

# Determinação simultânea de paracetamol e cafeína por espectrometria UV-Vis associada a ferramentas matemáticas

Simultaneous determination of acetaminophen and caffeine by UV-Vis spectrometry associated to mathematical tools

Daniela Florencio Maluf<sup>1</sup>, Noemi Nagata<sup>2</sup>, Paulo Vitor Farago<sup>3</sup> & Patricio Guillermo Peralta Zamora<sup>4</sup>

**RESUMO** – A utilização de medicamentos contendo associações de fármacos tem por objetivo intensificar a atividade farmacológica, empregando uma dose menor e/ou reduzindo os efeitos colaterais. A espectrometria UV-Vis apresenta diversas vantagens no controle da qualidade de medicamentos, como rapidez e custo baixo. No entanto, a ocorrência de sobreposição de sinais torna sua aplicabilidade comprometida quando da análise de fármacos em associação. No presente trabalho foi avaliada a potencialidade da utilização das ferramentas matemáticas do princípio da aditividade espectrofotométrica (SAP), da análise espectrométrica derivativa (DSA) e da regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) para a determinação simultânea de paracetamol e cafeína, associadas à espectrometria UV-Vis. Quando da aplicação do método de calibração convencional, segundo o SAP, foi observada uma significativa sobreposição dos sinais de absorção dos fármacos. Em contrapartida, a utilização da DSA ou da PLSR, como ferramentas matemáticas de calibração, combinadas à espectrometria UV-Vis, permitiram a obtenção de resultados adequados à determinação concomitante do paracetamol e da cafeína a partir do meio etanólico proposto.

**PALAVRAS-CHAVE** – Cafeína, calibração multivariada, espectrometria UV-Vis, paracetamol.

**SUMMARY** – An increased pharmacological activity can be achieved by a combined drug form that also allows a lower dosage and/or a side effects reduction. The UV-Vis spectrometry shows many advantages to the drug quality control, e.g. a fast and low cost method. However its application is influenced by overlapping signals, mainly when a combined drug form is evaluated. The goal of this work was to study the potential use of mathematical tools, as spectrometric additivity principle (SAP), derivative spectrometry analysis (DSA) and partial least square regression (PLSR), combined to UV-Vis spectrometry for the simultaneous quantification of acetaminophen and caffeine. To the conventional calibration method by SAP, a remarkable overlapping of absorption signals was observed. However, DSA and PLSR utilization as mathematical tools combined to UV-Vis spectrometry showed appropriated results to simultaneous acetaminophen and caffeine quantification from the used ethanolic medium.

**KEYWORDS** – Acetaminophen; caffeine; multivariate analysis; UV-Vis spectrometry.

## INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica utiliza diferentes ferramentas analíticas voltadas ao controle da qualidade de insumos e medicamentos, em obediência à legislação e à necessidade dos pacientes. Muitas vezes, para atender aos requisitos de qualidade, é necessário o emprego de métodos instrumentais de custo elevado, como a cromatografia líquida de alta eficiência (Hao *et al.*, 2007; Furusawa, 2001; Zeevi *et al.*, 2001), a cromatografia gasosa (Hao *et al.*, 2007; Speed *et al.*, 2001; Sunkersett *et al.*, 2001) e a eletroforese capilar (Pérez-Ruiz *et al.*, 2005; Prado *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2002).

A espectrometria UV-Vis é uma ferramenta analítica consolidada, de aplicação simples, custo baixo e sensibilidade compatível com as necessidades da indústria farmacêutica. Entretanto, a baixa seletividade torna sua aplicação comprometida quando da análise de sistemas com composição complexa (Sahin *et al.*, 2007; Goicoechea & Olivieri, 1999).

Para evitar problemas decorrentes da falta de seletividade, muitos métodos têm sido propostos em associação à espectrometria UV-Vis. No entanto, grande parte deles é fundamentada na aplicação prévia de processos de separação química, os quais acrescentam etapas experimentais, comprometendo a reprodutibilidade.

