. Este facto é fortemente motivado pela competição económica e pelo aumento da exigência por produtos mais consistentes e de melhor qualidade e por processos que causem menor impacto no meio ambiente.

A espectroscopia de infravermelhos próximo, como foi referido anteriormente, é um método rápido, que não recorre ao uso de solventes. As amostras não precisam de qualquer tipo de preparação, sendo colocadas nos respectivos recipientes, para posterior análise.

Assim o NIR é um método eficaz na substituição de alguns métodos de referência, tal como o Karl-Fisher para a determinação da humidade. Este método recorre ao uso de reagentes como o Iodo, o dióxido de Enxofre e a Piridina, que são prejudiciais quer para o homem, quer para o meio ambiente.

Tabela 2 – Informações de segurança sobre os reagentes

Nome	Nº CAS	Fórmula Química	Precauções	Simbologia ¹
Iodo	7553-56-2	I ₂	<u>Inalação</u> : Nocivo <u>Ingestão</u> : Causa sensibilização <u>Contacto com a pele</u> : Nocivo <u>Contacto com os olhos</u> : Causa sensibilização	 
Dióxido de Enxofre	007446-09-5	SO ₂	<u>Inalação</u> : Tóxico <u>Ingestão</u> : Corrosão <u>Contacto com a pele</u> : Queimaduras <u>Contacto com os olhos</u> : Lesões graves	   
Piridina ²	110-86-1	C ₅ H ₅ N	<u>Inalação</u> : Irritação nasal <u>Ingestão</u> : Tóxico <u>Contacto com a pele</u> : Causa Irritação <u>Contacto com os olhos</u> : Causa Irritação	  

Assim, a rápida implementação do NIRS em detrimento de alguns métodos de referência convencionais seria uma mais-valia para as indústrias, não só pelo facto de não necessitarem do uso de solventes que são poluentes, reduzindo a sua pegada ecológica, mas também porque não estariam a colocar os operários em risco, ao manipular estas substâncias.

¹ Pictogramas adaptados de (ECHA - European Chemicals Agency)

² No caso dos métodos que ainda recorram a soluções com este constituinte.

8. Economia e Viabilidade

Hoje em dia, o NIRS é amplamente e prosperamente usado em muitos campos diferentes, como na medicina, no controlo de qualidade, na análise de alimentos, etc. A razão pela qual esta técnica é cada vez mais recorrida é o facto de ser associada a baixos custos e rapidez, dois pontos importantes para a indústria.

Quando se pretende implementar um método no NIRS, é necessário fazer o seu estudo, construir uma calibração onde o erro de previsão seja o mínimo possível e este fica pronto a ser utilizado. Economicamente, é uma grande vantagem face a outros métodos, pois, a partir do momento que o método está implementado no *software*, qualquer pessoa pode utilizar, não sendo necessário um técnico especializado. O método torna-se de uso tão fácil e acessível que qualquer pessoa pode usar e, aliado ao facto de cada análise demorar apenas entre 15 a 40 segundos, fica o candidato perfeito a substituir muitos dos métodos usados pela indústria.

O instrumento é operado por um computador, através de um programa de *software*, onde é possível ter acesso às mais recentes tecnologias de calibração com informações e com capacidade e habilidade de troca de dados, não necessitando a aquisição de novas actualizações por parte de fornecedores.

O preço dos equipamentos ronda entre os 50 000€ e os 70 000€ (Paula F. Costa), sendo necessário esse investimento inicial, assim como é feito para qualquer outro equipamento usado em laboratório. Como os aparelhos NIR carecem de uma verificação diária, a durabilidade destes aparelhos torna-se elevada, visto há um controlo regular. Assim, vendo de ponto de vista económico, tornar-se-ia interessante se as empresas aderissem a esta técnica, pois seria apenas lucrativo em todos os aspectos.

B- Materiais e Métodos

Toda a fase experimental do trabalho foi executada na Cipan, nos laboratórios de Investigação e Desenvolvimento.

As tarefas propostas provinham de problemas reais que a empresa necessitava de resposta. Assim, todos os procedimentos realizados seguiram as normas impostas pela empresa. Desde o registo de qualquer amostra que fosse analisada, ao processo envio e rotulagem de amostras para análise, tudo foi rastreado.

1. Sistema NIRS

Como foram tratados dois tipos de amostras (sólidas e líquidas), foram necessários dois equipamentos diferentes. Contudo, o modo de proceder é muito semelhante com os dois aparelhos.

1.1 Amostras sólidas

Os espectros foram adquiridos no equipamento de Espectroscopia de Infravermelho próximo FT-NIR da ABB Bomem Inc, série MB-160, número de série SZM480VE, equipado com um acessório de reflectância para amostras.

A fonte de luz é uma lâmpada de Quartzo-Halogéneo, captada por um detector de Índio-Gálio-Arsénio (InGaAs), fazendo com que o aparelho trabalhe numa larga gama espectral dos 4000 cm^{-1} aos 12000 cm^{-1} .

O seu funcionamento foi assegurado por um pacote de *software* designado por GRAMS/32 AI versão 6.01. O tratamento e pré-processamento dos espectros foram realizados no programa PLSplus/IQ 5.09. No final, o método foi implementado no programa AIRS professional. O tratamento estatístico para a calibração e validação foi elaborado no Excel, da Microsoft®

1.2 Amostras líquidas

Os espectros foram adquiridos no equipamento de Espectroscopia de Infravermelho próximo FT-NIR da ABB FTLA2000 Inc, série MB-160, número de série 1044659, equipado com um acessório de transmitância para amostras.

A fonte de luz é uma lâmpada de Quartzo-Halogéneo, captada por um detector de Índio-Gálio-Arsênio (InGaAs), fazendo com que o aparelho trabalhe numa larga gama espectral dos 4000 cm^{-1} aos 12000 cm^{-1} .

O seu funcionamento foi assegurado por um pacote de *software* designado por GRAMS/32 AI versão 7. O tratamento e pré-processamento dos espectros foram realizados no programa PLSplus/IQ 7. No final, o método foi implementado no programa AIRS professional, versão 3. O tratamento estatístico para a calibração e validação foi elaborado no Excel, da Microsoft®

2. Procedimento Experimental

À excepção da fermentação e do isolamento do produto da fermentação, todas as outras amostras analisadas eram produtos ou reagentes usados na Cipan. Uma vez obtidos, procedia-se à aquisição do seu espectro através do NIRS e o seu valor pelo método de referência.

Os parâmetros ópticos, para ambos os equipamentos, foram decididos consoante o tipo de amostra, i.e., o número de varrimentos, a resolução e o ganho eram diferentes para amostras sólidas e líquidas.

Tabela 3 – Condições de funcionamento dos equipamentos NIR

Tipo de amostra	Modo de funcionamento	Gama espectral (cm^{-1})	Nº varrimentos	Resolução (cm^{-1})	Ganho
Sólida	Reflectância	4500 - 12000	64	16	High B
Líquida	Transmitância	4500 - 12000	32	16	Low B

3. Materiais e Métodos de Referência

Dada a variedade de processos e amostras abrangidas neste trabalho e para uma melhor organização, subdividiu-se este ponto nos diferentes estudos realizados.

3.1 Composto A

As amostras do composto A são sólidas. Encontravam-se na forma de pó e foram colocadas no frasco de NIR, com um espalhamento no fundo uniforme, de forma a ter uma amostra homogénea. Aquando da aquisição dos espectros, as amostras eram enviadas para o Controlo de Qualidade para determinar o valor de humidade. O método usado era o **Karl-Fischer**.

Neste método, se nenhuma reacção lateral ocorrer, será apenas determinada a quantidade de água. O método demora uns minutos, pode ser validado e portanto, totalmente documentado. Desde a sua introdução há mais de 60 anos, o seu progresso tem sido uma conquista e em muitos laboratórios, é impossível trabalhar sem ele.

Com a titulação de KF quer livre ou ligada, a água pode ser determinada, como por exemplo, a água à superfície de cristais e água dentro deles. O método funciona através de uma vasta gama de concentrações de ppm até 100% e fornece resultados reprodutíveis e correctos.

O agente titulante é uma solução de iodo e a percentagem de humidade de uma amostra é calculada através do título e do volume de titulante gasto até ao ponto final de titulação. As reacções envolvidas na titulação de Karl-Fischer são:



(RN = Base)

3.2 Composto B

As amostras do composto B são líquidas. Foram colocadas no frasco de NIR, com um volume máximo de 1 mL. Aquando da aquisição dos espectros, as amostras eram enviadas para o Controlo de Qualidade para determinar o valor de humidade. O método usado, tal como para o composto A, era o **Karl-Fischer**.

3.3 Fermentação

As amostras resultantes da Fermentação são líquidas. Foram colocadas no frasco de NIR, com um volume máximo de 1 mL. Aquando da aquisição dos espectros, as amostras eram enviadas para o laboratório para determinar o valor do composto C e D. O método usado era a **Cromatografia Iónica**.

A cromatografia iónica é uma subdivisão da HPLC. Neste método a separação baseia-se em diferenças nas afinidades de permuta iónica dos analitos (Eith, 2001). Utiliza resinas de troca iónica para separar iões atómicos ou moleculares com base na sua interacção com a resina. A separação dos analitos é conseguida de forma isocrática ou por aplicação de gradiente. Uma das aplicações deste método é a análise de iões inorgânicos em várias matrizes como águas residuais ou caldos de fermentação (FCT - Departamento de Química - Cromatografia Iónica, 2014).

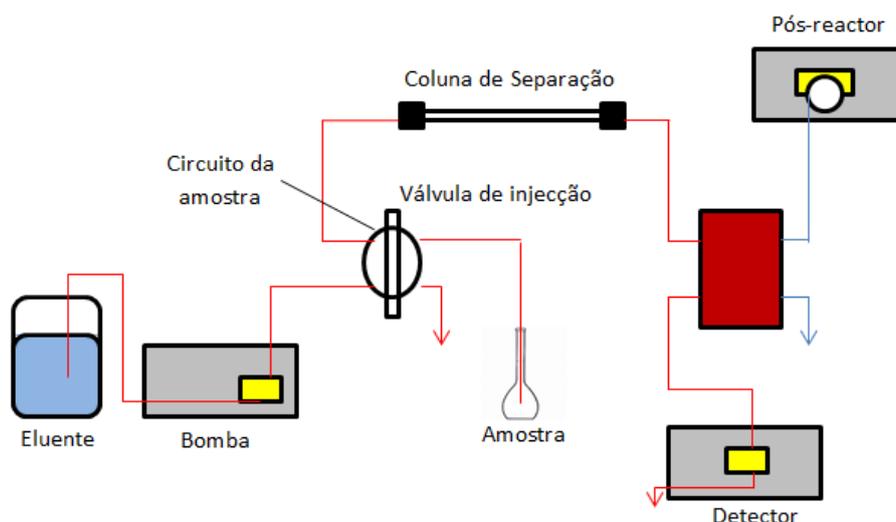


Figura 14 - Esquema representativo da cromatografia iónica. Adaptado de (Eith, 2001).

3.4 Isolamento/Concentração do produto da fermentação

As amostras resultantes do Isolamento do produto da fermentação são líquidas. Foram colocadas no frasco de NIR, com um volume máximo de 1 mL. Aquando da aquisição dos espectros, as amostras eram enviadas para o laboratório para determinar o valor do composto D. O método usado era a **Cromatografia Iónica**.

4. Tratamento dos Dados

Uma vez obtidos os dados espectrais e os dados analíticos, procedeu-se à sua análise segundo as etapas esquematizadas na Figura 15.

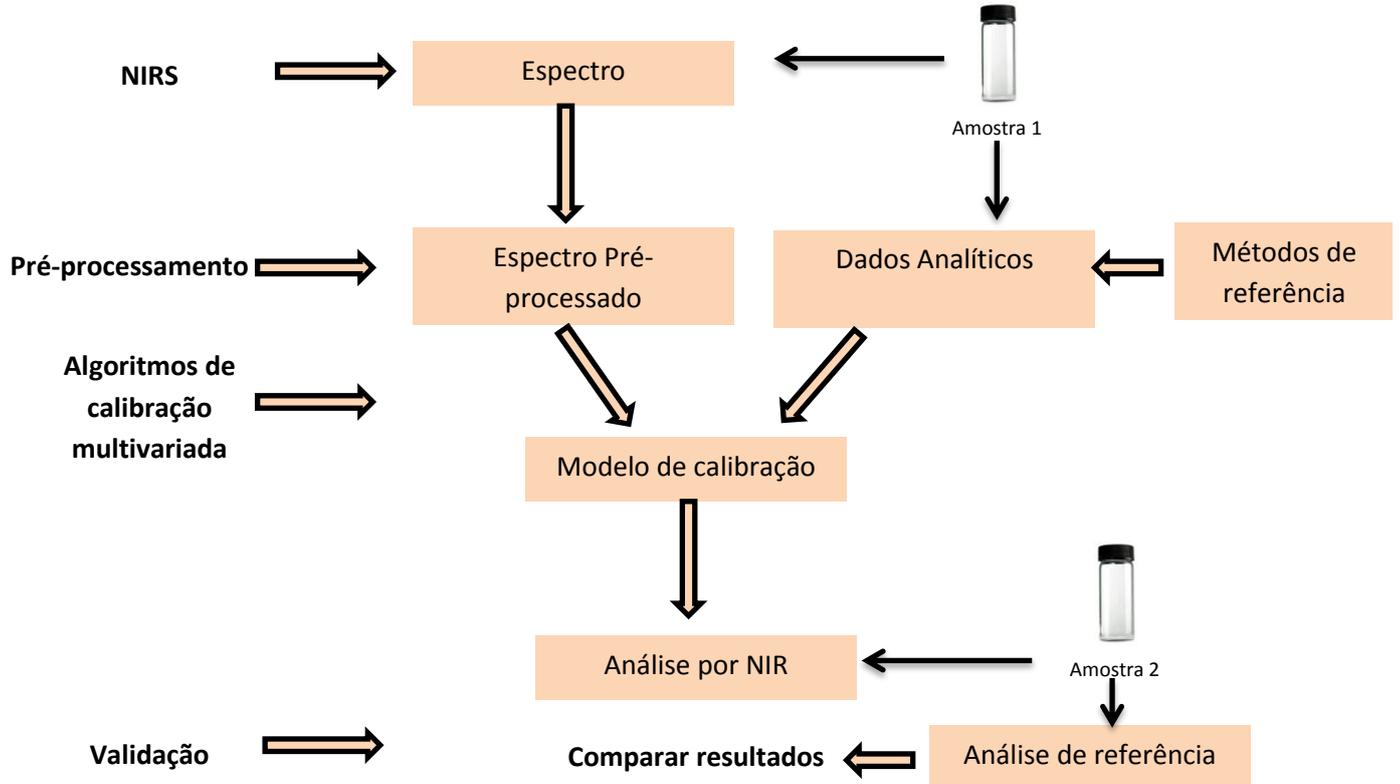


Figura 15 - Sequência de etapas envolvidas no processo de análise e desenvolvimento do modelo de calibração. Adaptado de (Costa, 2000).

Primeiramente procede-se ao pré-processamento dos espectros (correção da linha de base, correção do efeito da dispersão de luz, cálculo da primeira ou segunda derivada, selecção das melhores regiões espectrais) de forma a minimizar o ruído e realçar os sinais correspondentes aos parâmetros analíticos de interesse. Seguidamente estabelecem-se modelos de correlação entre os dados analíticos e espectrais, por aplicação de técnicas de calibração multivariada.

A avaliação dos modelos efectua-se por comparação entre os resultados obtidos por NIR e os originados pelo método de referência, nomeadamente no que se refere à capacidade preditiva, reprodutibilidade e rapidez.

C- Discussão de Resultados

O trabalho experimental pretende avaliar a potencialidade e versatilidade analítica da técnica de Espectroscopia de Infravermelho Próximo. Assim, como foram abordados diferentes problemas, optou-se por dividir o trabalho em quatro partes, de modo a simplificar a sua análise.

Na parte A trata-se do controlo da humidade no composto A, na parte B do controlo da humidade no composto B, a parte C da monitorização do substrato e produto resultantes de várias fermentações e a parte D do isolamento/concentração do produto das fermentações.

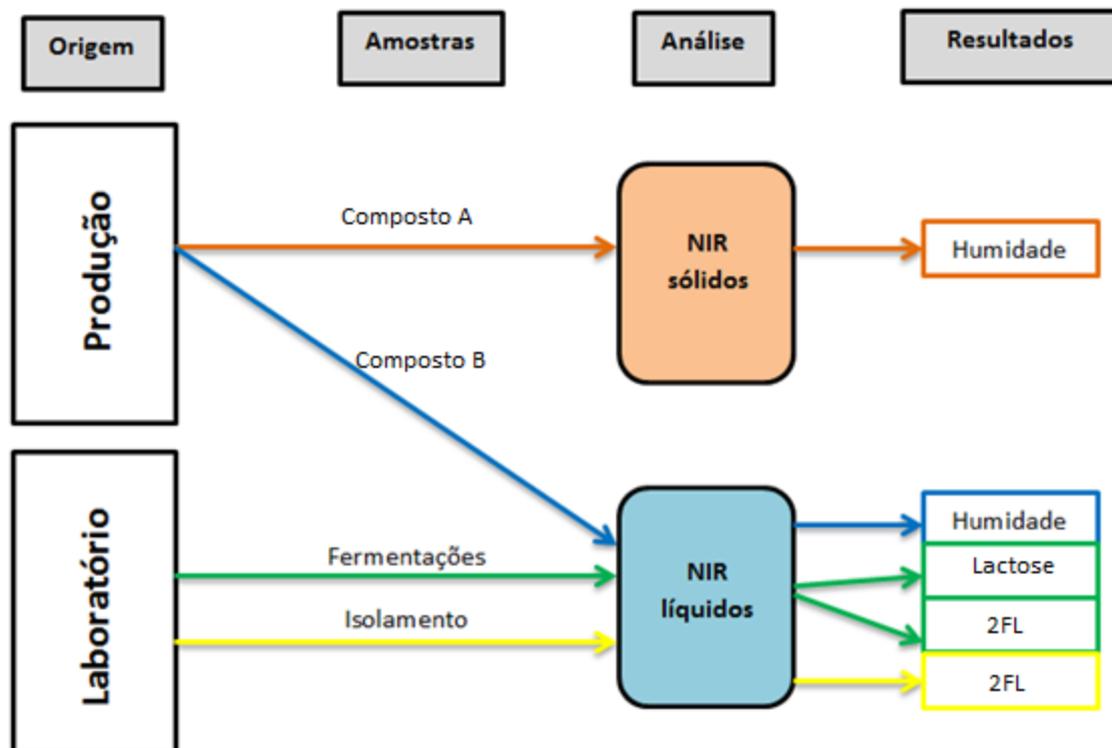


Figura 16 - Esquema representativo dos quatro trabalhos realizados com o NIR.

Parte A- Composto A

1. Introdução

1.1 A família do composto A

Apesar de já terem sido descobertas há várias dezenas de anos, continuam a ter um papel importante em terapia, visto serem antibióticos. (M.Manuela da Fonseca). Representam uma das mais importantes famílias farmacológicas e, tendo em conta o seu largo espectro de acção antibacteriano, são usadas como tratamento de primeira escolha nas infecções bacterianas causadas pela *Chlamydia*, a *Rickettsia*, entre outras (Cristina M. C. M. Couto, 1999). Um exemplo recente é o seu uso como um dos componentes de uma mistura para o tratamento de úlceras estomacais causadas por *Helicobacter pylori* (M.Manuela da Fonseca).

Além da sua utilidade terapêutica, a família do composto A têm um uso importante como matérias-primas de partida para a produção de antibióticos e semi-síntese. Por exemplo, a produção da A3 e de A4, que são antibióticos com melhores propriedades do que aqueles onde foram obtidos, a A1 e a A2 respectivamente (M.Manuela da Fonseca).

A descoberta do primeiro elemento da família do composto A foi em 1945 por Benjamin Duggar, a A5, que é um produto da fermentação natural da bactéria *Streptomyces aureofaciens* (Elene Cristina Pereira-Maia, 2009). A partir daí foram produzidas mais de 30 elementos naturais da família do composto A, especialmente isoladas de espécies de *Streptomyces*, incluindo a A2 em 1950 (*Streptomyces rimosus*) (M.Manuela da Fonseca).

Além destes elementos da família do composto A obtidas por fermentação, vários derivados desta série têm sido preparados por síntese química a partir dos elementos da família do composto A naturais.

1.2 Composto A

O composto A é um pó cristalino, amarelo e sem odor. É estável a temperatura ambiente, mas quando é exposto a luz solar muito forte, começa a escurecer. É ligeiramente solúvel em água, é solúvel em ácido diluído e em soluções alcalinas de hidróxido, ligeiramente solúvel em álcool e praticamente insolúvel em clorofórmio e éter.

Os elementos da família do composto A são principalmente bacteriostáticos e exercem o seu efeito antimicrobiano através da inibição da síntese de proteínas. São activos contra uma vasta gama de organismos gram-negativos e gram-positivos (M.Manuela da Fonseca). Os fármacos da classe do composto A têm aspectos antimicrobiano muito semelhantes e a resistência cruzada entres eles é comum.

- Espectro de acção

Recebem a classificação de antibióticos de amplo espectro de acção microbiana. Os elementos do composto A actuam sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas, clamídias, riquetsias e até mesmo alguns protozoários (M.Manuela da Fonseca).

- Mecanismo de acção

Os elementos da família do composto A agem inibindo a síntese proteica dos microrganismos sensíveis, ligando-se aos ribossomas. Estes fármacos impedem que o RNA-transportador (t-RNA) se fixe no ribossoma e, deste modo, a síntese proteica é inibida. São considerados antibióticos bacteriostáticos (detêm o crescimento) (M.Manuela da Fonseca).

1.3 Ficha de Segurança

- **Indicações de Perigo**

H315 – Provoca irritação cutânea

H319 – Provoca irritação ocular grave

H335 – Pode irritar as vias respiratórias

- **Indicações de Prevenção**

P261 – Evitar respirar o pó/fumo/gás/neblina/vapor/aerosol

P305 + P351 + P338 – Em caso de contacto com os olhos, enxaguar com água durante vários minutos.

- **Pictograma**



Figura 17 - Pictograma de perigo (atenção). Adaptado de (ECHA - European Chemicals Agency)

2. Parte experimental

A determinação da humidade nas matérias-primas e produtos intermediários é importante para os processos industriais. A água, como tem bandas bem definidas na região do Infravermelho Próximo, faz dela um dos melhores analitos para ser quantificado por esta técnica, em alternativa ao seu respectivo método de referência. Os métodos tradicionais para a determinação da humidade em produtos da indústria farmacêutica são baseados em perda de peso por secagem e titulação de Karl-Fischer. Contudo, cada um tem prós e contras em termos de exactidão, velocidade e facilidade de manuseamento. A perda de peso por secagem é limitada se os químicos forem instáveis a elevadas temperaturas ou se estiverem presentes espécies voláteis. A titulação de Karl-Fischer é demorada e usa reagentes tóxicos. Contudo, esse é o método usado pela Cipan para determinar a humidade deste composto.

