

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA



**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A
DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO,
PARACETAMOL E CAFEÍNA EM MATRIZ SÓLIDA POR
ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA**

Aluno: Altair Benedito Moreira

Orientador: Lauro Tatsuo Kubota

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Química - Área de Química Analítica

Campinas, Maio de 2005.

Dedico esta tese em especial à minha mãe e esposa, que sempre acreditaram e me deram todo apoio para alcançar os objetivos propostos, e a todos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

- A minha família, pelo apoio despendido em todas as etapas de minha vida: Minha irmã Aparecida P. Ribeiro, e meus irmãos, Amarildo B. Moreira, Aldir B. Moreira, Adriano B. Moreira e ao caçulinha André B. Moreira.
- A minha esposa Márcia, pelo carinho, compreensão e apoio em todos os momentos.
- Ao professor Lauro Tatsuo Kubota, com quem tive o privilégio de conviver e principalmente pela excelente orientação. Ficam expressos o meu mais profundo agradecimento e minha admiração por sua confiança e, principalmente, por sua amizade.
- A professora Dra. Teresa Dib Zambon Atvars, pela colaboração e auxílio para a realização deste trabalho.
- A Professora Dra. Márcia Miguel Castro Ferreira, pela colaboração e auxílio para a realização deste trabalho.
- A Professora Dra. Iara L.T. Dias, pela colaboração para a realização deste trabalho.
- Ao Dr. Hueder P.M. Oliveira, pela colaboração em análises pertinentes à realização deste trabalho.
- Ao órgão financiador CNPq (Centro Nacional de Pesquisa de Química) pela bolsa concedida e incentivo financeiro fornecido.
- À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelos recursos concedidos à compra do espectrofluorímetro.
- Aos amigos da República Paraná, Eduardão, Cesão, Flavião, Rogerião, Odairsão, Anisião e Leandrão.
- Aos amigos do LEEDS (Laboratório de Eletroanalítica, Eletroquímica e Desenvolvimento de Sensores) César, Miyuki, Pillar, Renato Freire, Rafaela,

Arnaldo, Tânia, Rodrigo, Antônio (Jequié), Alaécio, Larissa, Karin, Percy, Renata, Diogo, Elizângela, Rita, Flávio, Emerson, Rosângela, Valter, Simone, Lucilene, Paulo, Bárbara e ao meu irmão Adriano, também integrante do grupo, pela convivência agradável que torna o trabalho mais prazeroso.

- Ao pessoal da CPG, especialmente à Bel, o Rodrigo e o Elias, pela competência em lidar com a parte burocrática.
- A todos os funcionários do IQ, em especial ao Fontana, Marcos, Mario, pessoal do almoxarifado e patrimônio.
- Ao Instituto de Química, pelas facilidades e oportunidades.
- Enfim, à todos que de alguma forma acreditaram e contribuíram e estiveram presentes durante todo esse meu trabalho, o meu muito obrigado.

Curriculum Vitae

Formação Acadêmica

1. **Doutorado em Ciências.** Química Analítica: (IQ/UNICAMP)

“Desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de ácido acetilsalicílico, paracetamol e cafeína em matriz sólida por espectroscopia de fluorescência”, 2005, sob a orientação do Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota.

2. **Mestrado em Química Aplicada.** Produtos do meio ambiente (DQI/UEM)

“Composição Físico-Química e Ácidos Graxos em Filé de *Brycon cephalus* (matrinã), *B. microlepis* (piraputanga) e *B. orbignyanus* (piracanjuba)”, 2001, sob a orientação do Prof. Dr. Makoto Matsushita.

3. **Graduação em Química**, opção Bacharelado (1995/1998) pela Universidade Estadual de Maringá - UEM - Maringá/Pr.

Publicações em Revistas Científicas:

1) Moreira A.B., Dias I.L.T., Ferreira M.M.C, Neto G.O., Zagatto E.A.G., Kubota L.T. Simultaneous spectrofluorimetric determination of acetylsalicylic acid and caffeine in powdered pharmaceutical preparations using partial least-squares (PLS1) multivariate calibration. *Talanta*, 2005 (In Press).

2) Moreira A.B., Atvars T.D.Z, Oliveira H.P.M., Dias I.L.T., Neto G.O., Zagatto E.A.G., Kubota L.T. Direct determination of paracetamol in powdered pharmaceutical samples by fluorescence spectroscopy, *Analytica Chimica Acta*, v. 539, p.257, 2005.

3) Moreira A.B. Dias I.L.T., Neto G.O., Zagatto E.A.G., Kubota L.T. Solid-phase fluorescence spectroscopy for the determination of acetylsalicylic acid in powdered pharmaceutical samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 523, p. 49, 2004.

4) Moreira A.B., Tarley C.R., de Souza N.E., Damasceno J.C., Matsushita M., Visentainer J.V. Longissimus dorsi composition and fatty acid profile of young goats slaughtered at different ages. *Anais da Associação Brasileira de Química*. v. 52, p 42, 2003.

5) Moreira A.B., de Souza N.E., Visentainer J.V., Matsushita M. Composição de ácidos graxos e teor de lipídios em cabeças de peixes: matrinã (*B. cephalus*),

piraputanga (*B. microlepis*) e piracanjuba (*B. orbignyanus*), criados em diferentes ambientes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 179, 2003.

6) Moreira A.B. de Souza N.E., Hayashi C., Matsushita M. Fatty acids profile and cholesterol contents of three Brazilian Brycon freshwaters fishes. *Journal of Food Composition and Analysis*. v. 14, p. 565, 2001.

Patente

1) Determinação de Ácido Acetilsalicílico em Matriz Sólida por Espectroscopia de Fluorescência. Número, PI0401219-4.

Publicações em Congressos:

1) “Alguns parâmetros físico-químicos do músculo Longissimus dorsi de machos de cabra cruzada Saanen”. *VI Encontro de Química da Região Sul*, Novembro/1998.

2) “Avaliação Físico-Química do Músculo Longissimus Dorsi de Cabra Cruzada Saanen”. *XV Semana de Química*, Julho/1999.

3) “Composição Físico-Química e ácidos Graxos do Músculo Longissimus dorsi de Caprinos Cruzada”. *VI Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Julho/1999.

3) “Proteína, colesterol e ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 em músculo longissimus dorsi de caprinos cruzada saanen”. *Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*, Novembro/1999.

4) “Ácidos Graxos em Brycon Cephalus (Matrinchã) e B. Hilarii (Piraputanga) Criados em Cativeiros”. *XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Agosto de 2000.

5) “Ácidos graxos em Brycon Orbignyanus (Piracanjuba) criados em cativeiros e nativos”. *VIII Encontro de Química da Região Sul*, Novembro de 2000.

6) “Associação do método de padronização interna e teste de Huber em análises por cromatografia de camada delgada”. *XI Encontro nacional de química analítica (Enqa)*, Setembro de 2001.

7) “Determinação de paracetamol em matriz sólida por espectroscopia de fluorescência”. *XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)*, Maio de 2002.

8) “Determinação de ácido acetilsalicílico em matriz sólida por espectroscopia de fluorescência”. *XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)*, Maio de 2003.

9) “Determinação simultânea de ácido acetilsalicílico e cafeína em tablets por espectroscopia de fluorescência e modelagem com PLS”. *XII Encontro nacional de química analítica (Enqa)*, Outubro de 2003.

10) “Determinação simultânea de ácido acetilsalicílico e cafeína em tablets por espectroscopia de fluorescência e modelagem com PLS”. *XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)*, Maio de 2004.

11) “Determinação de ácido acetilsalicílico em fármacos empregando sistema sequencial de análise em fluxo”. *XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)*, Maio de 2004.

12) “Hydrolysis of acetylsalicylic acid in tablets observed by fluorescence spectroscopy: A kinetic study” *IV Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP)*, Julho de 2003, Ribeirão Preto/SP.

Cursos e Mini-Cursos

1) Química do Solo: Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, no Período: Julho/1998 Carga Horária: 45 hrs.

2) Espectroscopia molecular na região do infravermelho próximo (NIR): Sociedade Brasileira de Química realizado em Poços de Caldas: Carga Horária: 6 hrs.

RESUMO: Desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de ácido acetilsalicílico, paracetamol e cafeína em matriz sólida por espectroscopia de fluorescência

Neste trabalho são descritos o desenvolvimento dos métodos analíticos para a determinação de ácido acetilsalicílico (AAS), paracetamol (PA) e cafeína (CF) em fase sólida por espectroscopia de fluorescência. A fluorescência nativa do PA no estado sólido foi demonstrada pela primeira vez. Todos os estudos realizados neste trabalho foram desenvolvidos visando principalmente a aplicação no controle de qualidade em indústrias químicas e farmacêuticas. Os estudos foram direcionados ao desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de AAS e PA, individualmente. Também foram desenvolvidos métodos para a determinação simultânea das misturas (CF e AAS) e (CF e PA) usando como ferramenta estatística a calibração multivariada para a construção dos modelos, empregando o algoritmo de regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR-1). Foram otimizadas a quantidade de amostra colocada no porta amostra e a distância desta da fibra óptica para todos os métodos analíticos desenvolvidos neste trabalho, e as melhores condições foram de 25 mg e 0,9 cm, respectivamente.

Os métodos desenvolvidos para a determinação individual de AAS e PA em amostras sólidas apresentaram boa precisão, exatidão e alta frequência analítica, podendo chegar a 300 determinações por hora. A exatidão foi checada comparando os valores obtidos pelo método desenvolvido com os procedimentos adotados pela farmacopéia britânica e os resultados foram estatisticamente o mesmo a nível de 95% de confiança. Para a determinação simultânea das misturas, os modelos construídos apresentaram excelente desempenho de previsão. Os resíduos foram inferiores a 10% para a maior parte das amostras usadas nos conjuntos de validação externa. A qualidade dos modelos foi avaliada através do coeficiente de variabilidade (CV), o qual variou entre 4 e 7% para todos os modelos. Desta maneira, os métodos desenvolvidos neste trabalho são uma boa alternativa aos métodos tradicionais descritos na literatura, devido suas características favoráveis como elevada frequência analítica, possibilidade de monitoramento *on line* em linha de produção e principalmente por serem não destrutivos, não gerarem resíduos e serem de baixo custo.

ABSTRACT: Development of analytical methods for the determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine in solid matrix by fluorescence spectroscopy

In this work are described the development of analytical method for acetylsalicylic acid (AAS), paracetamol (PA) and caffeine (CF) determinations in solid phase by fluorescence spectroscopy. The native fluorescence of PA was demonstrated in the solid state for the first time. All studies performed here were developed seeking mainly the application in the quality control in chemical and pharmaceutical industries. The studies were addressed to the development of analytical methods for the AAS and PA determination, individually. Methods for the simultaneous determination (CF and AAS) and (CF and PA) using as statistical tool the multivariate calibration for the models construction, employing the partial least squares regression (PLSR-1) algorithm were also developed. The amount of sample placed in the sample compartment and the distance between the fiber optic and sample were optimized for all analytical methods developed in this work and the better conditions were 25 mg and 0.9 cm, respectively.

The developed methods for single determination of AAS and PA in samples gave good performance. A high analytical frequency, being able to reach 300 determinations per hour. The accuracy checked comparing the obtained values by the developed methods with the procedures adopted by the British Pharmacopoeia and the results were statistically the same at 95% confidence level. For the simultaneous determination of the mixtures, the built models presented excellent performance of prediction. The residuals were lower than 10% for most used samples in the external validation set. The quality of the models was evaluated through the coefficient of variability (CV), which changed between 4 and 7% for the models. Looking for innovative methods that generate no residue, quick, non-destructive, on line monitoration in production line and low cost is a good option to the traditional methods.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. AAS, PA e CF: Aspectos gerais	3
1.2. Métodos analíticos empregados em análises de AAS, PA e CF	5
2. FUNDAMENTOS DA FLUORESCÊNCIA MOLECULAR E QUIMIOMETRIA	7
2.1. Fluorescência molecular.....	8
2.1.1. Rendimento quântico e Rigidez estrutural.....	11
2.2. Quimiometria e calibração multivariada	12
2.2.1. Componentes principais	14
2.2.2. Amostras anômalas “Outliers”	15
2.2.3. Calibração multivariada: Aspectos gerais sobre seu emprego.....	17
3. OBJETIVOS	20
4. PARTE EXPERIMENTAL	22
4.1. Reagentes	23
4.2. Espectrofluorímetro.....	23
4.3. Procedimento empregado para a determinação de AAS e PA individuais ...	24
4.4. Procedimento do método oficial (Farmacopéia Britânica) para determinação do PA.....	26
4.5. Amostras	26
4.6. Procedimento para a determinação das misturas (CF e AAS) e (CF e PA)..	26

4.7. Fluorescência resolvida no tempo e a análise de distribuição de tempos de vida de fluorescência pelo método de Marquardt (MM).....	27
4.8. Calibração multivariada e programa computacional	29
4.9. Amostras	29
5. DETERMINAÇÃO DE AAS E PA EM MATRIZ SÓLIDA POR SISTEMA UNIVARIADO	30
5.1. Determinação de AAS em matriz sólida.....	31
5.1.1. Efeito do tamanho das partículas na fluorescência.....	32
5.1.2. Otimização dos parâmetros que influenciam na fluorescência do AAS	33
5.1.3. Parâmetros otimizados	34
5.1.4. Influência dos excipientes	36
5.1.5. Parâmetros analíticos	37
5.1.6. Comparação de métodos	39
5.2. Determinação de PA em matriz sólida	41
5.2.1. Fluorescência do Paracetamol.....	41
5.2.2. Efeito do tamanho das partículas e homogeneização na fluorescência do PA	44
5.2.3. Parâmetros otimizados	46
5.2.4. Efeito dos excipientes	47
5.2.5. Parâmetros analíticos	48
5.2.6. Característica do método.....	50
5.2.7. Aplicações em amostras.....	51
6. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA EM MISTURAS EMPREGANDO CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	52
6.1. Determinação de CF e AAS em misturas	53

6.1.1. Aplicações.....	60
6.2. Determinação de CF e PA em misturas	61
6.2.1. Aplicações.....	67
7. CONCLUSÕES	69
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	72
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Condições instrumentais utilizadas para os métodos desenvolvidos. 25
- Tabela 2.** Estudos do efeito do tamanho das partículas na intensidade de fluorescência do AAS; DP = Diâmetro das partículas, Concentração de AAS = 100 mg g⁻¹ 32
- Tabela 3.** Efeito dos compostos usados como excipientes. I = intensidade de fluorescência numa unidade arbitrária, C = concentração de AAS em mg g⁻¹ 37
- Tabela 4.** Quantidade de AAS (mg) determinado em formulações farmacêuticas pelo método proposto (fluorimétrico) e oficial (Farmacopéia Britânica). Todas as medidas foram realizadas em triplicata..... 40
- Tabela 5.** Estudos do efeito do tamanho das partículas na intensidade de fluorescência do PA; DP = Diâmetro das partículas; Concentração do PA = 200 mg g⁻¹ 45
- Tabela 6.** Efeito de cada um dos compostos usados como excipientes na formulação. I = intensidade de fluorescência numa unidade arbitrária, C = concentração do paracetamol em mg g⁻¹ 48
- Tabela 7.** Valores obtidos para o PA (em mg por comprimido) determinados pelos métodos proposto e de referência [10]. As medidas foram realizadas em triplicata. 51
- Tabela 8.** Determinação simultânea da CF e AAS em 25 diferentes misturas sintéticas (grupo de validação externa) usando o PLS-1. 59

- Tabela 9.** As concentrações de AAS e CF (adicionada, encontrada), expressada em mg g^{-1} são médias de três determinações; proporção 1 e 2 = 70:15:10:5 e 80:10:7:3 m/m, respectivamente..... 60
- Tabela 10.** Determinação simultânea da CF e PA em 25 diferentes misturas sintéticas (grupo de validação externa) usando o PLS-1. 66
- Tabela 11.** As concentrações de PA e CF (adicionada, encontrada), expressada em mg g^{-1} são médias de três determinações; proporção 1 e 2 = 70:14:9:4:3 e 75:12:8:3:2 m/m, respectivamente..... 67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas moleculares do ácido acetilsalicílico (A), paracetamol (B) e cafeína (C).	4
Figura 2. Diagrama de Jablonski de níveis de energia mostrando os estados singlete e triplete de energias mais baixas e as diversas transições [58].	9
Figura 3. Estrutura molecular do fluoreno e fenil-benzeno.....	12
Figura 4. Espectro característico de fluorescência.	18
Figura 5. Espectrofluorímetro de luminescência Perkin Elmer (A); Fibra óptica (B); porta amostra (C) e Microcomputador (D).....	24
Figura 6. Espectros de excitação (1) e emissão (2) do AAS e seus correspondentes espectros dos excipientes (3 e 4) em fase sólida. Proporção dos excipientes = 80:10:7:3 m/m; Concentração do AAS = 80 mg g ⁻¹	31
Figura 7. Efeito do tempo de homogeneização da amostra no sinal de fluorescência para o AAS, concentração 100 mg g ⁻¹	34
Figura 8. Otimização da distância da fibra óptica até a amostra. Concentração de AAS 100 mg g ⁻¹	35
Figura 9. Efeito da quantidade de amostra no porta amostra. Concentração de AAS 100 mg g ⁻¹	36
Figura 10. Curva analítica obtida para a determinação do AAS na proporção 80:10:7:3 de excipientes.	39
Figura 11. Estrutura molecular do paracetamol.	41