Recebido em 19/7/2007

<sup>1</sup>Farmacêutica, Mestranda em Ciências Farmacêuticas, Professora do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Laboratório de Síntese de Fármacos, Jardim Botânico, 80210-170, Curitiba, PR, Brasil

<sup>2</sup>Química, Doutora em Química, Professora do Departamento de Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, Laboratório L-109, Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brasil

<sup>3</sup>Farmacêutico, Mestre em Ciências Biológicas, Professor do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, Laboratório CIPP-13, Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brasil

<sup>4</sup>Químico, Doutor em Química, Professor do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Laboratório de Química Ambiental e de Materiais, 81531-990, Curitiba, PR, Brasil

de (Hemmateenejad *et al.*, 2006; Abbaspour & Mirzajani, 2005). Dessa forma, para aumentar a seletividade da espectrometria UV-Vis, métodos matemáticos têm sido utilizados como ferramentas analíticas complementares. Nesse sentido, é possível destacar o uso do princípio da aditividade espectrofotométrica (SAP), da análise espectrométrica derivativa (DSA) e dos métodos de calibração multivariada, como a regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) (Niazi, 2006; Markopoulou *et al.*, 2005; Palabiyik *et al.*, 2004; Dinç & Usundag, 2003).

Frente ao exposto, o objetivo do presente estudo foi analisar o potencial analítico da associação entre espectrometria UV-Vis e métodos matemáticos de calibração para a determinação simultânea de paracetamol e cafeína a partir de soluções elaboradas em meio etanólico.

## MATERIAL E MÉTODOS

Paracetamol (PAR) (99,8% de pureza, Pharma Nostra, Rio de Janeiro, Brasil), cafeína (CAF) (99,5% de pureza, Pharma Nostra, Rio de Janeiro, Brasil) e álcool etílico P.A. (EtOH) (99,8% de pureza, Synth, Diadema, Brasil) foram empregados sem qualquer tratamento prévio.

### Soluções analíticas

Inicialmente, foram preparadas as soluções padrão dos fármacos em estudo. A solução padrão de PAR (242mmol.L<sup>-1</sup>) foi obtida a partir da dissolução de 0,0183g do PAR em EtOH, empregando um balão volumétrico de 500mL. A partir dessa solução, foram realizadas 10 diluições em meio etanólico, para compor 10,0mL das soluções amostra na faixa de concentração de 24,20 a 96,80mmol.L<sup>-1</sup>. Considerando a diferente absorbtividade molar, a solução padrão de CAF (113mmol.L<sup>-1</sup>) foi elaborada em balão volumétrico de 500mL, através da dissolução de 0,0110g da CAF em EtOH. De forma análoga ao PAR, foram efetuadas 10 diluições em meio etanólico, resultando em 10,0mL de soluções amostra na faixa de concentração de 11,3 a 113mmol.L<sup>-1</sup>.

### Soluções binárias de calibração e validação

De forma complementar, considerando a necessidade das ferramentas matemáticas (DSA e PLSR), a partir das soluções padrão de PAR e CAF, foram preparadas 20 soluções binárias em meio etanólico, contendo diferentes concentrações dos fármacos em análise, compondo um conjunto de amostras de calibração, resumido na Figura 1 (em círculos). O planejamento experimental foi ainda composto por 5 soluções binárias, com concentrações aleatórias e intermediárias ao conjunto de amostras de calibração, denominadas como conjunto de amostras de validação (Figura 1, em estrela). A faixa de concentração estudada no conjunto de calibração foi de 60,00 a 90,00mmol.L<sup>-1</sup> para o PAR e 10,00 a 29,00mmol.L<sup>-1</sup> para a CAF.

### Espectrometria UV-Vis

A obtenção do espectro UV-Vis de todas as soluções amostra, destinadas a compor as curvas analíticas para o PAR e para a CAF, bem como das soluções que integram o conjunto de amostras de calibração e de validação, foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1501, resolução de 1,30nm, Kyoto, Japão), com varre-

dura de absorção na faixa de 200 a 800nm, utilizando cubetas de quartzo de 1cm de caminho ótico.