Assim, foi desenvolvida esta técnica NIRS para a determinação da humidade no composto A, usando o método de referência Karl-Fischer. Para tal, usaram-se 79 amostras deste composto com uma gama de calibração entre 0.33% e 1.39%.

Para este API, a gama de calibração foi definida tendo por base as necessidades de controlo do processo. Todas as amostras foram obtidas da produção, sendo adquiridas em diferentes tempos de secagem, para que a variabilidade de valores fosse elevada.

2.1 Instrumentação

2.1.1 Espectroscopia NIR

Os espectros NIR foram adquiridos utilizando um espectrofotómetro ABB Bomem Inc, MB Series FT-NIR modelo MB-160, no intervalo de comprimento de onda entre os 12000 cm^{-1} e os 4500 cm^{-1} , com uma resolução espectral de 16 cm^{-1} , a uma temperatura de 25°C . Cada espectro obtido é a média de 64 varrimentos e com um ganho em High B. O espectrofotómetro vem equipado com um acessório de suporte para amostras sólidas com módulo de reflectância, fonte de radiação térmica policromática, produzida por uma lâmpada de Quartz-Halogénio e um detector de índio-Arsénio (InAs). As amostras são colocadas sobre o acessório de suporte de amostras sólidas em frascos cilíndricos.

2.1.2 Técnica Instrumental de referência – Método de Karl-Fischer

A humidade do composto A foi determinada por titulação volumétrica de Karl-Fischer. Este método é usado para a determinação do teor de água em amostras. O material usado foi:

- Bureta automática, Metrohm, modelo 701 KF Titrino
- Balança analítica, Mettler, modelo AG285
- Placa de agitação magnética com bomba de resíduos, Metrohm, modelo 703 Ti Stand
- Eléctrodo de Platina, Metrohm
- Célula de titulação 250 mL, Metrohm

2.1.3 Programas para aquisição dos espectros

Os espectros NIR e os dados de referência das amostras foram tratados pelos programas informáticos da Galactic:

- Grams 32/AI 7.0 – Programa que permite a aquisição dos espectros e a sua visualização, aplicando os pré-tratamentos espectrais mais habituais.
- AIRS PHARMA 3.0 com o PLSPLUS/IQ – Programa que permite desenvolver calibrações de modo a obter os métodos de análise pretendidos. Permite trabalhar com conjuntos de dados multivariáveis e incorpora os algoritmos quimiométricos mais comuns. Foi utilizado para aplicar os pré-tratamentos espectrais, realizar análises de componentes principais (PCA) e calcular regressões por mínimos quadrados parciais (PLS).

Procedeu-se à validação dos modelos obtidos, cumprindo os requerimentos da Farmacopeia Europeia, Farmacopeia Americana, ICH e EMA.

3. Discussão dos resultados

3.1 Desenvolvimento do Método

Observando o comportamento espectral do composto A com diferentes conteúdos de água, é possível correlacionar este parâmetro com as regiões espectrais onde as absorções são mais notáveis. A figura 18 apresenta dois espectros do composto A com diferentes conteúdos de água, onde é possível observar diferenças de absorção na região entre os 7100 cm^{-1} e os 4900 cm^{-1} , sendo mais notável perto dos 5000 cm^{-1} . Essa zona corresponde às bandas de absorção da água. É também notável que a amostra superior tem partículas mais grosseiras, pois apresenta uma maior absorvância, logo a linha de base é superior.

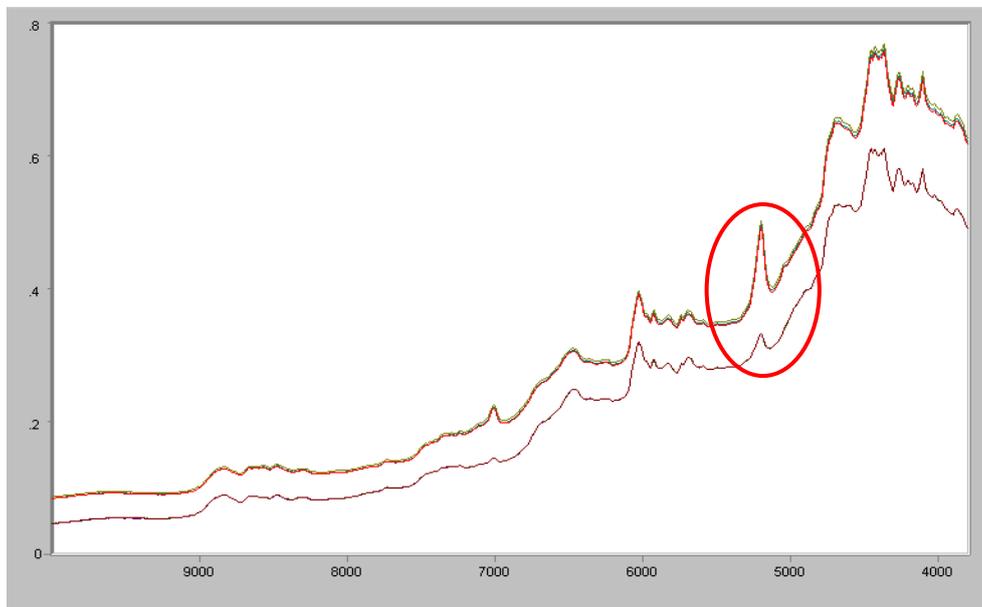


Figura 18 - Espectros de duas amostras do composto A com diferentes teores de humidade.

Primeiramente deve ser analisada a existência de padrões nos dados. Ao utilizar a PCA nos espectros adquiridos para a calibração, após os pré-processamentos, não foram encontradas diferenças entre as amostras da produção. A projecção gráfica do *score 1* vs *score 2* permite verificar a existência de agrupamentos e a natureza dos mesmo. Pela análise da figura 19, os pontos encontram-se todos concentrados num intervalo, o que prova que todas as amostras são o composto A, pois existe uma classe bem definida. As amostras mais afastadas (localizadas nas extremidades) correspondem a *outliers*.

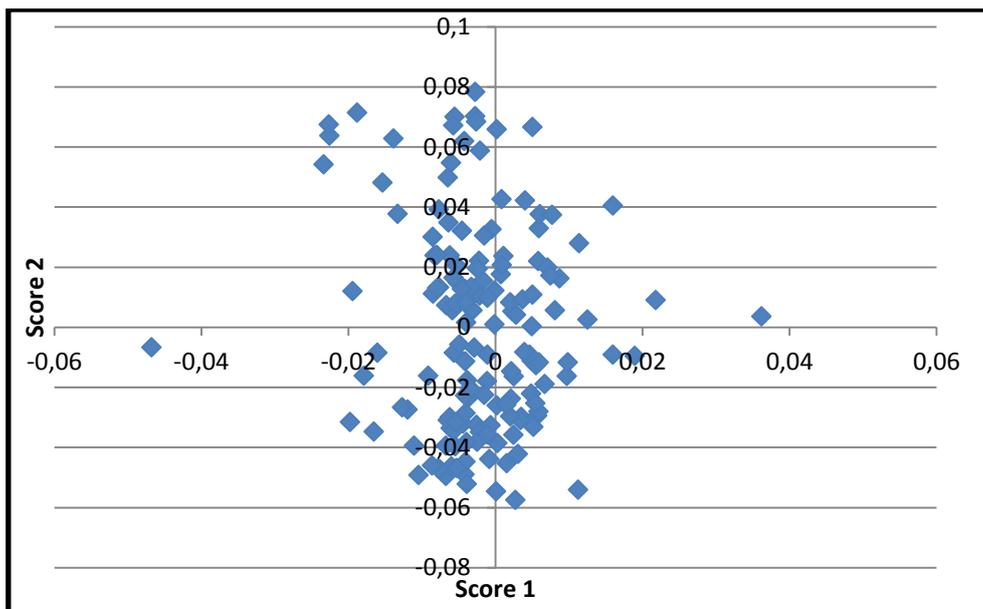


Figura 19 – Análise de PCA das amostras de calibração para o composto A.

O modelo de calibração usa o algoritmo dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS) e, de modo a obter uma calibração adequada, foram desenvolvidos vários modelos que combinavam diferentes regiões espectrais e técnicas de pré-processamento. Para o modelo de calibração, o R^2 e o SECV foram obtidos, permitindo uma primeira avaliação da capacidade preditiva do modelo.

O modelo de calibração escolhido usa o tipo de calibração PLS-1, combinado com o tipo de diagnóstico Cross Validation, a preparação de dados foi Mean Center, a correção do percurso óptico foi MSC e a região espectral usada foi entre os 9000 cm^{-1} e os 3800 cm^{-1} .

Na tabela 4 é mostrado a estatística para o modelo de calibração.

Tabela 4 – Resultados do modelo de calibração PLS desenvolvido para a determinação da humidade do composto A

Pré-Processamento	Gama espectral (cm^{-1})	Factores	R^2	SECV/RMSEE (%)
MSC+MC	9000-3800	18	0,992	0,03

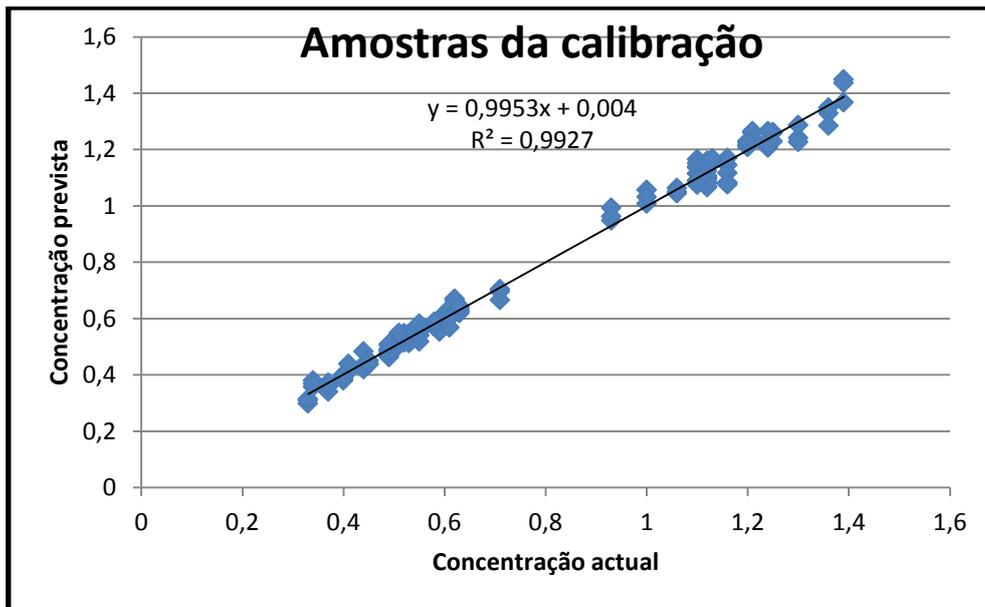


Figura 20 - Concentração Prevista vs Concentração Actual para o composto A.

A figura 20 mostra a calibração com uma boa correlação. Para se obter um valor de R^2 tão perto de 1, quatro amostras foram eliminadas (*outliers*) do total das amostras de calibração. Essas amostras eram facilmente detectadas, pois tinham valores de humidade diferentes dos outros, o que fazia com que se afastassem muito da recta de calibração, tornando o coeficiente de correlação menor. A causa pode dever-se com a aquisição dos espectros com o NIRS ou um erro nas medições do método de referência ou então as amostras foram, de facto, retiradas da produção com esses valores de humidade.

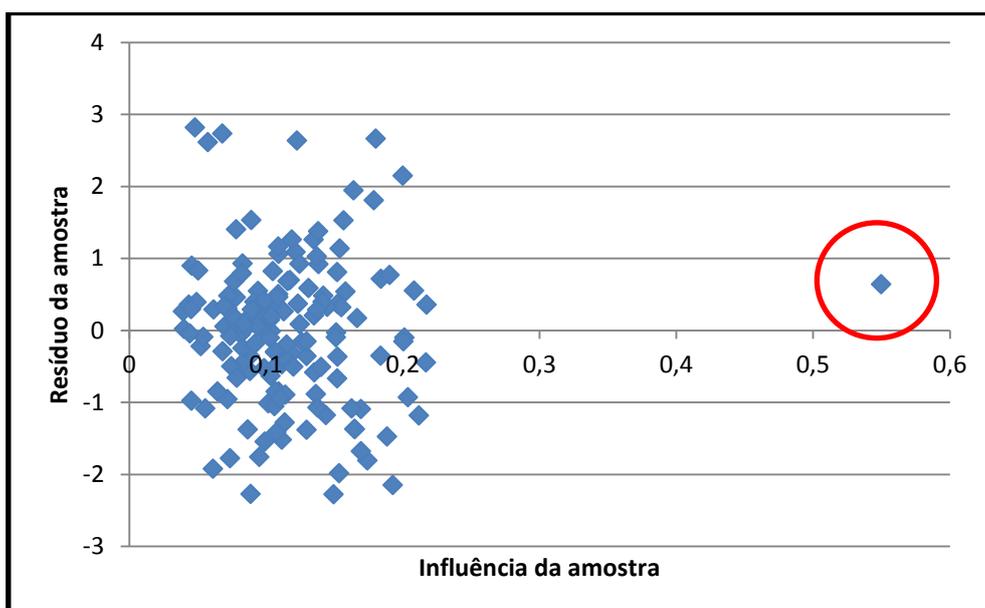


Figura 21 - Resíduo da amostra vs Influência da amostra para as amostras do composto A.

Para certificar a existência de *outliers*, existem dois critérios que podem ser seguidos. Contudo, deve verificar-se de uma forma geral se as amostras apontadas por estes critérios influenciam de facto a calibração, isto é, se os valores são de mesmo *outliers* ou apenas ligeiramente diferente dos restantes, não variando em quase nada o valor da correlação.

O primeiro critério, “leverage”, pode ser considerado como um parâmetro de influência, associado à distância existente entre os espectros e o centróide definido para o conjunto de espectros de calibração. Este parâmetro apresenta um valor limite definido pela expressão $3p/n$, onde p representa o número de componentes principais utilizadas no desenvolvimento do modelo e n o número de amostras de calibração. As amostras que apresentem um valor superior devem ser desprezadas.

$$\frac{3 \times 18}{165} = 0,327$$

O segundo critério utilizado é representado pelo valor dos resíduos de Student. Considerando-se uma distribuição normal dos resíduos, dentro de um limite de confiança de 95%, o valor máximo estabelecido para este parâmetro corresponde a $\pm 2,5$. Este critério não necessita de ser seguido rigorosamente, visto que apenas se baseia na interpretação de um gráfico. É necessário confrontar os possíveis outliers provenientes da análise gráfica de Studentized Residuals vs Sample Leverage com o gráfico da Previsão da concentração vs Concentração actual.

Também algumas amostras com um Studentized residuals ligeiramente acima dos $\pm 2,5$ poderiam ser considerados outliers, mas como se encontram na curva de calibração (figura 20) e a sua influência na amostra (sample leverage) é baixa, não há a necessidade de serem removidos.

Assim, as características do método final são:

- 153 espectros, de 51 amostras;
- Pré-Processamento: PLS-1, MSC e Mean Centering
- 18 factores usados na caracterização dos principais componentes das amostras;
- Intervalo de concentração de 0,33% a 1,39%. A especificação do composto A é $\leq 2\%$;
- O factor de correlação e o erro estimado: $R^2 = 0,992$ e $SECV = 0,03\%$.

3.2 Validação do Método

Uma vez que a calibração foi desenvolvida e as previsões dos valores foram favoráveis, é necessário a validação do método para ser aceite para uso em rotina.

O método foi validado para provar que cumpre a sua finalidade, através da determinação de vários parâmetros recomendados por diferentes *guidelines*: especificidade, exactidão, precisão (repetibilidade e precisão intermédia), linearidade e gama de trabalho, robustez e a validação externa.

3.2.1 Especificidade

É a capacidade de avaliar de forma inequívoca o analito na presença de componentes que podem ser esperados estarem presentes.

O método NIRS deve ser selectivo para o parâmetro e específico para a matriz da amostra. O primeiro passo para avaliar a selectividade foi o estudo dos espectros da amostra e a presença do parâmetro analítico a ser medido nos espectros (figura 20).

Tabela 5 – Testes de especificidade para diferentes amostras

<i>Amostra</i>	<i>Distância de Mahalanobis</i>	<i>Concentração (%)</i>	<i>Testes Limite</i>
7HT	15603857	33864791	Falhou
Lime	17050939	35169586	Falhou
Mino	-3104884	34178111	Falhou
DOT-B	-12781835	33181407	Falhou

Através dos valores da tabela, é fácil de observar que o método é apenas específico para o composto A, porque confrontado a calibração construída com outras amostras (outros compostos), os valores da Distância de Mahalanobis e da concentração são muito elevados, ou seja, não pertencem ao intervalo de calibração. Os testes limite realizados pelo *software* para estas 4 amostras falharam, o que realça a ideia da especificidade do método.

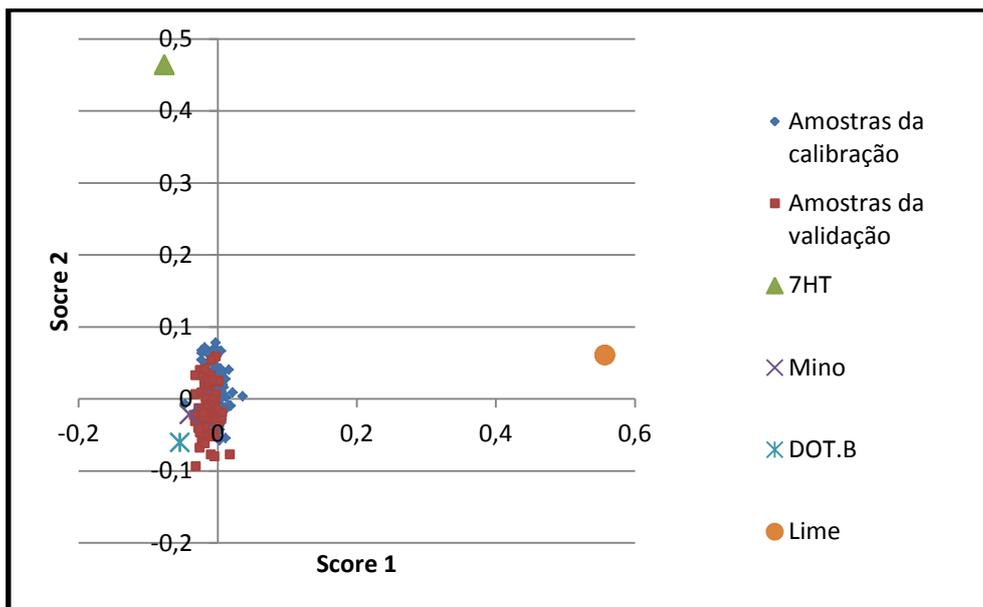


Figura 22 - Análise PCA para todas as amostras (calibração, validação e quatro amostras extra).

As amostras de 7HT e Limeciclina estão distantes das restantes amostras, o que torna claro que o método não é aplicável para este tipo de composto. Contudo, para Minociclina e DOT.B, as amostras encontram-se próximas das amostras de calibração e validação. Com os parâmetros na tabela 5, para as quatro amostras, os valores da Distância de Mahalanobis e de Concentração são muito elevados, o que prova que, apesar de estarem perto das restantes amostras, o método não reconhece as “amostras extra” mostrando valores elevados nos parâmetros.

3.2.2 Linearidade e Gama de trabalho

A linearidade de um procedimento analítico é a capacidade (dentro de um intervalo definido) de obter resultados que são directamente proporcionais à concentração do analito da amostra, e a gama é o intervalo entre o valor mais alto e o valor mais baixo de concentração do analito na amostra, para o qual tem de ser demonstrado que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exactidão e linearidade.

A linearidade do método foi avaliada por um teste de regressão entre o método de NIRS desenvolvido e o método de referência, na gama escolhida para o método.

A humidade foi medida em triplicado pelo método de NIRS, em diferentes amostras, a regressão linear foi executada e os intervalos de confiança associados para a intercepção e para o declive foram calculadas.

O critério de aceitação é baseado no acordo de resultados avaliados pela seguinte equação:

$$y = bx + a$$

Sendo o y o valor previsto pelo NIR, x o valor obtido pelo método de referência, a a intercepção e b o declive. A equação da regressão é mostrada na figura 23.

Para ser considerada linear:

- O intervalo de confiança associado à intercepção (I.C._a): $a \pm S_a \cdot t$ deve conter o valor zero;
- O intervalo de confiança associado ao declive (I.C._b): $b \pm S_b \cdot t$ deve conter o número 1;

S_a é o desvio padrão da intercepção, S_b é o desvio padrão do declive e t o valor tabelado de acordo com o grau de confiança desejado e $n-2$ graus de liberdade (n é o número de determinações das amostra).

Tabela 6 – Parâmetros da regressão para a verificação da linearidade

	<i>Abaixo 95%</i>	<i>Acima 95%</i>
Intercepção	-0,061	0,0099
Variável X	0,953	1,059

A intercepção contém o valor zero ($-0,061 < 0 < 0,0099$) e o declive contém o valor um ($0,953 < 1 < 1,059$).

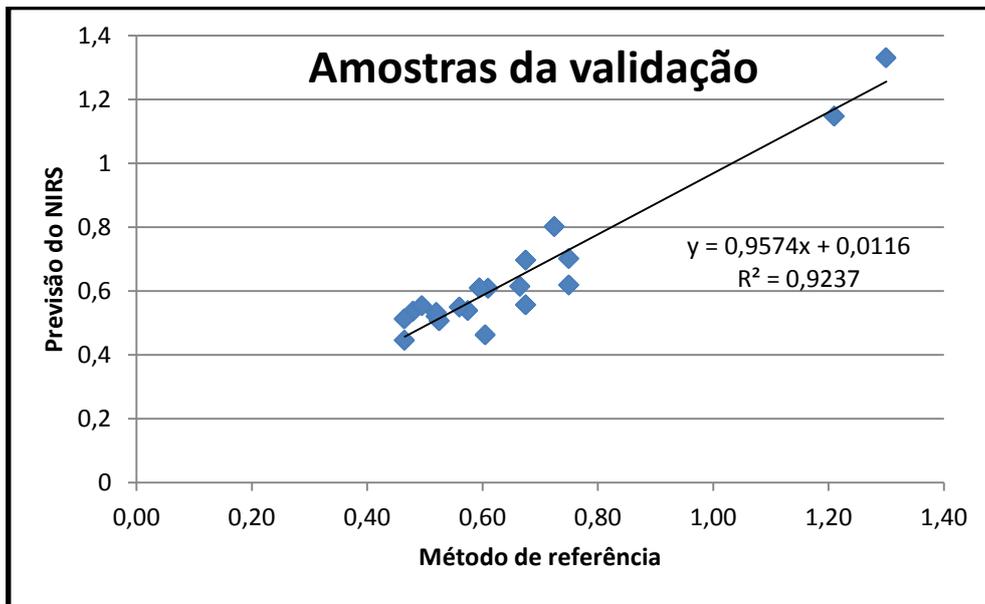


Figura 23 - Valores de humidade pelo método de referência versus os valores previstos pelo NIR para as amostras do composto A.

