

Análise Comparativa entre Métodos Multivariados no Problema de Quantificação do Princípio Ativo Hidroclorotiazida em Amostras de Medicamentos Anti-hipertensivos

Rolf Fredi Molz¹, Pedro H. A. Konzen², João Carlos Furtado¹, Marco Flores Ferrão³, Claudia Willke Carvalho³, Geraldo Lopes Crossetti⁴

¹UNISC – Departamento de Informática – Av. Independência 2293, Santa Cruz do Sul - RS

²UNISC – Curso de Matemática Aplicada e Computacional – Av. Independência 2293, Santa Cruz do Sul – RS

³UNISC – Departamento de Química e Física – Av. Independência 2293, Santa Cruz do Sul – RS

⁴UFRJ – Coordenação dos Programas de Pós-Graduação de Engenharia – Cidade Universitária – Centro de Tecnologia – Bloco G – sala 116 – Ilha do Fundão, Rio de Janeiro - RJ

E-mails: rolf@unisc.br, m20254@unisc.br, jcarlosf@unisc.br, ferrao@unisc.br, crossetti@peq.coppe.ufrj.br

Abstract

This work presents a comparative analysis between the multi-variate regression method by Partial Least Squares (PLS) and the Artificial Neural Networks (ANN) in the active principle quantification problem to samples of anti-hypertensive pharmacological compounds. In the first experiment, two techniques were used to understand the analyte quantification: Diffuse Reflection in Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS) and PLS. The second experiment involves the use of multi level perceptron algorithm with backpropagation training in the PLS substitution. Both experiments used the same DRIFTS data set. The implementation and the calibration models were developed in MATLAB environment. The training and validation spectra sets were obtained by a diffuse reflectance accessory joined to a Nicolet Magna 550 spectrometer on the medium infrared region.

1. Introdução

Com a constante evolução dos processos produtivos, cada vez mais se fazem necessárias ferramentas analíticas que não causem impacto ambiental, bem como não necessitem de tratamentos demorados na amostra e ainda que não alterem as características inerentes aos insumos industriais.

Neste sentido o presente grupo vem pesquisando ferramentas analíticas para a caracterização das matérias-primas empregadas na industrialização de alimentos e medicamentos. Em especial, técnicas espectroscópicas baseadas na radiação infravermelha, como por exemplo, a reflexão no infravermelho próximo

(NIR) e a reflexão difusa no infravermelho médio com Transformada de Fourier (DRIFT). Aliados a estas técnicas de análise, ferramentas quimiométricas de regressão como o método dos mínimos quadrados parciais (PLS) tem apresentado excelentes resultados [1-2].

A metodologia atualmente empregada na quantificação e qualificação dos princípios ativos presentes em medicamentos anti-hipertensivos, baseia-se em métodos cromatográficos, que apresentam inúmeras desvantagens como: o elevado tempo de análise; a sobreposição de picos; a necessidade de equipamentos e condições específicas de análise; e a destruição da amostra.

Enquanto isto, o uso da técnica de espectroscopia por reflexão difusa no infravermelho com Transformada de Fourier (DRIFTS) não provoca a destruição da amostra, tem baixo custo de implementação, rapidez na análise e não gera resíduos ao meio ambiente.

Embora se tenha conseguido bons resultados com a utilização do algoritmo PLS, o presente trabalho tem por objetivo realizar uma análise comparativa do método de regressão multivariado PLS frente à utilização de Redes Neurais Artificiais (RNAs) no problema de quantificação do princípio ativo hidroclorotiazida em amostras de medicamentos anti-hipertensivos utilizando dados de espectroscopia no infravermelho.

Uma aplicação semelhante das RNAs em substituição a calibração multivariada foi abordada recentemente por Cerqueira e colaboradores [3] estudando o teor de nitrogênio em folhas de trigo.