### Modelos matemáticos de calibração

No caso do princípio da aditividade espectrofotométrica (SAP) (Lykos, 1992), considerando o comprimento de onda de absorção máxima para os fármacos - PAR em 249nm e CAF em 273nm (Merck & Co., 2001), os espectros UV-Vis das soluções-amostra para o PAR e para a CAF foram transportados para o software Origin® Technical Graphics and Data Analysis in Windows® (versão 7.0, MicroCal Software, Northampton, Estados Unidos), onde foram selecionados os valores de absorbância para esses dois comprimentos de onda mencionados, gerando assim, 4 curvas analíticas.

A partir da inclinação de cada curva analítica, foi possível estabelecer os valores de absorbtividade molar (e) para cada analito em cada um dos comprimentos de onda avaliados. Assim, um sistema de equações simultâneas foi constituído para a avaliação da associação entre PAR e CAF, conforme apresentado nas equações 1 e 2.

$$A_{\bar{e}1} = A_{1(\bar{e}1)} + A_{2(\bar{e}1)} = \bar{a}_{1(\bar{e}1)} \cdot C_1 + \bar{a}_{2(\bar{e}1)} \cdot C_2 \quad (1)$$

$$A_{\bar{e}2} = A_{1(\bar{e}2)} + A_{2(\bar{e}2)} = \bar{a}_{1(\bar{e}2)} \cdot C_1 + \bar{a}_{2(\bar{e}2)} \cdot C_2 \quad (2)$$

Onde:  $A_{\bar{e}1}$  e  $A_{\bar{e}2}$  são os valores de absorbância medidos em dois comprimentos de onda diferentes (l1 e l2) e os índices 1 e 2 representam os dados para cada uma das espécies de interesse.

Na análise espectrométrica derivativa (DSA) (Rocha & Teixeira, 2004), os espectros UV-Vis das soluções-amostra dos fármacos PAR e CAF foram igualmente transportados para o software Origin® Technical Graphics and Data Analysis in Windows®, no qual foi realizada a derivação de 1a. ordem, sendo obtidos os espectros alisados. No ponto de inflexão verificado para o PAR, onde a derivada da absorbância foi igual a zero, foi determinado o comprimento de onda aplicado para a CAF, visando à construção da curva analítica nas condições de derivação. O mesmo procedimento foi adotado para a CAF.

Ainda assim, para o conjunto de amostras de calibração (Figura 1, em círculos), foi aplicado a DSA. Os espectros UV-Vis dessas soluções binárias foram alisados e derivados sob as mesmas condições descritas aci-

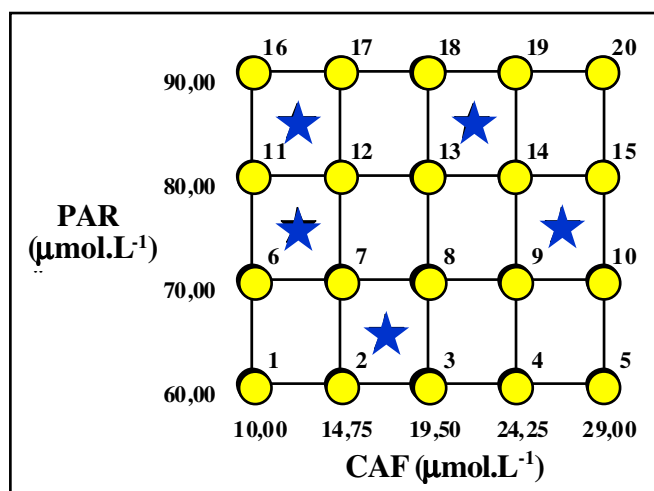


FIG. 1 - Composição das soluções binárias do conjunto de amostras de calibração (círculos) e do conjunto de amostras de validação (estrelas).

ma. A partir das absorvâncias nos comprimentos de onda determinados experimentalmente, 249nm para o PAR, 243nm e 272nm para o CAF, foram plotadas as curvas analíticas (derivada da absorvância vs. concentração). Com esses dados, foram construídas as equações de calibração e obtidos os coeficientes de regressão para ambos os fármacos.