O método NIRS desenvolvido demonstrou ser linear quando comparado com o método de referência, dentro das gamas de concentração.

3.2.3 Exactidão

A exactidão de um método analítico expressa-se pelo grau de concordância entre o valor que é aceite e o valor que é considerado verdadeiro.

A exactidão pode ser estudada pela determinação do Erro Padrão de Previsão (SEP) e comparação do seu valor com a precisão do método de referência, denominado de Erro Padrão de Laboratório (SEL), como foi feito com a validação externa.

Os valores de humidade das amostras A e B foram medidos em dias diferentes pelo NIRS e o método de referência. O valor de SEL calculado foi de 0,171% e o valor de SEP (calculado com todas as amostras) foi de 0,087%. Verificando a condição $SEP_{NIR} \leq 1,4 \times SEL$, o valor é de 0,240, o que confirma que o NIRS é exacto.

3.2.4 Precisão

A precisão de um método analítico é o grau de concordância entre resultados de testes individuais quando o método é aplicado repetidamente a várias amostragens de uma amostra homogénea. Esta foi avaliada em dois níveis: **repetibilidade** e **precisão intermédia**.

Repetibilidade

Expressa a precisão sobre as mesmas condições de operação num curto período de tempo.

A repetibilidade do método foi avaliada medindo a humidade numa amostra homogénea, seis vezes, em dois dias, com os dois métodos, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento. Primeiro, é calculado o PG (baseado no cálculo do rácio das variâncias dos dois métodos) e depois é comparado com o F (teste f para a variância de duas amostras). Se $PG \leq F$, então não há diferenças estatísticas significativas entre os dois métodos.

Tabela 7 – Valores de PG e F para o teste das duas amostras

	<i>Amostra A</i>	<i>Amostra B</i>
PG – Dia 1	0,38	4
PG – Dia 2	1	1
F	5,05	

Como o valor de PG é menor que o de F (em ambos os dias), os métodos não são estatisticamente diferentes.

Precisão Intermédia

A precisão intermédia expressa as variações dentro do laboratório: dias diferentes, analistas diferentes, equipamentos diferentes, etc.

A precisão intermédia foi avaliada pela medição da humidade numa amostra homogénea, seis vezes, mas em dois dias diferentes, por dois analistas diferentes usando o mesmo equipamento. Os resultados estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 – Resultados da precisão intermédia (S_i – Desvio padrão da precisão intermédia; RSD – Desvio padrão relativo)

<i>Amostra</i>	<i>Método</i>	S_i	<i>RSD</i>
A	NIR	0,03	2,3
	M.Ref	0,03	2,3
B	NIR	0,04	3,3
	M.Ref	0,02	1,9

Para a amostra A, a precisão intermédia é igual em ambos os métodos, contudo, para a amostra B o desvio-padrão da precisão intermédia é relativamente superior para o método NIR. A diferença entre os métodos é tão pequena que não é preocupante, isto é, torna-se possível dizer que o método NIR é tão preciso como o método de referência.

3.2.5 Robustez

A robustez de um procedimento analítico é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas variações nos parâmetros do método, fornecendo uma indicação da sua fiabilidade em condições normais de uso.

O longo tempo de desenvolvimento e o uso de um largo número de amostras introduz variabilidade natural e robustez no método.

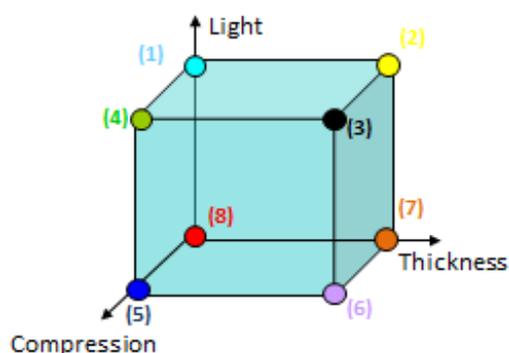
O factor que pode afectar maioritariamente a robustez do método é aquele inerente ao equipamento. As condições de funcionamento são verificadas diariamente através de um teste de performance operacional e as condições ambientais são mantidas estáveis.

Tabela 9 – Parâmetros a estudar

<i>Parâmetros a estudar</i>	<i>Valor</i>			
Luz – Ganho do detector	+	High C	-	High A
Espessura da amostra	+	Alta	-	Baixa
Compressão da amostra	+	Sim	-	Não

Com a mesma amostra, foram criadas oito novas onde se variou três parâmetros (luz, espessura da amostra e compressão da amostra) e guardou-se as suas humidades para comparar qual dos três tem maior importância para as amostras.

Tabela 10 – Parâmetros estudados



<i>Amostra</i>	<i>Luz</i>	<i>Espessura</i>	<i>Compressão</i>
1	High C	Baixa	Baixa
2	High C	Alta	Baixa
3	High C	Alta	Alta
4	High C	Baixa	Alta
5	High A	Baixa	Alta
6	High A	Alta	Alta
7	High A	Alta	Baixa
8	High A	Baixa	Baixa

Figura 24 - Parâmetros a estudar para as 8 amostras.

Tabela 11 – Efeitos dos parâmetros estudados

<i>Parâmetros a estudar</i>	<i>t_{calculado}</i>	<i>Efeito</i>
Luz – Ganho do detector	2,625	Significativo
Espessura da amostra	0,199	Insignificativo
Compressão da amostra	0,088	Insignificativo

Após os cálculos, é facilmente perceptível que o ganho do detector (luz) é o parâmetro mais importante, porque o $t_{calculado}$ é maior que o $t_{tabelado}$ (2,365). A aquisição dos espectros com o ganho High A ou High C faz muita diferença. A má escolha deste parâmetro no início da aquisição dos espectros pode comprometer todo o trabalho. Contudo, a espessura e a compressão da amostra também devem ser controladas, porque apesar de terem um $t_{calculado}$ mais baixo que o $t_{tabelado}$, podem também afectar a aquisição dos espectros.

3.2.6 Validação Externa

Após a validação interna cruzada realizada pelo *software*, o método foi testado contra um conjunto de dados independentes das amostras de validação, que não foram usadas para gerar o método, desde que não excedam os extremos da gama de calibração. A validação externa é usada para verificar a exactidão, precisão e robustez do método ao longo do tempo.

Durante a validação externa, o Erro Padrão de Previsão (SEP) é calculado e comparado com o valor do Erro Padrão de Laboratório (SEL) que foi determinado durante a validação do método de referência.

O critério de aceitação é definido pelo guia EMA, através da equação $SEP_{NIR} \leq 1,4 \times SEL$.

Na tabela 12 estão presentes os parâmetros de validação externa.

Tabela 12 – Parâmetros da validação externa

Espectro usado	23
SEP (%)	0,087
SEL (%)	0,171
1.4 × SEL (%)	0,240

Os testes de validação realizados depois da selecção do modelo confirmaram que o modelo é apropriado que o seu propósito.

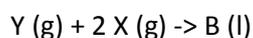
Parte B – Composto B

1. Introdução

1.1 Composto B

O composto B é o composto químico mais simples da sua família. Quando puro, consiste num líquido incolor, inflamável, de odor agradável, muito tóxico e miscível com a água. Possui um ponto de ebulição de 64,7°C e o ponto de fusão de - 97,8°C (CETESB, 2012).

Obtém-se sinteticamente a partir do Y e do X a uma pressão de 200 bar e a uma temperatura de 380°C na presença de catalisadores, segundo a reacção química:



1.2 Ficha de Segurança

- **Indicações de Perigo**

H225 Líquido e vapor facilmente inflamáveis.

H331 Tóxico por inalação.

H311 Tóxico em contacto com a pele.

H301 Tóxico por ingestão.

H370 Afecta os órgãos

- **Indicações de Prevenção**

P210 Manter afastado do calor/faísca/chama aberta/superfícies quentes. Não fumar.

P260 Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.

P301+P310 Em caso de ingestão: contacte imediatamente um Centro de Informação antivenenos ou um médico.

P302+P352 Se entrar em contacto com a pele: lavar com sabonete e água.

Pictograma



Figura 25 - Pictogramas de perigo (Inflamável, tóxico e inalação. Adaptado de (ECHA - European Chemicals Agency).

2. Parte experimental

Foi desenvolvida esta técnica NIRS para a determinação da humidade no composto B, usando o método de referência Karl-Fischer. Para tal, foram usadas 27 amostras deste solvente com uma gama de calibração entre 0.02% e 1.8%.

Para este solvente, a gama de calibração foi definida tendo por base as especificações impostas pela Cipan. Todas as amostras foram obtidas do Controlo de Qualidade, sendo adquiridas diferentes lotes e autotanques, para que a variabilidade de valores fosse elevada.

2.1 Instrumentação

2.1.1 Espectroscopia NIR

Os espectros NIR foram adquiridos utilizando um espectrofotómetro FT-NIR modelo FTLA2000-160 da ABB no intervalo de comprimento de onda entre os 12000 cm^{-1} e os 4500 cm^{-1} , com uma resolução espectral de 16 cm^{-1} , a uma temperatura de 25°C. Cada espectro obtido é a média de 32 varrimentos e com um ganho em Low B. O espectrofotómetro vem equipado com um acessório de suporte para amostras líquidas com módulo de transmitância, fonte de radiação térmica policromática, produzida por uma lâmpada de Quartz-Halogénio e um detector de índio-Arsénio (InAs).

As amostras são colocadas sobre o acessório de suporte de amostras líquidas em frascos cilíndricos de 1mL.

2.1.2 Técnica Instrumental de referência – Método de Karl-Fischer

A humidade do composto B foi determinada por titulação volumétrica de Karl-Fischer. Este método é usado para a determinação do teor de água em amostras. O material usado foi:

- Bureta automática, Metrohm, modelo 701 KF Titrino
- Balança analítica, Mettler, modelo AG285
- Placa de agitação magnética com bomba de resíduos, Metrohm, modelo 703 Ti Stand
- Eléctrodo de Platina, Metrohm
- Célula de titulação 250 mL, Metrohm

2.1.3 Programas para aquisição dos espectros

Os espectros NIR e os dados de referência das amostras foram tratados pelos programas informáticos da Galatic:

- Grams 32/AI 7.0 – Programa que permite a aquisição dos espectros e a sua visualização, aplicando os pré-tratamentos espectrais mais habituais.
- AIRS PHARMA 3.0 com o PLSPLUS/IQ – Programa que permite desenvolver calibrações de modo a obter os métodos de análise pretendidos. Permite trabalhar com conjuntos de dados multivariáveis e incorpora os algoritmos quimiométricos mais comuns. Foi utilizado para aplicar os pré-tratamentos espectrais, realizar análises de componentes principais (PCA) e calcular regressões por mínimos quadrados parciais (PLS).

Procedeu-se à validação dos modelos obtidos, cumprindo os requerimentos da Farmacopeia Europeia, Farmacopeia Americana, ICH e EMA.

3. Discussão dos resultados

3.1 Desenvolvimento do Método

Observando o comportamento espectral do composto B com diferentes conteúdos de água, é possível correlacionar este parâmetro com as regiões espectrais onde as absorções são mais notáveis. A figura 26 apresenta dois espectros do composto B com diferentes conteúdos de água, onde é possível observar diferenças de absorção na região entre os 7100 cm^{-1} e os 4900 cm^{-1} , sendo mais notável perto dos 5000 cm^{-1} . Essa zona corresponde as bandas de absorção da água, como já foi mencionado. O espectro superior corresponde à amostra onde a quantidade de água é maior

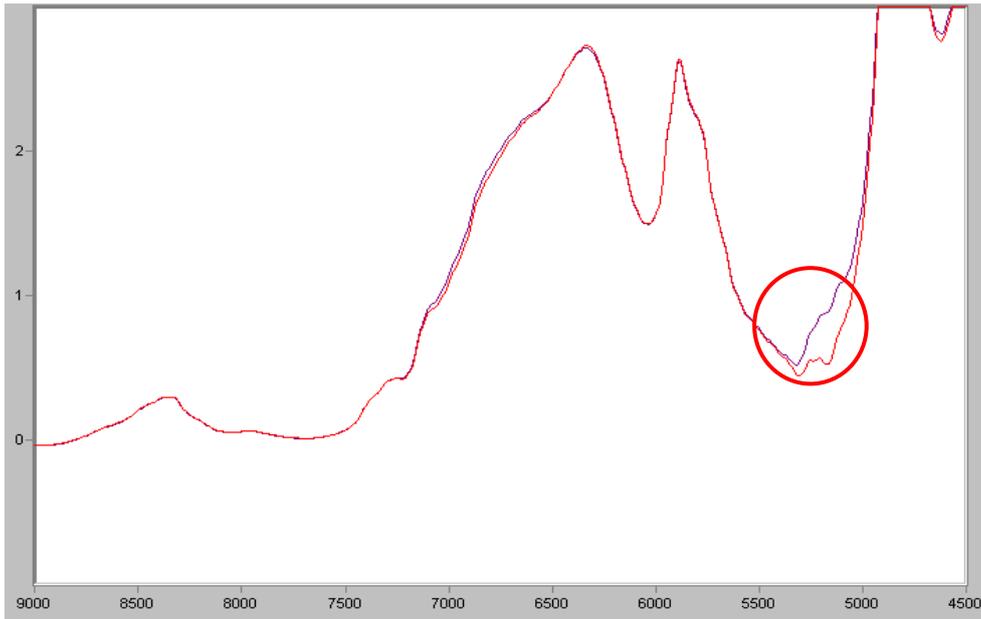


Figura 26 - Espectros de duas amostras do composto B com diferentes teores de humidade.

Primeiramente deve ser analisada a existência de padrões nos dados. Ao utilizar a Análise de Componentes Principais (PCA) nos espectros adquiridos para a calibração, após os pré-processamentos, foram encontradas diferenças entre as amostras. A projecção gráfica do *score 1* vs *score 2* permite verificar a existência de agrupamentos e a natureza dos mesmo. Pela análise da figura 27, verifica-se a existência de uma classe (de notar que a escala encontra-se muito ampliada), o que significa que todas as amostras são o mesmo solvente, o composto B.

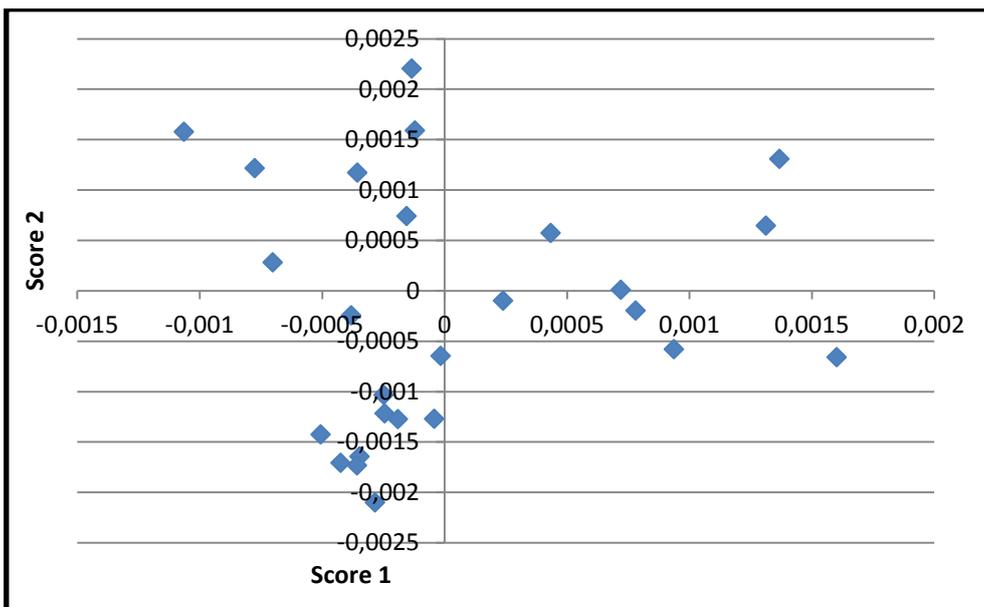


Figura 27 - Análise de PCA para as amostras do composto B.

O modelo de calibração usa o algoritmo dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS) e, de modo a obter uma calibração adequada, foram desenvolvidos vários modelos que combinavam diferentes regiões espectrais e técnicas de pré-processamento. Para o modelo de calibração, o R^2 e o SECV foram obtidos, permitindo uma primeira avaliação da capacidade preditiva do modelo.

O modelo de calibração escolhido usa o tipo de calibração PLS-1, combinado com o tipo de diagnóstico Cross Validation, a preparação de dados foi Mean Center, a correcção do percurso óptico foi Normalize e a região espectral usada foi entre os 12000 cm^{-1} e os 4500 cm^{-1} .

Na tabela 13 é mostrado a estatística para o modelo de calibração.

Tabela 13 – Resultados do modelo de calibração PLS desenvolvido para a determinação da humidade do composto B

Pré-Processamento	Gama espectral (cm^{-1})	Factores	R^2	SECV/RMSEE (%)
MC+Norm	12000-4500	10	0,999	0,008

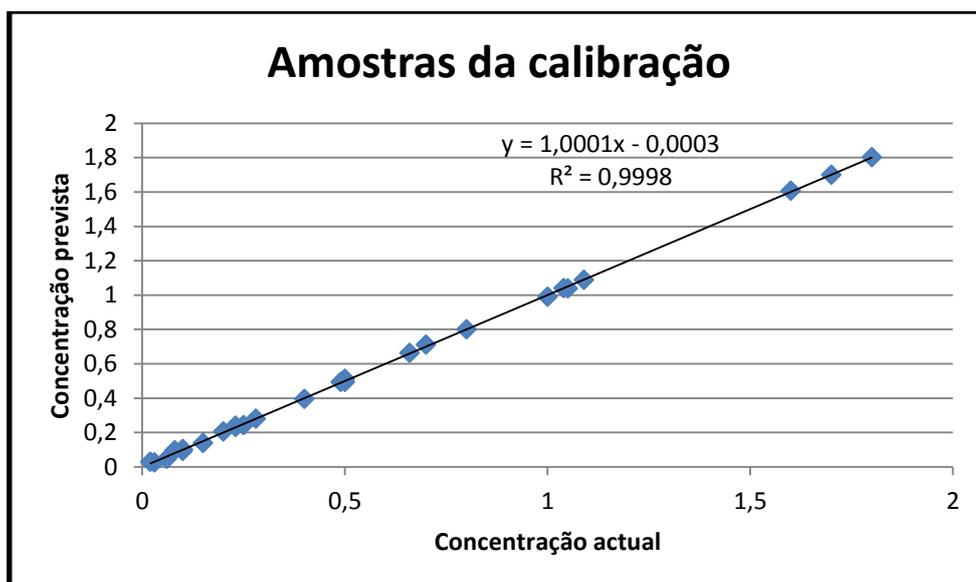


Figura 28 - Concentração Prevista vs Concentração Actual para o composto B.

A figura 28 mostra a calibração com uma boa correlação. Para se obter um valor de R^2 tão perto de 1, algumas amostras tiveram de ser removidas. A razão da exclusão foi porque ao confrontar os espectros com o seu respectivo valor de humidade, apresentavam grandes desvios na recta de calibração. A causa pode dever-se com a aquisição dos espectros com o NIRS ou um erro nas medições do método de referência.

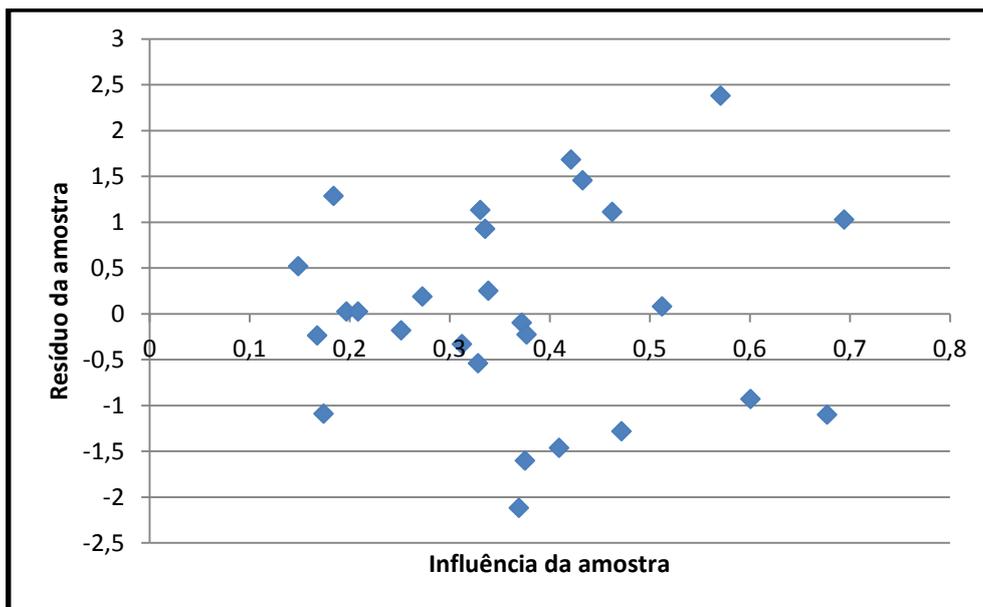


Figura 29 - Resíduo da amostra vs Influência da amostra para as amostras em estudo.

Para certificar a existência de outliers, segundo o **primeiro critério**, “leverage”, as amostras que apresentem um valor superior ao calculado em seguida, devem ser desprezadas.

$$\frac{3 \times 10}{27} = 1,11$$

O **segundo critério** utilizado é representado pelo valor dos resíduos de Student, onde esse valor não deve ultrapassar os $\pm 2,5$. Este critério não necessita de ser seguido rigorosamente, visto que apenas se baseia na interpretação de um gráfico. É necessário confrontar os possíveis outliers provenientes da análise gráfica de Studentized Residuals vs Sample Leverage com o gráfico da Previsão da concentração vs Concentração actual.

Segundo este dois critérios, nenhuma amostra necessita de ser removida, pois o “leverage” máximo não ultrapassa os 0,7 e os resíduos de Student são abaixo de $\pm 2,5$

As características do método final são:

- 27 espectros, de 27 amostras;
- Pré-Processamento: PLS-1, com Mean Centering e Normalize;
- 10 factores usados na caracterização dos principais componentes das amostras;
- Intervalo de concentração de 0,02% a 1,8%. A especificação do composto B é $\leq 0,3\%$;
- O factor de correlação e o erro estimado: $R^2 = 0,999$ e $SECV = 0,008\%$.

3.2 Validação do Método

Uma vez que a calibração foi desenvolvida e as previsões dos valores foram favoráveis, é necessário a validação do método para ser aceite para uso em rotina.

O método foi validado para provar que cumpre a sua finalidade, através da determinação de vários parâmetros recomendados por diferentes *guidelines*: especificidade, exactidão, precisão (repetibilidade e precisão intermédia), linearidade e gama de trabalho, robustez e a validação externa.

3.2.1 Especificidade

É a capacidade de avaliar de forma inequívoca o analito na presença de componentes que podem ser esperados estarem presentes.