2. Reflexão difusa

A técnica de reflexão difusa está bem fundamentada na literatura [4-8], sendo amplamente aplicada associada aos equipamentos que operam no infravermelho próximo, com os quais geralmente é designada de espectroscopia de reflexão no infravermelho próximo

(NIRS ou NIRR); ou associada àqueles que operam na região do infravermelho médio, sendo conhecida por espectroscopia por reflexão difusa no infravermelho médio com Transformada de Fourier (DRIFTS).

A reflexão difusa ocorre em superfícies não totalmente planas, podendo o substrato ser contínuo ou fragmentado (na forma de pó). Neste processo de reflexão o feixe incidente penetra a superfície da amostra interagindo com a matriz, retornando à superfície da mesma, após absorção parcial e múltiplos espalhamentos.

Na reflexão difusa, a radiação incidente entra em contato diversas vezes com as partículas da amostra sendo conseqüentemente atenuada. Com isto a radiação que sofre a reflexão difusa fornece informações qualitativas e quantitativas, sobre a natureza química da amostra.

As informações qualitativas dizem respeito a capacidade de que cada funcionalidade da molécula orgânica tem de absorver energia, em determinada região do infravermelho, para promoção de vibração entre dois centros (átomos) que compõem determinada ligação.

Já a quantificação destas informações químicas segue a função de Kubelka Munk (expressão 1) que relaciona os espectros de reflectância difusa com a concentração de cada molécula presente na amostra, transformando o espectro de reflectância em formato que se assemelha a um espectro de absorbância. Por esta razão, a análise de Kubelka Munk é conhecida como a Lei de Beer da espectroscopia de reflectância.

$$f(R_{\infty}) = (1 - R_{\infty})^2 / 2R_{\infty} \quad (1)$$

onde R_{∞} é a reflectância difusa.

De acordo com a teoria, $f(R_{\infty})$ está relacionado com o coeficiente de absorção K e o coeficiente de dispersão da superfície S de uma amostra espessa, conforme expressão 2.

$$f(R_{\infty}) = K / S \quad (2)$$

O efeito do tamanho da partícula causa deslocamento da linha de base, efeito que se torna muito pronunciado em comprimentos de onda de grande absorção pela amostra. Por exemplo, em duas amostras com mesma composição, porém diferente granulometria, há maior reflexão das partículas menores (mais finas), e os efeitos da reflexão especular são minimizados em uma superfície composta de menor tamanho.

A correta quantificação de analitos em amostras em pó é dependente do efetivo poder de penetração, sendo grande o suficiente para providenciar um espectro representativo da amostra por inteiro. A equação de Kubelka Munk é mais simples e a forma geralmente mais usada para definir uma afinidade linear entre intensidade da banda e concentração da amostra na espectroscopia por reflectância difusa.

Um maior detalhamento desta técnica, bem como de outras técnicas de reflexão empregadas em análises que potencialmente aplicam informações químicas obtidas via espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier, pode ser encontrado em recente revisão publicada por Ferrão [9].

É importante salientar que a radiação que retorna de forma difusa de um substrato é geralmente muito inferior em magnitude que a radiação incidente, em função disso, a maior parte dos acessórios de reflexão difusa apresentam esquemas óticos que visam concentrar a radiação, para posteriormente a mesma ser focada sobre o sistema de detecção dos instrumentos.

Do ponto de vista da análise quantitativa, além das anomalias que podem ser atribuídas à presença do fenômeno da reflexão especular, merece ainda destaque o efeito que os diferentes tamanhos de partículas podem ter sobre o espectro. Estas anomalias estão amplamente descritas nos trabalhos publicados por Olinger e Griffiths [10-12].

3. Regressão por mínimos quadrados parciais

Na análise quantitativa, em particular na análise instrumental, a calibração ou regressão é uma das mais importantes ferramentas empregadas. Os procedimentos matemáticos utilizados têm como objetivo descrever as relações quantitativas existentes entre duas ou mais variáveis.

O processo de calibração consiste de duas etapas [13]: a primeira, dita descritiva emprega um conjunto de medidas realizadas para uma série de amostras (os padrões), cuja concentração é conhecida, para construir um modelo que relacione a grandeza medida com a concentração da espécie de interesse; e uma segunda, preditiva, que utiliza deste modelo para prever as concentrações de novas amostras, com base nas medidas analíticas realizadas para cada uma destas amostras.