- Figura 12.** Espectros de excitação (1) e emissão (2) do PA. Os espectros de emissão foram obtidos fixando comprimentos de onda de excitação entre 325 e 349 nm com incremento de 1 nm. Gráfico inserido: dependência da intensidade de emissão com o comprimento de onda de excitação. Concentração 250 mg g⁻¹ 42
- Figura 13.** Decaimento de fluorescência para o PA obtido a $\lambda_{\text{ex}} = 333$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 382$ nm; espectro 1 é a função de resposta do instrumento da solução LUDOX e o espectro 2 é o decaimento da amostra, ambos obtidos a 298 K no estado sólido. 43
- Figura 14.** Espectros de excitação (1) e emissão (2) do PA e seus correspondentes espectros do branco (3 e 4) em fase sólida. Proporção dos excipientes = 70:14:9:4:3 m/m; Concentração do PA = 250 mg g⁻¹ 44
- Figura 15.** Efeito do tempo de homogeneização da amostra no sinal de fluorescência para o PA, concentração 250 mg g⁻¹ 46
- Figura 16.** Efeitos da quantidade de amostra (A) e da distância entre a fibra óptica e amostra (B). Concentração de PA = 250 mg g⁻¹ 47
- Figura 17.** Curva analítica obtida para a determinação do PA na proporção 70:14:9:4:3 m/m de excipientes. 49
- Figura 18.** Espectros individuais de excitação do AAS (1), CF (2) e emissão AAS (3), CF (4) e seus respectivos espectros do branco de excitação do AAS (5), CF (6) e emissão do AAS (7), CF (8). Concentração de 80 mg g⁻¹ para ambos os compostos. 54
- Figura 19.** PRESS em função do número de componentes principais para o modelo da CF usando PLS-1 com os dados centrados na média. 56

- Figura 20.** PRESS em função do número de componentes principais para o modelo do AAS usando PLS-1 com os dados centrados na média.... 56
- Figura 21.** Gráficos de resíduos de *Student* em função da *leverage* para os modelos da CF..... 58
- Figura 22.** Gráficos de resíduos de *Student* em função da *leverage* para os modelos da AAS..... 58
- Figura 23.** Espectros de excitação e emissão (1 e 2) para a CF e (3 e 4) para o PA, respectivamente, e seus correspondentes espectros de excitação do branco da CF (5), PA (7) e emissão CF (6), PA (8). Proporção entre os excipientes 70:14:9:4:3 m/m. Concentração da CF 100 mg g⁻¹ e PA 200 mg g⁻¹ 62
- Figura 24.** PRESS em função do número de componentes principais para o modelo da CF, usando PLSR-1 e com os dados centrados na média. 63
- Figura 25.** PRESS em função do número de componentes principais para o modelo do PA, usando PLSR-1 e com os dados centrados na média. 63
- Figura 26.** Gráficos de resíduos de *Student* em função da *leverage* para o modelo da CF..... 64
- Figura 27.** Gráficos de resíduos de *Student* em função da *leverage* para o modelo do PA..... 65

1. INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução geral

Nos últimos anos têm havido uma crescente preocupação referente à qualidade dos medicamentos. Além disso, com um mercado cada vez mais exigente e competitivo, o constante aperfeiçoamento com o objetivo de melhorar a qualidade, reduzir custos de produção e geração de resíduos, tem se tornado uma prática indispensável na indústria farmacêutica.

A etapa analítica nos processos industriais tem recebido muita atenção [1]. Na indústria farmacêutica ela é essencial para a garantia de um produto de boa qualidade, e este controle pode ser feito de diferentes maneiras e em diferentes etapas da produção. Nos processos mais usuais, as análises devem ser realizadas na matéria prima, no produto intermediário e principalmente no produto final, o qual carece de uma análise mais cuidadosa. Métodos analíticos que permitem o monitoramento constante durante os processos de produção, possibilitando a identificação imediata de uma falha no sistema de produção são essenciais. Entretanto, no monitoramento de todo o processo de produção um grande número de análises são envolvidos e deste modo demanda muito tempo de análise, consumo de reagentes e conseqüentemente o custo é muito elevado e, além disso, normalmente são geradas grandes quantidades de resíduos. Neste contexto, tem havido um crescente interesse das indústrias químicas e/ou farmacêuticas no desenvolvimento de métodos analíticos não destrutivos envolvendo mínima ou nenhuma manipulação da amostra, e que possibilite obter informações em tempo real [2,3].

Este interesse se justifica por que normalmente em indústrias farmacêuticas, as análises químicas empregadas para avaliar a composição do medicamento é uma prática realizada por amostragem depois do produto acabado, isto em virtude do elevado tempo despendido de análise para a maioria dos

métodos descritos na literatura. E a possibilidade de uma análise em tempo real poderia abrir novas perspectivas para um processo de produção de medicamentos mais seguros.

Neste contexto, o trabalho aqui proposto tem como principal meta desenvolver métodos analíticos que tenham rapidez, mínimo consumo de reagentes, baixo custo por análise e que não gere resíduos. Para atender estes requisitos uma técnica que possibilita realizar medidas diretamente no sólido, sem necessidade de dissolução da amostra, se faz necessária. A técnica espectrofluorimétrica, apesar de ainda pouco explorada em análise quantitativa de amostras sólidas [4], parece ser muito adequada para atender os requisitos anteriormente citados. Para isto, alguns fármacos comercialmente disponíveis no mercado, como ácido acetilsalicílico, paracetamol e cafeína foram escolhidos para avaliar a possibilidade da realização do controle idealizado.

1.1. AAS, PA e CF: Aspectos gerais

O ácido acetilsalicílico, AAS, também chamado ácido 2-acetoxi-benzóico (Figura 1A), foi preparado pela primeira vez em 1853 por Gerhardt [5] fazendo reagir cloreto de acetila com ácido salicílico. Em 1898 foi estudado por Dresser e lançado pela Bayer sob o nome patenteado de aspirina. É um dos compostos sintéticos de maior êxito em todo o campo da química farmacêutica. Ele é empregado como analgésico para dores de pequena intensidade, apresentando ação sedativa suave e antipirético excelente [6]. Além disso, o efeito anticoagulante da aspirina tem sido amplamente estudado [7]. Alguns efeitos adversos provocados pelo AAS, tais como: alteração no sistema respiratório, depressão [8] e de ansiedade [9], têm sido observados em pacientes que utilizam o medicamento.

Ainda que a ação terapêutica seja semelhante à do AAS, o paracetamol (acetaminofen; N-acetil-4-aminofenol), PA, Figura 1 B, é um fármaco muito usado em todo o mundo como uma alternativa à aspirina. Ele é normalmente empregado como analgésico e antipirético e pode ser obtido numa variedade de diferentes formulações [10]. Em doses adequadas ele alivia dores de cabeça, dores lombares, de artrite e pós-operatória. Ele também é usado para a redução de febre de origem bacteriana ou viral [11]. Overdoses de PA causam necroses hepáticas, provavelmente em decorrência do seu metabólico, N-acetil-p-benzoquinona [12].

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina), CF, Figura 1C é um alcalóide e pertence ao grupo das metilxantinas. Ela também é chamada de teína e está presente naturalmente no café, guaraná, erva-mate, chocolate e também é adicionada em muitas bebidas. No homem, a cafeína pode produzir um estado de excitação psíquica que favorece o trabalho intelectual e a aplicação mental, afasta o sono e a sensação de fadiga [13] e também é usada como diurético [14]. É empregada para combater a sonolência ou a depressão provocada por analgésicos e também para potencializar o efeito de fármacos semelhantes à aspirina [15]. Excessiva ingestão de CF pode causar efeitos indesejáveis, assim como tremor, taquicardia e problemas gastro intestinais [16,17].

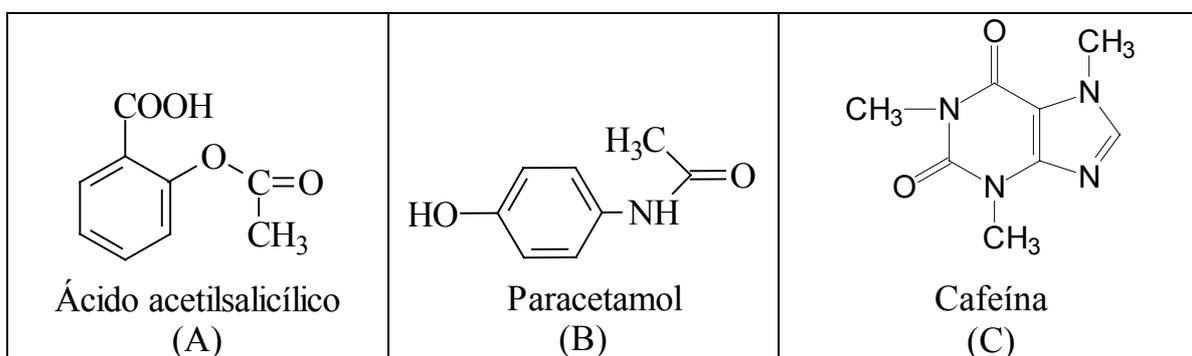


Figura 1. Estruturas moleculares do ácido acetilsalicílico (A), paracetamol (B) e cafeína (C).

1.2. Métodos analíticos empregados em análises de AAS, PA e CF

Muitos métodos analíticos têm sido propostos para determinação de AAS, PA e CF, e diferentes técnicas são empregadas, como cromatográficas [18-22], espectrofotométricas [23-35], eletroquímicas [36-44] e espectrofluorimétricas [45-49]. Geralmente, o AAS não é determinado diretamente, e uma etapa prévia de hidrólise é normalmente necessária para converter o AAS em salicilato [37,45]. Para a maioria dos procedimentos relatados, um elevado consumo de reagentes e longo tempo de análise são requeridos. Além disso, a necessidade de preparação prévia da amostra antes da determinação torna o método muito laborioso, e assim, menos atraente para análises em larga escala. Tanto em indústrias químicas, como farmacêuticas, um grande número de análises precisa ser realizado num curto intervalo de tempo. Por isto, são mais recomendados procedimentos simples de serem executados num curto intervalo de tempo. Deste modo, procedimentos analíticos que não requerem o uso de substâncias químicas e/ou etapas de pré-tratamento são uma boa alternativa para os métodos convencionais.

Com esta visão, algumas técnicas como a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) [50-52,53] e Raman [54] têm sido utilizadas para determinação do AAS, PA e CF no estado sólido na forma individual e em misturas. A espectroscopia de fluorescência na região do UV-VIS, também possibilita realizar medidas qualitativas e quantitativas diretamente em matrizes sólidas [4]. Entretanto, esta possibilidade ainda tem sido pouco explorada, principalmente em compostos de interesse farmacológico.

Estas técnicas espectroscópicas fundamentam-se na interação da radiação eletromagnética com moléculas para a obtenção de informações qualitativas e quantitativas. Estas ferramentas analíticas apresentam inúmeras vantagens, pois fornecem resultados rápidos e de modo não destrutivo, podendo ser aplicada em

análises “on-line” e “in-situ” [55]. No entanto, medidas quantitativas mais precisas só se tornaram possíveis com o advento da Quimiometria, principalmente para a técnica NIR e Raman, uma vez que os métodos quimiométricos possibilitam a análise de misturas complexas (multicomponentes), cujos espectros apresentam-se sobrepostos. No caso da espectroscopia NIR, fatores como a umidade ambiente pode influenciar nos espectros de refletância, principalmente em amostras em pó. Neste tipo de amostra, a absorção de água, pode ser observada através de um aumento na banda de absorção nas regiões de 1425 e 1900 nm [56]. Para a técnica fluorimétrica a água não é um interferente, e também possibilita a determinação em matriz sólida e sem o auxílio da quimiometria, além de se destacar pela sensibilidade, seletividade e uma ampla faixa linear de trabalho [4].

2. FUNDAMENTOS DA FLUORESCÊNCIA MOLECULAR E QUIMIOMETRIA

2.1. Fluorescência Molecular

A fluorescência, juntamente com a fosforescência e quimiluminescência são procedimentos conhecidos coletivamente como métodos de luminescência molecular. Entretanto, atualmente o número de métodos fluorimétricos é significativamente maior que o número de aplicações de procedimentos de fosforescência e quimiluminescência [57].

O fenômeno de luminescência baseia-se fundamentalmente, em todo processo na qual uma molécula em um estado eletrônico excitado retorna ao estado fundamental pela emissão de fótons. As moléculas podem retornar ao estado fundamental por processos não-radiativos ou radiativos, este último também conhecido como luminescência. A fim de entender os processos de luminescência é importante conhecer os estados eletrônicos dispostos em um diagrama de nível de energia (Figura 2). Este diagrama, também conhecido como diagrama de Jablonski, representa quatro estados eletrônicos distintos (S_0 , S_1 , S_2 e T_1) e níveis energéticos vibracionais associados com cada estado eletrônico (denominados 0, 1, 2, etc.) [58].

As transições radiativas ou luminescentes provenientes de um estado excitado para um estado fundamental também podem ocorrer por fluorescência ou fosforescência. Em geral o processo de fluorescência ocorre a partir de uma transição proveniente de um estado singlete excitado para um estado singlete fundamental, enquanto que a fosforescência corresponde a uma transição de um estado triplete excitado para um estado singlete fundamental.

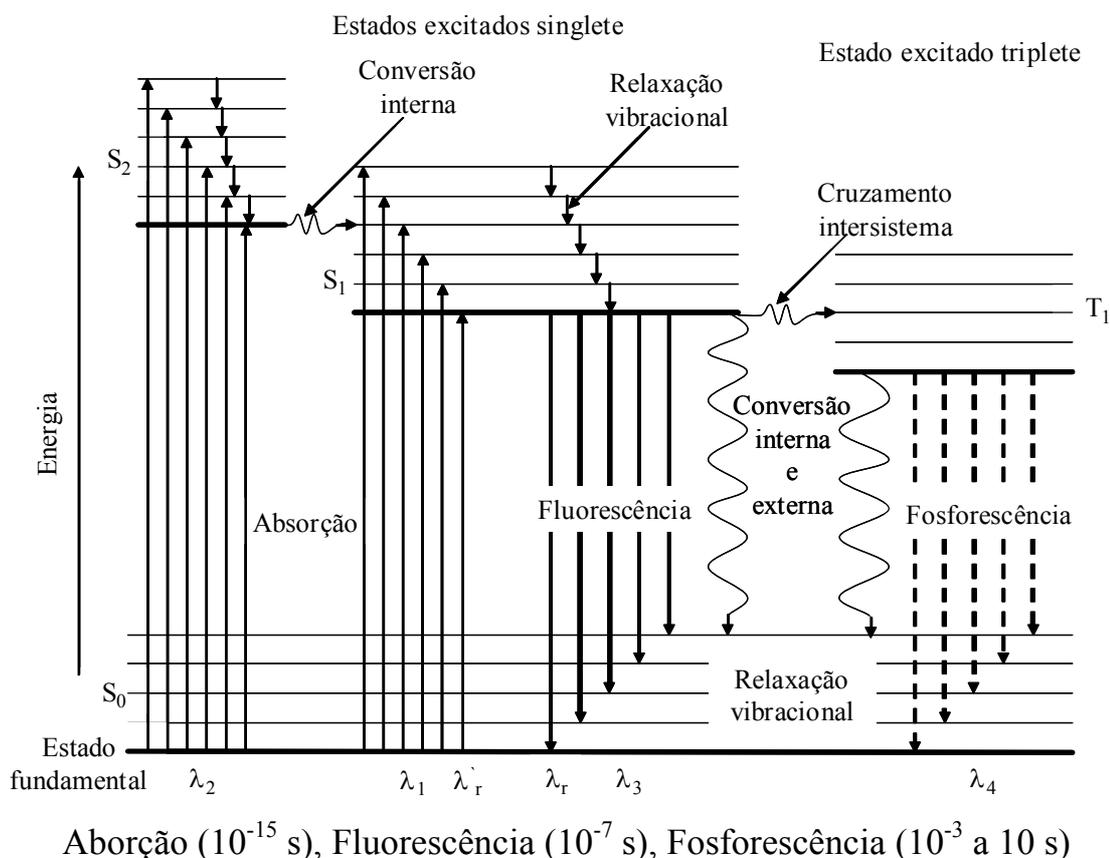


Figura 2. Diagrama de Jablonski de níveis de energia mostrando os estados singlete e triplete de energias mais baixas e as diversas transições [58].