O método NIRS deve ser selectivo para o parâmetro e específico para a matriz da amostra. O primeiro passo para avaliar a selectividade foi o estudo dos espectros da amostra e a presença do parâmetro analítico a ser medido nos espectros (Figura 26).

Tabela 14 – Testes de especificidade para diferentes amostras

<i>Amostra</i>	<i>Distância de Mahalanobis</i>	<i>Concentração (%)</i>	<i>Testes Limite</i>
ACN	1759114,5	-6,7997917	Falha
DMF	695558,9	-11,858754	Falha

Através dos valores da tabela, é fácil de observar que o método é apenas específico para o composto B, porque confrontado a calibração construída com outras amostras (outros compostos) os valores da Distância de Mahalanobis e da Concentração são muito elevados, ou seja, não pertencem ao intervalo de calibração. Os testes limite realizados pelo *software* para estas duas amostras falharam, o que realça a ideia da especificidade do método.

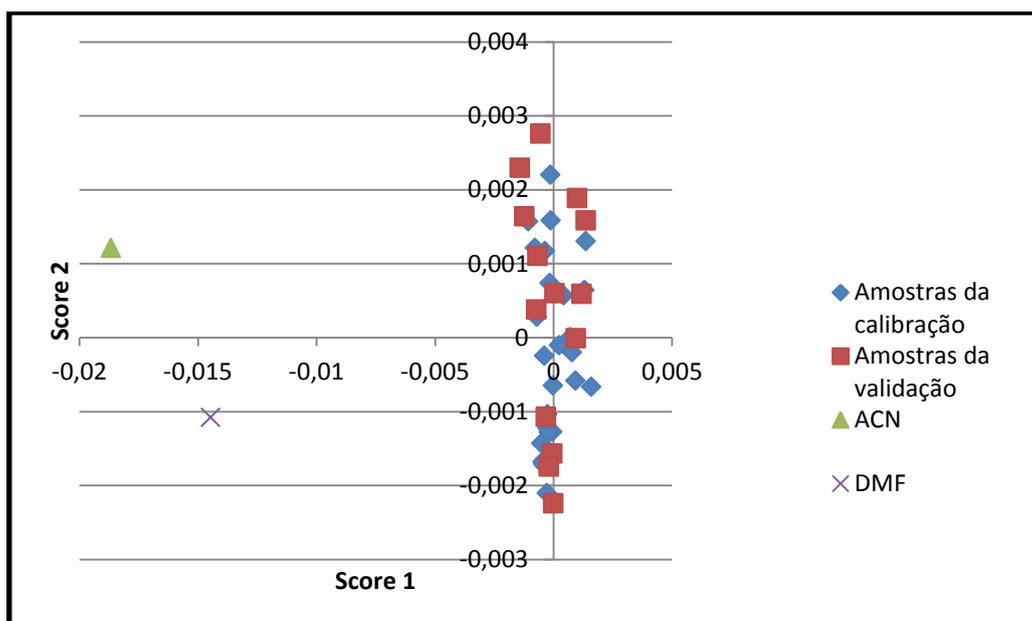


Figura 30 - Análise PCA para todas as amostras do composto B (calibração, validação e quatro amostras extra).

As amostras de ACN e DMF estão distantes das restantes amostras, o que torna claro que o método não é aplicável para este tipo de composto. Para além disso, com os parâmetros na tabela 14, para as duas amostras, os valores da Distância de Mahalanobis e de Concentração são muito elevados, reforçando a ideia que o método não reconhece as “amostras extra” mostrando valores elevados nos parâmetros.

3.3 Linearidade e Gama de trabalho

A linearidade de um procedimento analítico é a capacidade (dentro de um intervalo definido) de obter resultados que são directamente proporcionais à concentração do analito da amostra, e a gama é o intervalo entre o valor mais alto e o valor mais baixo de concentração do analito na amostra, para o qual tem de ser demonstrado que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exactidão e linearidade.

A linearidade do método foi avaliada por um teste de regressão entre o método de NIRS desenvolvido e o método de referência, na gama escolhida para o método.

A humidade foi medida em triplicado pelo método de NIRS, em diferentes amostras, a regressão linear foi executada e os intervalos de confiança associados para a intercepção e para o declive foram calculadas.

O critério de aceitação é baseado no acordo de resultados avaliados pela seguinte equação:

$$y = bx + a$$

Sendo o y o valor previsto pelo NIR, x o valor obtido pelo método de referência, a a intercepção e b o declive. A equação da regressão é mostrada na figura 31.

Para ser considerada linear:

- O intervalo de confiança associado à intercepção (I.C._a): $a \pm S_a \cdot t$ deve conter o valor zero;
- O intervalo de confiança associado ao declive (I.C._b): $b \pm S_b \cdot t$ deve conter o número 1;

S_a é o desvio padrão da intercepção, S_b é o desvio padrão do declive e t o valor tabelado de acordo com o grau de confiança desejado e $n-2$ graus de liberdade (n é o número de determinações das amostra).

Tabela 15 – Parâmetros da regressão para a verificação da linearidade

	Abaixo 95%	Acima 95%
Intercepção	-0,025	0,022
Variável X	0,958	1,020

A intercepção contém o valor zero ($-0,025 < 0 < 0,022$) e o declive contém o valor um ($0,958 < 1 < 1,020$).

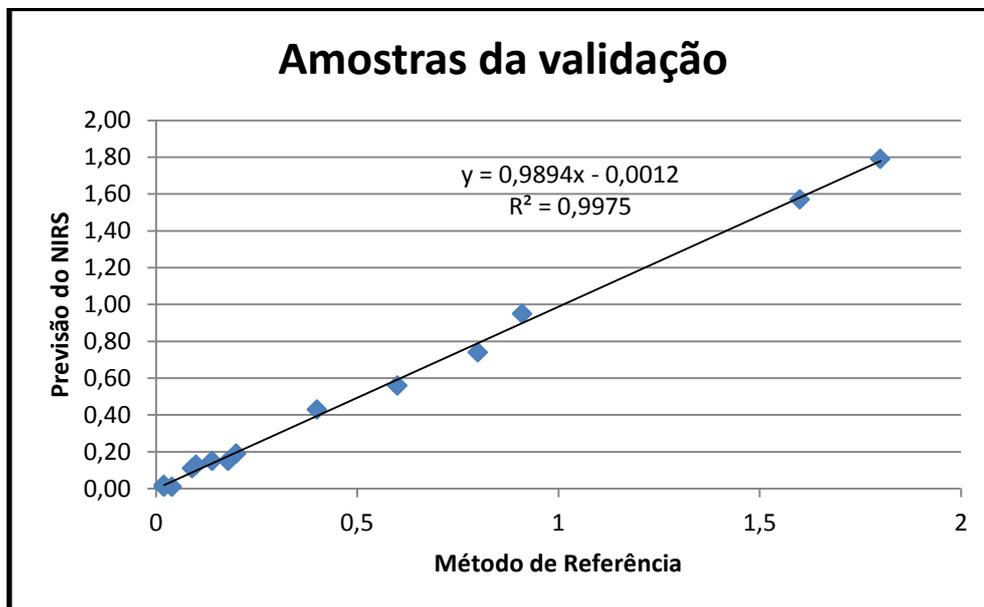


Figura 31 - Valores de humidade pelo método de referência versus os valores previstos pelo NIRS para as amostras do composto B.

O método NIRS desenvolvido demonstrou ser linear quando comparado com o método de referência, dentro das gamas de concentração.

3.4 Exactidão

A exactidão de um método analítico expressa-se pelo grau de concordância entre o valor que é aceite e o valor que é considerado verdadeiro.

A exactidão pode ser estudada pela determinação do Erro Padrão de Previsão (SEP) e comparação do seu valor com a precisão do método de referência, denominado de Erro Padrão de Laboratório (SEL), como foi feito com a validação externa.

Os valores de humidade das amostras 1 e 2 foram medidos em dias diferentes pelo NIRS e o método de referência. O valor de SEL calculado foi de 0,065% e o valor de SEP (calculado com todas as amostras) foi de 0,029%. Verificando a condição $SEP_{NIR} \leq 1,4 \times SEL$, o valor é de 0,091, o que confirma que o NIRS é exacto.

3.5 Precisão

A precisão de um método analítico é o grau de concordância entre resultados de testes individuais quando o método é aplicado repetidamente a várias amostragens de uma amostra homogénea. Esta foi avaliada em dois níveis: **repetibilidade** e **precisão intermédia**.

Repetibilidade

Expressa a precisão sobre as mesmas condições de operação num curto período de tempo. A repetibilidade do método foi avaliada medindo a humidade numa amostra homogénea, seis vezes, em dois dias, com os dois métodos, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento.

Primeiro, é calculado o PG (baseado no cálculo do rácio das variâncias dos dois métodos) e depois é comparado com o F (teste f para a variância de duas amostras). Se $PG \leq F$, então não há diferenças estatísticas significativas entre os dois métodos.

Tabela 16 – Valores de PG e F para o teste das duas amostras

	<i>Amostra 1</i>	<i>Amostra 2</i>
PG – Dia 1	0,22	0,65
PG – Dia 2	0,40	1,6
F	5,05	

Como o valor de PG é menor que o de F (em ambos os dias), os métodos não são estatisticamente diferentes.

Precisão Intermédia

A precisão intermédia expressa as variações dentro do laboratório: dias diferentes, analistas diferentes, equipamentos diferentes, etc.

A precisão intermédia foi avaliada pela medição da humidade numa amostra homogénea, seis vezes, mas em dois dias diferentes, por dois analistas diferentes usando o mesmo equipamento. Os resultados estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17 – Resultados da precisão intermédia

<i>Amostra</i>	<i>Método</i>	<i>S_i</i>	<i>RSD</i>
Amostra 1	NIR	0,03	4,6
	M.Ref	0,02	2,6
Amostra 2	NIR	0,03	13,5
	M.Ref	0,02	9,5

Para ambos os métodos, em cada amostra, os valores do desvio padrão da precisão intermédia é igual, isto é, para o NIR o valor é de 0,03 e para o Método de Referência é de 0,02. A diferença entre os métodos é muito pequena (0,01), que visto por valores de humidade, a diferença pode considerar-se insignificante.

O desvio padrão relativo do NIR é superior ao do método de referência em ambas as amostras. Contudo, não é preocupante, pois os valores de previsão de humidade pelo NIRS são praticamente iguais, a pequena diferença que existe é na casa das centésimas, fazendo daí a diferença do desvio padrão relativo.

3.6 Robustez

A robustez de um procedimento analítico é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas variações nos parâmetros do método, fornecendo uma indicação da sua fiabilidade em condições normais de uso.

O longo tempo de desenvolvimento e o uso de um largo número de amostras introduz variabilidade natural e robustez no método.

O factor que pode afectar maioritariamente a robustez do método é aquele inerente ao equipamento. As condições de funcionamento são verificadas diariamente através de um teste de performance operacional e as condições ambientais são mantidas estáveis.

Tabela 18 – Parâmetros a estudar

Parâmetro a estudar	Valor		
Luz – Ganho do detector	+	Low C	- Low A

Com uma amostra, a aquisição do seu espectro foi realizada com dois ganhos diferentes, Low A e Low C, visto que a aquisição “normal” é o ganho em Low B. Os valores foram registados e as quantidades de água foram comparadas para saber se é importante fazer uma correcta escolha deste parâmetro.

Tabela 19 – Efeito do parâmetro estudado

Luz – Ganho do detector	Humidade (%)
Low A	0,051
Low B	0,01
Low C	1,32

O modo correcto de aquisição dos espectros é o Low B e comparando com os valores de humidade previstos pelos espectros em Low A e Low C, são diferentes. Como esta diferença entre os valores na tabela 19 é bastante acentuada, o Ganho do espectrómetro deve ser tomado em consideração na altura das aquisições dos espectros.

3.7 Validação Externa

Após a validação interna cruzada realizada pelo *software*, o método foi testado contra um conjunto de dados independentes das amostras de validação, que não foram usadas para gerar o método, desde que não excedam os extremos da gama de calibração. Durante a validação externa, SEP é calculado e comparado com o valor do SEL que foi determinado durante a validação do método de referência. O critério de aceitação é definido pelo guia EMEA, através da equação $SEP_{NIR} \leq 1,4 \times SEL$.

Tabela 20 – Parâmetros da validação externa

Espectros usados	14
SEP (%)	0,029
SEL (%)	0,065
1.4 × SEL (%)	0,091

Os testes de validação realizados depois da selecção do modelo confirmaram que o modelo é apropriado que o seu propósito.

Parte C - Fermentações

1. Introdução

Optimizar a síntese de um produto requer conhecimento e controlo de processos fermentativos. Hoje em dia, o controlo de processos fermentativos é amplamente reconhecido como longe de ser ideal, em parte devido à falta de obter informações químicas sobre as quais a base de decisões de controlo é tomada em tempo real (S. Alison Arnold, 2002).

Esta disponibilidade limitada em processar informação atempada sobre o processo de biomassa, substratos, intermediários e nutrientes, não só reduz a capacidade de monitoramento e controlo de processos, mas também impede a melhoria do processo eficaz, o que reduz a produtividade de fabrico (S. Alison Arnold, 2002).

Os processos de fermentação são geralmente controlados com base em valores de concentração dos principais substratos de carbono e hidrogénio presentes, os principais metabólitos produzidos (ou seja, os ingredientes activos farmacêuticos, API), a concentração de biomassa e até mesmo algumas outras substâncias importantes. Todos estes parâmetros são normalmente obtidos por técnicas de fora da linha e demorados, tendo entre 30 minutos a 4 horas cada para se obter. Isto significa que, para efeitos de controlo em tempo real do processo e de diagnóstico e também para a melhoria da economia do processo, as medições fora de linha, devem ser substituídas por técnicas automáticas e preferivelmente multiparamétricas (Ceitil, 2007).

A espectroscopia de infravermelho próximo pode melhorar os processos fermentativos através da rápida incorporação (análises em segundos), não-destrutiva, análise de constituintes múltiplos do meio do caldo fermentativo directamente nas estratégias de monitorização e controlo da fermentação com a preparação mínima ou nenhuma da amostra ou pré-tratamento. (S. Alison Arnold, 2002)

Durante os últimos 35 anos, as capacidades de análise NIR têm aumentado, num diversificado leque de aplicações para controlo de qualidade e análise de processos na alimentação e agricultura e nas indústrias farmacêuticas, químicas, polímeros e petroquímicas. A espectroscopia de NIR oferece oportunidades significativas para análises e controlo de processos fermentativos em ambos os laboratórios de apoio e directamente no ambiente de produção (S. Alison Arnold, 2002).

1.1 A Fermentação

A fermentação é um processo biológico anaeróbico com o objectivo de obter energia (síntese de ATP), a partir da degradação de substâncias orgânicas, resultando uma disponibilidade energética inferior quando comparada à respiração aeróbia.

Na fermentação, a glicose é catabolizada em substâncias orgânicas mais simples (piruvato) e estas, por sua vez, são metabolizadas em vários compostos, de acordo com a fermentação (Figura 34). Neste mecanismo não ocorrem etapas como o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória, e o receptor final de hidrogénio é um composto orgânico.

Este processo pode ser restrito, ou seja, a única forma que um organismo disponibiliza para adquirir energia depende das reacções do metabolismo, ou então facultativo, ou seja, uma alternativa extra. Isto é uma característica evolutiva favorável, pois permite que um organismo realize fermentação como também respiração aeróbia, alternando consoante as condições do meio ou então sujeições requeridas pelo potencial do próprio organismo (Giovani Brandão, 2007).

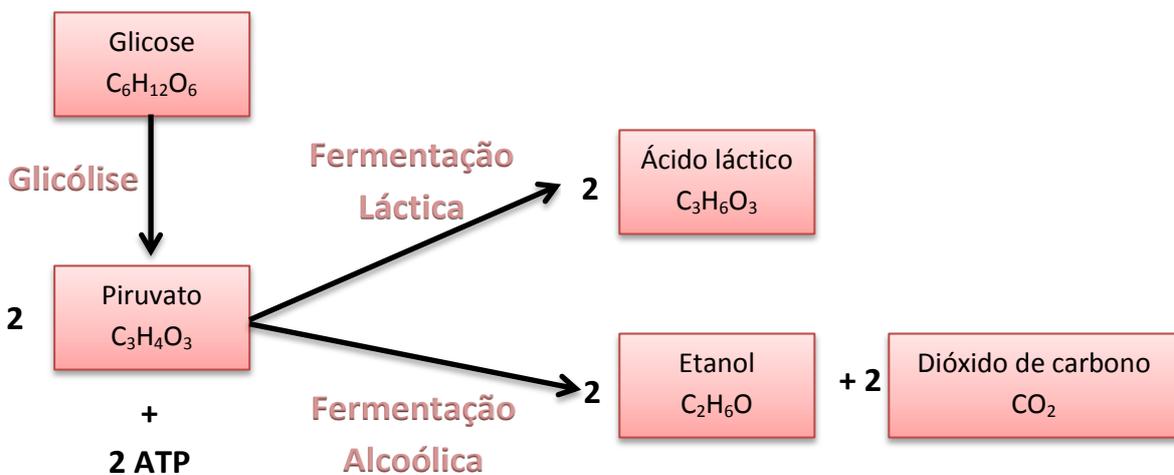


Figura 32 - Esquema geral da fermentação.

1.1 Processos Fermentativos

No fabrico de uma fermentação, uma determinada espécie de célula microbiana, planta ou animal é cultivada num meio líquido com nutriente adequado num biorreactor sobre condições cuidadosamente controladas para produzir um produto desejado. Esse produto podem ser as próprias células, algum componente celular ou um metabolito sintetizado pelas células (S. Alison Arnold, 2002).

1.1.1 Química dos processos fermentativos

A complexidade química do meio fermentativo varia consideravelmente e isso é um desafio para obter um método de análise NIR robusto. Na maioria dos processos, estão presentes múltiplos substratos.

Para fermentações a grande escala industrial (150 m³), as fontes de nutrientes podem ser quimicamente indefinidas, tal como farelo de soja ou óleos. Assim, a composição química desses meios pode ser altamente variável de carga em carga. Contrariamente, um meio de cultura de células animais, embora algumas vezes seja quimicamente definida, pode conter muitos nutrientes individuais (S. Alison Arnold, 2002).

Depois da inoculação, o crescimento e os níveis de nutrientes descem rapidamente. Para estimular a formação de produto, muitos processos fermentativos dependem em manter um nutriente-chave a níveis “limitantes” uma vez que o crescimento das células está completo. No processo descontínuo de alimentação (fed-batch, o mais comum em fermentações), a cultura deve ser alimentada a uma velocidade controlada cuidadosamente de modo a que o excesso de biomassa não se acumule (S. Alison Arnold, 2002).

1.1.2 Cinética dos Processos Fermentativos

O estudo cinético dos processos fermentativos está relacionado com o acompanhamento dos valores das concentrações de células, substrato e produtos. Quando este acompanhamento é feito ao longo do tempo, é possível traçar as curvas de ajuste que caracterizam o bioprocesso (Figura 33). Para o estudo cinético, no geral, escolhe-se o produto de interesse e o substrato limitante (Nascimento, 2012).

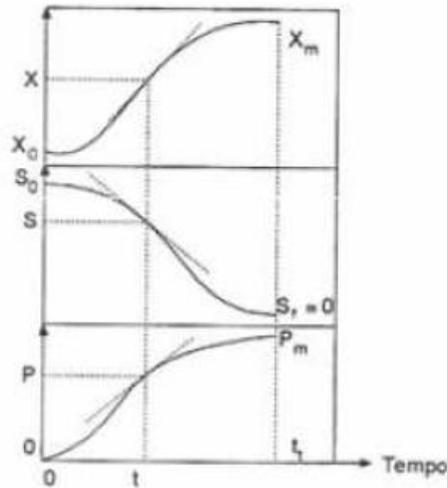


Figura 33 - Curvas de ajuste para uma cinética fermentativa idealizada. X, P e S correspondem a concentração das células, produto e substrato, respectivamente (**Nascimento, 2012**).

A cinética de uma fermentação permite comparar quantitativamente diferentes condições de cultivo através das variáveis como a velocidade de transformação e os factores de conversão, obtidos a partir das curvas de ajuste do bioprocesso.

As velocidades de transformação são expressas pelas equações 9, 10 e 11, para reprodução de microorganismos, consumo de substratos e formação de produto, respectivamente.

$$(9) \quad r_x = \frac{dX}{dt}$$

$$(10) \quad r_s = \frac{dS}{dt}$$

$$(11) \quad r_p = \frac{dP}{dt}$$

Os valores de X, S e P podem ser relacionados entre si através dos factores de conversão definidos pelas equações 12, 13 e 14 para um determinado instante t de fermentação onde o índice "0" indica a concentração inicial para cada parâmetro.

$$(12) \quad Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S - S_0}$$

$$(13) \quad Y_{x/p} = \frac{X - X_0}{P - P_0}$$

$$(14) \quad Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S - S_0}$$

Com a concentração de células, a curva de crescimento dos microorganismos apresenta um comportamento semelhante ao da figura 34, apresentando sete etapas diferentes.

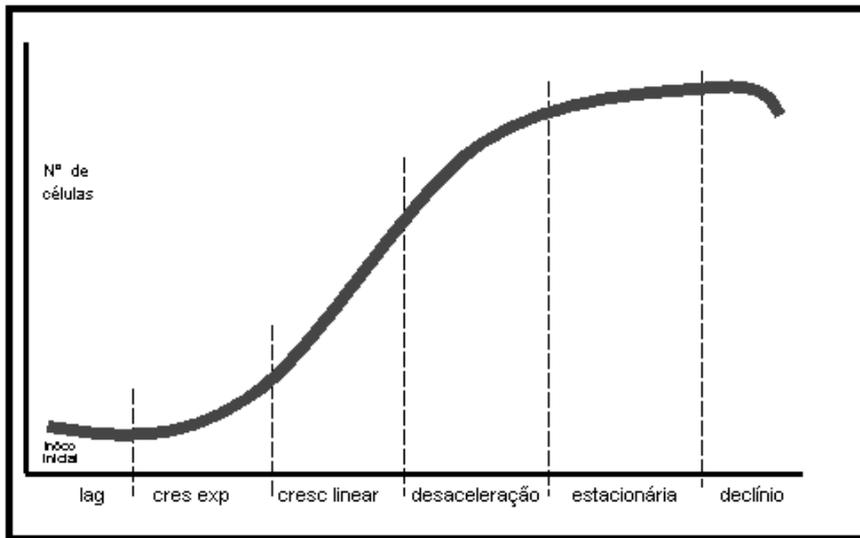


Figura 34 - Curva de crescimento típica de um microorganismo em cultivo descontínuo (Nascimento, 2012).