Para a realização do método de calibração multivariada, os espectros UV-Vis das soluções binárias do conjunto de amostras de calibração foram coletados no software Origin® Technical Graphics and Data Analysis in Windows® (versão 7.0) e exportados para o software Matlab® for Windows® (versão 4.0, com aplicativo PLS Toolbox® versão 1.5, The MathWorks Inc., Natick, Estados Unidos), para desenvolver o modelo de calibração multivariada de regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) (Ferreira *et al.*, 1999). O modelo PLSR foi desenvolvido a partir da faixa espectral completa, de 200 a 800nm, sem transformação de dados, empregando-se a condição de valores centrados na média e o procedimento de validação cruzada.

#### Validação da espectrometria UV-Vis associada a ferramentas matemáticas

A etapa de validação foi realizada para os três métodos matemáticos de quantificação propostos, SAP, DSA e PLSR. A capacidade de p revisão de cada uma das ferramentas foi avaliada frente às 5 soluções do conjunto de amostras de validação (Figura 1, em estrela). A partir das respostas de validação foram calculados o erro relativo (%) e o RMSEP (raiz quadrada da soma dos erros de previsão) (equação 3) para cada estratégia empregada, visando definir a ferramenta matemática associada à espectrometria UV-Vis com resultados mais adequados para a determinação concomitante do PAR e da CAF.

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum (C_{real} - C_{prevista})^2}{n}} \quad (3)$$

Onde:  $C_{real}$  é a concentração real do fármaco,  $C_{prevista}$  é a concentração estimada pela ferramenta matemática e  $n$  é o número de amostras do conjunto de validação. O RMSEP é uma forma de avaliar o erro absoluto, permitindo aferir a exatidão de um método matemático em estudo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Espectrometria UV-Vis

A Figura 2 apresenta os espectros UV-Vis obtidos para as soluções amostra de PAR (Figura 2a), na faixa de concentração de 24,20 a 96,80mmol.L<sup>-1</sup> e de CAF (Figura 2b), na faixa de concentração de 11,3 a 113mmol.L<sup>-1</sup>.

Considerando esses dados espectrais, foram plotadas as curvas analíticas, para o PAR (Figura 2c), em  $\lambda = 249$  nm, e para a CAF (Figura 2d), em  $\lambda = 273$  nm. Com base nesses resultados, foram calculadas as respectivas equações de reta nos comprimentos de onda mencionados. Em ambas as situações, foram verificados valores de coeficiente de correlação (r) próximos a 1, 0,998 para o PAR e 0,999 para a CAF. Segundo a

literatura (Ribani *et al.*, 2004; ANVISA, 2003; Gennaro, 2000; ICH, 1996) valores superiores a 0,99 indicam um ajuste ideal entre os dados experimentais, denotando assim, que as variáveis são significativamente correlacionadas.

Entretanto, conforme apresentado na Figura 3b, quando da análise de soluções binárias contendo PAR e CAF, ocorreu sobreposição dos sinais espectrais de absorção, sobretudo nas regiões do UV particularmente destinadas à quantificação dos analitos. Esse fato revela a necessidade de se combinar modelos matemáticos de calibração, com o objetivo de melhor resolver essa interferência espectral e possibilitar a determinação com exatidão de PAR e CAF, quando esses fármacos se encontram em associação.

### Modelos matemáticos de calibração

Considerando a elaboração das quatro curvas analíticas independentes, obtidas para o PAR e para a CAF, nos comprimentos de onda de 249 e 273nm, foi possível construir o sistema linear que constitui o SAP, indicado nas equações 4 e 5.

$$A_{249} = 13258,30.C_{PAR} + 2682,34.C_{CAF} \quad (4)$$

$$A_{273} = 3322,12.C_{PAR} + 8535,08.C_{CAF} \quad (5)$$

Dessa forma, essa ferramenta matemática caracteriza-se como um método de calibração convencional que permite calcular a concentração de cada um dos dois analitos em estudo, PAR e CAF, a partir de um espectro UV-Vis resultante de uma solução contendo esses fármacos em associação.