Existem várias possibilidades de transições entre os estados energéticos eletrônicos. Em condições normais de temperatura e equilíbrio, praticamente todas as moléculas existem num nível energético eletrônico mais baixo conhecido como S_0 . Entretanto, absorção de luz visível ou ultravioleta pode promover as moléculas para um estado excitado. O lado esquerdo da Figura 2 mostra a transição de absorção a partir do estado singlete fundamental (S_0) para o primeiro e segundo estados singletes excitados (S_1 e S_2). De acordo com as regras de seleção da mecânica quântica, as transições de absorção de estado singlete S_0 para estado triplete T_1 não são permitidas, assim, não é possível observar uma transição de

absorção entre estes dois níveis eletrônicos. Ainda, de acordo com a Figura 2, é possível verificar que um elétron pode ser promovido para vários níveis vibracionais para cada estado eletrônico. O excesso de energia das moléculas presentes no estado excitado pode ser dissipado por processos não radiativos para níveis populacionais fundamentais de um dado nível eletrônico. Esta relaxação vibracional tipicamente ocorre na ordem de 10^{-11} segundos. Outros processos não radiativos e mais rápidos (10^{-12} segundos), conhecidos como conversão interna, ocorrem quando as moléculas no estado excitado S_2 são convertidas para o estado S_1 . Ambos os processos de relaxação e conversão interna resultam em níveis vibracionais de mais baixa energia que o estado excitado S_1 [59].

As moléculas quando no estado excitado S_1 dissipam o excesso de energia por processos radiativos (fluorescência) ou não radiativos (conversão interna para estado de mais baixa energia). A intensa energia envolvida no processo de emissão de S_1 para S_0 faz com que a conversão interna seja em geral praticamente negligenciável, devido à energia envolvida neste processo. A energia envolvida no processo de fluorescência é menor ou igual ao processo de absorção, desta forma a luz fluorescente terá um comprimento de onda maior ou igual à luz de excitação.

Algumas moléculas do estado excitado S_1 podem sofrer transição para um estado triplete excitado por um processo não radiativo conhecido como cruzamento intersistema. Os elétrons presentes agora no estado excitado T_1 podem retornar ao estado eletrônico fundamental por fosforescência ou ainda por processos não radiativos. Devido esta transição ser caracterizada como um processo não permitido pelas regras de seleção da mecânica quântica, o tempo de vida se encontra ao redor 10^{-3} a 10 segundos. Em geral o fóton emitido pela transição de T_1 para S_0 possui menor energia do que a transição S_1 para S_0 , ocasionando maiores comprimentos de onda de emissão [59].

2.1.1. Rendimento quântico e Rigidez estrutural

O rendimento quântico, ou eficiência quântica para fluorescência (simbolizado pela letra ϕ) pode ser obtido pela razão entre o número de moléculas que luminescem pelo número de moléculas que são excitadas. Como é observado na equação 1, os valores de ϕ são dependentes das constantes de velocidades relativas dos processos pelos quais o estado excitado singlete de menor energia é desativado (Figura 2), onde k_f é a da fluorescência, k_i do cruzamento intersistema, k_{ce} da conversão externa, k_{ci} da conversão interna, k_{pd} da pré-dissociação e k_d da dissociação. Estas duas últimas constantes são dependentes principalmente da estrutura química, enquanto que as restantes são influenciadas principalmente pelo ambiente.

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{ce} + k_{ci} + k_{pd} + k_d} \quad (\text{Eq. 1})$$

Além desses fatores que podem influenciar no rendimento quântico, sabe-se empiricamente que a rigidez molecular também pode influenciar em medidas espectrofluorimétricas. Espécies que possuem torção angular ou um maior grau de liberdade emitem menos fluorescência. Um exemplo bem característico deste fenômeno é observado quando se compara a eficiência quântica entre as moléculas do fluoreno e fenil-benzeno; apesar da semelhança estrutural entre elas (Figura 3), o rendimento quântico da molécula do fluoreno é aproximadamente cinco vezes maior que a do fenil-benzeno [58].

Um importante trabalho neste contexto, foi realizado por Nijegorodoy e Downey [60]. Os autores avaliaram o efeito da rigidez estrutural na fluorescência de 23 moléculas orgânicas e a partir dos resultados obtidos demonstraram a

dependência do rendimento quântico de acordo com a rigidez estrutural das moléculas.



Figura 3. Estrutura molecular do fluoreno e fenil-benzeno.

2.2. Quimiometria e calibração multivariada

A quimiometria foi introduzida em 1972 por Kowalski e Bender [61], para descrever o campo da química focado na aplicação da matemática e estatística para interpretação de dados químicos. Entretanto, o uso de métodos quimiométricos tanto na química, como em outras ciências experimentais, alavancou somente após o desenvolvimento do computador e de equipamentos capazes de realizar diversas medidas em uma amostra, simultânea ou seqüencialmente, permitindo assim a aquisição e o tratamento multivariado destes dados [62]. Com isto, métodos de calibração multivariada têm sido cada vez mais utilizados em química analítica, principalmente quando os compostos presentes numa mistura necessitam ser determinados, mas a informação analítica disponível não apresenta seletividade. Isto é, quando em uma mistura não é possível identificar os componentes individuais a partir da resposta instrumental.

A base da calibração multivariada é estabelecer uma relação entre duas matrizes (ou blocos) de dados, quando houver uma dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas. E suas principais vantagens são: permitem determinações simultâneas, ocasionam diminuição de erros devido ao

maior número de variáveis, e possibilitam a análise mesmo sem boa resolução do sinal ou resposta analítica e permite a análise na presença de interferentes mesmo quando o detector não é seletivo.

Muitos métodos de calibração multivariada têm sido descritos na literatura [25,26,63], entretanto, os métodos assim chamados: regressão linear múltipla (MLR), regressão por componentes principais (PCR) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) são os mais empregados [64]. Neste trabalho vamos destacar somente o método de calibração por PLSR, uma vez que, já é bem conhecido na literatura o seu melhor desempenho para dados de espectroscopia, quando comparado a outros métodos de calibração [65,66].

A base fundamental do método por PLSR é baseado na decomposição de uma matriz de dados \mathbf{X} em “scores” (\mathbf{T}) e “loadings” (\mathbf{P}), princípio da análise de componentes principais (PCA) (equação 2).

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP} \quad (\text{Eq. 2})$$

A PCA consiste na manipulação de uma matriz de dados com objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um número menor de “fatores”. Assim, um novo sistema de eixos é construído (denominados rotineiramente de fatores, componentes principais, variáveis latentes ou ainda autovetores) para representar as amostras, no qual a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões [64]. E desta forma, é possível utilizar a análise de componentes principais para simplificar e reduzir a dimensionalidade dos dados, selecionar variáveis e amostras de interesse e detectar amostras anômalas [67].

A redução da dimensionalidade dos dados e sua simplificação são as propriedades mais significativas para os métodos de calibração multivariada. Os

algoritmos mais empregados para esses fins são: o NIPALS (“Nonlinear Interactive Partial Least Squares”) [68] e a decomposição de valor singular (SVD), do inglês “Singular Value Decomposition” [67].

Na PLSR, a decomposição dos dados é feita simultaneamente nas matrizes \mathbf{X} (espectros) chamadas de variáveis dependentes e \mathbf{Y} (concentrações) chamadas de variáveis dependentes e ambas são representadas pela análise de componentes principais (Equações 3 e 4) [68]. Tanto a matriz das variáveis independentes \mathbf{X} , como a das variáveis dependentes \mathbf{Y} são representadas pelos “scores” e “loading”:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP} + \mathbf{E}_x = \sum \mathbf{t}_h \mathbf{p}_h + \mathbf{E}_y \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ} + \mathbf{E}_y = \sum \mathbf{u}_h \mathbf{q}_h + \mathbf{E}_y \quad (\text{Eq. 4})$$

nas quais \mathbf{T} e \mathbf{U} são matrizes de “scores”, \mathbf{P} e \mathbf{Q} são matrizes de “loadings” e \mathbf{E}_x e \mathbf{E}_y são as matrizes de resíduos associados ao modelamento.

Uma relação entre as duas matrizes de dados \mathbf{X} e \mathbf{Y} pode ser construída, correlacionando-se os “scores” de cada bloco:

$$\mathbf{U} = \mathbf{bT} \quad (\text{Eq. 5})$$

e assim, o coeficiente de regressão \mathbf{b} descreve uma função linear entre os dois blocos.

2.2.1. Componentes principais

O número de componentes principais utilizado num modelo é de fundamental importância nos resultados a serem obtidos, e deste modo, uma escolha criteriosa desse valor é necessária. A utilização de um número menor de

variáveis latentes poderá fornecer resultados não satisfatórios, uma vez que toda a informação disponível dos dados originais não está sendo utilizada, e isto pode ocasionar sobreajuste do modelo ou “underfitting” como é designado na língua inglesa. No entanto, no caso de se usar um número de componentes principais superior ao necessário poderá ocasionar problemas de superajuste ou “overfitting” que seria a inclusão de ruídos ao modelo [68]. Para evitar que isto aconteça, deve-se selecionar um número adequado de parâmetros no modelo, como um compromisso entre os erros calculados na calibração (erro padrão de previsão, SEP) e validação.

Existem várias maneiras de se determinar o número ideal de componentes principais [69]. No método por validação cruzada, as mesmas amostras são usadas para modelar e validar o modelo construído. A partir do conjunto de treinamento, usado para a construção do modelo de calibração, são retiradas certas amostras. Um novo modelo é construído com as amostras que sobraram e a seguir, as amostras que foram retiradas são utilizadas para a previsão, sendo calculados os resíduos referentes a esta previsão. O processo é repetido com outros grupos de amostras, até que todas elas tenham sido colocadas fora do modelo de calibração. Após isso, todos os resíduos de previsão são combinados para dar a variância residual da validação. O processo é repetido para modelos com uma, duas e assim por diante, componentes principais. Para cada sistema em estudo, o número mais adequado de componentes principais é aquele que produz o menor valor de PRESS [68,70].

2.2.2. Amostras anômalas “*Outliers*”

Amostras anômalas, em geral, são aquelas consideradas muito diferentes ou que apresentam erros grosseiros quando comparados com a maioria dos dados. Entretanto, é muito comum em trabalho experimental se deparar com situações em

que, ao obter ou analisar um conjunto de dados, deparar-se com um ou mais valores que aparentemente diferem razoavelmente dos outros. Esses valores, muitas vezes, dependendo da amplitude do seu afastamento, podem levar a conclusões errôneas. As suas causas podem ser variadas, como: erros do analista, experimentais, instrumentais ou a presença de compostos químicos de diferentes composições.

A forma mais comum de anomalias corresponde àquelas provenientes das amostras. Uma variável anômala é proveniente de dados de alguma amostra que difere do conjunto total de calibração por causa de ruídos ou porque esta reflete alguma propriedade única (um fenômeno físico ou algum tipo particular de não linearidade). Os elementos anômalos nos dados das matrizes X (variáveis independentes) ou Y (variáveis dependentes) podem representar ruídos [71,72].

Durante as últimas décadas métodos estatísticos têm sido desenvolvidos com o intuito de identificar amostras anômalas. No entanto, tal procedimento deve ser encarado com alguma cautela. Algumas vezes, a presença de amostras diferentes das demais não representa uma anomalia. Esta pode conter, ao invés de erros, informações que não são encontradas nos outros dados e, desta forma, sua presença pode contribuir muito para o desenvolvimento do modelo.

Após a identificação de amostras diferentes do conjunto é importante verificar que tipo de amostra ela representa: uma anomalia ou uma amostra informativa. Através disso pode-se decidir qual procedimento adotar: eliminá-las ou mantê-las no processo. Para esta decisão é importante entender, quando possível, o que significa uma anomalia.

Amostras com alto ou baixo nível de analitos são geralmente amostras muito diferentes do restante do conjunto, ou seja, apresentam *leverage* e/ou resíduos elevados. Porém, em casos onde a resposta instrumental é linear, ou melhor, o modelo de calibração é linear, amostras desse tipo são mais informativas do que propriamente anomalias e devem ser mantidas no modelo de calibração.

Outros tipos de anomalias que afetam o modelo de calibração devem ser eliminados. A identificação do problema pode estar na medida experimental ou instrumental, sendo necessário repetir os procedimentos.

2.2.3. Calibração multivariada: Aspectos gerais sobre o seu emprego

A calibração multivariada consiste em tentar estabelecer uma relação entre dois blocos de informação, o das medidas instrumentais (neste trabalho os espectros de fluorescência obtidos na região do ultravioleta e visível) e o da propriedade calibrada (concentração dos compostos de interesse) [64]. A exemplo do procedimento clássico de calibração (métodos univariados), o desenvolvimento de modelos com calibração multivariada envolve duas etapas: o desenvolvimento (ou calibração) e a validação (previsão). Assim, na fase de calibração um conjunto de padrões deve ser preparado, a partir dos quais medidas instrumentais são obtidas, relacionadas à propriedade de interesse. Em espectrofluorimetria é obtido um espectro no qual se têm diferentes intensidades de fluorescência para cada comprimento de onda (Figura 4).

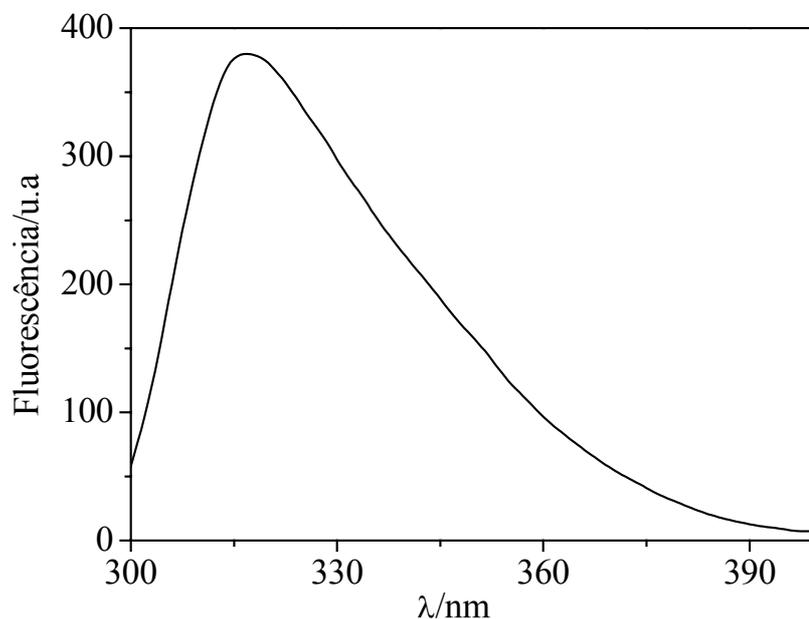


Figura 4. Espectro característico de fluorescência.

Depois de construir o modelo, é necessário validá-lo, avaliando sua capacidade de realizar determinações (capacidade preditiva). Para isso, medidas instrumentais (espectros), cujo valor de referência da propriedade de interesse é conhecido (concentrações dos compostos de interesse), devem ter esses valores determinados com o modelo construído e comparados entre si. Recomenda-se que o conjunto de validação externa seja constituído por amostras cujos espectros não tenham sido usados no conjunto de calibração. No entanto, quando os elementos necessários para construir um conjunto de amostras para a validação externa não estão disponíveis, pode-se realizar uma validação interna [64]. Neste caso, todos os padrões preparados são empregados no cálculo do modelo e são utilizados também como amostras para o teste do modelo construído.

O parâmetro empregado para avaliar a capacidade preditiva dos modelos, através da comparação entre os valores previstos (concentrações dos elementos de

interesse determinadas com o modelo) com os valores de referência é o erro padrão de previsão (SEP), calculado como:

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (C_i - \hat{C}_i)^2}{N}} \quad (\text{Eq. 6})$$

onde C_i é a concentração conhecida do analito, \hat{C}_i é a concentração prevista pelo modelo construído e N é o número de experimentos no conjunto de calibração. O SEP permite estimar o desempenho do modelo e também pode ser usado como uma estimativa do desvio padrão das previsões e é obtido nas unidades utilizadas em determinações [62]. Quando mais de uma propriedade está sendo calibrada, pode-se calcular o SEP para cada uma delas ou apenas um SEP que indicará a capacidade global de previsão do modelo. Isto pode ser representado como o coeficiente de variabilidade (CV), que é independente da unidade utilizada (equação 7) [73].

$$CV = SD_{RES} \frac{100}{\bar{x}} \quad (\text{Eq. 7})$$

onde SD_{RES} é o desvio padrão dos resíduos e \bar{x} é a média das concentrações conhecidas do composto de interesse.

Depois de construídos e otimizados, os modelos desenvolvidos podem ser utilizados para realizar determinações a partir dos espectros de amostras com concentrações desconhecidas, obtidas seguindo os mesmos processos empregados na preparação dos padrões utilizados nas etapas de calibração. Para isso, é necessário, mais uma vez, reuni-los em uma matriz de espectros e submetê-los à determinação das concentrações empregando o modelo construído.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho consistiu no desenvolvimento de métodos analíticos visando obter uma análise rápida, não destrutiva e sem gerar resíduos. Para isto será empregada a espectrofluorimetria, pouco explorada para esta finalidade, mas que possibilita alcançar essas metas. Alguns compostos como AAS, PA e CF, comumente empregados em formulações farmacêuticas, serão utilizados para estes estudos.

Como objetivo específico deste trabalho teve-se o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação individual de AAS e PA em amostras sólidas.