- A **etapa inicial** é denominada de “lag”, que se segue logo após a inoculação do meio com o microorganismo. Apresenta-se como um período de adaptação onde a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio.
- Na **segunda fase**, ocorre o período de transição onde se observa o início da reprodução dos microorganismos.
- A **terceira fase** é denominada de fase logarítmica ou fase exponencial onde a velocidade específica de crescimento é constante e máxima.
- A **quarta fase** é a fase linear de crescimento e apresenta velocidade constante de reprodução dos microorganismos.
- Na **quinta fase** ocorre uma desaceleração do crescimento microbiano devido ao esgotamento dos componentes do meio de cultura e aumento da concentração dos metabolitos inibidores do crescimento.
- Na **sexta fase**, denominada de fase estacionária, a concentração de células atinge o seu valor máximo e constante.
- Na **última fase** ocorre o declínio, ou seja, as células começam a morrer e a concentração celular decai, indicando o fim do processo fermentativo.

1.2 Desafios de monitorização de processos fermentativos com o NIRS

A espectroscopia de infravermelho próximo apresenta-se como um método analítico inovador, mas possui alguns desafios que devem ser levados em consideração quando a obtenção de modelos quimiométricos é realizada e, posteriormente, a monitorização é implementada.

Algumas características dos processos fermentativos podem ajudar ou atrapalhar na implementação do método analítico, pois as condições de operação do biorreactor e até mesmo a natureza do agente transformador podem interferir na tomada dos espectros do meio de fermentação (Nascimento, 2012).

- Influência do microorganismo produtor

Nas fermentações é o microorganismo que impõe as condições de operação dos biorreactores e influenciam na complexidade do meio a ser analisado, pois a concentração de células e a sua morfologia influenciam na viscosidade e nas propriedades de dispersão da luz no meio (Nascimento, 2012).

- Influência da temperatura

As mudanças de temperatura afectam a densidade, a viscosidade do meio e a intensidade das vibrações das ligações intramoleculares e intermoleculares, sendo assim, os espectros de uma amostra serão influenciados pelas possíveis variações de temperatura que venham a ocorrer (Nascimento, 2012).

Estes dois factores são parâmetros importantes para processos farmacêuticos, bem como para as técnicas estatísticas de análise multivariada, pois variações significativas em algum dos factores ocasionam grandes mudanças nos espectros obtidos. Portanto, ao promover-se ensaios de fermentação com o objectivo de construir modelos de calibração deve-se manter as condições de realização de ensaios, o mais próximo possível do valor estipulado.

2. Parte experimental

Hoje em dia, as capacidades de análise do NIR têm um diverso campo de aplicações para o controlo de qualidade e análise de processos na alimentação, agricultura e nas indústrias farmacêutica, química, polimérica e petroquímica (S. Alison Arnold, 2002). A razão pela qual o uso desta técnica está a aumentar é devido aos baixos custos e análises rápidas, dois pontos importantes para a indústria. Genericamente, uma grande parte dos antibióticos comercializados têm origem em processos fermentativos, que usa a nível de produção, uma variedade de microorganismos, que merecem um estudo de melhoria (M.Manuela da Fonseca).

Durante a fermentação, é importante medir as quantidades de substrato e produto e avaliar outras características de qualidade para o produto final. Contudo, essas análises, pelos métodos tradicionais, requerem preparação de amostra, um equipamento e técnicos específicos, tornando-se moroso e dispendioso (Valentina Di Egidio, 2010).

Uma boa monitorização da fermentação é uma necessidade crescente devido ao rápido ritmo de mudança na indústria farmacêutica, o que requer métodos mais rápidos, que forneçam a informação em tempo real de modo a reduzir o tempo de espera dos valores das fermentações e para garantir a qualidade do produto em todas as fases do processo.

Os métodos convencionais como a Cromatografia gasosa (GC), a Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou a Cromatografia iónica (IC), apesar de fornecerem bons resultados, requerem um técnico especializado para trabalhar com o aparelho, uma preparação e pré-tratamento das amostras, algumas das técnicas usam solventes, o que é mau para o ambiente, mas acima de tudo, é um processo moroso para obtenção dos resultados. A espectroscopia de Infravermelho Próximo pode melhorar os processos fermentativos através da incorporação de uma análise rápida, não destrutiva e multivariada do meio fermentativo, directamente na monitorização e controlo das fermentações sem preparação ou pré-tratamento das amostras.

Na produção da fermentação, uma determinada estirpe de uma célula microbiana, animal ou de planta é cultivada no meio líquido com os nutrientes adequados, num biorreactor sob condições cuidadosamente controladas. O produto pode ser as células em si, um componente celular ou um metabolito sintetizado pelas células (S. Alison Arnold, 2002). Esta fermentação usa bactéria Y para produzir o composto D, usando o composto C como substrato. O método usado para saber o valor destes dois compostos é a Cromatografia iónica.

O objectivo é tentar aplicar a Espectroscopia NIR, combinada com diferentes estratégias quimiométricas para monitorizar a fermentação feita pela bactéria Y, prevendo os valores do composto C e D durante as diferentes fases do processo, de modo a poder substituir o método convencional usado (IC). Para tal foram usadas 410 amostras, variando entre os 0 mg/mL e os 100 mg/mL para o composto C e os 0 mg/mL e os 150 mg/mL para o composto D, aproximadamente.

2.1 Instrumentação

2.1.1 Espectroscopia NIR

Os espectros NIR foram adquiridos utilizando um espectrofotómetro FT-NIR modelo FTLA2000-160 da ABB no intervalo de comprimento de onda entre os 12000 cm^{-1} e os 4500 cm^{-1} , com uma resolução espectral de 16 cm^{-1} , a uma temperatura de 25°C. Cada espectro obtido é a média de 32 varrimentos e com um ganho em Low B. O espectrofotómetro vem equipado com um acessório de suporte para amostras líquidas com módulo de transmitância, fonte de radiação térmica policromática, produzida por uma lâmpada de Quartz-Halogénio e um detector de índio-Arsénio (InAs).

As amostras são colocadas sobre o acessório de suporte de amostras líquidas em frascos cilíndricos de 1mL.

2.1.2 Técnica Instrumental de referência – Cromatografia Iónica

A concentração do composto C e D foi determinada por IC. O material usado foi:

- Equipamento: Metrohm 881 compact IC pro
- Amostrador automático: Metrohm 863 compact autosampler
- Detector PAD: Metrohm 896 professional detector
- Coluna com comprimento de 250 mm, diâmetro de 2mm, Dionex CarboPac PA1
- Pré-coluna com comprimento de 50 mm, diâmetro de 2mm, Dionex CarboPac PA1
- Balança analítica
- Balões volumétricos
- Micropipetas
- Pontas de micropipetas
- Viais de 1 mL
- Falcons de 11 mL com tampa para o amostrador automático
- Garrafa de eluente PP 2 L

2.1.3 Programas para aquisição dos espectros

Os espectros NIR e os dados de referência das amostras foram tratados pelos programas informáticos da Galatic:

- Grams 32/AI 7.0 – Programa que permite a aquisição dos espectros e a sua visualização, aplicando os pré-tratamentos espectrais mais habituais.
- AIRS PHARMA 3.0 com o PLSPLUS/IQ – Programa que permite desenvolver calibrações de modo a obter os métodos de análise pretendidos. Permite trabalhar com conjuntos de dados multivariáveis e incorpora os algoritmos quimiométricos mais comuns. Foi utilizado para aplicar os pré-tratamentos espectrais, realizar análises de componentes principais (PCA) e calcular regressões por mínimos quadrados parciais (PLS).

2.1.4 Ensaios de Fermentação e Amostragem

Foram acompanhadas 27 fermentações, com um total de 410 amostras. O processo fermentativo decorreu em reactores de aço, variando da escala piloto para laboratorial, mantendo o mesmo meio de cultura, variando apenas o volume (400L para escala piloto e 1.5L para escala laboratorial). As fermentações foram realizadas pela bactéria Y e foi controlada a uma temperatura entre os 20°C e os 30°C e a um pH entre 7 e 9. O número de amostras por cada fermentação varia dependendo do decorrer do processo, sendo uma média de 16 amostras por fermentação. Cada amostra foi retirada do processo fermentativo e posteriormente sofria uma centrifugação para separar a biomassa dos restantes constituintes da matriz.

3. Discussão de Resultados

3.1 Desenvolvimento do método

O processo de fermentação tem, normalmente, um comportamento semelhante ao representado na Figura 35 a, onde o substrato é todo consumido e o produto é produzido. Contudo, nestas fermentações, se o valor do composto C baixasse dos 40 mg/mL e se, nesse mesmo momento, o valor do composto D estivesse abaixo dos 100 mg/mL, uma quantidade do composto C era introduzida para aumentar o valor do composto D (Figura 35b). Quando o valor do composto D passa os 100 mg/mL, o processo da fermentação segue normalmente, esgotando o composto C e produzindo o composto D.

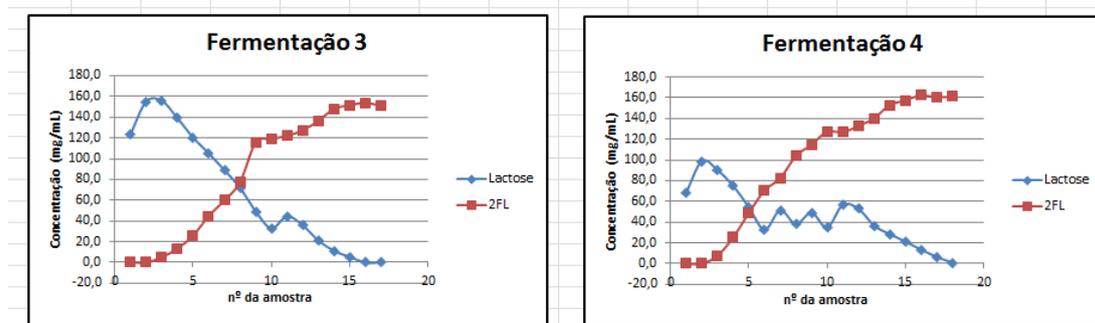


Figura 35 - a) Processo normal de Fermentação; b) Processo manipulado de Fermentação.

A figura 36 mostra alguns dos espectros usados no processo. Todos eles têm o mesmo comportamento, mostrando dois picos elevados aos 5000 cm^{-1} e 7000 cm^{-1} . Estas características observadas no espectro estão relacionadas com o primeiro sobretom do alongamento da ligação O-H da água. Como as fermentações têm grandes quantidades de água na matriz e como o background usado foi um vial vazio, é normal que estas duas bandas estejam mais pronunciadas. A razão da escolha deste background (em vez do vial com água para subtrair a todas as amostras) é pelo facto de ser necessário uma grande quantidade de cálculos, caso seja aplicado na monitorização *in-line*.

Assim a água foi considerada simplesmente como um componente adicional do efeito de matriz global que influencia os espectros. Neste caso, é possível usar os espectros brutos para a determinação em tempo real dos analitos durante a fermentação para obter resultados sem atraso de tempo.

De notar que, para tal procedimento, é necessário um grande número de amostras usadas para representar o sistema, porque uma nova variável foi introduzida no sistema.

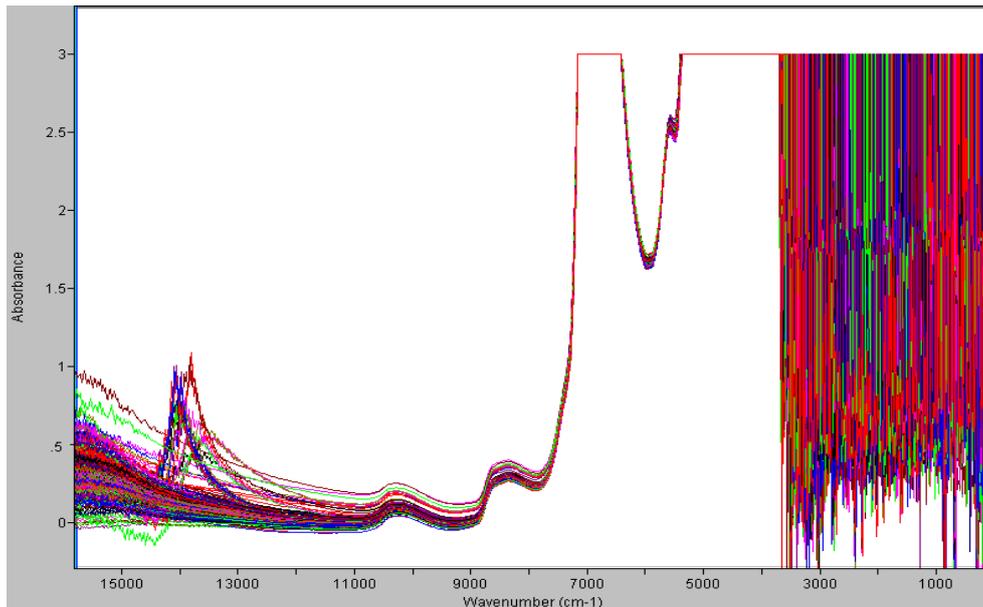


Figura 36 - Espectros de fermentação usados para a calibração.

Para saber qual a região do espectro que tem interesse de ser analisada (características espectrais), os espectros sofrem um pré-processamento, a 1ª derivada. Como já foi mencionado, o espectro NIR da água exibe duas diferentes regiões de absorção perto dos 7000 cm^{-1} e os 5000 cm^{-1} . Pela análise da figura 37, há duas regiões espectrais definidas. A primeira região é entre os 9000 cm^{-1} e os 8500 cm^{-1} e a segunda é entre os 6400 cm^{-1} e os 5400 cm^{-1} . A primeira região pode ser associada ao segundo sobretom do alongamento da ligação C-H, possivelmente da molécula do composto C e a segunda região pode ser associada ao primeiro sobretom do alongamento da ligação C-H ou da ligação O-H, possivelmente da molécula dos compostos C e D, respectivamente (Tabela 1). Não é possível saber qual das zonas pertence a que molécula, porque a espectroscopia NIR exibe as bandas correspondentes às ligações químicas e não às moléculas. E, além disso, a matriz das fermentações contém mais constituintes, por isso podem também influenciar os espectros.

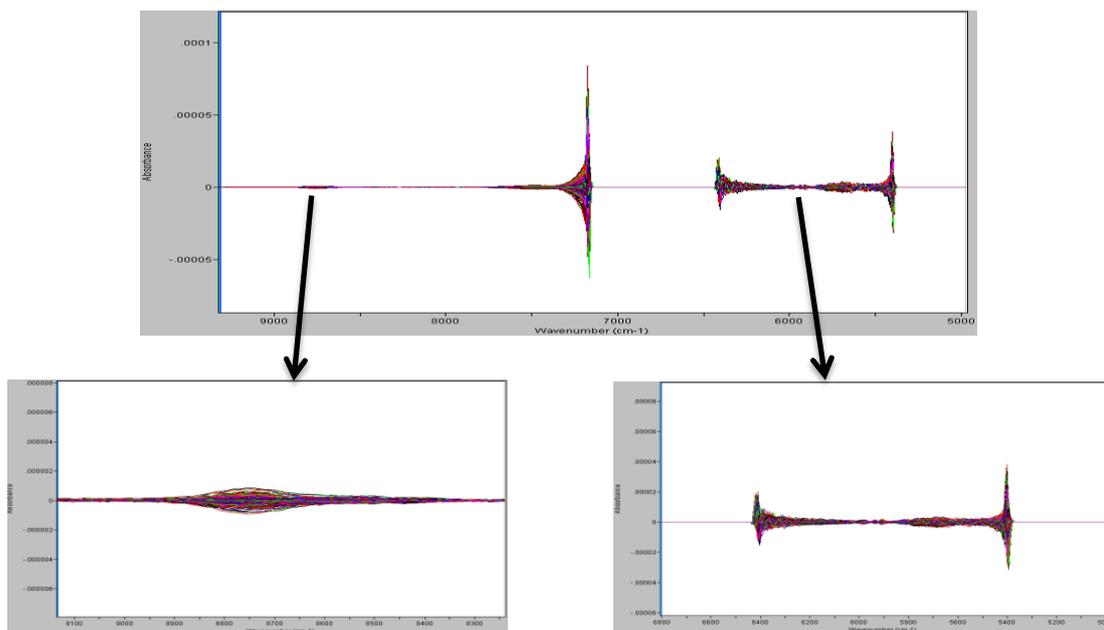


Figura 37 - Espectros da fermentação processados com a 1ª derivada.

De modo a mostrar a possibilidade de construir modelos de calibração satisfatórios para os compostos em matrizes complexas, foram elaborados nove modelos variando a região espectral e o composto, isto é, três modelos foram construídos para prever os valores dos compostos C e D, três modelos para prever apenas o valor do composto C e os restantes três modelos para prever o valor do composto D.

Para as 410 amostras, o modelo de calibração usado foi o algoritmo de PLS e, de modo a obter uma calibração adequada, foram desenvolvidos vários modelos de calibração combinando diferentes regiões espectrais e técnicas de pré-processamentos. Para o modelo de calibração, o R^2 e o SECV foram obtidos, permitindo uma primeira avaliação da capacidade preditiva do modelo. Métodos multivariados, como PLS, extraem os factores espectrais numa ampla gama de comprimentos de onda que, simultaneamente relacionam a concentração do analito e compensam pelas bandas de absorção de interferência, espalhando as diferenças e mudanças na posição da banda.

Os nove modelos usaram o tipo de calibração PLS-1, combinado com o tipo de diagnóstico Cross Validation (CV), a preparação dos dados foi Mean Center e a correcção do percurso óptico foi Normalize, sendo a região espectral a única diferença entre eles (tabela 21).

Tabela 21 – Resultados das calibrações para os nove modelos

Modelo	Composto	Região espectral ¹	Nº de factores	R ²	SECV (mg/mL)
A	C	1	7	0,899	8,25
	D		7	0,965	8,98
B	C	1	7	0,902	8,18
C	D	1	7	0,962	9,59
D	C	2	11	0,976	4,30
	D		11	0,991	4,43
E	C	2	12	0,973	4,51
F	D	2	12	0,991	4,49
G	C	3	13	0,979	4,04
	D		13	0,992	4,11
H	C	3	13	0,974	4,15
I	D	3	12	0,991	4,67

¹ – O intervalo 1 é entre 9000 cm⁻¹ e 8500 cm⁻¹, o intervalo 2 é entre 6400 cm⁻¹ e 5400 cm⁻¹ e o intervalo 3 é o conjunto dos intervalos 1 e 2.

Sem a validação externa, os dois parâmetros que podem definir um possível bom modelo são o Erro Padrão da Validação Cruzada (SECV) e a correlação (R²), isto é, o valor mais baixo para SECV e o valor mais próximo de 1 para o R².

Analisando a tabela 21, para o composto C, o melhor modelo de calibração poderia ser o G, porque tem o valor mais baixo para o SECV e o R² é quase 1. Para o composto D, o melhor modelo de calibração poderia também ser o G, pelos mesmos motivos.

3.2 Validação Externa

Analisando a tabela 21, todos os modelos têm boas correlações. No entanto, a validação externa é o factor mais importante para decidir qual dos modelos é melhor, porque apresenta o Erro Padrão de Previsão (SEP), que é associado ao erro da previsão dos valores com a calibração. Para a validação externa, 65 amostras foram usadas para prever os seus valores através dos nove modelos. Os resultados estão apresentados na tabela 22.

Um modelo de calibração NIR robusto produzirá um SEP semelhante ao SECV do modelo de calibração NIR derivado. Tanto o declive da recta de regressão e o coeficiente de correlação, R², devem ser próximo de 1 e a intercepção com o eixo das ordenadas deve aproximar-se de zero.

Analisando estes valores, a região espectral 1 ($9000\text{ cm}^{-1} - 8500\text{ cm}^{-1}$) tem os valores mais fracos para o SEP e R^2 . Isto significa que nesta zona não é fácil de perceber as diferenças entre as amostras, pois o erro de previsão dos valores é superior.

Para o composto C, o modelo mais apropriado é o D. Apesar de não ter o maior R^2 , tem o valor mais baixo de SEP e a diferença entre o SECV da calibração e o SEP da validação externa é de muito pouca (2,28 mg/mL). Este modelo como tem os parâmetros da calibração mais favoráveis face aos outros modelos (melhor R^2 e SECV mais baixo) torna-se o mais fiável. A intercepção com o eixo das ordenadas não é tão próximo de zero (7,7), devido às variações nas concentrações do composto C durante os vários processos fermentativos (Figura 35a e 35b).

Para o composto D, o modelo mais apropriado é o G, porque tem o valor mais baixo de SEP e o valor mais alto de R^2 . Para além disso, a diferença entre o SECV da calibração e o SEP da validação externa é mínima (2,28 mg/mL) e a intercepção com o eixo das ordenadas é 4.01.

Isto significa que, quando o modelo prevê os valores das fermentações, estes dois modelos são os indicados para obter as diferenças mais baixas entre o NIR e o método de referência. Contudo, para o composto D, a diferença entre o modelo D e G é mínima, logo, de modo a tornar industrialmente mais prático, optou-se por implementar o modelo D, prevendo em simultâneo o valor dos dois compostos.

De reparar que, para todos os métodos, os valores de R^2 para a calibração e validação externa são superiores para o composto D do que o composto C. A razão, já mencionada, é porque o composto C, durante o processo fermentativo, foi sempre adicionada quando descia para valores abaixo dos 40 mg/mL, por isso a variação de pontos e espectros é maior (Figura 35b). Para ter os valores do factor de correlação, para os dois compostos, próximos um do outro, é necessário adquirir mais espectros, para haver maior variabilidade e o valor de R^2 para o composto C aumentar.

Um ponto importante a considerar reside na dificuldade de decréscimo dos valores de SEP. Após análise de todas as amostras, nota-se que a maior diferença entre o valor do método de referência e do NIRS está na amostra inicial. Isto porque como cada fermentação só há uma amostra desse género, a variedade de espectros com valores tão elevados do composto C é baixa, portanto o erro associado a essas amostras iniciais é maior. Como o SEP é uma média, ao ter uma diferença tão elevada na primeira amostra de todas as fermentações, faz com que o seu valor aumente, não correspondendo, de todo, ao erro de previsão das restantes amostras das fermentações.

O modelo ideal é aquele que consegue prever os valores dos compostos C e D em simultâneo, porque é mais rápido para obter os valores de uma análise multivariada, tornando-se mais prático quando usado a nível industrial. Contudo, construir modelos com duas variantes, torna-se mais complexo, porque com o *software* do NIRS, os pré-processamentos seleccionados são aplicados para ambos os compostos, assim como os outliers a retirar. Neste caso, os pré-processamentos escolhidos e *outliers* para o composto C são os mesmos que para o composto D e vice-versa. Por isso, o modelo D é o indicado para o estudo deste tipo de fermentações.

Tabela 22 – Resultados para a calibração e validação externa para os nove modelos

Modelo	Região espectral ¹	Composto	Calibração		Validação Externa	
			R ²	SECV (mg/mL)	R ²	SEP (mg/mL)
A	1	C	0,899	8,25	0,612	10,70
		D	0,965	8,98	0,881	13,36
B	1	C	0,902	8,18	0,636	10,25
C	1	D	0,962	9,59	0,908	12,16
D	2	C	0,976	4,30	0,775	6,71
		D	0,991	4,43	0,969	6,94
E	2	C	0,973	4,51	0,761	7,06
F	2	D	0,991	4,49	0,963	7,66
G	3	C	0,979	4,04	0,733	7,63
		D	0,992	4,11	0,973	6,39
H	3	C	0,974	4,15	0,737	7,85
I	3	D	0,991	4,67	0,966	7,35

4. Estratégia de análise NIRS

Os instrumentos NIR são desenhados para ser instalados quer em laboratório em linha ou em interface directa com o biorreactor (*in situ*). Acima de tudo, o modo de medição mais apropriado e a melhor localização para o NIRS é ditado pelas propriedades do caldo fermentativo, a selectividade e sensibilidade requerida pelo analito, a duração da fermentação e os requerimentos de monitorização e controlo (S.Alison Arnold, 2003).