No modelo de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), desenvolvido por Herman Wold [14-15], as informações espectrais e as concentrações são usadas ao mesmo tempo na fase de calibração. O alicerce do método PLS reside na decomposição de uma matriz de dados $\mathbf{X}$ em termos da soma das várias matrizes $\mathbf{M}$, que apresentam dimensionalidade um, e que são acrescidas de uma matriz de resíduos (que corresponde ao erro), conforme a equação 3.

$$\mathbf{X} = \mathbf{M}_1 + \mathbf{M}_2 + \dots + \mathbf{M}_n + \mathbf{E} \quad (3)$$

onde n corresponde ao número de fatores (componentes principais ou variáveis latentes) selecionados para truncar a igualdade, e $\mathbf{E}$ corresponde a matriz de resíduos, relacionada ao número de fatores escolhido.

Basicamente, uma matriz contendo os espectros dos padrões ($\mathbf{X}$) é relacionada com outra matriz que armazena dados sobre a sua concentração ($\mathbf{Y}$),

resultando as equações 4 e 5 nas quais os elementos T e U são chamados de *scores* de X e Y respectivamente, e os elementos P e Q são chamados de *loadings*. Já as matrizes E e F representam os erros da modelagem de X e Y .

$$X = T P^t + E \quad (4)$$

$$Y = U Q^t + F \quad (5)$$

O resultado deste procedimento é uma equação linear de uma curva de calibração semelhante à equação 6, onde X é uma matriz de resposta (assim como o conjunto de espectros) para uma série de amostras de calibração, c é um vetor com a concentração (ou propriedades) de todas as amostras, b é um vetor contendo os parâmetros do modelo, e e é um vetor que representa o ruído do espectro e os erros do modelo.

$$c = X b + e \quad (6)$$

Usualmente, os modelos de calibração multivariados são avaliados a partir da correlação entre a técnica alternativa proposta e o método de referência (geralmente o método oficial) com base nos valores do coeficiente de correlação (R^2) e dos erros padrões de calibração (SEC) e de validação (SEV), sendo estes últimos calculados conforme a expressão 7, onde y_i e $\hat{y}_i$ são, respectivamente, os valores de referência e estimado para a i -ésima amostra e n o número total de amostras.

$$SEC \text{ (ou SEV)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (7)$$

4. Redes neurais artificiais

A era moderna das Redes Neurais Artificiais (RNAs) começou com o trabalho de McCulloch e Pitts [16] onde descrevem um cálculo lógico das redes neurais que unifica os estudos de neurofisiologia e da lógica matemática. Cerca de 15 anos após a publicação deste clássico artigo, uma nova abordagem para o problema de reconhecimento de padrões foi introduzida por Rosenblatt [17] em seu trabalho sobre o perceptron, um método inovador de aprendizagem supervisionada.

Em 1986, foi relatado por Rumelhart, Hinton e Williams [18] o desenvolvimento do algoritmo de retropropagação (*back-propagation*). Logo a aprendizagem por retropropagação emergiu como o algoritmo de aprendizagem mais popular para o treinamento de perceptrons de múltiplas camadas.

Tipicamente, uma rede neural consiste de um conjunto de unidades sensoriais (nós de fonte) que constituem a camada de entrada, uma ou mais camadas ocultas de nós computacionais e uma camada de saída de nós computacionais. O sinal de entrada se propaga para frente através da rede, camada por camada. Estas

redes neurais são normalmente chamadas de perceptrons de múltiplas camadas (MLP, *multilayer perceptron*) [19].