Um segundo enfoque, consistiu no desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação simultânea das misturas (CF e AAS) e (CF e PA) em amostras sólidas, empregando métodos quimiométricos para o tratamento dos dados. O processo multivariado corresponde à regressão de mínimos quadrados parciais na modalidade PLSR-1.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4. Parte experimental

4.1. Reagentes

Os excipientes utilizados, lactose, amido de milho, talco e estearato de magnésio, ácido esteárico, polivinilpirrolidona foram de grau farmacêutico (Galena); já o ácido acetilsalicílico (ACROS), paracetamol (Synth) e cafeína (ACROS) foram de grau analítico. Os excipientes foram utilizados para efetuar as diluições dos compostos estudados de acordo com as concentrações desejadas.

4.2. Espectrofluorímetro

O equipamento utilizado para as medidas fluorimétricas foi um Espectrofluorímetro de Luminescência da Perkin Elmer - Inglaterra (modelo LS 55), equipado com uma lâmpada de excitação de xenônio pulsada (20kw, 8 μ s), um monocromador (Monk-gillieson), uma fotomultiplicadora (Hamamatso), um fotodiodo de referência e um acessório de fibra óptica com uma superfície planar de 4 mm de diâmetro (Figura 5). Além disso, empregou-se como compartimento para colocar a amostra pulverizada uma placa em acrílico com 96 poços, sendo que cada um deles continha 7 mm de diâmetro e 8 mm de profundidade. Para a classificação do tamanho das partículas foram utilizadas peneiras INOX, marca Bronzinox com malhas de 38, 53, 106 e 150 μ m.

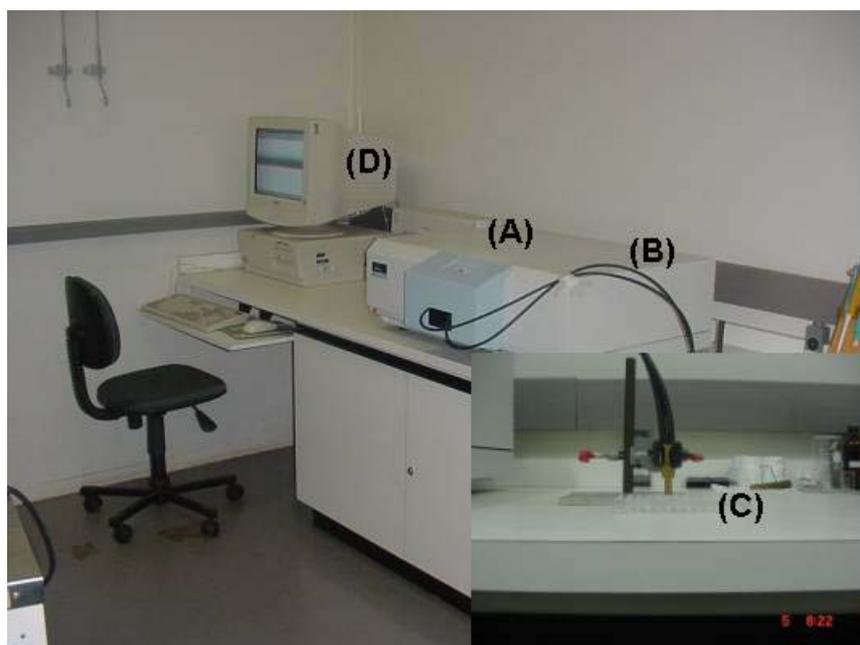


Figura 5. Espectrofluorímetro de luminescência Perkin Elmer (A); Fibra óptica (B); porta amostra (C) e Microcomputador (D).

4.3. Procedimento para a determinação de AAS e PA individuais

As medidas de fluorescência foram realizadas diretamente sobre a amostra pulverizada. Inicialmente, para o AAS, misturas de excipientes contendo lactose, amido de milho, talco e estearato de magnésio (formulação 1) nas proporções 70:15:10:5, 80:10:7:3 e 85:8:5:2 m/m foram preparadas. Para o PA, as misturas de excipientes foram preparadas com lactose, amido de milho, talco, polivinilpirrolidona e ácido esteárico (formulação 2) nas proporções de 70:14:9:4:3, 75:12:8:3:2 e 80:10:7:2:1 m/m. Esses excipientes foram escolhidos por que eles são usualmente empregados em formulações farmacêuticas e as proporções entre eles estão de acordo com os limites estipulados por um handbook [74,75]. Para a preparação dos padrões, os princípios ativos (AAS e PA) foram pesados juntamente com os excipientes (formulações 1 e 2) e pulverizados em um almofariz de ágata

por 30 segundos, totalizando um tempo de aproximadamente 2 minutos para cada amostra, incluindo o tempo de pesagem. A curva analítica foi obtida diluindo AAS na formulação 1 para obter concentrações dentro da faixa de 50 a 170 mg g⁻¹. O mesmo procedimento foi empregado para o PA, entretanto usando a formulação 2 para obter concentrações dentro da faixa de 100 a 400 mg g⁻¹. A quantidade de amostra colocada no porta amostra e a distância da fibra óptica até a amostra para as medidas de AAS e PA foram de 25 mg e 0,9 cm para ambos os métodos, respectivamente. Os parâmetros instrumentais otimizados para ambos os métodos como: voltagem da fotomultiplicadora, aberturas das fendas de excitação e emissão e velocidade de varredura estão descritos na Tabela 1. Estes parâmetros foram otimizados a fim de obter maior sensibilidade. Os máximos de excitação e emissão foram observados a 288 e 318 nm para o AAS e 333 e 382 nm para o PA, respectivamente. Os espectros foram registrados entre 250 a 310 nm (excitação) e 300 a 450 nm (emissão) para o AAS e de 305 a 355 nm (excitação) e 360 a 475 nm (emissão) para o PA. Todas as medidas foram realizadas à temperatura de 25 ± 1 °C.

Tabela 1. Condições instrumentais utilizadas para os métodos desenvolvidos.

	Método AAS	Método PA
Voltagem da fotomultiplicadora (mV)	775	800
Abertura da fenda de excitação (nm)	10	12
Abertura da fenda de emissão (nm)	10	15
Velocidade de varredura (nm min ⁻¹)	500	700

4.4. Procedimento do método oficial (Farmacopéia Britânica) para determinação do PA

Para a realização do experimento, pese e pulverize vinte comprimidos. Adicione 0,15 g de paracetamol pulverizado em 50 mL de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹, em seguida diluir com 100 mL de água, agite por 15 minutos e adicione água o suficiente para produzir 200 mL. Misture, filtre e dilua 10 mL do filtrado para 100 mL com água. Adicione 10 mL da solução resultante em 10 mL de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹, dilua para 100 mL com água e meça a absorvância da solução resultante no comprimento de onda máximo de 257 nm [10]. A curva analítica é preparada com soluções padrões de PA na faixa de concentração de 50 a 120 µmol L⁻¹.

4.5. Amostras

Com o objetivo de verificar o desempenho dos métodos desenvolvidos (para AAS e PA), amostras simuladas de medicamentos contendo as mesmas proporções entre os excipientes e fármaco foram empregadas. As amostras produzidas foram estocadas em frascos de vidro âmbar e posteriormente utilizadas para efetuar a determinação.

4.6. Procedimento para a determinação das misturas (CF e AAS) e (CF e PA)

Os excipientes utilizados na preparação das formulações para as misturas (CF e AAS) e (CF e PA) foram os mesmos empregados nas formulações para o AAS e PA como foi descrito na seção 4.3.

Para a construção do modelo da mistura CF e AAS foram utilizadas duas proporções de excipientes, 70:15:10:5 e 80:10:7:3 m/m. Os padrões foram preparados em concentrações que variaram de 5 a 20 mg g⁻¹ para a CF e 50 a 170 mg g⁻¹ para o AAS; também foram utilizadas diferentes proporções de CF e AAS (9:1, 10:1 e 11:1), uma vez que em comprimidos comerciais a proporção é de aproximadamente 10:1. Este procedimento foi adotado objetivando melhorar a robustez do modelo construído, e assim, minimizar erros de previsão no caso de haver pequenas variações na proporção de excipientes ou princípios ativos.

Para a mistura de CF e PA as proporções dos excipientes utilizados foram 70:14:9:4:3 e 75:12:8:3:2 m/m. As concentrações dos padrões variaram entre 10 e 65 mg g⁻¹ para a CF e 100 e 400 mg g⁻¹ para o PA. Pelo mesmo motivo relatado acima para a mistura CF e AAS, as proporções dos princípios ativos utilizadas foram 7:1, 8:1 e 9:1, sendo que em comprimidos comerciais a proporção comumente utilizada é de 8:1.

As condições instrumentais para ambas as misturas foram as mesmas utilizadas para os métodos univariados, como foi descrito na Tabela 1, assim como, a quantidade de amostra colocada no porta amostra e a distância da fibra óptica até a amostra. Para a mistura CF e AAS a faixa espectral utilizada na construção do modelo foi obtida entre 310 e 375 nm, mantendo o comprimento de onda de excitação em 275 nm. Já para a mistura CF e PA a faixa espectral empregada foi de 350 a 420 nm com excitação em 324 nm.

4.7. Fluorescência resolvida no tempo e a análise de distribuição de tempos de vida de fluorescência pelo Método de Marquardt (MM)

As medidas de tempo de decaimento de fluorescência (τ_F) foram obtidas em um espectrofluorímetro FL 900 (Edinburgh Analytical Instruments, Edinburgh

UK) usando o método de contagem de um único fóton correlacionado no tempo (*single-photon counting, SPC*). A excitação da amostra foi realizada por uma lâmpada de hidrogênio pulsada nF 900 operando com uma velocidade de frequência de repetição de 40 kHz. Para a realização das medidas, amostras em forma de pastilhas foram preparadas pela compressão do PA sólido (41 MPa de pressão). Estas pastilhas foram fixadas sobre a face de uma cubeta de quartzo e em seguida as medidas foram realizadas em comprimentos de onda de excitação a 333 nm e emissão a 382 nm, sendo as medidas realizadas à temperatura ambiente.

O decaimento observado da intensidade de fluorescência $R(t)$ são dadas pela deconvolução integral [76].

$$R(t) = \int_0^t F(t-t')L(t')dt \quad (\text{Eq. 8})$$

Na qual $L(t')$ é o tempo de distribuição do pulso da lâmpada; $F(t')$ é a função da resposta correspondendo para um pulso de excitação da lâmpada infinitamente pequeno; t é o tempo de decaimento da amostra e t' é o tempo de decaimento da amostra padrão (solução de LUDOX).

$L(t')$ foi medido usando uma solução LUDOX (DuPont) para experimentos de decaimento de fluorescência espaçado no tempo. Os resultados foram analisados pelo método de séries exponenciais (MSE), o qual assume que o decaimento de fluorescência pode ser analisado como uma função exponencial múltipla, onde o melhor ajuste usa o algoritmo de Marquardt para minimizar o χ^2 (soma do quadrado da diferença entre os dados experimentais e a função de modelamento multiplicada pelo fator peso) [76]. Um bom ajuste é obtido quando χ^2 aproxima-se de 1 e uma distribuição residual ocasional é observada.

4.8. Calibração multivariada e programa computacional

Os modelos construídos para CF e AAS foram desenvolvidos a partir de 83 amostras preparadas no laboratório, escolhidas de um conjunto de 108 amostras, sendo as 25 restantes reservadas para a etapa de validação. Para a mistura de CF e PA foram utilizadas 96 amostras para a calibração, escolhidas de um conjunto de 121 e o restante (25 amostras) foram reservadas para a validação externa.

O tratamento dos dados foi feito por métodos estatísticos multivariados utilizando o “software” Pirouette (versão 3.02, Infometrix Inc). Para ambas as misturas descritas acima, a metodologia de calibração multivariada foi conduzida essencialmente via processos de regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR), o qual foi aplicado através da forma PLSR-1.

4.9. Amostras

Com o objetivo de verificar o desempenho dos modelos construídos para a determinação simultânea de (AAS e CF) e (PA e CF), amostras simuladas de medicamentos contendo as mesmas proporções entre os excipientes foram empregados. As amostras produzidas foram estocadas em frascos de vidro âmbar e posteriormente utilizadas para efetuar a determinação.

5. DETERMINAÇÃO DE AAS E PA EM MATRIZ SÓLIDA POR SISTEMA UNIVARIADO

5.1. Determinação de AAS em matriz sólida

Para obter um máximo de sensibilidade, primeiramente foram otimizadas as condições instrumentais, como abertura das fendas de excitação e emissão, voltagem da fotomultiplicadora e velocidade de varredura. As condições adequadas estão apresentadas na Tabela 1 (parte experimental, item 4.3)

A Figura 6 mostra os espectros de excitação (1) e emissão (2) do AAS misturado nos excipientes, e seus correspondentes espectros do branco (3 e 4) obtidos diretamente sobre a mistura pulverizada colocada no porta amostra. Os máximos de excitação e emissão foram observados em 288 e 318 nm, respectivamente.

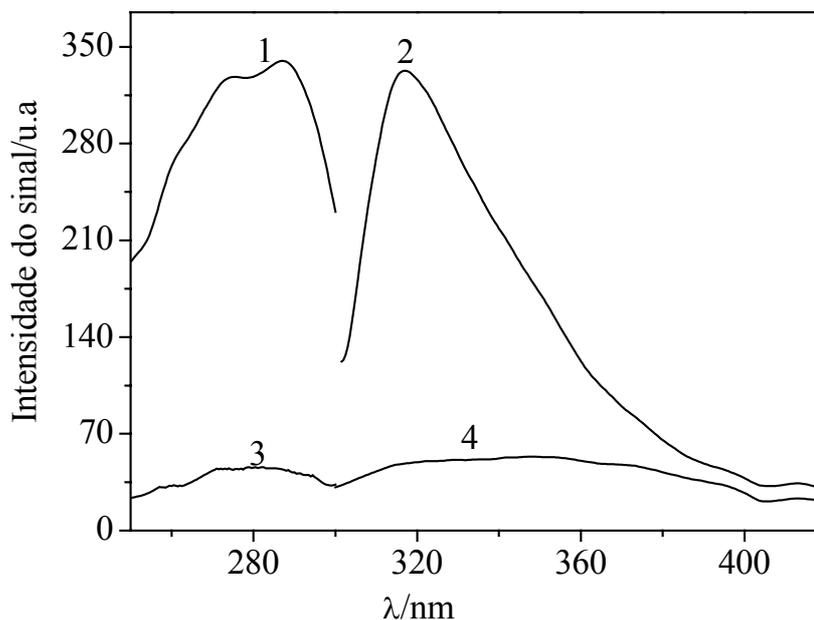


Figura 6. Espectros de excitação (1) e emissão (2) do AAS e seus correspondentes espectros dos excipientes (3 e 4) em fase sólida. Proporção dos excipientes = 80:10:7:3 m/m; Concentração do AAS = 80 mg g⁻¹.

5.1.1. Efeito do tamanho das partículas na fluorescência

Erros provenientes do tamanho de partículas são frequentemente encontrados em se tratando de amostras sólidas, entretanto, estudos correlatos têm sido feitos preferencialmente por meio de técnicas como a espectrometria atômica [77].

Neste trabalho, foi realizado um estudo a fim de avaliar o efeito do diâmetro das partículas (DP) na intensidade do sinal de fluorescência do AAS. Como foi descrito na parte experimental (item 4.2) as peneiras utilizadas para classificar os DP foram de 38, 53, 106 e 150 μm . A Tabela 2 mostra os resultados obtidos e como pode ser observado, para partículas com diâmetros entre 38 e 106 μm o sinal de fluorescência permanece praticamente constante. Entretanto, para diâmetros de partículas inferiores a 38 μm houve um decréscimo do sinal. Isto provavelmente ocorreu devido à dificuldade em homogeneizar a mistura em decorrência do aspecto agregante, observado quando as partículas são muito pequenas.

Tabela 2. Estudos do efeito do tamanho das partículas na intensidade de fluorescência do AAS; DP = Diâmetro das partículas, Concentração de AAS = 100 mg g^{-1} .

DP/ μm	Fluorescência/u.a
< 38	404 \pm 8
38-53	449 \pm 6
53-106	445 \pm 7

5.1.2. Otimização dos parâmetros que influenciam na fluorescência do AAS

Um outro parâmetro que freqüentemente influencia em análises de amostras sólidas, é ocasionado pela distribuição heterogênea do elemento de interesse (AAS) com os excipientes. Os problemas de homogeneidade são observados normalmente no caso onde as concentrações estão abaixo de 100 mg g^{-1} , principalmente para diâmetros de partículas inferiores a $38 \mu\text{m}$. Deste modo, a fim de contornar esse problema inerente a este sistema, foram realizados estudos objetivando conseguir uma condição ótima de análise. Para isto, foi preparado uma amostra contendo os excipientes com o AAS na concentração de 100 mg g^{-1} , sem classificar o tamanho das partículas. Esta mistura foi transferida para um almofariz de ágata, e logo em seguida foi realizada uma mistura com uma espátula, a qual foi considerada como sendo o tempo zero. Posteriormente, a mistura foi conduzida por maceração usando um pistilo, e todas as medidas foram obtidas em triplicata.