Existem três tipos de análise/monitorização de fermentações, sendo a análise em laboratório, a análise rápida em linha e a análise directa em linha. Neste estudo, a configuração usada foi a primeira (Figura 38a).

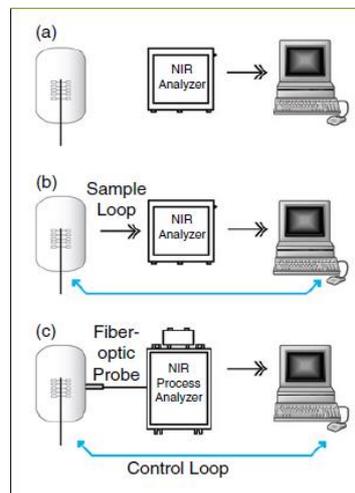


Figura 38 - Estratégias de análise de fermentações pelo NIRS a (a) escala laboratorial, (b) sistemas de análise rápida em linha, e (c) sistema de análise directa em linha (S.Alison Arnold, 2003).

A razão é porque fornece uma melhor flexibilidade analítica, porque ambos os modos de reflectância e transmitância podem ser medidos para amostras do caldo fermentativo, ingredientes de alimentação, matérias-primas e efluentes. Para além disso, fornece uma maior selectividade e sensibilidade analítica, porque a análise espectral do NIR pode ser feita em toda a região espectral entre 12000 cm^{-1} – 4500 cm^{-1} . Contudo, esta estratégia requer uma amostragem manual dos biorreactores para o aparelho de NIR. Embora esta investigação esteja em fase de estudo, caso a monitorização das fermentações avance para níveis industriais, a configuração poderá ser mudada para o sistema de análise rápida em linha (figura 38b).

Parte D - Isolamento do Produto das Fermentações

1. Introdução

Em todas as fermentações, o microorganismo que as realiza recebe um substrato, que será consumido, e transformá-lo-á num produto. Neste caso, o organismo é a bactéria Y e usa o composto C como substrato para produzir o composto D.

O composto D é um dos oligossacáridos mais abundantes no leite humano, constituindo cerca de 30%. Foi descoberto em 1950 e a sua técnica de isolamento foi descoberta 22 anos depois. Devido às suas propriedades pré-bióticas e anti-infecciosas, o composto D é discutido como um nutriente adicional na alimentação infantil. Este composto estimula o crescimento de certos receptores, prestando protecção tóxica e patogénica. Entre os patogénicos que o composto D é capaz de proteger estão a *Campylobacter jejuni* e a *Salmonella*, entre outros. Logo, os oligossacáridos do leite humano são conhecidos por serem o factor mais relevante para desenvolver a flora intestinal das crianças amamentadas (Won-Heong Lee, 2012).

Normalmente, os baixos níveis do composto D no soro do leite humano para crianças estão associados a um elevado nível de casos de diarreia. Por isso, este composto torna-se de elevado interesse a níveis nutricionais e farmacêuticos.

1.1 Síntese do composto D

O composto D pode ser sintetizado através da acção enzimática do composto C por α -1, 2 fucosiltransferase (FucT2), o que requer guanosina 5'difosfato (GDP)-E-fucose como um doador de E-fucose. A bactéria Y é conhecida por ser capaz de sintetizar o GDP-E-fucose, uma vez que é usado para a biossíntese do ácido colânico, um dos principais componentes da parede celular (Won-Heong Lee, 2012).

1.2 Etapas do processo do isolamento/concentração do composto D

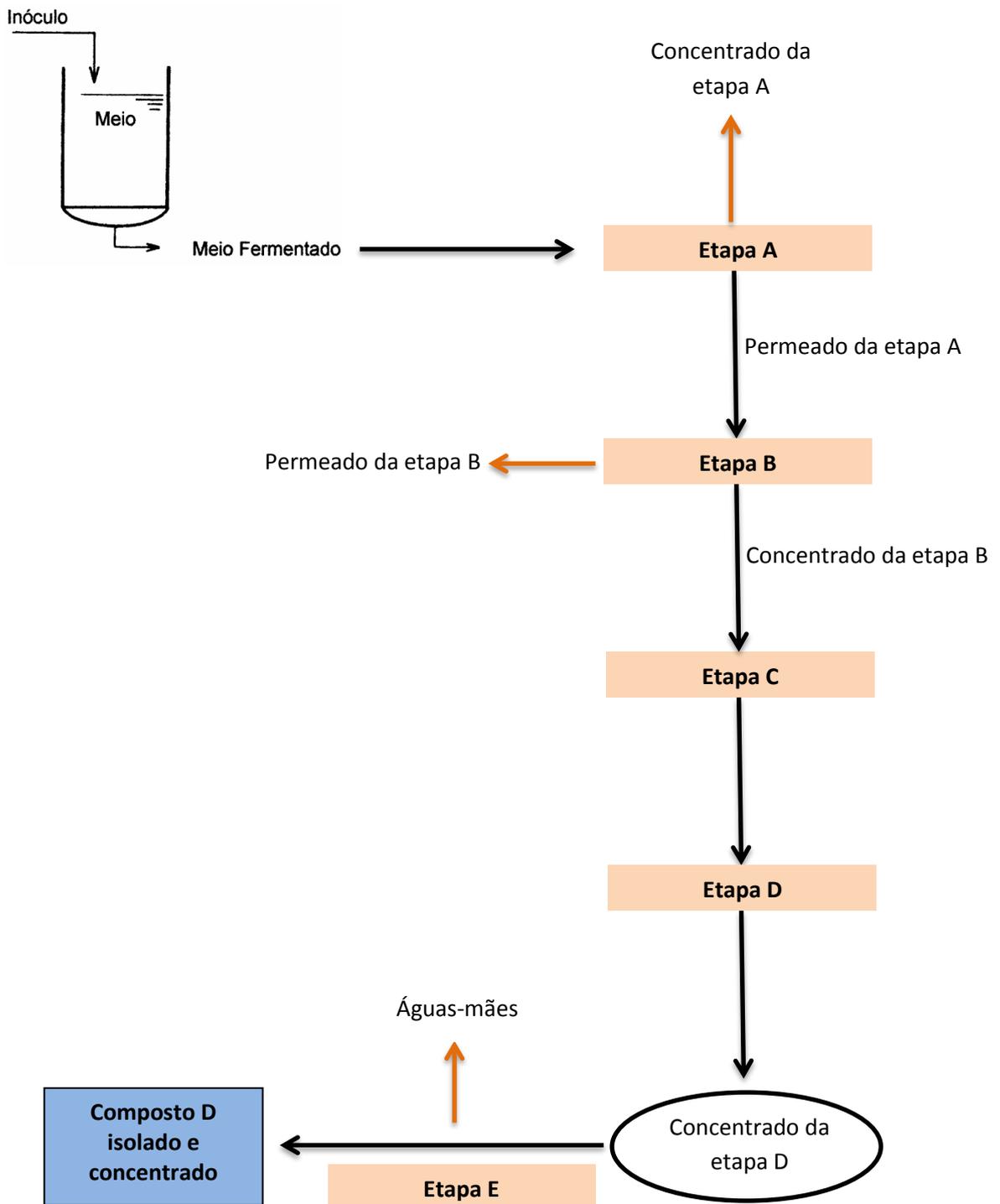


Figura 39 - Etapas do processo de concentração e isolamento do produto das fermentações.

Após o processo fermentativo terminar, é necessário isolar o composto D e concentrá-lo até aos valores desejados. Assim, o caldo da fermentação passa por diversos passos:

1º Etapa A: Nesta fase, obtém-se o CA (concentrado da Etapa A) e o PA (permeado da Etapa A). O CA é excluído (concentração do composto D bastante baixa) e o PA, como tem elevadas concentrações do composto D, segue no processo. Nesta fase é criada a 1ª calibração para prever os valores do composto D resultantes da etapa A.

2º Etapa B: Nesta fase, as espécies iónicas maiores e moléculas complexas são retidas, logo o composto D fica retido na membrana. Assim, o permeado da etapa B (PB), como tem uma baixa concentração ou nenhuma do composto D, é rejeitado e o concentrado da etapa B (CB) é usado na fase seguinte.

3º Etapa C: Nesta fase, o CB é filtrado para se separar das suas impurezas ou elementos poluentes. Esses componentes que estão no CB ficam retidos na etapa C. Nesta fase é criada a 2ª calibração para prever os valores do composto D resultantes das etapas B e C.

4º Etapa D: Nesta fase há uma separação parcial dos componentes, induzida por uma corrente eléctrica. O resultado final é um aumento da concentração de iões em compartimentos alternados e uma redução nos restantes compartimentos, ou seja, formam-se duas correntes, uma diluída e outra concentrada. Nesta fase é criada a 3ª calibração para prever os valores do composto D resultantes da etapa D.

5º Etapa E: Nesta fase o objectivo é concentrar ainda mais o produto desejado. São criadas a 4ª e 5ª calibração para prever os valores do composto D resultantes da etapa E. São necessárias duas calibrações pois é necessário saber qual o melhor modo de medição através do método de referência, isto é, se os valores resultantes do NIRS se assemelham mais à IC quando esta é efectuada com amostras medidas em volume ou medidas em peso.

6º Etapa F: Para se obter o composto D em pó e concentrado, é necessário que as amostras sofram a etapa F. Nesta fase as amostras são tratadas com Ácido acético, sendo assim necessário criar a 6ª calibração onde se prevê os valores do ácido acético.

2. Parte experimental

O acompanhamento do isolamento do produto da fermentação em estudo através do NIRS foi com o objectivo de acelerar o processo, isto é, saber se seria possível acompanhar as diversas fases do processo de concentração do composto D. O método usado para saber o valor da concentração do composto D foi a Cromatografia iónica. Como este método, apesar de eficaz, é um processo moroso, a substituição pelo NIRS seria ideal.

2.1 Instrumentação

2.1.1 Espectroscopia NIR

Os espectros NIR foram adquiridos utilizando um espectrofotómetro FT-NIR modelo FTLA2000-160 da ABB no intervalo de comprimento de onda entre os 12000 cm^{-1} e os 4500 cm^{-1} , com uma resolução espectral de 16 cm^{-1} , a uma temperatura de 25°C. Cada espectro obtido é a média de 32 varrimentos e com um ganho em Low B. O espectrofotómetro vem equipado com um acessório de suporte para amostras líquidas com módulo de transmitância, fonte de radiação térmica policromática, produzida por uma lâmpada de Quartz-Halogénio e um detector de índio-Arsénio (InAs).

As amostras são colocadas sobre o acessório de suporte de amostras líquidas em frascos cilíndricos de 1mL.

2.1.2 Técnica Instrumental de referência – Cromatografia Iónica

A concentração do composto D foi determinada por IC. O material usado foi:

- Equipamento: Metrohm 881 compact IC pro
- Amostrador automático: Metrohm 863 compact autosampler
- Detector PAD: Metrohm 896 professional detector
- Coluna com comprimento de 250mm, diâmetro de 2mm, Dionex CarboPac PA1
- Pré-coluna com comprimento de 50mm, diâmetro de 2mm, Dionex CarboPac PA1
- Balança analítica

- Balões volumétricos
- Micropipetas
- Pontas de micropipetas
- Viais de 1mL
- Falcons de 11mL com tampa para o amostrador automático
- Garrafa de eluente PP 2L

2.1.3 Programas para aquisição dos espectros

Os espectros NIR e os dados de referência das amostras foram tratados pelos programas informáticos da Galatic:

- Grams 32/AI 7.0 – Programa que permite a aquisição dos espectros e a sua visualização, aplicando os pré-tratamentos espectrais mais habituais.
- AIRS PHARMA 3.0 com o PLSPLUS/IQ – Programa que permite desenvolver calibrações de modo a obter os métodos de análise pretendidos. Permite trabalhar com conjuntos de dados multivariáveis e incorpora os algoritmos quimiométricos mais comuns. Foi utilizado para aplicar os pré-tratamentos espectrais, realizar análises de componentes principais (PCA) e calcular regressões por mínimos quadrados parciais (PLS).

2.1.4 Ensaios de Isolamento/Concentração e Amostragem

No total, foram usadas 224 amostras. Para obter uma maior variedade de espectros, adquiriram-se os espectros resultantes das fases de concentração mas também CA e PB, que eram rejeitados no processo, para ser possível determinar as concentrações destas amostras. O processo fermentativo decorreu em reactores de aço, variando da escala piloto para laboratorial, mantendo o mesmo meio de cultura, variando apenas o volume (400L para a escala piloto e 1.5L para a escala laboratorial). As fermentações foram realizadas pela bactéria Y e foi controlada a uma temperatura entre os 20°C e os 30°C e a um pH entre 7 e 9.

3. Discussão de Resultados

À medida que o caldo fermentativo seguia nas etapas descritas na figura 39, a concentração do composto D ia aumentando (figura 40). Para a construção das calibrações, de forma a obter uma gama de trabalho mais alargada, foram usadas todo o tipo de amostras do processo, desde concentrados aos PB, CA e as ML (águas-mães).

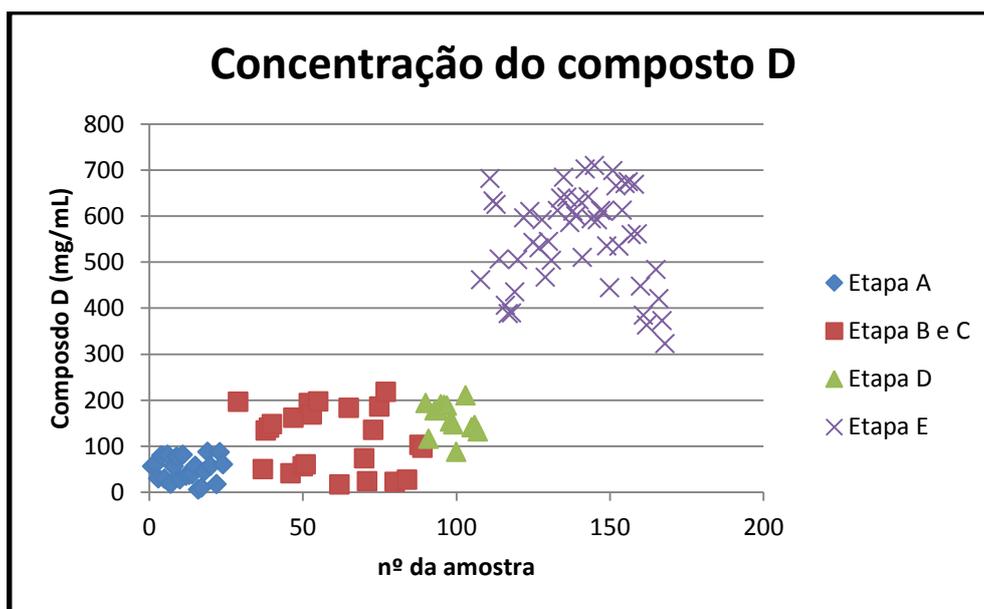


Figura 40 – Aumento da concentração do composto D ao longo do processo.

A figura 41 mostra alguns dos espectros usados no processo. Todos eles têm o mesmo comportamento, mostrando dois picos elevados aos 5000 cm^{-1} e 7000 cm^{-1} , relacionados com o primeiro sobretom do alongamento da ligação O-H da água. Como no final das fermentações existem grandes quantidades de água na matriz e como o background usado foi um vial vazio, é normal que estas duas bandas estejam mais notáveis.

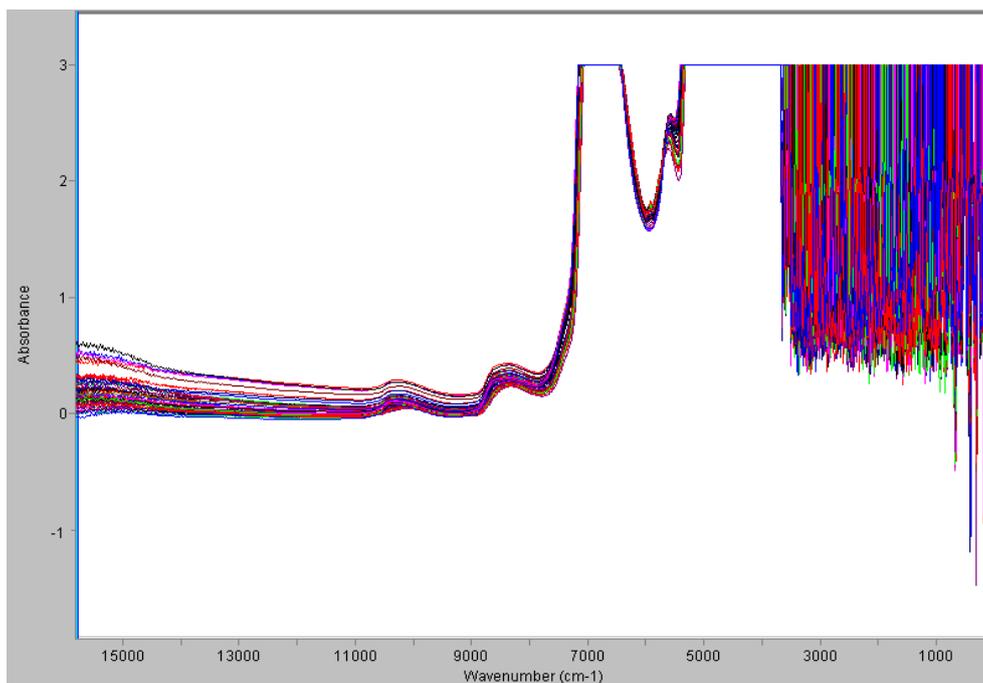


Figura 41 – Espectro usados para a calibração.

Para saber qual a região do espectro que tem interesse de ser analisada (características espectrais), os espectros sofrem um pré-processamento, a 1ª derivada. Pela análise da figura 42, existem duas regiões espectrais definidas. A primeira região é entre os 9100 cm^{-1} e os 8100 cm^{-1} e a segunda é entre os 7000 cm^{-1} e os 5400 cm^{-1} . Como foi provado com as amostras das fermentações, a zona ideal para quantificar o composto D é a 2ª, pois está associada ao primeiro sobretom do alongamento da ligação O-H existente na molécula do composto D (Tabela 1).

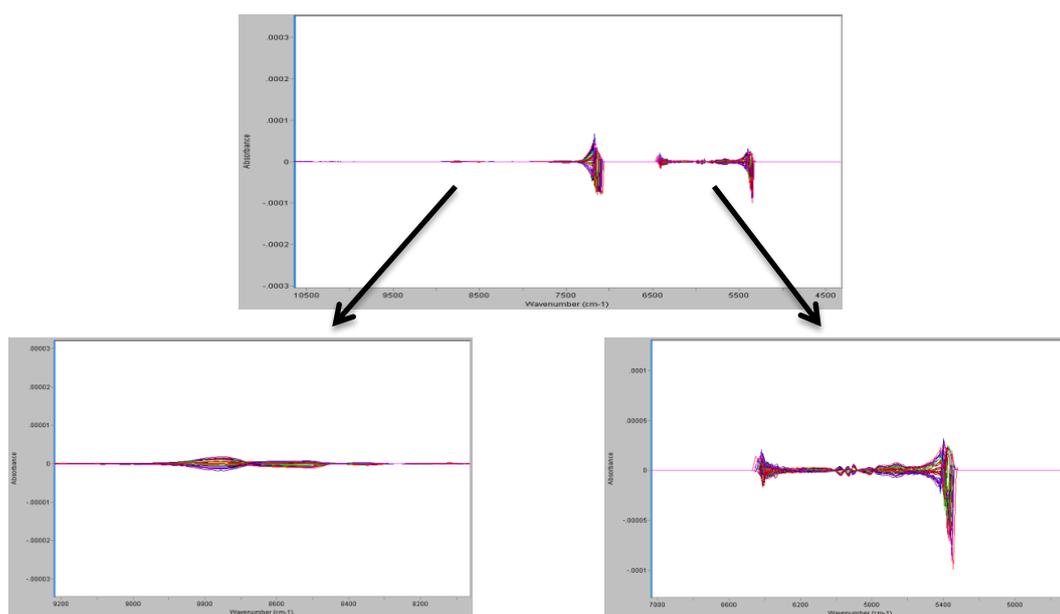


Figura 42 – Espectros do Isolamento processados com a 1ª derivada.

Etapa A

3.1 Desenvolvimento do método

Primeiramente deve ser analisada a existência de padrões nos dados. Ao utilizar a PCA nos espectros adquiridos para a calibração, após os pré-processamentos, foram encontradas diferenças entre as amostras. Pela análise da figura 43, é possível verificar que as amostras estão agrupadas em dois grupos, sendo que as amostras do 2º e 3º quadrante pertencem às amostras CA e as amostras do 1º e 4º quadrante pertencem às amostras PA.

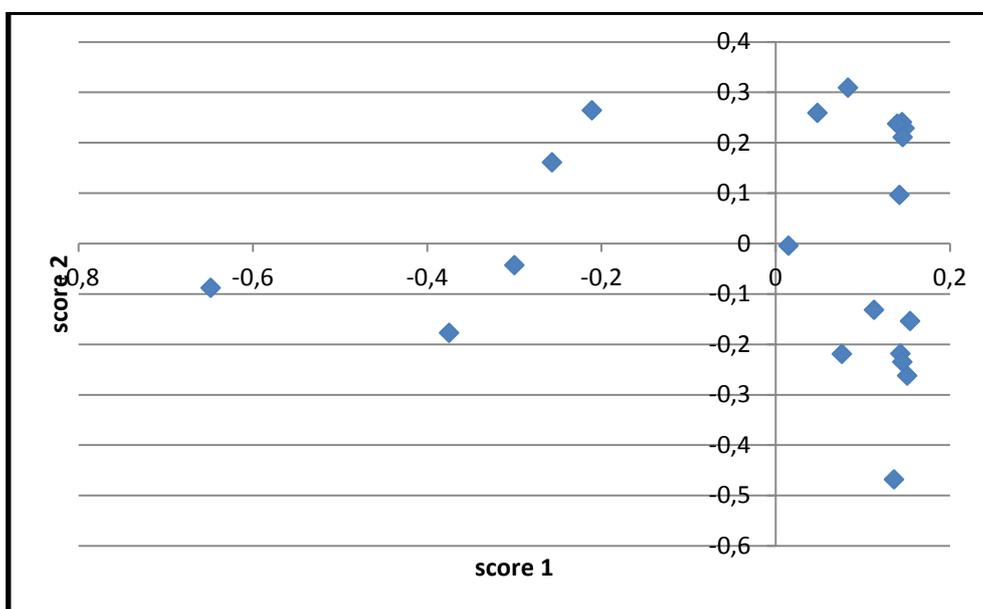


Figura 40 – Análise PCA das amostras resultantes da etapa A.