Para o treinamento das RNAs estamos interessados no popular algoritmo de retropropagação de erro (*backpropagation error*). Basicamente, a aprendizagem por retropropagação de erro consiste de dois passos através das diferentes camadas da rede: um passo para frente, a propagação, e um passo para trás, a retropropagação. No passo para frente, um padrão de treinamento (vetor de entrada) é aplicado aos nós sensoriais da rede e seu efeito se propaga através da rede, camada por camada. Então, um conjunto de saídas é produzido como a resposta da rede. Durante o passo de propagação, os pesos sinápticos são mantidos fixos. Já, no passo para trás os pesos sinápticos são todos ajustados de acordo com uma regra de correção dos pesos. Normalmente, a resposta da rede é subtraída da resposta desejada para produzir um sinal de erro. Este sinal de erro é então propagado para trás através da rede, contra a direção das conexões sinápticas, donde vem o nome de retropropagação de erro.

Conforme Haykin [19] podemos resumir as computações para frente e para trás como seguem.

4.1. Computação para frente (propagação)

Supondo que um exemplo de treinamento do conjunto seja representado por $(x(n), d(n))$, com o vetor de entrada $x(n)$ aplicado à camada de entrada de nós sensoriais e o vetor resposta $d(n)$ representando os sinais da camada de saída de nós computacionais desejados. Calculam-se os campos locais induzidos e os sinais funcionais da rede prosseguindo para frente através da rede, camada por camada. O campo local induzido $v_j^{(l)}(n)$ para o neurônio j na camada l é dado por:

$$v_j^{(l)}(n) = \sum_{i=0}^{m_l} w_{ji}^{(l)}(n) \cdot y_i^{(l-1)}(n) \quad (8)$$

onde $y_i^{(l-1)}(n)$ é o sinal (função) de saída do neurônio i na camada anterior $l-1$, na iteração n , e $w_{ji}^{(l)}(n)$ é o peso sináptico do neurônio j da camada l , que é alimentado pelo neurônio i da camada $l-1$. Para $i = 0$, temos $y_0^{(l-1)} = +1$ e $w_{j0}^{(l)}(n) = b_j^{(l)}(n)$ é o *bias* aplicado ao neurônio j na camada l . Assumindo-se o uso de uma função de ativação do tipo sigmóide, o sinal de saída do neurônio j na camada l é dado por:

$$y_j^{(l)} = \phi(v_j^{(l)}(n)). \quad (9)$$

Se o neurônio j está na primeira camada oculta (isto é, $l = 1$), faz-se:

$$y_j^{(0)}(n) = x_j(n) \quad (10)$$

onde $x_j(n)$ é o j -ésimo elemento do vetor de entrada $x(n)$. Se o neurônio j está na camada de saída (isto é, $l =$

L, onde L é denominado como a profundidade da rede), faz-se:

$$y_j^{(L)} = o_j(n) \quad (11)$$

Enfim, calcula-se o sinal de erro:

$$e_j(n) = d_j(n) - o_j(n) \quad (12)$$

onde $d_j(n)$ é o j-ésimo elemento do vetor resposta desejada $\mathbf{d}(n)$.

4.2. Computação para trás (retropropagação)

Calculam-se os gradientes locais (δ) da rede, denominados por:

$$\delta_j^{(l)}(n) = e_j^{(l)}(n) \cdot \varphi'(v_j^{(l)}(n)) \quad (13)$$

se j é um neurônio de saída, e

$$\delta_j^{(l)}(n) = \varphi'(v_j^{(l)}(n)) \cdot \sum_k \delta_k^{(l+1)}(n) \cdot w_{kj}^{(l+1)}(n) \quad (14)$$

Em seguida ajustam-se os pesos sinápticos da rede na camada l de acordo com a regra delta generalizada:

$$w_{ji}^{(l)}(n+1) = w_{ji}^{(l)}(n) + \eta \cdot \delta_j^{(l)}(n) \cdot y_i^{(l-1)}(n) \quad (15)$$

onde η é o parâmetro da taxa de aprendizagem.

5. Metodologia

Foram definidas através de um planejamento experimental 22 amostras contendo o princípio ativo hidroclorotiazida em amido, das quais, 17 foram usadas para calibração (treinamento) e 5 para validação. O princípio ativo foi manipulado de forma a obtermos um conjunto de amostras com diferentes concentrações. Esta variação foi de 20% acima e abaixo das concentrações comumente comercializadas, sendo a variação de 0,5% para cada amostra [20].