O gráfico da Figura 7 mostra os resultados obtidos do tempo de mistura da amostra em função do sinal de fluorescência do AAS. No tempo zero, um desvio relativamente elevado entre as triplicatas foi observado, quando comparado com os outros pontos. Isto indica que existe problema de mistura entre os excipientes e AAS. A partir de 5 s de maceração, o desvio entre as triplicatas permanece praticamente constante, entretanto, um aumento do sinal de fluorescência é observado. Isto indica que, possivelmente deve existir alguma interação intrínseca entre os excipientes e AAS que necessita de um determinado tempo de mistura para atingir a estabilidade do sinal. Como pode ser observado, a partir de 15 segundos de mistura, o sinal tende a se manter constante.

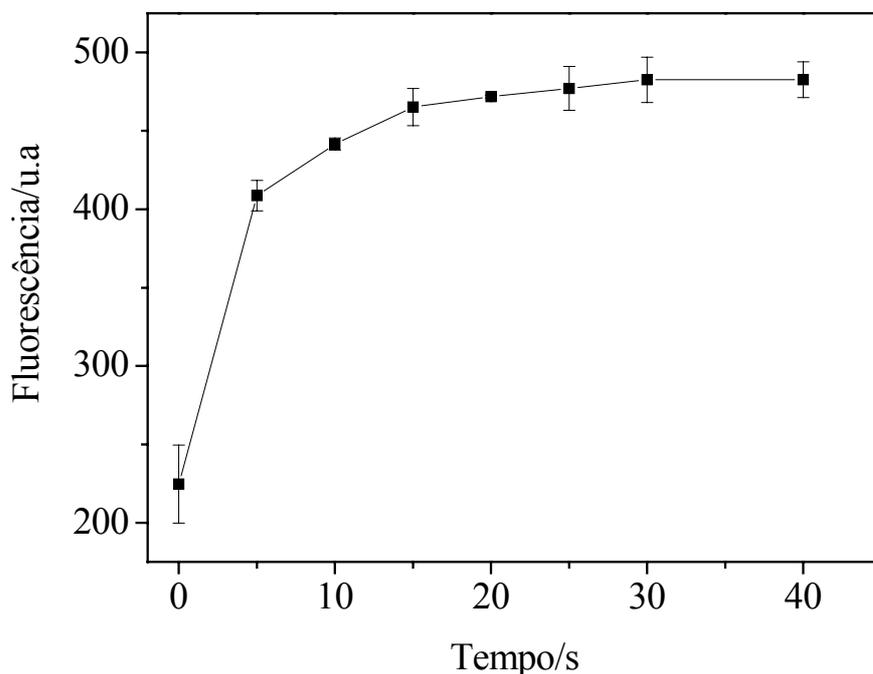


Figura 7. Efeito do tempo de homogeneização da amostra no sinal de fluorescência para o AAS, concentração 100 mg g^{-1} .

5.1.3. Parâmetros otimizados

Um importante parâmetro que deve ser levado em consideração no uso de fibras ópticas é o ângulo de luz para a refletância interna total da fibra e o *ângulo de aceitação*. A capacidade de uma fibra óptica captar luz está interligada a este ângulo, deste modo foi necessário otimizar a distância entre a fibra óptica e a amostra. A Figura 8 mostra que a melhor sensibilidade é obtida mantendo a distância entre 0,8 e 1,0 cm.

A influência da quantidade de amostra adicionada no porta amostra também foi um parâmetro relevante. Dependendo deste valor, uma variação na intensidade de fluorescência pode ocorrer devido a eventuais espalhamentos

provocados pela radiação que cruza a amostra; além disso, o número de moléculas pode não ser suficiente para interagir com a radiação incidente. Para quantidades de amostras maiores do que 10 mg, a intensidade de fluorescência permaneceu constante independente da quantidade de amostra, sendo a distância entre a fibra óptica e a amostra foi mantida entre 0,8 e 1,0 cm (Figura 9).

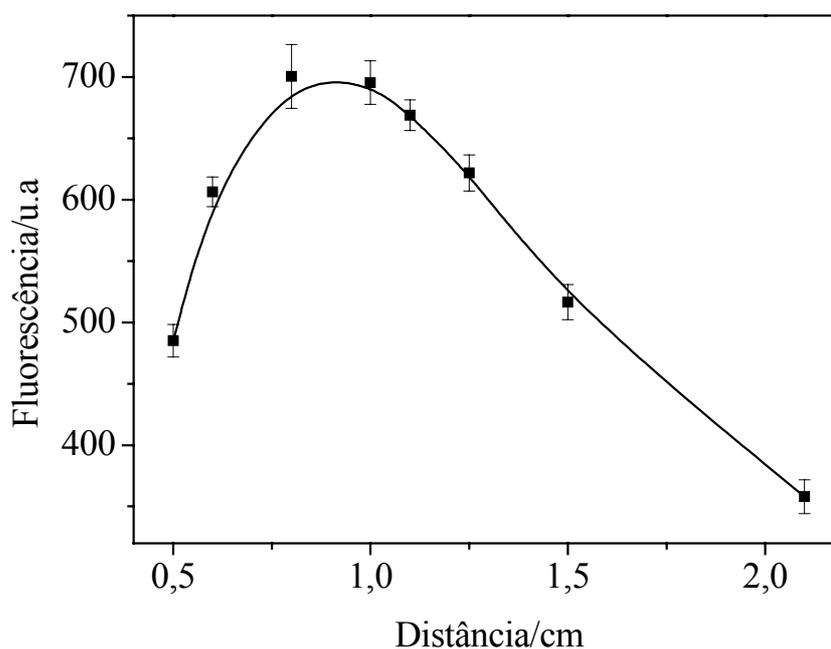


Figura 8. Otimização da distância da fibra óptica até a amostra. Concentração de AAS 100 mg g^{-1} .

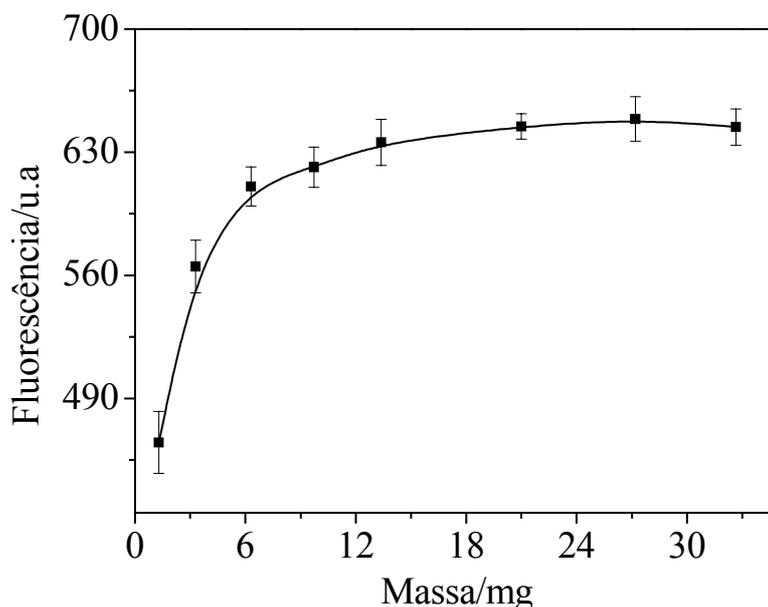


Figure 9. Efeito da quantidade de amostra no porta amostra. Concentração de AAS 100 mg g^{-1} .

5.1.4. Influência dos excipientes

A influência das substâncias empregadas como excipientes no preparo de comprimidos de AAS (lactose, amido de milho, talco e estearato de magnésio) foi avaliada individualmente. Para este estudo, misturas de cada excipiente com AAS foram preparadas como descrito na seção experimental. A mistura de AAS com estearato de magnésio apresentou menor razão sinal/concentração (I/C) como pode ser observado na Tabela 3. Estes dados revelam que o método proposto é dependente da quantidade e tipo de excipientes usados como constituintes dos medicamentos. O efeito de cada excipiente na fluorescência do AAS possivelmente ocorre devido a uma competição entre processos de desativação resultado da interação específica entre o fluoróforo (AAS) e os excipientes presentes na

amostra. Deste modo, é importante ter prévio conhecimento da composição da amostra antes da etapa de calibração.

Tabela 3. Efeito dos compostos usados como excipientes. I = intensidade de fluorescência numa unidade arbitrária, C = concentração de AAS em mg g^{-1} .

Compostos	C	I	I/C
Estearato de magnésio	100	172	1,7
Talco	99	462	4,7
Amido de milho	100	614	6,1
Lactose	100	1106	11,0

5.1.5. Parâmetros analíticos

Para obter a faixa de linearidade do método foram realizadas medidas de concentrações que variaram de 10 até 260 mg g^{-1} de AAS em misturas de excipientes como descrito na seção experimental. A partir desses resultados, foi escolhido a faixa linear para a construção da curva analítica.

Nas condições otimizadas, a intensidade de fluorescência do AAS foi linear dentro da faixa de 50 a 170 mg g^{-1} . A curva analítica foi descrita pela equação $y = 264 (\pm 8) + 2,33 (\pm 0,07) x$, com um coeficiente de correlação de $r = 0,9976$ para $n = 7$; na qual: x é a concentração de AAS expresso como mg g^{-1} ; y é a intensidade de emissão, em unidade arbitrária para a proporção de 70:15:10:5 (m/m). Para as proporções 80:10:7:3 e 85:8:5:2 (m/m), as equações ajustadas foram $y = 277 \pm 7 + 2,01 (\pm 0,06) x$, com $r = 0,9977$ para $n = 7$ e $y = 239 (\pm 8) + 2,55 (\pm 0,07) x$, com $r = 0,9982$ para $n = 7$, respectivamente. A Figura 10 mostra a curva analítica para a proporção 85:8:5:2 m/m. Um fato interessante, e que chama atenção nesta curva

analítica, assim como para as outras duas equações, é o elevado valor do coeficiente linear, uma vez que, seria esperado que ele passasse pela origem ou pelo menos próximo a ela. Possivelmente, deve haver faixas lineares mais sensíveis para concentrações muito baixas, entretanto, em virtude da dificuldade em homogeneizar a amostra nessas concentrações não foi possível confirmar experimentalmente.

Observando as equações ajustadas acima descritas, para as diferentes proporções de excipientes é claramente observado que é necessário calibrar o método para cada processo de produção, usando a mesma proporção de excipientes envolvida. Entretanto, pequenas variações nas proporções como 78:11:8:3, 80:10:7:3 e 82:9:7:2 foram realizadas e os resultados demonstraram boa robustez do método, com desvio padrão relativo de 2,3% para $n = 6$. As médias dos limites de detecção e quantificação foram 2,2 e 7,3 mg g^{-1} , respectivamente, usando o critério 3 s/m e 10 s/m, onde s = estimativa do desvio padrão (10 medidas sucessivas) referentes à prova em branco, m = coeficiente angular da equação da curva analítica [78]. O espectro de fluorescência foi registrado em 18 s, conduzindo para uma possível frequência analítica de 200 amostras por hora, considerando um sistema automatizado ou que as amostras estejam prontas para serem analisadas.

O desvio padrão relativo dos resultados obtidos após dez análises sucessivas de uma amostra típica com aproximadamente 100 mg g^{-1} de AAS foi estimada em 2,4%, realçando a boa precisão associada com o procedimento proposto.

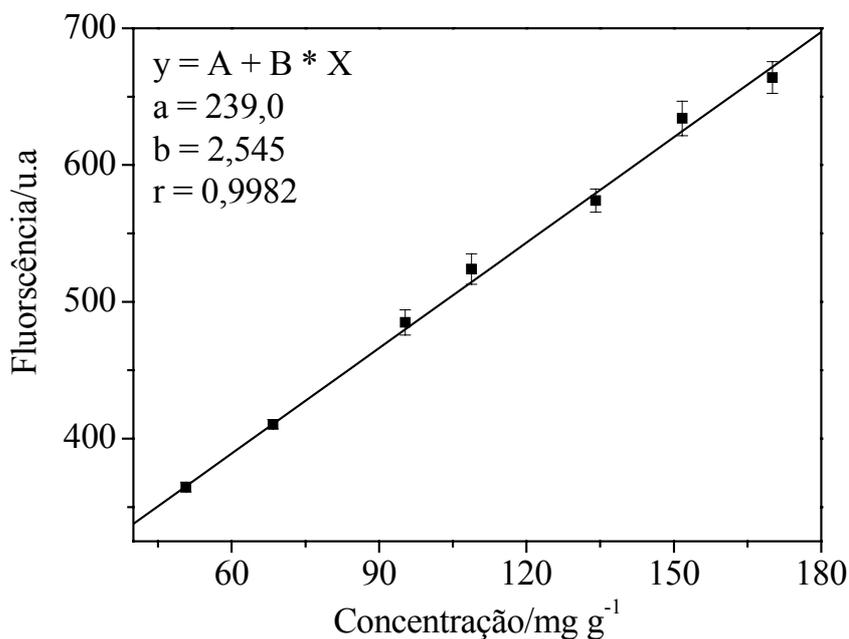


Figura 10. Curva analítica obtida para a determinação do AAS na proporção 80:10:7:3 de excipientes.

Embora as concentrações de AAS (Tabela 4) nas amostras farmacêuticas testadas tenham sido maiores do que a faixa linear otimizada, o método pode ser aplicado sem diluir a amostra usando quantidades menores de amostras e/ou modificando a distância entre a fibra óptica e a amostra, ou ainda diminuindo a intensidade de radiação incidente. Esta potencialidade do método facilita no controle da amostra, o qual permite a determinação direta na linha de produção.

5.1.6. Comparação de métodos

A concentração de AAS foi determinada para amostras farmacêuticas de 500 mg (nominal) com lactose, amido de milho, talco e estearato de magnésio

como excipientes. O método de referência empregado foi o titulométrico descrito na Farmacopéia Britânica [10] e as determinações foram realizadas usando diferentes proporções de excipientes (70:15:10:5, 80:10:7:3 e 85:8:5:2 m/m). Para isto, concentrações do AAS dentro da faixa linear foram conseguidas efetuando diluições com os excipientes. O teste *F* foi aplicado para verificar as precisões entre os dois conjuntos de dados e não foram encontradas diferenças significativas para 2 graus de liberdade. Deste modo, o teste *t* de *Student* pareado foi aplicado para comparar as médias entre ambos os métodos e não foram encontradas diferenças estatísticas em nível de 95% de confiança (Tabela 4) [79].

Tabela 4. Quantidade de AAS (mg) determinado em formulações farmacêuticas pelo método proposto (fluorimétrico) e oficial (Farmacopéia Britânica). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Amostra	Nominal	Fluorimétrico	Farmacopéia Britânica
1 ^a	500	498 ± 4	492 ± 2
2 ^a	500	496 ± 6	499 ± 4
3 ^a	500	497 ± 7	500 ± 5
4 ^b	500	495 ± 7	493 ± 4
5 ^b	500	494 ± 6	495 ± 2
6 ^b	500	498 ± 7	502 ± 4
7 ^c	500	495 ± 6	488 ± 3
8 ^c	500	500 ± 5	494 ± 3
9 ^c	500	497 ± 7	501 ± 4

^a = Proporção 1, ^b = Proporção 2 ^c = Proporção 3

5.2. Determinação de PA em matriz sólida

Para a determinação fluorimétrica do PA (Figura 11) em meio aquoso, o analito é usualmente oxidado em condições ligeiramente alcalinas com hexacianoferrato (III), e assim, produz uma substância fluorescente [80]. Este procedimento é feito porque, a partir de experimentos realizados no laboratório e também depois de uma minuciosa revisão na literatura, foi possível observar que o PA não emite fluorescência naturalmente em meio aquoso. No entanto, foi observado a fluorescência do PA no estado sólido, isto provavelmente se deve ao fato do ambiente proporcionar a rigidez da molécula, fenômeno este, que já é bem conhecido na literatura [58]. A Figura 11 mostra a estrutura do PA, e quando esta molécula se encontra em meio aquoso, o grupamento amida possui livre rotação na ligação que o nitrogênio faz com o carbono do anel aromático, e assim, este comportamento provavelmente poderia estar conduzindo a uma desativação da fluorescência desta molécula.

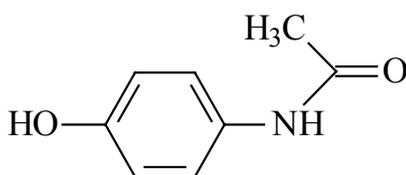


Figura. 11. Estrutura molecular do paracetamol.

5.2.1. Fluorescência do Paracetamol

Tendo em vista o aspecto pioneiro, foi importante confirmar experimentalmente se a banda observada é referente à fluorescência do PA no estado sólido ou somente um fenômeno de espalhamento. Uma forma simples de

confirmar a existência de fluorescência é obter espectros característicos (“emissão”) da amostra através da variação do comprimento de onda de excitação. No caso de espalhamento de luz, um deslocamento das bandas (espectros) para cada comprimento de onda de excitação é observado [59]. Deste modo, experimentos foram realizados a fim de comprovar a fluorescência do PA na fase sólida. Através da Figura 12 (espectros 2) pode-se observar que para os espectros obtidos em diferentes comprimentos de ondas de excitação não foi observado deslocamento das bandas, ao contrário do que é usualmente observado para espalhamento de luz. Isto indica que estes espectros sejam realmente de emissão proveniente do PA. Adicionalmente, a curva inserida na Figura 12 ilustra que a excitação com menor absorção de radiação produz espectro de “emissão” com menor intensidade.