Para o processo da etapa A foram usadas 20 amostras. O modelo foi elaborado com o tipo de calibração PLS-1, combinado com o tipo de diagnóstico Cross Validation, a preparação dos dados foi Mean Center e a correção do percurso óptico foi Normalize.

Tabela 23 – Resultado da calibração para o processo da etapa A

Modelo	Região espectral (cm ⁻¹)	Nº de factores	R ²	SECV (mg/mL)
U	9100 - 8100	5	0,938	5,94

Um bom modelo de calibração deve ter o valor de SECV mais baixo e o valor da correlação (R^2) deve ser o mais próximo de 1. Sem efectuar a validação externa, o modelo apresenta resultados para uma boa calibração. O valor da correlação é próximo do ideal (0,938) e o erro associado à calibração apresenta um valor baixo, cerca de 6 mg/mL. Contudo, o número de amostras usadas é reduzido, permitindo apenas verificar a existência de uma correlação. A introdução de novas amostras na calibração irá torná-la melhor, aumentando o seu valor e R^2 e reduzindo o SECV.

3.2 Validação Externa

Para a validação externa foram usadas 4 amostras. O modelo revelou-se eficaz, pois apresentou um factor de correlação de 0,992 e o erro de previsão é baixo (3,36 mg/mL). Além disso, a intercepção com o eixo das ordenadas é próximo de zero (1,96).

Tabela 24 – Resultados da calibração e da validação externa para as amostras da etapa A

Modelo	Região espectral (cm^{-1})	Composto	Calibração		Validação Externa	
			R^2	SECV (mg/mL)	R^2	SEP (mg/mL)
U	9100 - 8100	D	0,938	5,94	0,992	3,36

Apesar do reduzido número de amostras usadas para a validação externa, o valor de SEP é baixo. Para certificar que a calibração elaborada é a mais correcta e garante resultados fidedignos, é necessário aumentar o número de amostras, quer para a calibração, quer para a validação.

Etapa B e C

3.1 Desenvolvimento do método

Nesta fase optou-se por fazer apenas uma única calibração para duas etapas do processo, visto que as alterações que podem ocorrer são apenas ao nível da etapa B. A etapa C serve para remover a cor e as impurezas que possam existir, logo não tem qualquer influência na aquisição dos espectros.

Ao utilizar a PCA nos espectros adquiridos para a calibração, após os pré-processamentos, foram encontradas pequenas diferenças entre as amostras. Pela análise da figura 44, é possível verificar que as amostras pertencentes a uma determinada fermentação encontram-se agrupadas no 2º quadrante. Esta diferença pode ser justificada por alguma diferença no meio fermentativo.

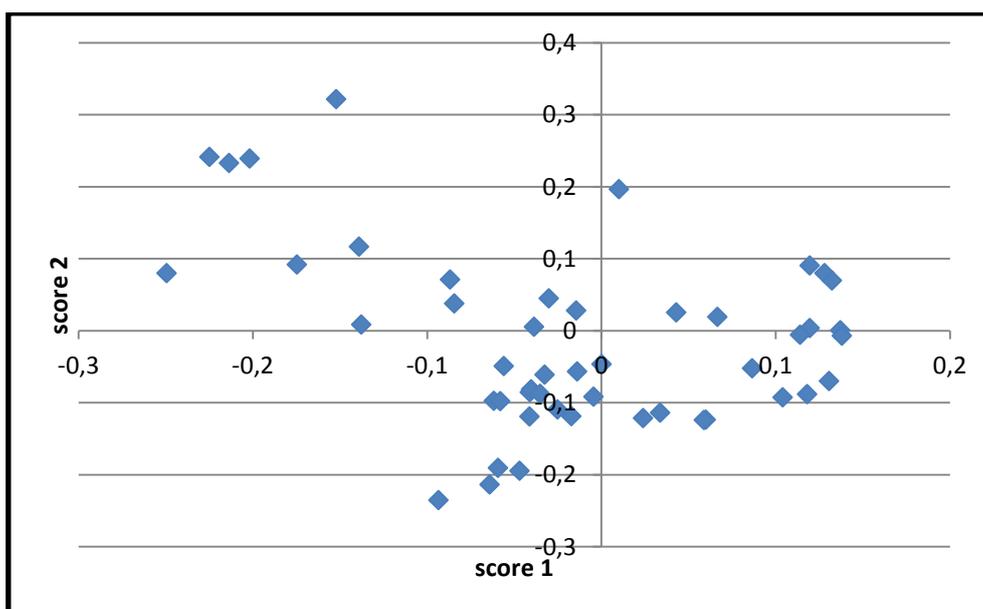


Figura 41 – Análise PCA para as amostras resultantes da etapa B e C.

Para o processo da etapa B e C e carvão activado foram usadas 50 amostras. O modelo foi elaborado com o tipo de calibração PLS-1, combinado com o tipo de diagnóstico Cross Validation, a preparação dos dados foi Mean Center e a correcção do percurso óptico foi Normalize.

Tabela 25 – Resultado da calibração para o processo da etapa B e C

Modelo	Região espectral (cm ⁻¹)	Nº de factores	R ²	SECV (mg/mL)
N	9100 - 8100	6	0,986	14,1

Sem efectuar a validação externa, o modelo apresenta um bom valor de correlação, pois é próximo do ideal (0,986), contudo o erro associado à calibração apresenta um valor elevado para o tipo de amostra em estudo (14,1 mg/mL).

3.2 Validação Externa

Para a validação externa foram usadas 10 amostras. O modelo revelou-se eficaz, pois apresenta um factor de correlação de 0,980 e a intercepção com o eixo das ordenadas é de 5,39. Contudo, o erro de previsão é elevado para o tipo de amostras em estudo (13,50 mg/mL), o que faz com que a confiança dos resultados obtidos não seja a melhor.

Tabela 26 – Resultados da calibração e da validação externa para as amostras da etapa B e C

Modelo	Região espectral (cm ⁻¹)	Composto	Calibração		Validação Externa	
			R ²	SECV (mg/mL)	R ²	SEP (mg/mL)
N	9100 - 8100	D	0,986	14,1	0,980	13,50

O número de amostras usadas para a validação externa é reduzido, daí o SEP ser elevado. Para certificar que a calibração elaborada é a mais correcta e garante resultados fidedignos, é necessário aumentar o número de amostras.

Etapa D

3.1 Desenvolvimento do método

Ao utilizar a PCA nos espectros adquiridos para a calibração, após os pré-processamentos, foram encontradas diferenças entre as amostras. Pela análise da figura 45, é possível verificar que as amostras estão agrupadas em dois grupos, sendo que as amostras do 2º e 3º quadrante pertencem às amostras de uma só fermentação e as amostras do 1º e 4º quadrante pertencem às amostras das restantes fermentações estudadas.

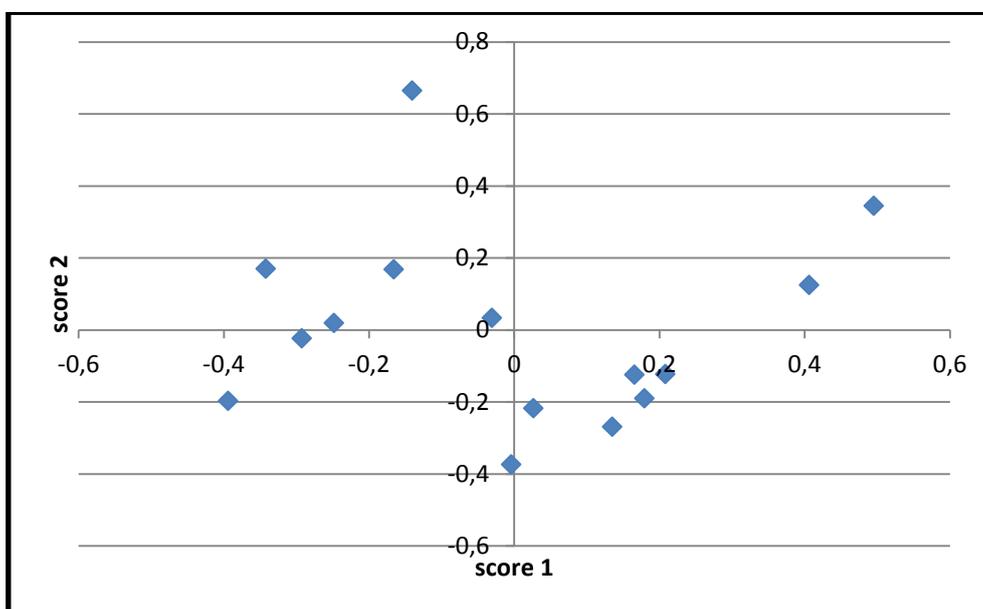


Figura 42 – Análise PCA para as amostras resultantes da etapa D.

Para o processo da etapa D foram usadas 15 amostras. O modelo foi elaborado com o tipo de calibração PLS-1, combinado com o tipo de diagnóstico Cross Validation, a preparação dos dados foi Mean Center e a correção do percurso óptico foi Normalize.

Tabela 27 – Resultado da calibração para o processo da etapa D

Modelo	Região espectral (nm)	Nº de factores	R ²	SECV (mg/mL)
E	9100 - 8100	4	0,982	7,09

Sem efectuar a validação externa, o modelo apresenta resultados para uma boa calibração. O valor da correlação é próximo do ideal (0,982) e o erro associado à calibração apresenta um valor baixo, cerca de 7,09 mg/mL. Contudo, o número de amostras usadas é reduzido, permitindo apenas verificar a existência de uma correlação. A introdução de novas amostras na calibração irá torná-la melhor, aumentando o seu valor e R^2 e reduzindo o SECV.

3.2 Validação Externa

Para a validação externa foram usadas apenas 3 amostras. O modelo revelou-se eficaz, pois apresentou um factor de correlação de 0,974, contudo o erro de previsão é alto (10,04 mg/mL). Além disso, a intercepção com o eixo das ordenadas é muito afastado de zero (41,36).

Tabela 28 – Resultados da calibração e da validação externa para as amostras da etapa D

Modelo	Região espectral (cm^{-1})	Composto	Calibração		Validação Externa	
			R^2	SECV (mg/mL)	R^2	SEP (mg/mL)
E	9100 - 8100	D	0,982	7,09	0,974	10,04

Apesar do reduzido número de amostras usadas para a validação externa, o valor de SEP é baixo. No entanto, não é possível afirmar que o modelo criado é o melhor para estas amostras, pois os 3 pontos escolhidos apenas reflectem uma pequena parte da gama espectral estudada. Para certificar que a calibração elaborada é a mais correcta e garante resultados fidedignos, é necessário aumentar o número de amostras.

Etapa E

3.1 Desenvolvimento do método

Ao utilizar a PCA nos espectros adquiridos para a calibração, após os pré-processamentos, não foram encontradas diferenças entre as amostras. Pela análise da figura 46, é possível verificar que as amostras estão agrupadas em apenas um grupo, sendo que as 3 amostras mais afastadas das restantes, correspondem aos outliers posteriormente removidos.

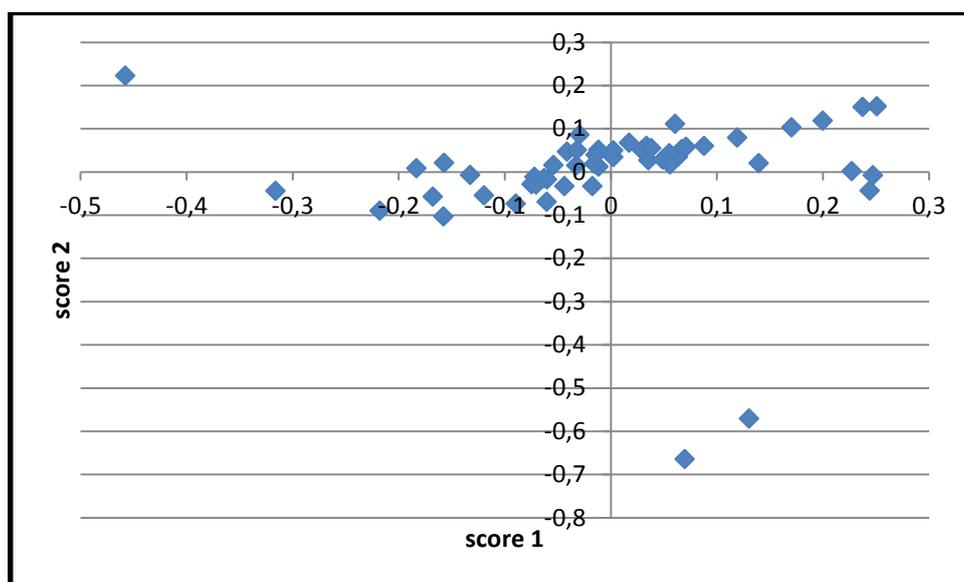


Figura 43 – Análise PCA para as amostras resultantes da etapa E.

Para o processo da destilação optou-se por comparar dois métodos. O primeiro foi obtido com os resultados medidos em volume e o segundo os resultados foram medidos em massa. A razão pela qual foram comparados estes dois métodos, reflecte-se na descoberta de qual das unidades se aproxima mais do método de referência (IC), quando previsto pelo NIR.

Como as amostras nesta fase são muito concentradas, ao pipetar corre-se o risco de não reflectir uma uniformidade, podendo acumular-se o composto D na ponta descartável da micropipeta, pipetando uma quantidade de solução com substrato que não corresponde à realidade. Assim, ao medir por peso, tenta manter-se uma homogeneidade da amostra para que não haja perda do composto D.

Para ambos os métodos foram usadas 16 amostras. Os modelos foram elaborados com o tipo de calibração PLS-1, combinado com o tipo de diagnóstico Cross Validation, a preparação dos dados foi Mean Center e a correcção do percurso óptico foi Normalize.

Tabela 29 – Resultado das calibrações para o processo da etapa E

Modelo	Região espectral (cm ⁻¹)	Nº de factores	R ²	SECV (mg/mL)
D _{volume}	9100 - 8100	4	0,990	16,19
D _{peso}	9100 - 8100	6	0,994	8,72

Para ambos os modelos, as correlações são boas, contudo o erro associado à calibração em volume é ligeiramente elevado (16,19 mg/mL). Sem a validação externa e comparando os valores dos dois modelos, o modelo medido em peso tem melhores resultados, ou seja, este modelo aproxima-se mais ao método do NIR.

3.2 Validação Externa

Para a validação externa foram usadas apenas 4 amostras para ambos os modelos. Os dois modelos revelaram-se eficazes, pois apresentaram um factor de correlação de 0,997 (volume) e de 0,991 (peso), contudo os erros de previsão foram altos. Além disso, as intercepções com o eixo das ordenadas são muito afastadas de zero, sendo 86,73 para a calibração medida em volume e 78,55 para a calibração medida em peso.

Tabela 30 – Resultados das calibrações e das validações externas para as amostras da etapa E

Modelo	Região espectral (cm ⁻¹)	Composto	Calibração		Validação Externa	
			R ²	SECV (mg/mL)	R ²	SEP (mg/mL)
D _{volume}	9100 - 8100	D	0,990	16,19	0,997	43,96
D _{peso}	9100 - 8100	D	0,994	8,72	0,991	49,64

O número de amostras usadas para a validação externa foi reduzido, daí o SEP ser tão elevado. No entanto, como nesta fase as concentrações do composto D são elevadas (na ordem dos 500 mg/mL), um erro com estas dimensões não é muito preocupante.

Com os resultados obtidos não é possível afirmar qual dos modelos será o mais fidedigno a seguir, pois seriam necessárias mais amostras para o comprovar.

Etapa F

3.1 Desenvolvimento do método

Ao utilizar a PCA nos espectros adquiridos para a calibração, após os pré-processamentos, foram encontradas diferenças entre as amostras. Pela análise da figura 47, é possível verificar que existem amostras mais afastadas (1º e 4º quadrante). A diferença pode dever-se a pequenas alterações existentes na matriz dessas amostras, contudo não influenciam negativamente a construção das calibrações.

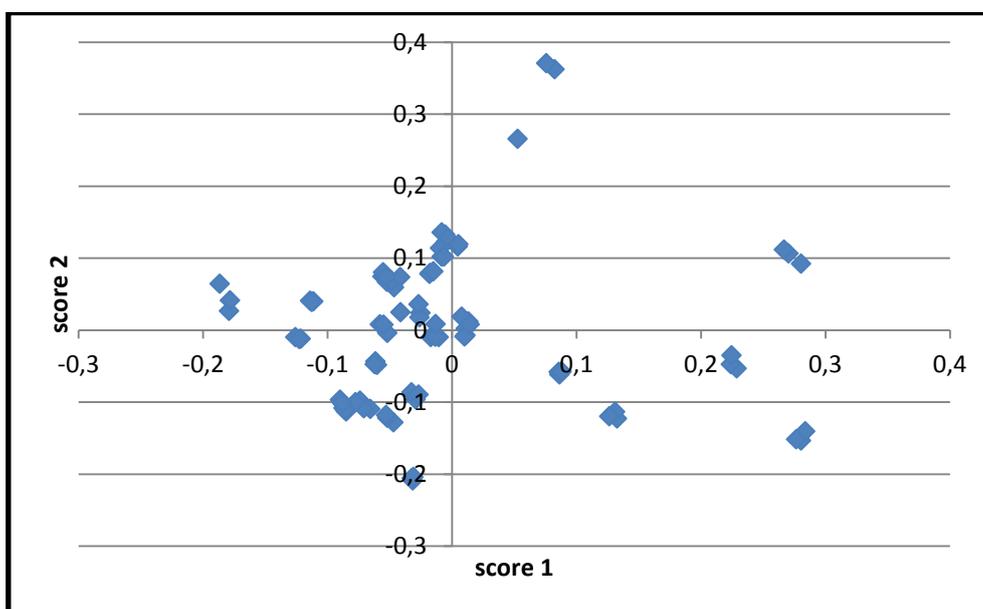


Figura 44 – Análise PCA para as amostras resultantes da etapa F.

Para reduzir o erro associado à aquisição espectral, as 28 amostras usadas neste processo foram medidas em triplicado, fazendo um total de 84 espectros. O modelo foi elaborado com o tipo de calibração PLS-1, combinado com o tipo de diagnóstico Cross Validation, a preparação dos dados foi Mean Center e a correção do percurso óptico foi MSC.

Tabela 31 – Resultado da calibração para o processo da etapa F

Modelo	Região espectral (cm ⁻¹)	Nº de factores	R ²	SECV (%)
S	6500 - 5500	6	0,980	0,15

Nesta etapa do processo não existiram amostras suficientes para realizar a validação externa, pois o processo ainda decorre nas instalações da Cipan. No entanto, o modelo apresenta valores razoáveis para ser prosseguido o estudo.

Águas-mães

3.1 Desenvolvimento do método

Ao utilizar a PCA nos espectros adquiridos para a calibração, após os pré-processamentos, foram encontradas diferenças entre as amostras. Pela análise da figura 48, é possível verificar que as amostras estão agrupadas de acordo com as fermentações a que correspondem. Por exemplo, no 1º quadrante estão as amostras correspondentes a uma determinada fermentação e no 2º quadrante estão as amostras de uma diferente fermentação. Isto pode dever-se a pequenas alterações nos meios fermentativos

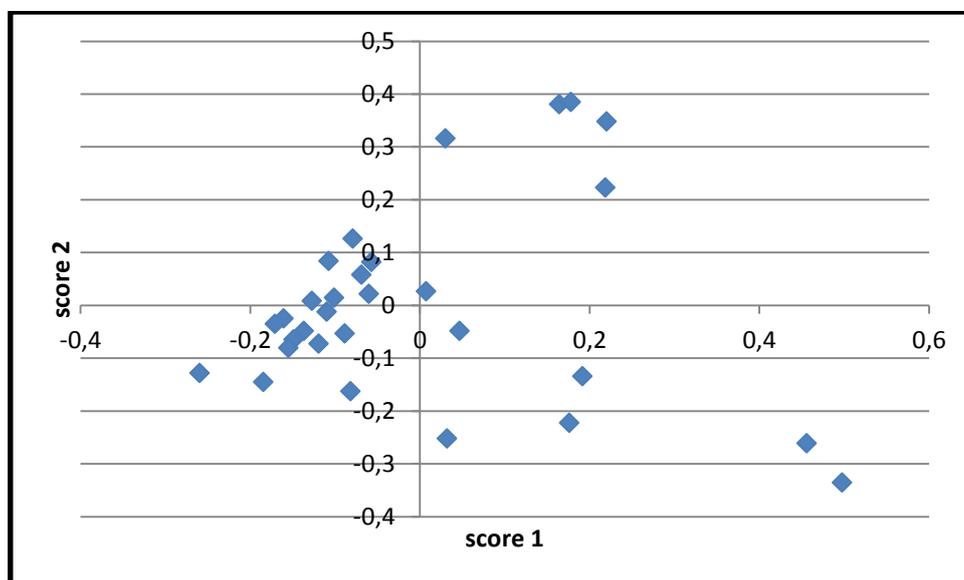


Figura 45 – Análise PCA para as amostras resultantes da etapa G.

Para as amostras da etapa G foram usadas 25 amostras. O modelo foi elaborado com o tipo de calibração PLS-1, combinado com o tipo de diagnóstico Cross Validation, a preparação dos dados foi Mean Center e a correcção do percurso óptico foi Normalize.

Tabela 31 – Resultado da calibração para as amostras das águas-mães

Modelo	Região espectral (cm^{-1})	Nº de factores	R^2	SECV (mg/mL)
ML	9100 - 8100	5	0,96	4,5

Sem efectuar a validação externa, o modelo apresenta um bom valor de correlação, pois é próximo do ideal (0,96) e o erro associado à calibração apresenta um valor baixo (4,5 mg/mL). Contudo, o número de amostras usadas na calibração é reduzido.

3.2 Validação Externa

Para a validação externa foram usadas apenas 3 amostras. O modelo revelou-se eficaz, pois apresentou um factor de correlação de 0,982, contudo o erro de previsão é alto (13,32 mg/mL). Além disso, a intercepção com o eixo das ordenadas é muito afastado de zero (10,24).

Tabela 34 – Resultados da calibração e da validação externa para as amostras da etapa G

Modelo	Região espectral (cm ⁻¹)	Composto	Calibração		Validação Externa	
			R ²	SECV (mg/mL)	R ²	SEP (mg/mL)
ML	9100 - 8100	D	0,96	4,5	0,982	12,32

O número de amostras usadas para a validação externa é reduzido, daí o SEP ser elevado. No entanto, não é possível afirmar que o modelo criado é o melhor para estas amostras, pois os 3 pontos escolhidos apenas reflectem uma pequena parte da gama espectral estudada.

Para certificar que a calibração elaborada é a mais correcta e garante resultados fidedignos, é necessário aumentar o número de amostras.