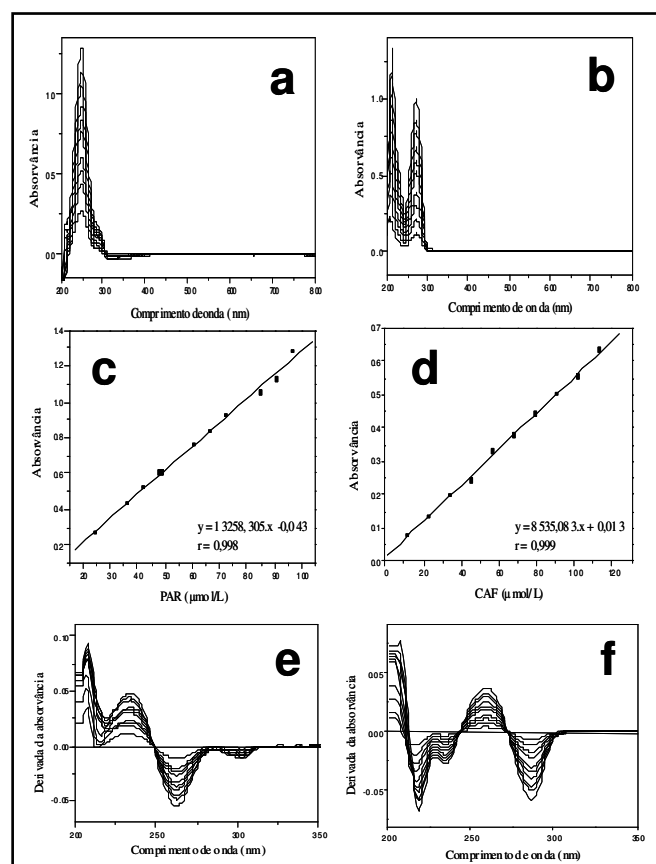


FIG. 2 - Espectros UV-Vis, curvas analíticas e espectros obtidos a partir da derivação de primeira ordem, respectivamente, para o PAR em (a), (c,  $\lambda = 249$  nm) e (e) e para a CAF em (b), (d,  $\lambda = 273$  nm) e (f).

Para a ferramenta matemática de DSA, foi feita a derivação de 1a. ordem dos espectros UV-Vis obtidos para as soluções-amostra dos fármacos PAR e CAF. Nas condições de derivação para o PAR, foi possível comprovar a presença de um ponto de inflexão (Figura 2e), no comprimento de onda de 249nm, onde a derivada da absorbância foi igual a zero. Para a CAF, entretanto, foram evidenciados dois pontos de inflexão (Figura 2f), em 243 e 272nm.

Assim, considerando que o propósito consiste na determinação simultânea de PAR e CAF e que, foi observada uma absorbância nula para os espectros derivados a partir das soluções-amostra de PAR em 249nm, é possível empregar esse comprimento de onda para a determinação da concentração de CAF, uma vez que a concentração de PAR nessas condições de derivação, não estabelece influência no valor da absorbância. Portanto, a partir dos espectros alisados e derivados do conjunto de amostras de calibração, foi obtida uma curva analítica em 249nm, para a determinação da concentração de CAF em soluções binárias dos fármacos em questão.

No caso das soluções-amostras de CAF, como foram verificados dois pontos de inflexão a partir dos espectros derivados, em 243 e 272nm, esses dois comprimentos de onda foram adotados para a determinação da concentração de PAR, visando evitar a interferência decorrente da presença da CAF. Igualmente, para o conjunto de amostras de calibração, após derivação, foram obtidas duas curvas analíticas em 243 e 272nm, destinadas à determinação da concentração de PAR em soluções binárias dos analitos. A Tabela I resume os parâmetros recomendados à quantificação de PAR e de CAF em soluções binárias, empregando a ferramenta matemática de DS.

Os resultados relativos ao método de calibração multivariado por PLSR estão sumarizados na Figura 3. A Figura 3a apresenta o gráfico do PRESS (soma dos quadrados dos erros de previsão) em função do número de componentes principais. Considerando que todas as amostras foram tratadas como objeto de previsão, a partir do procedimento de validação cruzada, foi possível estimar o PRESS a partir da quantidade de componentes principais necessários para obtenção do menor valor. Assim, foi possível estabelecer um PRESS mínimo em dois ou três componentes principais (Figura 3a), sem perder informação analítica relevante. Contudo, para evitar inserir ruído e obter um modelo mais robusto, foram selecionadas duas componentes principais.