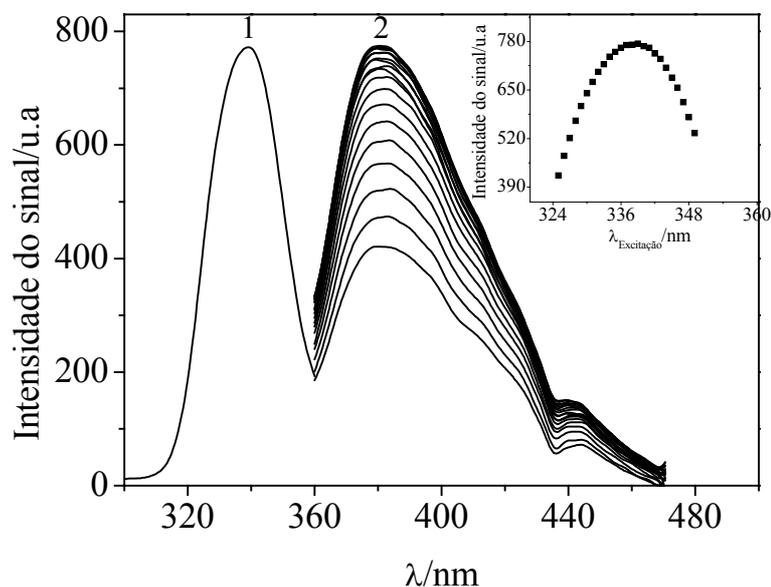


Figura 12. Espectros de excitação (1) e emissão (2) do PA. Os espectros de emissão foram obtidos fixando comprimentos de onda de excitação entre 325 e 349 nm com incremento de 1 nm. Gráfico inserido: dependência da intensidade de emissão com o comprimento de onda de excitação. Concentração 250 mg g⁻¹.

Com o objetivo de realmente confirmar a fluorescência do PA no estado sólido, realizou-se um estudo do decaimento de emissão (Figura 13) deste usando a técnica de fluorescência de contagem única de fóton resolvida no tempo (SPCTR). Um decaimento monoexponencial foi observado, com tempo de vida $\tau_F = 1,77 \pm 0,01$ ns, $\chi^2 = 1,093$. Os espectros estacionário e dinâmico de emissão indicam claramente que o PA no estado sólido realmente exibe fluorescência. E assim, este sinal de emissão pode ser usado para a determinação do PA.

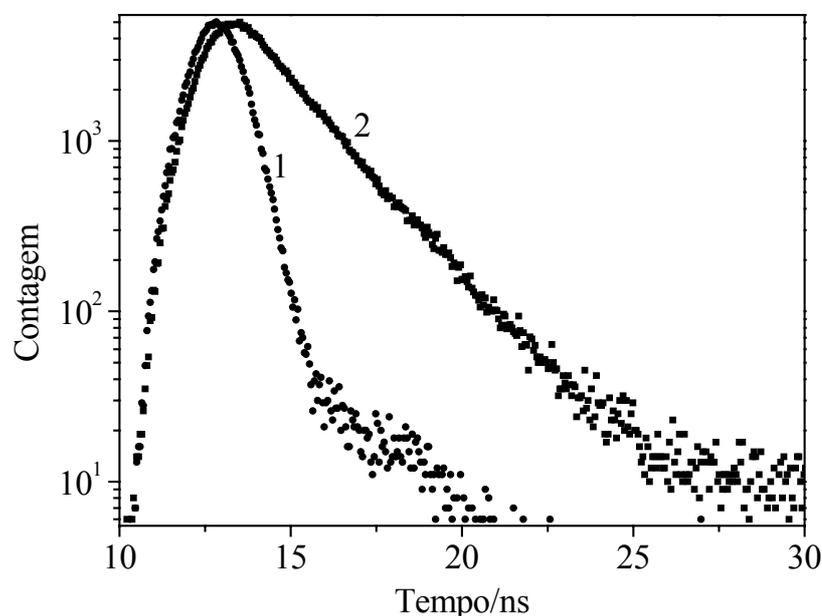


Figura. 13. Decaimento de fluorescência para o PA obtido a $\lambda_{ex} = 333$ nm e $\lambda_{em} = 382$ nm; espectro 1 é a função de resposta do instrumento da solução LUDOX e o espectro 2 é o decaimento da amostra, ambos obtidos a 298 K no estado sólido.

Deste modo, um método para a determinação de PA por espectroscopia de fluorescência em amostra sólida foi desenvolvido. A Figura 14 mostra os espectros de excitação (1) e emissão (2) com os máximos registrados em 333 e 382 nm, respectivamente, e seus respectivos espectros do branco (3 e 4).

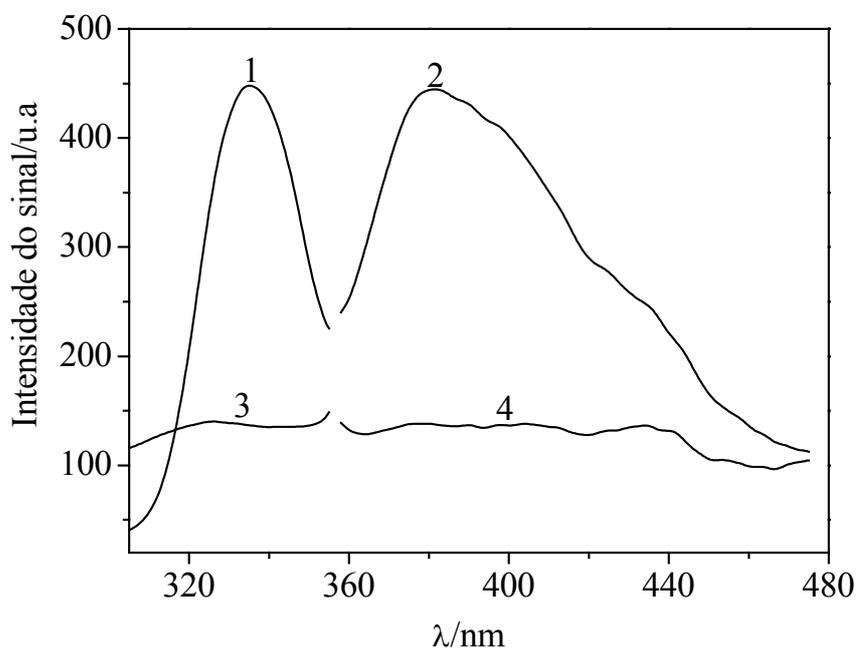


Figura 14. Espectros de excitação (1) e emissão (2) do PA e seus correspondentes espectros do branco (3 e 4) em fase sólida. Proporção dos excipientes = 70:14:9:4:3 m/m; Concentração do PA = 250 mg g⁻¹.

5.2.2. Efeito do tamanho das partículas e homogeneização na fluorescência do PA

Os estudos referentes ao efeito do tamanho das partículas na fluorescência do PA foram realizados seguindo o mesmo procedimento empregado para o AAS descrito no item 5.1.1. Como é mostrado na Tabela 5, um aumento expressivo do sinal foi observado para amostras com diâmetros de 38-53 para 53-106 μm, e para diâmetros inferiores o sinal de fluorescência apresentou menor intensidade. Este comportamento mostrou-se muito diferente em relação ao observado para o AAS (Tab. 2). Isto indica que a fluorescência está intimamente ligada não somente ao

tamanho das partículas, mas também ao fluoróforo, uma vez que diferentes interações com os excipientes podem ocorrer.

Tabela 5. Estudos do efeito do tamanho das partículas na intensidade de fluorescência do PA; DP = Diâmetro das partículas; Concentração do PA = 200 mg g⁻¹.

DP/(μm)	Fluorescência/(u.a)
< 38	212 \pm 6
38-53	241 \pm 4
53-106	336 \pm 11

Também foi realizado um estudo para avaliar o comportamento da fluorescência do PA em função do tempo de homogeneização com os excipientes. Para isto, foi preparado uma amostra contendo os excipientes com PA na concentração de 200 mg g⁻¹ sem realizar classificação do tamanho das partículas. O procedimento foi o mesmo empregado no item 5.1.2. Como é observado na Figura 15, no tempo zero, um desvio relativamente elevado entre as triplicatas foi observado, quando comparado com os outros pontos. Isto indica que existe problema de mistura entre os excipientes e PA. A partir de 5 s de maceração, o desvio entre as triplicatas permanece praticamente constante, e um decréscimo do sinal de fluorescência é observado; e a partir de 25 segundos o sinal permanece estável. Este comportamento indica que possivelmente a homogeneização não seja proveniente somente da mistura superficial entre o PA e os excipientes. Provavelmente, deve existir alguma interação intramolecular entre os excipientes e o PA que também necessite de um determinado tempo de mistura para atingir a estabilidade do sinal.

Um fato que chamou a atenção foi a diminuição do sinal de fluorescência com o aumento do tempo de maceração, contrário ao observado para o AAS (Figura 7) onde houve aumento do sinal. Como foi mostrado na Tabela 5, para tamanho de partículas maiores, o sinal de fluorescência tende a aumentar de forma significativa. Deste modo, quanto maior o tempo de maceração um decréscimo do tamanho das partículas vai ocorrer, e assim, justifica o porque da redução do sinal de fluorescência em função do tempo de maceração.

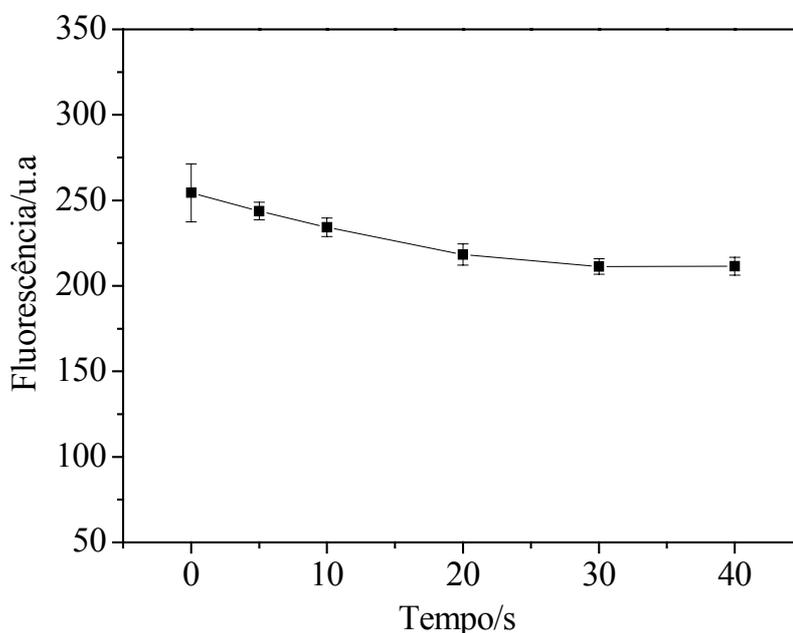


Figura 15. Efeito do tempo de homogeneização da amostra no sinal de fluorescência para o PA, concentração 250 mg g^{-1} .

5.2.3. Parâmetros otimizados

Da mesma forma como foi descrito no item 5.1.3 no método desenvolvido para o AAS, estudos para avaliar o efeito da distância da fibra óptica até a amostra

e da quantidade de amostra também foram realizados para o PA. Como é mostrado na Figura 16A, para quantidades maiores do que 15 mg de amostra colocada no porta amostra não ocorre variação do sinal de fluorescência, e a melhor sensibilidade foi obtida a uma distância de 0,7 e 0,9 cm da fibra óptica até a amostra (Figura 16B).

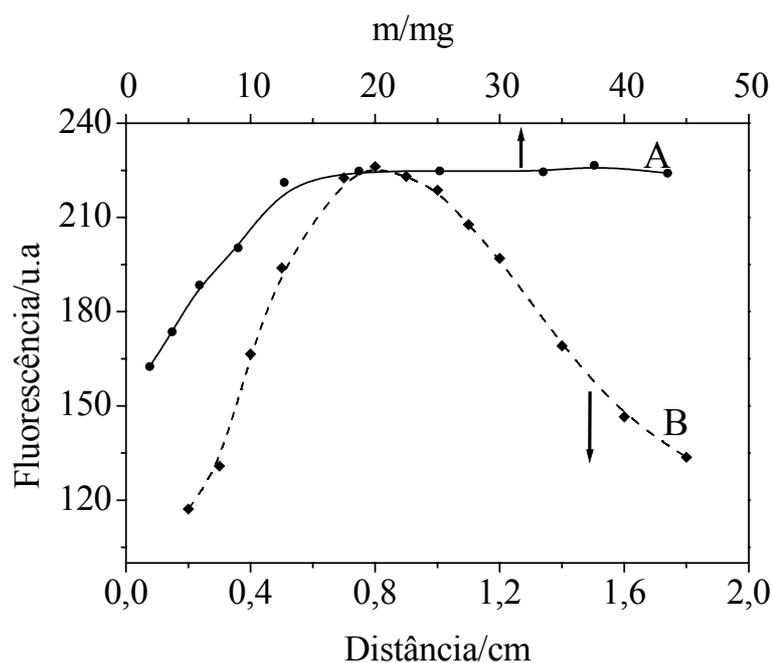


Figura 16. Efeitos da quantidade de amostra (A) e da distância entre a fibra óptica e amostra (B). Concentração de PA = 250 mg g⁻¹.

5.2.4. Efeito dos excipientes

O efeito das espécies químicas, lactose, amido de milho, talco, polivinilpirrolidona e ácido esteárico na intensidade de fluorescência do PA foram avaliadas individualmente. O procedimento adotado foi o mesmo empregado para o AAS, como descrito na seção experimental. A menor relação sinal/concentração

(I/C) foi observada para a mistura PA e polivinilpirrolidona e a maior foi obtida para a mistura PA e ácido esteárico, como pode ser observado na Tabela 6. A maior fluorescência do PA na mistura com ácido esteárico possivelmente ocorre devido a maior rigidez estrutural, uma vez que, o PA apresenta característica básica e assim maior interação deve ocorrer com o ácido esteárico. Estes resultados revelam que este método é dependente da quantidade e dos tipos de excipientes usados como constituintes do medicamento, assim como foi observado para o método do AAS desenvolvido anteriormente.

Tabela 6. Efeito de cada um dos compostos usados como excipientes na formulação. I = intensidade de fluorescência numa unidade arbitrária, C = concentração do paracetamol em mg g^{-1} .

Compostos	C	I	I/C
Lactose	250	312	1,3
Amido de milho	251	106	0,4
Talco	252	194	0,8
Polivinilpirrolidona	253	45	0,2
Ácido esteárico	249	463	1,9

5.2.5. Parâmetros analíticos

O método de calibração foi realizado para uma quantidade de 25 mg de amostra, colocada no porta amostra. A faixa linear foi obtida variando as concentrações de PA de 35 a 600 mg g^{-1} . Uma boa resposta linear foi encontrada entre 100 e 500 mg g^{-1} de PA, entretanto decidiu-se trabalhar numa faixa de 100 a 400 mg g^{-1} , devido algumas propriedades intrínsecas do PA que dificulta a sua

manipulação em almofariz para concentrações acima deste valor. No entanto, é importante salientar que o emprego de um sistema mecânico poderia resolver este problema. A Figura 17 mostra a curva analítica obtida para a mistura de excipientes 70:14:9:4:3 m/m (proporção I), e uma boa resposta linear ($r = 0,9950$; $n=7$) foi obtida. A equação ajustada foi $y = 32 (\pm 7) + 0,99 (\pm 0,03) x$, a qual x é igual a concentração do PA e y a intensidade de fluorescência em unidade arbitrária. Para as outras duas proporções investigadas, 75:12:8:3:2 (II) e 80:10:7:2:1 (III) m/m, as equações foram:

$$\text{II: } y = 46 (\pm 9) + 0,90 (\pm 0,03) x \quad (r = 0,9981, n = 7) \text{ e;} \quad (\text{Eq. 9})$$

$$\text{III: } y = 41 (\pm 10) + 0,97 (\pm 0,04) x \quad (r = 0,9985, n = 7) \quad (\text{Eq. 10})$$

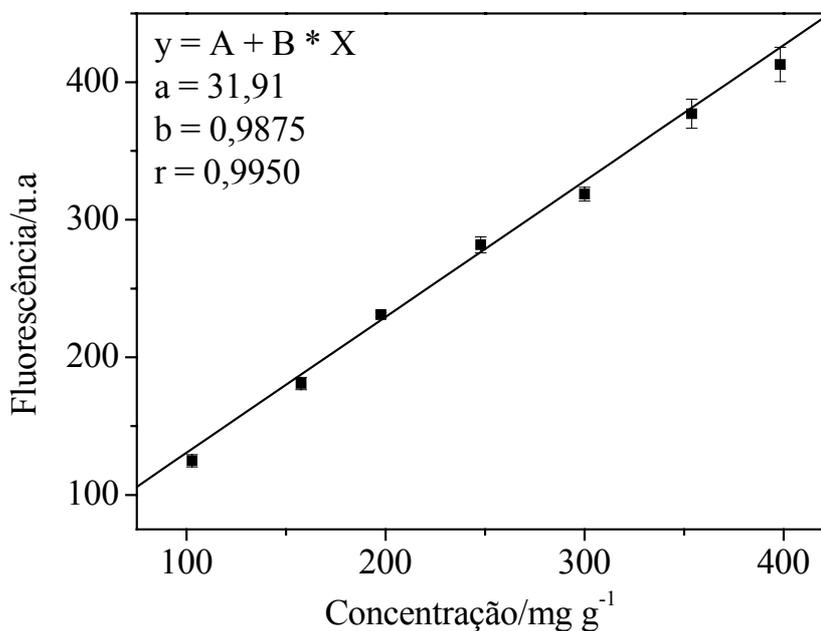


Figura 17. Curva analítica obtida para a determinação do PA na proporção 70:14:9:4:3 m/m de excipientes.