D- Conclusões

A espectroscopia de Infravermelho Próximo, juntamente com as técnicas de quimiometria, revelou ser uma técnica eficaz como substituinte dos métodos convencionais usados na monitorização de processos farmacêuticos. A introdução desta técnica na indústria trás inúmeras vantagens, desde a não utilização de solventes, a não preparação de amostras, bem como a rapidez de obtenção de resposta. Além do mais, não necessita de um operador qualificado para poder manusear o equipamento, o que reduz custos.

Para o composto A obteve-se uma boa calibração e o seu erro de previsão foi baixo, o que permitiu uma margem de confiança para a sua implementação no *software* do aparelho. Assim, quando for necessário a medição da humidade deste composto, os operadores da Cipan poderão recorrer ao NIRS para obter uma rápida resposta.

O mesmo sucede com o composto B, pois graças à eficácia da calibração elaborada para este solvente, a Cipan pode recorrer a esta técnica para obter os valores de humidade, deixando de parte o método convencional aplicado, o Karl-Fischer.

Relativamente ao estudo das fermentações, à medida que a quantidade de espectros envolvidos na calibração ia aumentando, mais baixo era o erro de previsão (SEP). Isto significa que, para poder aumentar o grau de confiança nos dados obtidos, o estudo necessita de ser continuado. No entanto, como os valores de SEP para os compostos C e D são baixos, e como o tipo de processo que é efectuado na Cipan não necessita de um erro associado menor ao obtido, as calibrações elaboradas foram aceitáveis. O modelo D, como obteve os melhores resultados e industrialmente é mais prático (prevê os dois compostos em simultâneo), foi implementado no aparelho de NIRS, de modo simplificar o trabalho feito pelos operadores da Cromatografia Iónica.

O estudo do acompanhamento do processo de isolamento/concentração do produto das fermentações apresentou também bons resultados, contudo, ainda está um pouco distante a sua implementação no aparelho de NIRS, pois a quantidade de dados espectrais estudados foi reduzida. Tal como nas fermentações, quanto maior a quantidade de espectros, maior a variabilidade, logo menor será o erro de previsão, por isso tornar-se-ia interessante a continuação do estudo deste processo, de modo a poder substituir a Cromatografia iónica pela Espectroscopia de infravermelho próximo, visto que seria algo de inovador na Indústria Farmacêutica que traria as vantagens já conhecidas.

E- Perspectivas futuras

Existem muitos processos na indústria farmacêutica, principalmente processos efectuados no Controlo de Qualidade, que recorrem a várias técnicas, como a Cromatografia gasosa, Cromatografia iónica, Cromatografia líquida de alta eficiência, Karl-Fischer, etc. Todos estes processos necessitam de solventes e de técnicos especializados para o seu manuseio, além de que o tempo para obter os resultados é demorado. Logo, seria de interesse para as indústrias que aplicassem a Espectroscopia de infravermelho próximo como substituta dos métodos convencionais usados, pois reduziria a sua pegada ecológica e os custos associados ao uso/manutenção dos aparelhos.

A monitorização e controlo de bioprocessos através do NIRS ainda estão numa fase muito primária, sendo necessário desenvolver ferramentas que permitam determinar os compostos intervenientes nas diferentes etapas dos processos. Na indústria farmacêutica, muitos princípios activos são produzidos através de fermentações que, para poder determinar o composto de interesse, recorrem a métodos convencionais que são morosos e poluentes. No estudo elaborado das fermentações e o isolamento/concentração do produto das fermentações, visto que estruturalmente está criado, seria um bom tema a ser desenvolvido para que pudesse ser aplicado na Indústria, pois ao investirem no desenvolvimento de novos métodos através do NIRS, não só estão a beneficiar em termos económicos (principal objectivo de uma indústria), como em termos ecológicos.

F- Referências Bibliográficas

Almeida, F. M. (Novembro de 2009). *Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) na Caracterização de Farinhas para Alimentação Pueril*. Instituto Superior Técnico - Universidade Técnica de Lisboa.

Ceitel, L. O. (Setembro de 2007). Process Analytical Technology in Active Pharmaceutical Ingredients Production. *Dissertação para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química*. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior Técnico.

CETESB. (Julho de 2012). *Ficha de Informação Toxicológica - Composto B*. Brasil: CETESB.

Claudia Eith, M. K. (Fevereiro de 2001). *Practical ion Chromatography - an introduction*. Herisau, Suíça .

Costa, P. A. (Setembro de 2000). *Aplicações da Espectroscopia de Radiação Infravermelha Próxima FT-NIR na Monitorização de Processos Farmacêuticos*. Lisboa, Portugal: Instituto Superior Técnico - Universidade Técnica de Lisboa.

Cristina M. C. M. Couto, M. C. (17 de Novembro de 1999). *Complexação da Tetraciclina, da Oxitetraciclina e da Clortetraciclina com o catião Cobre (II). Estudo potenciométrico*. Porto: CEQUP - Departamento de Química Física - Faculdade de Farmácia do Porto .

ECHA - European Chemicals Agency. (s.d.). *Pictogramas CRE*. Obtido em 20 de Março de 2014, de <http://echa.europa.eu/pt/chemicals-in-our-life/clp-pictograms>

Elene Cristina Pereira-Maia, P. P. (9 de Setembro de 2009). *Tetraciclinas e Glicilciclinas: uma visão geral*. Brasil: Quim. Nova, Vol. 33, No. 3, 700-706, 2010.

Farmacopeia Portuguesa VIII. (2005). Espectroscopia no infravermelho próximo. Infarmed.

FCT - Departamento de Química - Cromatografia Iónica. (2014). Obtido em Março de 2014, de Cromatografia Iónica: <http://www.dq.fct.unl.pt/servicos-externos/cromatografia-ionica>

George X. Zhou, Z. G. (13 de Dezembro de 2002). *Determination and differentiation of surface and bound water in drug substances by Near Infrared Spectroscopy*. Rahway, Nova Jérсия.

Giovani Brandão, M. d. (Janeiro de 2007). *Elementos Biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 2ª parte – A Fermentação*. Revista Analytica.

Leitão, T. M. (2012). *Aplicações da espectroscopia da Infravermelho próximo em Ciências Farmacêuticas*. Porto: Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Fernando Pessoa.

M. Manuela da Fonseca, J. A. (s.d.). *Reactores Biológicos - Fundamentos e Aplicações*. Lidel.

Metrohm. (Fevereiro de 2013). *NIR Spectroscopy. A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing processes*. Herisau, Suíça: Metrohm.

Nascimento, R. J. (Fevereiro de 2012). *Monitoramento em tempo real de processos fermentativos por espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS)*. Natal, Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Centro de Tecnologia - Departamento de Engenharia Química.

Paula F. Costa, T. P. (s.d.). *Monitorização at-line de Bioprocessos Industriais com FT-NIR*. Lisboa: Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia.

Pereira, C. M. (Junho de 2011). *A Espectroscopia NIR no Controlo de Qualidade de Solventes Industriais. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química*. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior Técnico.

Reich, G. (19 de Janeiro de 2005). *Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications*. Institute for Pharmacy and Molecular Biotechnology, Department of Pharmaceutical Technology and Pharmacology, University of Heidelberg.

S. Alison Arnold, L. M. (Novembro de 2002). *Employing Near-Infrared Spectroscopic Methods of Analysis for Fermentation Monitoring and Control - Part 1, Method Development*. BioPharm International.

S. Alison Arnold, L. M. (Janeiro de 2003). *Employing Near-Infrared Spectroscopy Methods of Analysis for Fermentation Monitoring and Control - Part 2, Implementation Strategies*. BioPharm International.

Thermo Galatic. (2002). *PLSplus IQ - User's Guide*. Salem: USA.

Valentina Di Egidio, N. S. (18 de Janeiro de 2010). *NIR and MIR spectroscopy as rapid methods to monitor red wine fermentation*. Itália: Springer.

Won-Heong Lee, P. P.-H.-S.-H. (30 de Abril de 2012). *Whole cell biosynthesis of a functional oligosaccharide, compound D, using engineered Y bacteria*. BioMed Central, Ltd.

G- Bibliografia

AcoFarma. (s.d.). *Ficha de dados de segurança – Composto A*.

E. Tamburini, G. V. (23 de Setembro de 2002). *Near-Infrared Spectroscopy: A tool for monitoring submerged fermentation processes using an immersion optical-fiber probe*. Itália: Universidade de Ferrara - Departamento de Química.

European Medicines Agency - Science Medicines Health. (20 de Janeiro de 2012). *Guideline on the use of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations*. Londres, Reino Unido.

J. Luybaert, D. M. (23 de Dezembro de 2006). *Near-Infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis*. Bélgica: Department of Analytical Chemistry and Pharmaceutical Technology, Pharmaceutical Institute.

Jerome Workman, J. (1996). *A brief review of near infrared in petroleum product analysis*. Estados Unidos da América: Analytical Science & Technology, Kimberly-Clark Corp.

Natasa Smola, U. U. (4 de Novembro de 1999). *Qualitative and quantitative analysis of oxytetracycline by near-infrared spectroscopy*. Eslovénia.

Robert P. Cogdill, C. A. (Dezembro de 2004). *Using NIR Spectroscopy as an integrated PAT tool*. Duquesne University Center for Pharmaceutical Technology.

Science Lab - Chemicals & Laboratory Equipment. (21 de Maio de 2013). *Material Safety Data Sheet - Methyl Alcohol MSDS*.

Sigma-Aldrich. (2000). *Analytix - Advances in Analytical Chemistry. Latest developments of Karl Fischer reagents reagents more convenience and less toxicity*.

S.J. Haswell, A. (21 de Julho de 1999). *Chemometrics: the issues of measurement and modeling*. Reino Unido: Elsevier - Analytica Chimica Acta.

Xiangji Zhou, P. H. (14 de Março de 1997). *Moisture determination in hygroscopic drug substances by near infrared spectroscopy*. Indianápolis, Estados Unidos da América.

Zou Xiaobo, Z. J. (23 de Março de 2010). *Variables selection methods in near-infrared spectroscopy*. Elsevier - Analytica Chimica Acta.

Anexos

I – Fórmulário

Cálculo da Exactidão

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2}{n}}$$

n – nº de lotes

Y – valor previsto por NIR

y – valor do método de referência

$$SEL = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (x_1 - x_2)^2}{m}}$$

m – nº de lotes

(x₁-x₂) – valor absoluto da diferença entre determinações da mesma amostra, preferencialmente em condições de precisão intermédia.

Cálculo da Precisão

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}$$

$$RSD (\%) = \frac{S}{\text{média}} \times 100$$

S – desvio-padrão

n – nº de ensaios efectuados por amostra e por nível de concentração

y_k – resultado obtido para a amostra

\bar{y} – média aritmética dos resultados da amostra

Cálculo da robustez

$$t_{calculado} = \frac{\sqrt{n} \times [D_f]}{\sqrt{2} \times s}$$

n – número de ensaios a cada nível, dentro de cada ensaio

D_f – efeito do factor

s – desvio padrão entre os factores em estudo

II – Calibrações

- Fermentações

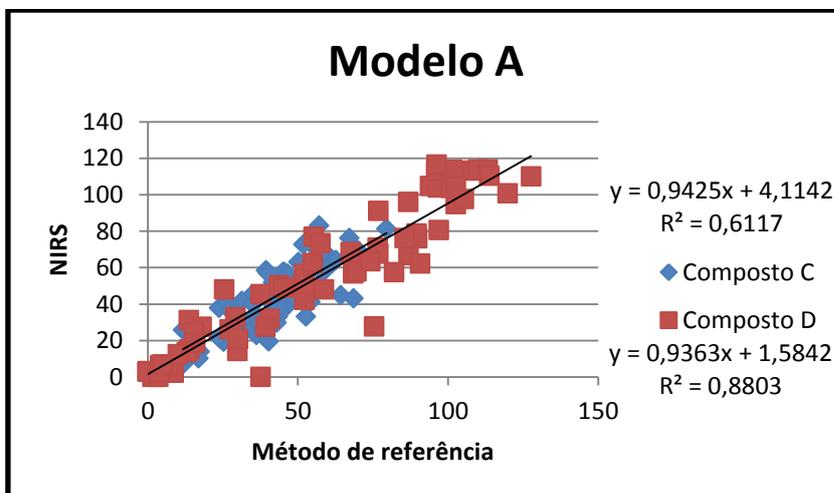


Figura A1 – Validação externa do modelo A.

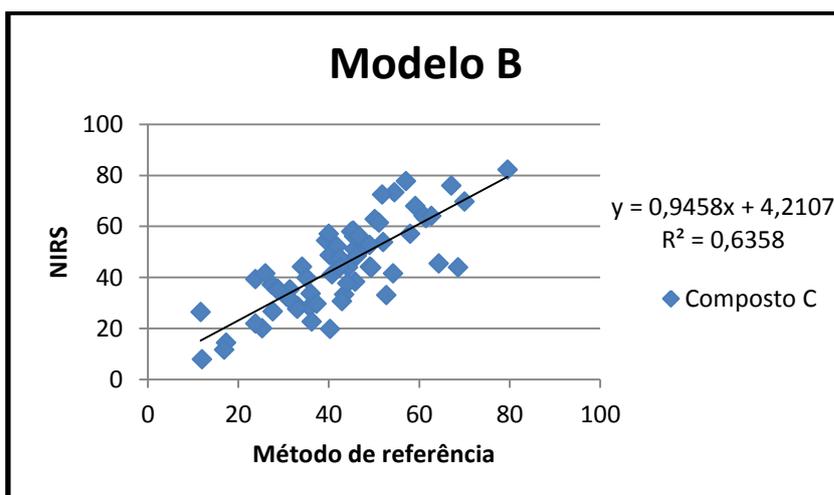


Figura A2 – Validação externa do modelo B.

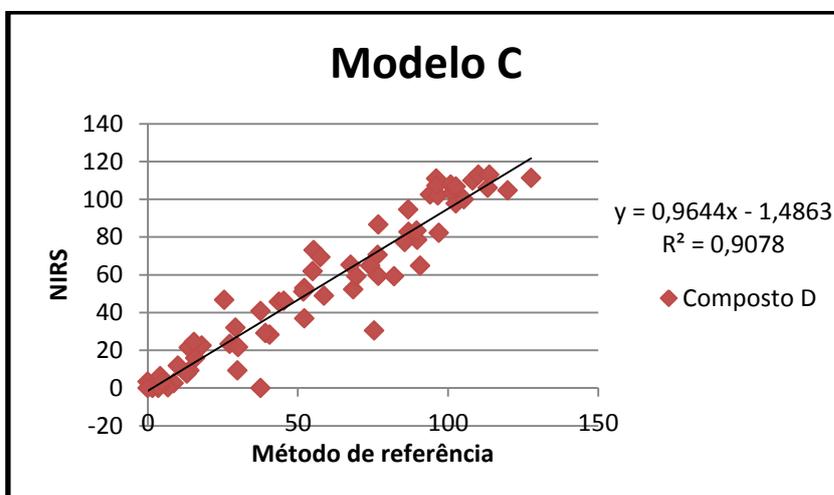


Figura A3 – Validação externa do modelo C.

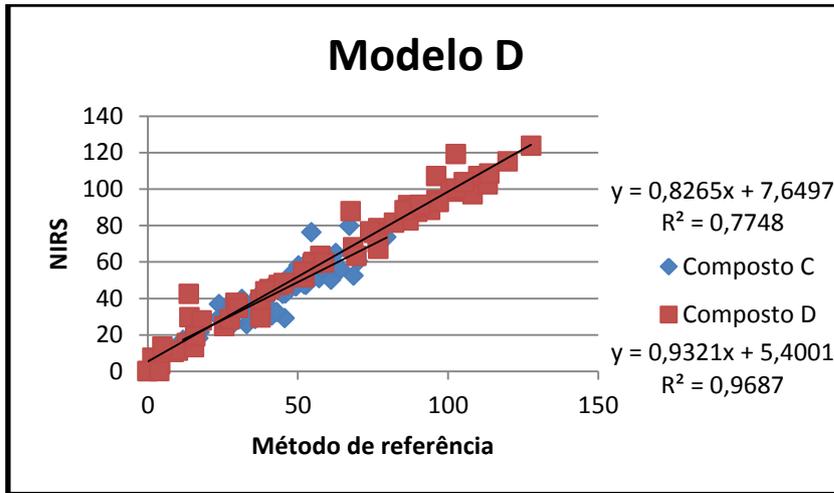


Figura A4 – Validação externa do modelo D.

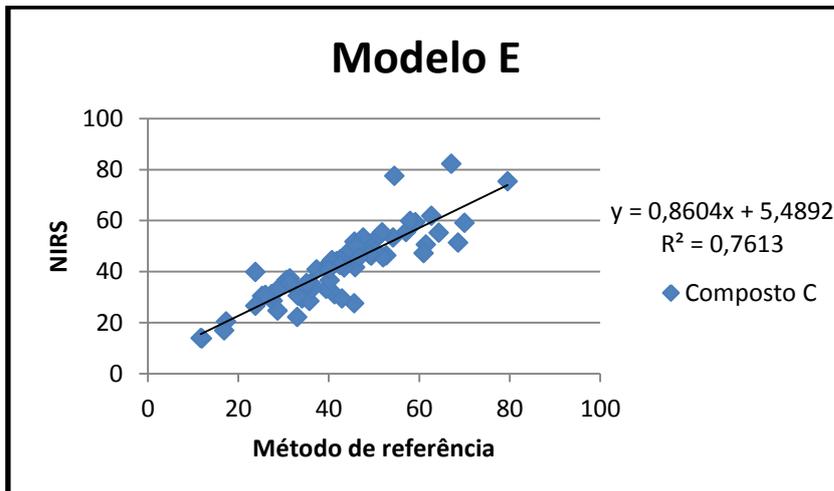


Figura A5 – Validação externa do modelo E.

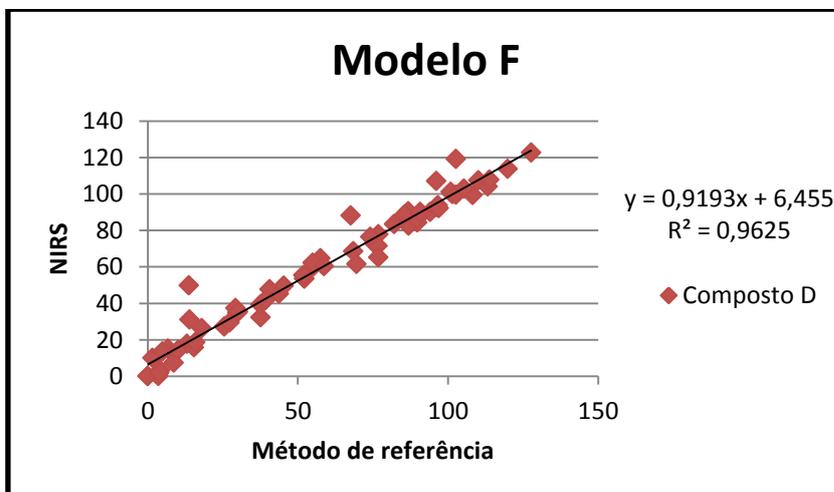


Figura A6 – Validação externa do modelo F.

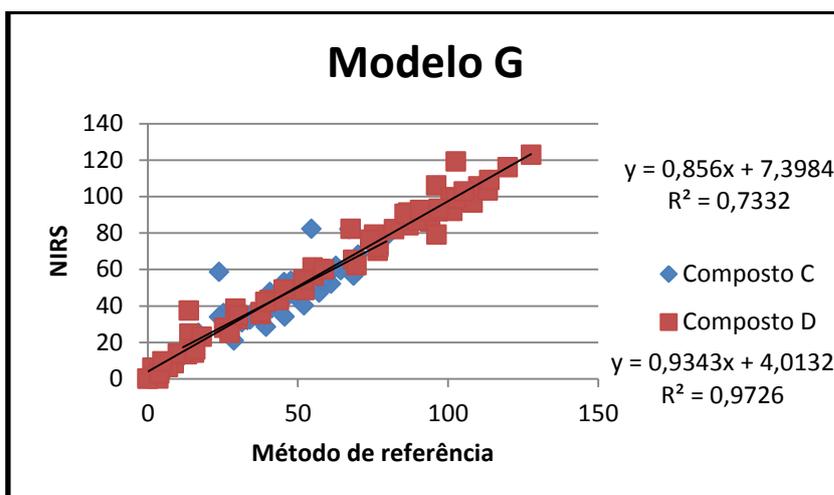


Figura A7 – Validação externa do modelo G.

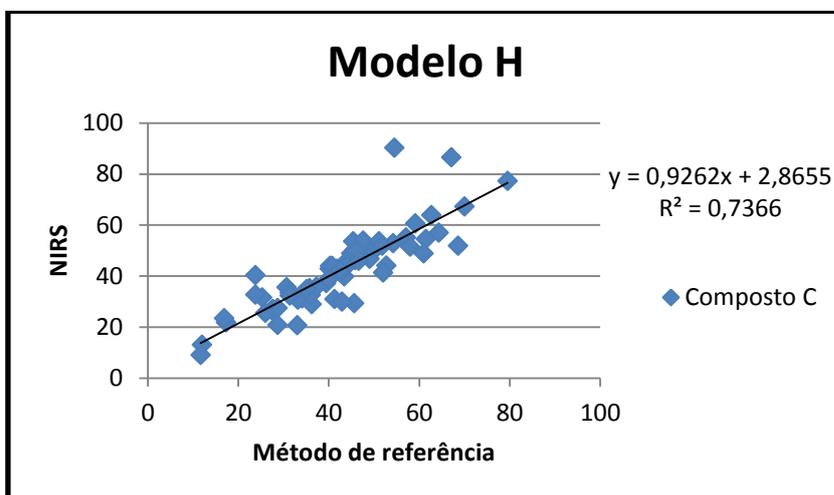


Figura A8 – Validação externa do modelo H.

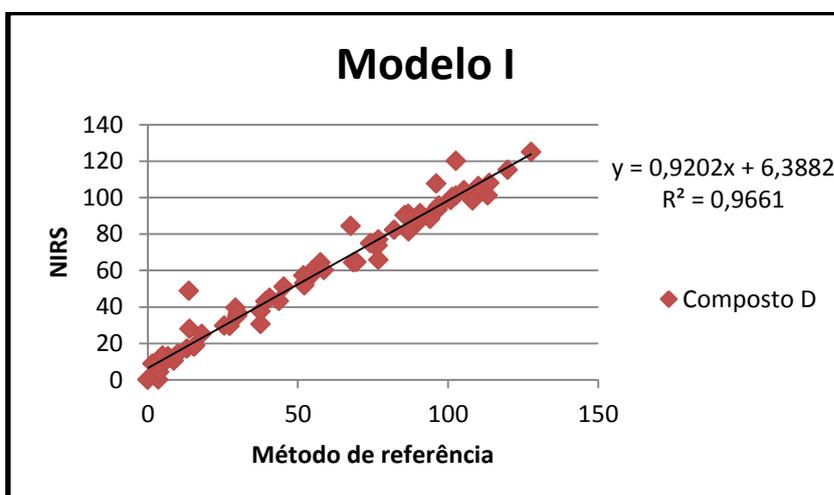


Figura A9 – Validação externa do modelo I.