Os conjuntos de espectros dos padrões e das amostras de validação (Figura 1) foram obtidos utilizando-se um acessório de reflectância difusa acoplado a um espectrofotômetro Nicolet Magna 550 na região do infravermelho médio.

Os modelos foram desenvolvidos em ambiente MATLAB empregando os dados brutos em forma de $\log(1/R)$ para as regiões espectrais selecionadas com base na subtração de espectros. A calibração foi realizada com o método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) utilizando, como pré-processamento a correção do espalhamento multiplicativo (MSC) [20].

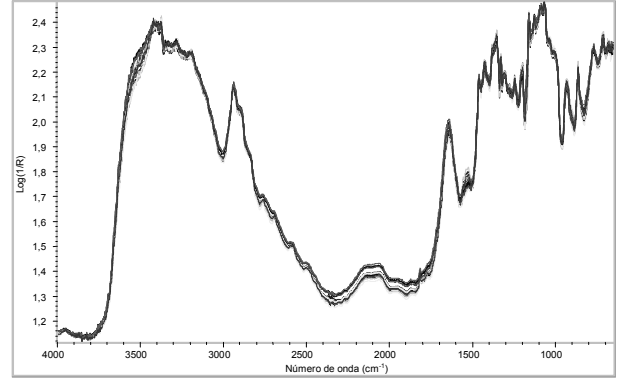


Figura 1: Espectros das amostras de hidroclorotiazida em amido em diferentes concentrações.

As regiões espectrais de 1158,5 a 1188,2 cm^{-1} , de 1503,5 a 1811,7 cm^{-1} e de 2818,6 a 2945,4 cm^{-1} foram escolhidas por apresentarem modelos de regressão multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS) com os melhores coeficientes de regressão (R^2). Estas regiões totalizam 245 números de onda.

Desta forma, estas regiões foram empregadas como sinais de entrada da Rede Neural implementada e os resultados comparados com os modelos obtidos pelo PLS. A topologia da rede utilizada foi um perceptron multicamada com 245 nós sensoriais, uma camada escondida e um neurônio na camada de saída. Foram testados vários números de neurônios na camada escondida buscando a otimização dos resultados. Também, várias taxas de aprendizagem foram utilizadas. A cada simulação os pesos sinápticos iniciais foram escolhidos aleatoriamente utilizando-se um gerador de números randômicos no intervalo $[-1,1]$ seguindo uma distribuição uniforme de média 0 (zero). A função de ativação utilizada foi a função sigmóide tangente hiperbólica. A implementação da RNA e os modelos foram desenvolvidos em ambiente MATLAB.

A determinação dos melhores resultados empregando RNAs foi feita observando-se os parâmetros SEC, SEV e R^2 .

6. Resultados

Primeiramente, os seis melhores resultados obtidos utilizando regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados obtidos com regressão por mínimos quadrados parciais.

VLs	SEC	SEV	R^2
5	1,751	1,624	0,874
6	1,228	2,167	0,938
7	0,847	1,608	0,970
8	0,442	1,777	0,992
9	0,336	1,702	0,995
10	0,220	1,794	0,998

É importante ressaltar que o modelo que emprega 7 variáveis latentes (VLs) apresenta o menor erro de validação, por outro lado, apresenta coeficiente de regressão de 0,97. Tendo em vista o coeficiente de correlação, o modelo que emprega 9 variáveis latentes resultou em $R^2 = 0,995$, mas um erro na validação um pouco maior (SEV = 1,702). A Figura 2 apresenta a curva de calibração para o modelo obtido através do PLS utilizando-se 7 VLs.

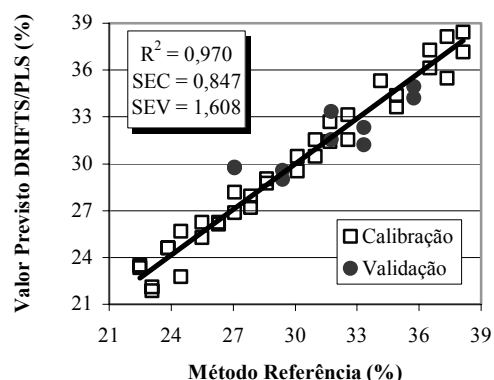


Figura 2: Curva de calibração resultante do modelo obtido através do PLS com 7 LVs.