As equações relatadas para as diferentes proporções de excipientes, sugerem da mesma forma como foi observado para o método do AAS descrito na seção 5, que é necessário calibrar o método para cada processo de produção. E apesar do coeficiente linear observado neste método ser bem menor do que os obtidos para o método desenvolvido para o AAS (item 5.1.5), possivelmente, do mesmo modo, deve haver faixas lineares para concentrações muito menores às usadas na curva analítica.

5.2.6. Característica do método

O método proposto foi avaliado em relação a precisão dos resultados, limites de detecção e quantificação, e frequência analítica.

A precisão foi avaliada realizando sucessivas determinações de uma amostra típica de concentração 250 mg g⁻¹ de PA. O desvio padrão relativo foi menor do que 2,4% para todas as proporções dos excipientes, destacando a boa repetibilidade inerente para o método proposto.

Os limites de detecção e quantificação foram estimados de acordo com o critério 3 s/m e 10 s/m [78]. Os valores para as três proporções de excipientes estudadas foram 13,0 e 43,6 mg g⁻¹ (proporção I), 14,2 e 47,4 mg g⁻¹, (proporção II), e 16,7 e 55,7 mg g⁻¹ (proporção III).

Para este procedimento, a velocidade de varredura foi superior ao método descrito anteriormente para o AAS, como pode ser observado na seção experimental. Isto possibilitou que os espectros de fluorescência fossem registrados num tempo de 10 s, conduzindo a uma possível frequência analítica de aproximadamente 300 amostras por hora.

5.2.7. Aplicações em amostras

A aplicabilidade do método desenvolvido foi demonstrada determinando PA em seis amostras contendo lactose, amido de milho, talco, polivinilpirrolidona e ácido esteárico como excipientes nas proporções de 70:14:9:4:3 (I) 75:12:8:3:2 (II) e 80:10:7:2:1 (III) m/m, respectivamente. Os resultados são mostrados na Tabela 7, juntamente com os valores obtidos com o procedimento descrito na Farmacopéia Britânica, que recomenda o método espectrofotométrico [10] para a determinação do PA em comprimidos. Como já descrito no item 5.1.6, o teste *F* foi aplicado para verificar as precisões entre os dois conjuntos de dados e não foram encontradas diferenças significativas para 2 graus de liberdade. Deste modo, o teste *t* de *Student* pareado foi aplicado para comparar as médias entre ambos os métodos e não foram encontradas diferenças estatísticas em nível de 95% de confiança (Tabela 7) [79].

Tabela 7. Valores obtidos para o PA (em mg por comprimido) determinados pelos métodos proposto e de referência [10]. As medidas foram realizadas em triplicata.

Amostra	Nominal	Método proposto	Método Farmacopéia Britânica
1	750 ^a	763 ± 14	759 ± 6
2	750 ^a	759 ± 13	746 ± 7
3	750 ^b	761 ± 10	753 ± 6
4	750 ^b	745 ± 11	756 ± 4
5	750 ^c	768 ± 10	755 ± 5
6	750 ^c	742 ± 8	754 ± 7

^a proporção I; ^b proporção II; ^c proporção III

6. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA EM MISTURAS EMPREGANDO CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

6.1. Determinação de CF e AAS em misturas

O analgésico mais conhecido é a aspirina (ácido acetilissalicílico), mas o PA também tem sido amplamente empregado com o mesmo propósito. Estes analgésicos compartilham um efeito colateral comum, a sonolência, de modo que em algumas formulações utilizam-se a CF para minimizar este efeito já que ela apresenta atividade estimulante. Ela também tem atividade antiinflamatória definida, incluindo a capacidade de potencializar os efeitos de medicamentos analgésicos semelhantes à aspirina [81]. Em vista disso, alguns trabalhos na literatura tem enfatizado o uso de medicamentos associados e também de métodos analíticos visando a determinação simultânea dessas misturas [26,27, 82,83]. Entretanto, inerente a estes métodos está o elevado custo e principalmente a geração de resíduos. E neste trabalho, está sendo proposto o desenvolvimento de métodos analíticos que atendam principalmente a esses requisitos, ou seja, redução de custos e também da geração de resíduos.

A Figura 18 mostra os espectros individuais de excitação (1 e 2) e emissão (3 e 4) para a CF e AAS, respectivamente, e seus correspondentes espectros do branco (5 e 6) e (7 e 8). O AAS apresenta uma banda intensa em 320 nm e a CF uma banda menos intensa em 367 nm. Como pode ser observado, a sobreposição das bandas dos dois compostos é muito elevada e não pode ser bem resolvido pelos métodos convencionais. Além disso, a CF é o menor constituinte em formulações farmacêuticas, e isto dificulta ainda mais obter boa resolução para a mistura dos constituintes. Entretanto, existem pequenas diferenças espectrais que podem ser usadas para resolver estas misturas através de métodos de calibração multivariada. O comprimento de onda de excitação escolhido para a obtenção dos espectros de emissão da mistura (CF e AAS) foi em 275 nm, a faixa espectral usada foi de 310 a

375 nm e o algoritmo PLS-1 foi selecionado para realizar a construção dos modelos.

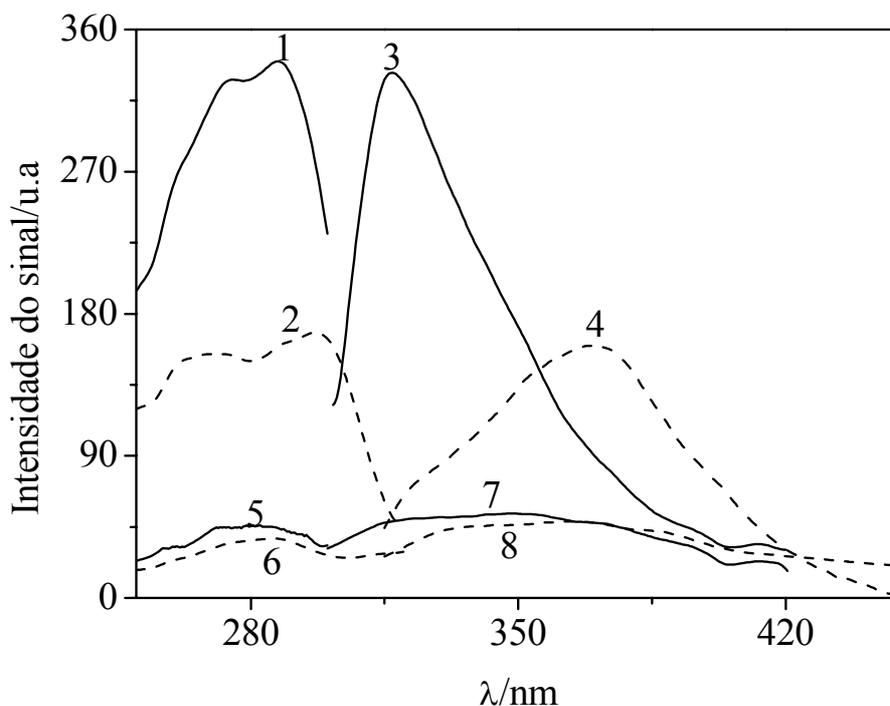


Figura 18. Espectros individuais de excitação do AAS (1), CF (2) e emissão AAS (3), CF (4) e seus respectivos espectros do branco de excitação do AAS (5), CF (6) e emissão do AAS (7), CF (8). Concentração de 80 mg g^{-1} para ambos os compostos.

Foram utilizadas 108 amostras de misturas de CF e AAS, sendo 83 para o conjunto de calibração e 25 para validação externa, como foi descrito na seção experimental. Com o objetivo de avaliar o desempenho dos modelos de calibração, alguns tipos de pré-processamento foram testados, como: com os dados auto-escalados, centrados na média e sem pré-processamento. Além disso,

transformações para primeira e segunda derivada e sem nenhum tipo de transformação também foram testados. O melhor pré-processamento foi com os dados centrados na média, sem transformação derivativa e usando o procedimento de validação cruzada. Neste último procedimento a calibração pode ser repetida n vezes (n = número de amostras), sendo que em cada oportunidade uma das amostras do conjunto de calibração é retirada e utilizada como amostra de previsão. Uma vez que todas as amostras tenham sido tratadas como objeto de previsão, é possível estimar a Soma dos Quadrados dos Erros de Previsão (PRESS) dada pela equação descrita abaixo e escolher o número de componentes principais necessários para a obtenção do menor valor de PRESS [68].

$$\text{PRESS} = \sum (C_{\text{Experimental}} - C_{\text{Previsto}})^2 \quad (11)$$

Sendo assim, a partir do procedimento de validação cruzada foi possível verificar que após 3 componentes principais para a CF e 4 para o AAS não existe nenhum ganho significativo em termos de minimização do PRESS. Além disso, as primeiras componentes principais (3 para a CF e 4 para o AAS) já são responsáveis por aproximadamente 99,8% da variância dos dados para ambos os modelos (Figuras 19 e 20).

Como foi mostrado na seção experimental (item 4.5), a faixa de concentração para a CF e AAS foram 5-20 e 50-170 mg g⁻¹, respectivamente. Isto justifica as elevadas diferenças nos valores de PRESS observado nos gráficos das Figuras 19 e 20.

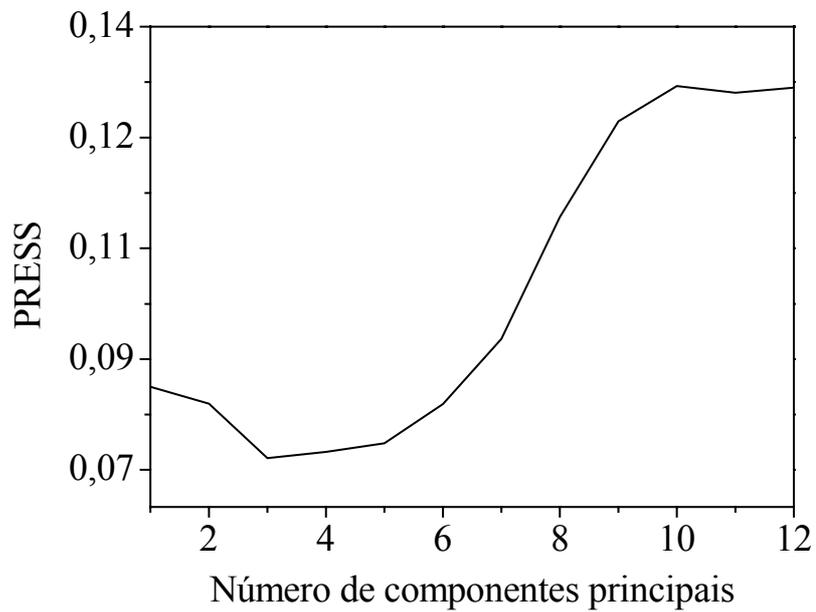


Figura 19. PRESS em função do número de componentes principais para o modelo da CF usando PLS-1, com os dados centrados na média.

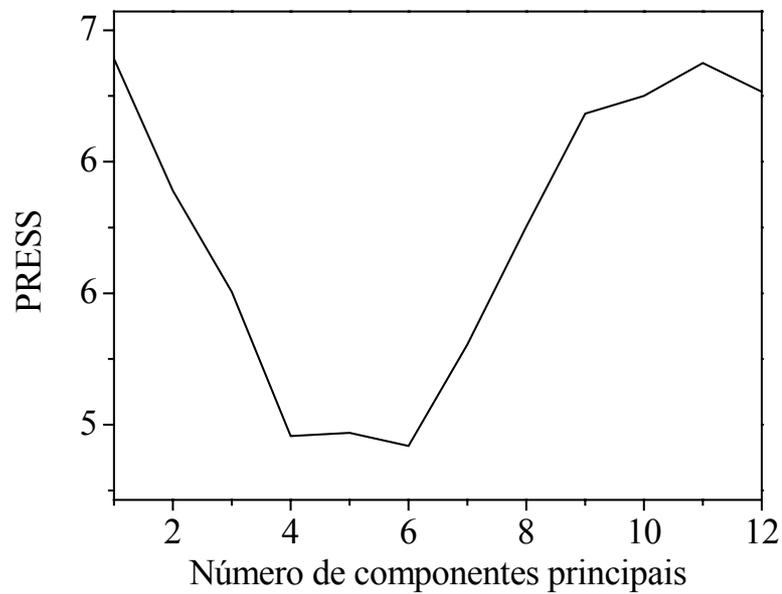


Figura 20. PRESS em função do número de componentes principais para o modelo do AAS usando PLS-1, com os dados centrados na média.

As Figuras 21 e 22 mostram os gráficos de resíduos de *Student* em função da *leverage* construídos a partir dos dados originais para a CF e AAS, respectivamente. Considerando-se que os resíduos de *Student* apresentam uma distribuição normal é possível aplicar o teste *t* para verificar se as amostras estão dentro da distribuição normal com um nível de confiança de 95%. De acordo com estudos anteriores [71], amostras com resíduos superiores a $|2,5|$ podem corresponder a uma amostra anômala, devendo ser cautelosamente averiguada. Para ambos os modelos (CF e AAS), nenhuma das amostras apresentou resíduos desta ordem, sendo portanto, desnecessário o estudo da retirada de amostras (Figuras 21 e 22).

Uma vez construído o modelo de calibração, a etapa seguinte consistiu em avaliar a sua capacidade preditiva. Para isto, foram utilizadas 25 amostras retiradas do grupo inicial de 108 amostras. A Tabela 8 mostra os valores de previsão para a CF e AAS, com seus respectivos erros relativos. Como pode ser observado, somente três amostras previstas para o modelo da CF e duas para o do AAS apresentaram resíduos superiores a 10%, isto mostra que ambos os modelos construídos apresentam boa capacidade de previsão. Outro parâmetro importante para avaliar a qualidade do modelo é o coeficiente de variabilidade (CV) [73] que indica o erro global de previsão e independe da unidade. Os resultados, mostrados na Tabela 8 foram considerados satisfatórios, considerando a forte sobreposição das bandas espectrais da CF e AAS.

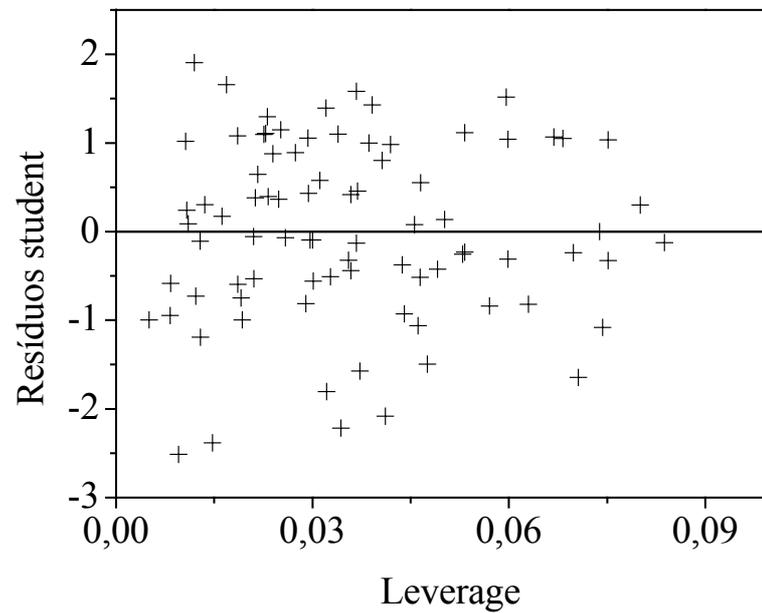


Figura 21. Gráficos de resíduos de *Student* em função da *leverage* para os modelos da CF.