O gráfico de coeficientes de regressão (Figura 3c), com a função de expressar a importância que cada variável estudada tem para a construção do modelo de calibração (Santos & Nagata, 2005), indicou que a primeira componente principal apresentou influência positiva na região de absorção máxima do PAR (Figura

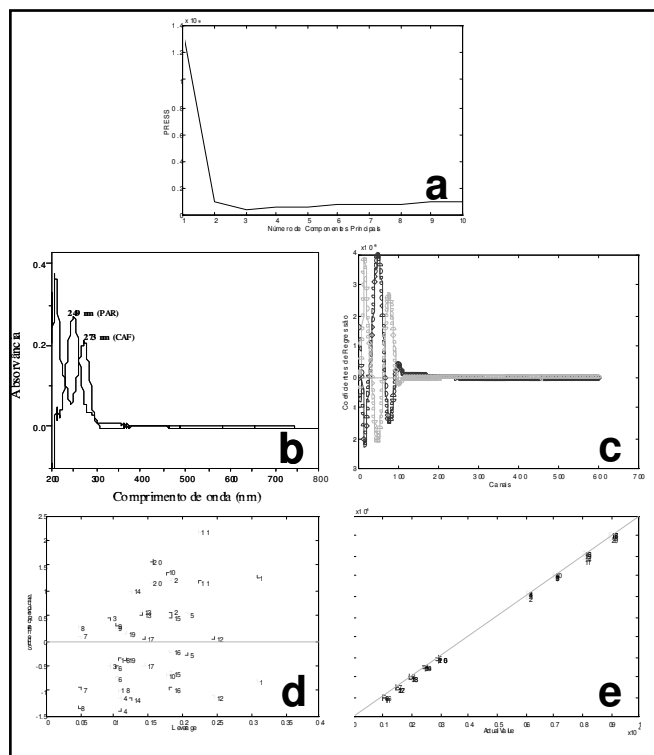


FIG. 3 - Parâmetros para a determinação da concentração de PAR e de CAF na mistura binária por PLSR: (a) PRESS em função do número de componentes principais; (b) espectro UV-Vis ressaltando a sobreposição dos sinais de absorção entre PAR e CAF; (c) coeficientes de regressão; (d) resíduos *studentizados* em função da *leverage*; (e) valores reais vs. valores previstos pelo modelo multivariado.

3b), passando a ter uma influência negativa na região referente à CAF. No caso da segunda componente principal, uma situação contrária foi verificada ao modelo com duas componentes principais.

A Figura 3d apresenta o gráfico de resíduos de *Student* em função da *leverage*. Considerando que o limite do valor de *leverage*, que representa a influência de uma amostra no modelo de regressão (Ferreira *et al.*, 1999), foi estabelecido em 0,45, é possível constatar que todas as amostras estão dentro desse limite, não havendo a existência de *outlier* (amostra anômala). Ainda assim, os resíduos *studentizados* podem ser utilizados para identificar amostras anômalas. Analisando o fato de que os resíduos de *Student* apresentam uma distribuição normal, é possível aplicar um teste *t* para verificar se as amostras estão dentro da distribuição normal, com um nível de confiança de 95%. Segundo esses mesmos autores, as amostras com resíduos superiores a  $|2,5|$  podem corresponder a *outliers*, devendo ser cuidadosamente estudadas. No presente caso, de acordo com a Figura 3d, nenhuma das amostras apresentou resíduos de *Student* nessa ordem de grandeza, sendo desnecessária a retirada de amostras anômalas para o modelo multivariado em estudo.

Por fim, a capacidade de previsão do modelo de PLSR pode ser visualizada na Figura 3e. Nesse gráfico foi possível comprovar que as concentrações previstas foram muito próximas às concentrações das soluções do conjunto de amostras de calibração. Inclusive, o modelo abrangeu uma ampla faixa de concentração, respondendo satisfatoriamente, mesmo em concentrações mais baixas.