Os melhores resultados com RNAs foram obtidos com 100 neurônios na camada escondida e taxa de aprendizagem de 0,01. A Tabela 2 apresenta os 3 melhores resultados em relação ao SEC e ao R^2 obtidos em 3 simulações independentes.

Tabela 2: Melhores resultados obtidos com RNAs em relação ao erro de calibração.

Simulação	SEC	SEV	R^2
A	0,574	1,875	0,987
B	0,441	1,581	0,992
C	0,589	1,719	0,986

Observa-se que a simulação B apresenta o melhor coeficiente de correlação (R^2) e um erro de validação de 1,581 o que mostra que a rede neural foi capaz de obter resultados semelhantes aos do algoritmo PLS em relação a calibração e ainda obter menor erro de validação em relação ao PLS.

A tabela 3, apresenta os 3 melhores resultados em relação ao SEV obtidos em 3 simulações independentes. Também foram empregados 100 neurônios na camada escondida e taxa de aprendizagem de 0,01.

Tabela 3: Melhores resultados obtidos com RNAs em relação ao erro de validação.

Simulação	SEC	SEV	R2
B	0,931	1,202	0,977

C	0,979	0,994	0,970
D	0,879	0,976	0,971

Observa-se que a simulação D apresenta o menor erro de validação, sendo de 0,976 e erro de calibração de 0,879. Embora o SEC seja maior em relação aos resultados da tabela 2 o SEV apresenta o melhor valor tanto em relação aos resultados anteriores com RNAs como frente ao PLS. A curva de calibração da Figura 3 mostra a correlação entre os valores reais (obtidos gravimetricamente) e os valores previstos pela rede neural artificial.

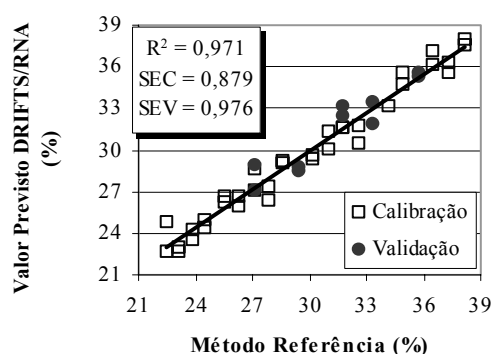


Figura 3: Curva de calibração resultante da simulação D.

7. Conclusões

Observou-se que a maioria das simulações realizadas com a RNA implementada apresentou resultados comparáveis com os do PLS. Em muitos casos obtiveram-se menores erros na previsão das amostras externas ao treinamento (conjunto de validação) quando utilizamos a RNA em comparação ao PLS. Isso confirma a grande capacidade de generalização das RNAs.

Assim sendo, as RNAs apresentam-se como alternativa ao uso do algoritmo de calibração multivariada PLS, seja pela habilidade de aprendizado ou de generalização.

Por fim, pode-se verificar que tanto a técnica DRIFTS associada do algoritmo de calibração PLS como quando das RNAs servem como alternativas para o problema de quantificação de princípios ativos em amostras de medicamentos. Estas metodologias abordam vantagens como a não destruição da amostra, o baixo custo, rapidez na análise e a não geração de resíduos. Podendo, desta forma, ter excelentes resultados quando aplicadas ao problema de controle de qualidade de medicamentos, seja a nível industrial ou no controle de produção em farmácias de manipulação.

8. Agradecimentos

FAPERGS – Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul.

SCT/RS – Secretaria de Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul.

PROGRUPE – Pesquisa, Otimização e Transferência de Processos Fermentativos para a Produção de Produtos Cárneos – UNISC.

FUNDAP: Grupo de Pesquisa em Sistemas e Processos Industriais (GPSPI).