TABELA I

Parâmetros para a determinação da concentração de PAR e de CAF na mistura binária por DSA

Comprimento de onda (nm)	Equação de calibração	Coefficiente de regressão
243 (determinação de PAR)	$y = 309,08 \cdot x + 3,26 E-4$	0,989
272 (determinação de PAR)	$y = 309,34 \cdot x - 1,17 E-4$	0,997
249 (determinação de CAF)	$y = 224,46 \cdot x - 1,31 E-3$	0,998

**TABELA II**  
 Dados de previsão obtidos por espectrometria UV-Vis associada a ferramentas matemáticas, indicando o erro relativo (%) e a raiz quadrada da soma dos erros de previsão (RMSEP), obtidos durante a validação da análise das soluções binárias de PAR e CAF

	SAP		DSA		PLSR	
	PAR	CAF	PAR	CAF	PAR	CAF
Erro relativo (%)	6,53	30,20	2,00	12,26	4,54	11,40
RMSEP	5,28 E-6	5,24 E-6	2,20 E-6	4,00 E-6	3,66 E-6	2,94 E-6

#### Validação da espectrometria UV-Vis associada a ferramentas matemáticas

A Tabela II apresenta os resultados obtidos a partir do conjunto de amostras de validação, quando da aplicação da espectrometria UV-Vis associada às ferramentas matemáticas descritas, para a análise das soluções binárias de PAR e CAF. A partir dos valores calculados para o erro relativo e para a raiz quadrada da soma dos erros de previsão (RMSEP), foi possível constatar que os três métodos de calibração revelaram uma menor exatidão na determinação da concentração de CAF, em relação à concentração de PAR, para as soluções do conjunto de amostras de validação. Conforme a literatura (Santos & Nagata, 2005), entre comportamento pode ser justificado pela diferença na absorvidade molar dos compostos estudados.

Para o SAP, foram verificados valores elevados ao erro relativo e ao RMSEP, sendo possível considerar essa ferramenta matemática inadequada à análise de soluções binárias contendo PAR e CAF, em função de uma significativa sobreposição dos sinais de absorção entre os fármacos analisados.

Para a DSA e PLSR, foram evidenciados valores próximos para o erro relativo e ao RMSEP, sendo possível afirmar que a incerteza relativa às medidas, quando da aplicação desses modelos matemáticos de calibração, fornece resultados similares. Dessa forma, a utilização da DSA e da PLSR, como ferramentas matemáticas combinadas à espectrometria UV-Vis permitiram a obtenção de resultados adequados à determinação concomitante de PAR e CAF nas soluções binárias que formaram o conjunto de amostras de validação. Sem dispensar a necessidade de validação analítica (Ribani *et al.*, 2004; ANVISA, 2003; ICH, 1996), esses resultados podem ser empregados no controle da qualidade de formas farmacêuticas sólidas, particularmente comprimidos.

#### CONCLUSÃO

Considerando a ocorrência de sobreposição dos sinais espectrais de absorção, quando da análise de soluções binárias contendo PAR e CAF, é indispensável à utilização de modelos matemáticos de calibração em associação à espectrometria UV-Vis, com o intuito de resolver a interferência espectral e possibilitar a determinação com exatidão dos fármacos em associação.

Quando da aplicação do método de calibração convencional segundo o SAP, foi observada uma significativa sobreposição dos sinais de absorção entre os fármacos avaliados. No entanto, a utilização da DSA ou da PLSR, como ferramentas matemáticas de calibração, combinadas à espectrometria UV-Vis, permitiram a ob-

tenção de resultados adequados à determinação concomitante de PAR e CAF a partir de soluções etanólicas binárias.

#### AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro através do Programa PIBIC/CNPq/UEPG.

#### REFERÊNCIAS

1. Abbaspour, A. & Mirzajani, R. Simultaneous determination of phenytoin, barbital and caffeine in pharmaceuticals by absorption (zero-order) UV spectra and first-order derivative spectra-multivariate calibration methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005 (38): 420-7
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº. 899 de 29 de maio de 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>, 2003
3. Chen, G.; Ye, J.; Bao, H. & Yang, P. Determination of the rate constants and activation energy of acetaminophen hydrolysis by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002 (29): 843-50
4. Dinç, E. & Ustundag, O. Linear regression analysis and its application to multivariate chromatographic calibration for the quantitative analysis of two-component mixtures. *Il Farmaco*, 2003 (58): 1151-61
5. Ferreira, M.M.C.; Antunes, A.M.; Melgo, M.S. & Volpe, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Quim. Nova*, 1999 (22): 724-31
6. Furusawa, N. Rapid high-performance liquid chromatographic identification/quantification of total vitamin C in fruit drinks. *Food Control.*, 2001 (12): 27-9
7. Gennaro, A.R. Remington: the science and practice of pharmacy. Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins, 2000, 2077 p.
8. Goicoechea, H.C. & Olivieri, A.C. Simultaneous multivariate spectrophotometer analysis of paracetamol and minor components (diphenhydramine or phenylpropranolamine) in tablet preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999 (20): 255-61
9. Hao, C.; Zhao, X. & Yang, P. GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. *TRAC*, 2007 (26): 569-80
10. Hermateenejad, B.; Abbaspour, A.; Maghami, H.; Miri, R. & Panjehshahin, M.R. Partial least squares-based multivariate spectral calibration method for simultaneous determination of beta-carboline derivatives in *Peganum harmalaseed* extracts. *Anal. Chim. Acta.*, 2006 (575): 290-9
11. International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: text and methodology (Q2B). London: ICH, 1996, 12 p.
12. Lykos, P. The Beer-Lambert law revisited – a development without calculus. *J. Chem. Educ.*, 1992 (69): 730-2
13. Markopoulou, C.K.; Malliou, E.T. & Koundourellis, J.E. Application of two chemometrics methods for the determination of imipramine, amitriptyline and perphenazine in content uniformity and drug dissolution studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005 (37): 249-58
14. Merck & Co. The Merck Index. Rahway: Merck & Co., 2001
15. Niazi, A. Simultaneous spectrophotometric determination of Fell and Fell in pharmaceuticals by partial least squares with chromogenic mixed reagents. *Croat. Chem. Acta.*, 2006 (79): 573-9
16. Palabiyik, I.M.; Dinç, E. & Onur, R. Simultaneous spectrophotometric determination of pseudoephedrine hydrochloride and ibuprofen in a pharmaceutical preparation using ratio spectra derivative spectrophotometry and multivariate calibration techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004 (34): 473-83
17. Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V. & Galera, R. Migration behaviour and separation of acetaminophen and p-aminophenol in capillary zone electrophoresis: Analysis of drugs based on acetaminophen. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005 (38): 87-93
18. Prado, M.S.A.; Steppe, M.; Tavares, M.F.M.; Kedor-Hackmann, E.R.M. & Santoro, M.I.R.M. Comparison of capillary electrophoresis and reversed-phase liquid chromatography methodologies for determination of diazepam in pharmaceutical tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005 (37): 273-9
19. Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. & Melo, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, 2004 (27): 771-80
20. Rocha, R.F.P. & Teixeira, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. *Quim. Nova*, 2004 (27): 807-12
21. Sahin, S.; Demir, C. & Güçer, S. Simultaneous UV-Vis spectrophotometer determination of disperse dyes in textile wastewater by partial least squares and principal component regression. *Dyes Pigm.*, 2007 (73): 368-76
22. Santos, M.E. & Nagata, N. Determinação espectrofotométrica simultânea de corante amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo via regressão por componentes principais. *Publ. UEPG*, 2005 (11): 51-60
23. Speed, D.J.; Dickson, S.J.; Cairns, E.R. & Kim, N.D. Analysis of paracetamol using solid-phase extraction, deuterated internal standards, and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, 2001 (25): 198-202
24. Sunkersett, M.R.; Grimsey, I.M.; Doughty, S.W.; Osborn, J.C.; York, P. & Rowe, R.C. The changes in surface energetics with relative humidity of carbamazepine and paracetamol as measured by inverse gas chromatography. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2001 (13): 219-25
25. Zeevi, M.; Ivanovi, L.J.; Agatonovic-Kustrin, S. & Minic, D. The use of a response surface methodology on HPLC analysis of methylodopa, amiloride and hydrochlorothiazide in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001 (24): 1019-25.

Endereço para correspondência  
 Daniela Florêncio Maluf  
 e-mail: danielamaluf@ufpr.br