Referências

- [1] C.W. Carvalho, P.H.A. Konzen, S.L. Hunning, J.C. Furtado, M.F. Ferrão. Determinação de fármacos anti-hipertensivos por reflexão no infravermelho, regressão multivariada e algoritmo genético. *Tecno-lóg.* 6(1), 9-27, 2002.
- [2] C.W. Carvalho, E. I. Muller, M.F. Ferrão, C.U. Davanzo. Desenvolvimento de uma rotina para controle de qualidade de farinhas de trigo empregando dados de espectroscopia por reflexão difusa no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFTS) e métodos de regressão multivariada. *Revista Redes*, 7(n.especial), 141 - 167, 2002.
- [3] E.O. Cerqueira, J.C. Andrade, R.J. Poppi. Redes neurais e suas aplicações em calibração multivariada. *Quim. Nova*, 24(6), 864-873, 2001.
- [4] A.H. Abdullah, W.F. Sherman. Kramers-Kronig type analysis of short spectral range reflection spectra. *Vib. Spec.*, 13, 133-142, 1997.
- [5] G.S. Birth, H.G. Hecht. *The physics of near-infrared reflectance – in Near-infrared technology in the agricultural and food industries* – by Phil Williams & Karl Norris, St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1987.
- [6] S.R. Culler. *Diffuse reflectance infrared spectroscopy: Sampling techniques for qualitative/quantitative analysis of solids* – in *Practical sampling techniques for infrared analysis* – by Patricia B. Coleman, Boca Raton: CRC Press, 1993.
- [7] B.G. Oosborne, T. Fearn, P.H. Hindle. *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis* – Singapore: Longman Scientific & Technical, 1993.
- [8] D.L. Wetzel. Near-infrared reflectance analysis sleeper among spectroscopic techniques. *Anal. Chem.*, 55, 1165A-1176A, 1983.
- [9] M.F. Ferrão. Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. *Tecno-lóg.*, 5(1), 65-85, 2001.
- [10] J.M. Olinger, P.R. Griffiths. Quantitative effects of an absorbing matrix on near-infrared diffuse reflectance spectra. *Anal. Chem.*, 60, 2427-2435, 1988.
- [11] J.M. Olinger, P.R. Griffiths. Effects of sample dilution and particle size/morphology on diffuse reflection spectra of carbohydrate systems in the near- and mid-Infrared. part I: Single analytes. *Appl. Spectrosc.*, 47, 687-694, 1993.
- [12] J.M. Olinger, P.R. Griffiths. Effects of sample dilution and particle size/morphology on diffuse reflection spectra of carbohydrate systems in the near- and mid-Infrared. part II: durum wheat. *Appl. Spectrosc.*, 47, 695-701, 1993.
- [13] M.F. Pimentel, B.B. Neto. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. *Quim. Nova*, 19, 268-277, 1996.
- [14] S. Wold. Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models. *Technometrics*, 20, 397-405, 1978.
- [15] M. Sjöström, S. Wold, W. Lindberg, J.A. Persson, H. Martens. A multivariate calibration problem in analytical chemistry solved by partial least-squares models in latent variables. *Anal. Chim. Acta*, 150, 61-70, 1983.
- [16] W.S. McCulloch, W. Pitts. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bulletin of Mathematical Biophysics*, 5, 115-133, 1943.
- [17] F. Rosenblatt. The perceptron: a probabilistic model for information storage and organization in the brain. *Psychological Review*, 65, 386-408, 1958.
- [18] D.E. Rumelhart, G.E. Hilton, R.J. Williams. Learning representations of back-propagation errors. *Nature (London)*, 323, 533-536, 1986.
- [19] S. Haykin. *Redes Neurais: princípios e prática*; trad. Paulo Martins Engel. 2 ed. - Porto Alegre: Bookman, 2001.
- [20] C.W. Willke. *Determinação de princípios ativos presentes em fármacos de ação anti-hipertensiva empregando espectroscopia por reflexão difusa no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFTS)*. Trabalho de Conclusão do Curso de Química Industrial - Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC, 2000.