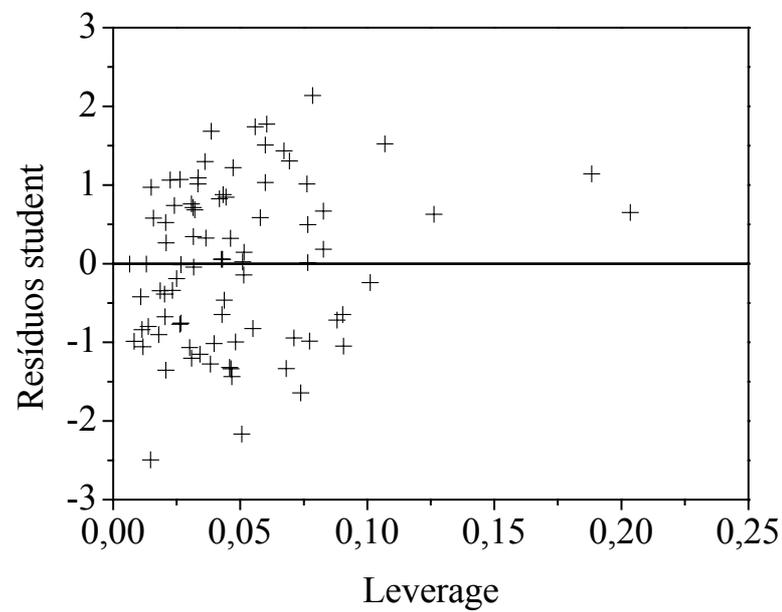


Figura 22. Gráficos de resíduos de *Student* em função da *leverage* para os modelos da AAS.

Tabela 8. Determinação simultânea da CF e AAS em 25 diferentes misturas sintéticas (grupo de validação externa) usando o PLS-1.

Valor experimental (mg g ⁻¹)		Valor previsto (mg g ⁻¹)		Erro (%)	
CF	AAS	CF	AAS	CF	AAS
10,5	94,8	9,9	96,1	6,3	-1,4
8,4	83,8	8,8	92,6	-4,7	-10,4
8,4	83,8	9,0	89,5	9,0	-6,8
7,6	75,7	7,4	74,6	7,4	1,5
10,5	104,5	10,4	111,3	10,4	-6,6
10,5	104,5	9,6	96,5	9,6	7,6
12,1	120,7	11,6	116,1	4,2	3,8
14,5	144,3	13,6	146,2	6,1	-1,3
12,9	141,5	14,2	143,9	-10,3	-1,7
15,6	171,6	16,8	169,6	-7,7	1,2
8,1	72,8	6,9	72,0	14,3	1,1
11,3	101,9	10,9	107,0	3,5	-4,9
13,2	118,6	12,9	129,0	2,4	-8,8
15,9	142,5	14,8	139,8	6,7	1,9
9,4	93,7	10,0	96,8	-6,8	-3,3
9,4	93,7	9,3	98,4	1,2	-5,1
12,2	122,2	12,9	132,3	-5,8	-8,3
14,5	144,7	14,2	146,6	2,0	-1,3
14,5	144,7	14,2	146,6	2,0	-1,3
7,5	82,5	7,1	72,5	5,9	12,2
7,5	82,5	8,1	81,9	-7,3	0,8
7,5	82,2	7,2	77,6	4,3	5,5
8,7	96,1	8,7	88,9	0,0	7,5
10,7	117,4	11,1	113,0	-3,6	3,8
13,2	144,9	13,0	137,9	1,5	4,8

^aCV = 6,0^bCV = 5,1^aCV = Coeficiente de variabilidade para as amostras de CF.^bCV = Coeficiente de variabilidade para as amostras de AAS.

6.1.1. Aplicações

Com o objetivo de checar o desempenho dos modelos propostos, o método foi aplicado para a determinação simultânea de CF e AAS em oito amostras simuladas. Quantidades conhecidas de ambos os analitos foram adicionadas em nível de mg g^{-1} em misturas de excipientes com duas proporções testadas como descrito na seção experimental (item 4.5). Os compostos foram determinados aplicando os modelos propostos e os resultados são apresentados na Tabela 9. Boas recuperações foram obtidas com erros de previsão aceitáveis para todas as amostras averiguadas.

Tabela 9. As concentrações de AAS e CF (adicionada, encontrada), expressada em mg g^{-1} são médias de três determinações; proporção 1 e 2 = 70:15:10:5 e 80:10:7:3 m/m, respectivamente.

Am	Pr	AAS			CF		
		Ad	Enc	Rec (%)	Ad	Enc	Rec (%)
1		83	84	$101 \pm 2,2$	8,3	8,0	$96 \pm 3,9$
2	1	83	82	$99 \pm 1,4$	8,3	8,6	$104 \pm 4,6$
3		92	91	$99 \pm 1,3$	9,2	9,3	$101 \pm 2,3$
4		92	88	$96 \pm 3,8$	9,2	8,9	$97 \pm 1,3$
5		93	91	$97 \pm 3,1$	9,4	9,9	$105 \pm 4,7$
6	2	93	92	$99 \pm 2,4$	9,4	9,7	$103 \pm 3,8$
7		93	91	$98 \pm 2,2$	9,4	9,5	$101 \pm 1,4$
8		93	91	$98 \pm 1,4$	9,4	9,7	$103 \pm 3,1$

Am = amostra; Pr = proporções; Ad = adicionado; Enc = encontrado; Rec = recuperado; AAS = ácido acetilsalicílico e CF = cafeína.

6.2. Determinação de CF e PA em mistura

A Figura 23 mostra os espectros individuais de excitação (1 e 3) e emissão (2 e 4) da CF e PA, respectivamente, e seus correspondentes espectros de excitação do branco da CF (5), PA (7) e emissão CF (6), PA (8). O comprimento de onda de excitação escolhido para a obtenção dos espectros de emissão da mistura (CF e PA) foi em 324 nm, onde ocorre a interseção dos espectros. Este comprimento de onda foi escolhido para obter um ganho de sinal de emissão semelhante para ambos os compostos. Os espectros foram obtidos na faixa de comprimentos de onda entre 350 e 440 nm. Na escolha da região espectral para a construção do modelo, foram construídos vários modelos empregando diferentes regiões do espectro. A região espectral entre 350 e 420 nm foi a que apresentou os melhores resultados de calibração, e também de previsão para as amostras usadas na validação do modelo.

Para a construção do modelo foram utilizadas 121 amostras contendo misturas de CF e PA. Deste total de amostras, 96 foram selecionadas para o grupo de calibração e 25 para a validação externa. A faixa de concentração empregada foi de 10 - 65 mg g⁻¹ para a CF e 100 - 400 mg g⁻¹ para o PA, como descrito na seção experimental (item 4.5). Os dados foram centrados na média, sem transformação derivativa e usando o procedimento de validação cruzada.

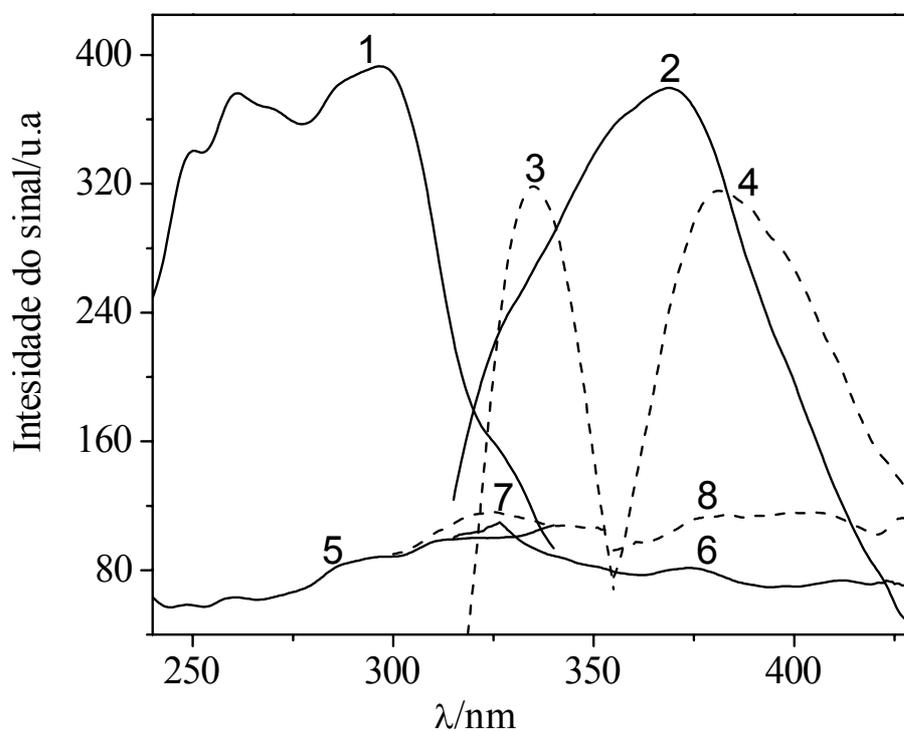


Figura 23. Espectros de excitação e emissão (1 e 2) para a CF e (3 e 4) para o PA, respectivamente, e seus correspondentes espectros de excitação do branco da CF (5), PA (7) e emissão CF (6), PA (8). Proporção entre os excipientes 70:14:9:4:3 m/m. Concentração da CF 100 mg g^{-1} e PA 200 mg g^{-1} .

As Figuras 24 e 25 mostram os gráficos de PRESS versus o número de variáveis latentes para a CF e PA, respectivamente. Quatro variáveis latentes foram escolhidas para ambos os modelos construídos (CF e PA), usando o mesmo critério que foi empregado na construção dos modelos descritos anteriormente para a mistura CF e AAS. Os elevados valores de PRESS observado na Figura 25 podem ser justificados devido às elevadas concentrações do PA em relação a da CF, como mostrado acima.

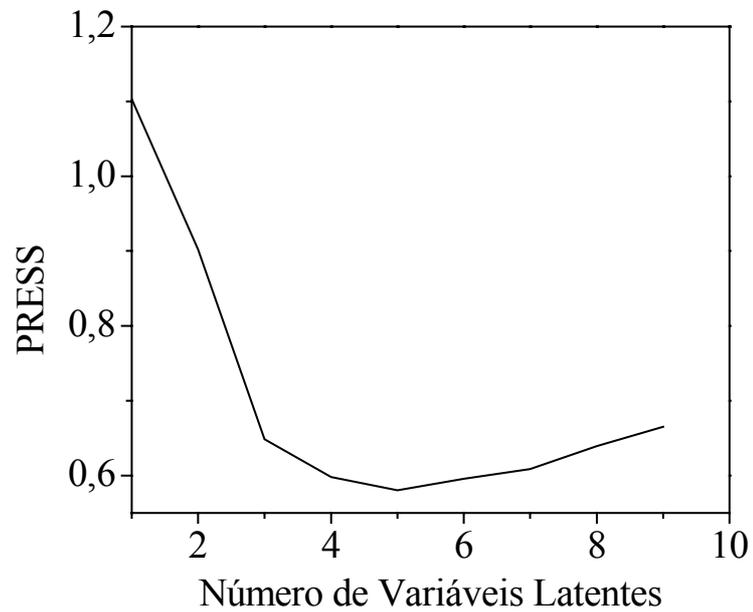


Figura 24. PRESS em função do número de componentes principais para o modelo da CF, usando PLSR-1 e com os dados centrados na média.

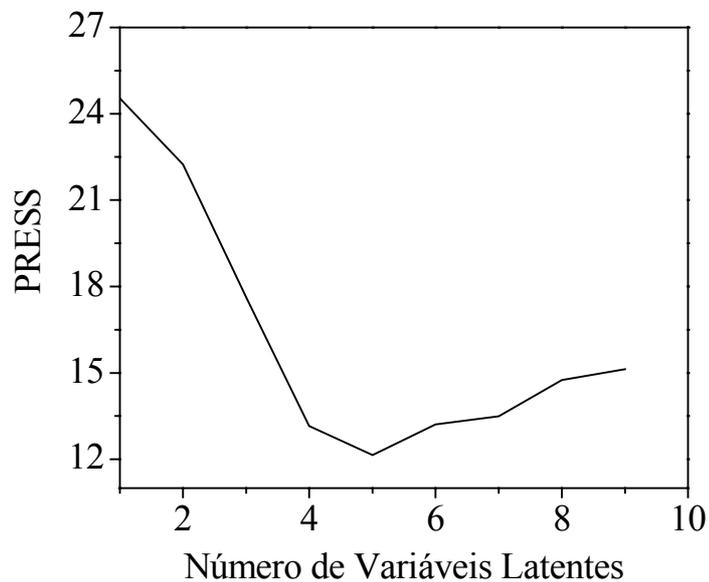


Figura 25. PRESS em função do número de componentes principais para o modelo do PA, usando PLSR-1 e com os dados centrados na média.

As Figuras 26 e 27 mostram os gráficos de resíduos versus *leverage* para os modelos da CF e PA, respectivamente. Como pode ser observado na Figura 26, nenhuma das amostras apresentou resíduo acima de $|2,5|$ [71]. Entretanto, no modelo construído para o PA uma das amostras apresentou resíduo de 2,9 (Figura 27), isto sugere a possível existência de uma amostra anômala. Desta forma, esta amostra foi retirada do conjunto de calibração e um novo modelo foi construído com previsões para amostras do grupo externo. Por não ter havido melhorias em termos de redução de PRESS e de previsão para as amostras externas, optou-se por deixá-la no conjunto de calibração.

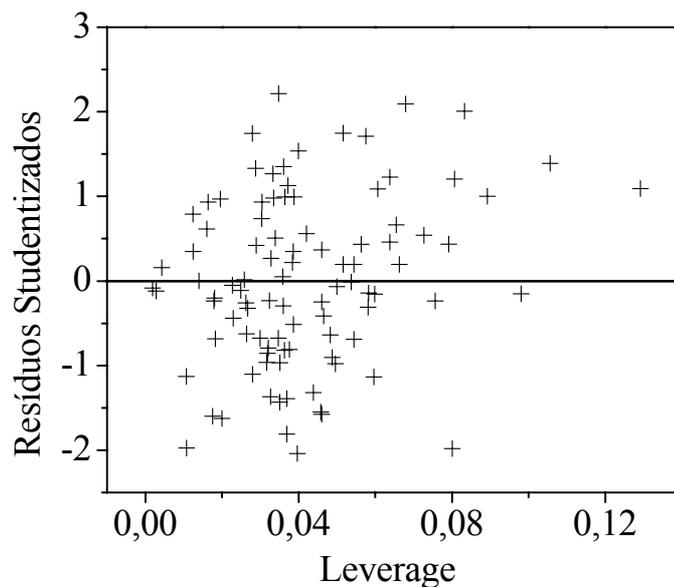


Figura 26. Gráficos de resíduos de *Student* em função da *leverage* para o modelo da CF.

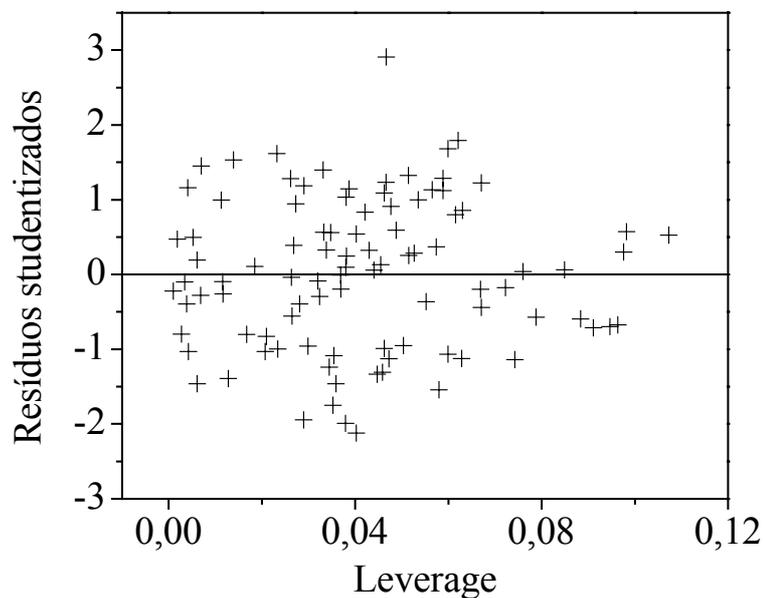


Figura 27. Gráficos de resíduos de *Student* em função da *leverage* para o modelo do PA.

Uma vez construído os modelos para ambos os analitos (CF e PA), foi utilizado um grupo de 25 amostras externas para avaliar a capacidade de previsão dos modelos. Como pode ser observado na Tabela 10, para o modelo do PA somente uma amostra apresentou resíduo superior a 10%, o que confere a ele uma boa capacidade de previsão. Entretanto, para o modelo da CF quatro amostras apresentaram resíduos superiores a 10%. A melhor capacidade preditiva do modelo para o PA pode também ser confirmada pelo baixo valor do coeficiente de variabilidade, como é mostrado na Tabela 10.

Tabela 10. Determinação simultânea da CF e PA em 25 diferentes misturas sintéticas (grupo de validação externa) usando o PLS-1.

Valor experimental (mg g ⁻¹)		Valor previsto (mg g ⁻¹)		Erro (%)	
CF	PA	CF	PA	CF	PA
23,3	155,9	21,5	162,4	8,0	-4,2
28,7	200,4	28,2	200,3	1,9	0,1
31,3	240,8	28,9	237,7	7,5	1,3
36,3	301,4	35,5	305,7	2,3	-1,4
47,0	349,4	41,1	324,3	12,5	7,2
51,5	403,8	49,0	390,7	5,0	3,3
15,2	103,3	16,7	106,6	-9,6	-3,2
22,1	158,1	20,9	171,0	5,4	-8,2
26,2	206,5	27,4	198,6	-4,5	3,8
35,2	304,3	34,9	294,4	0,6	3,3
35,2	304,3	36,3	313,1	-3,2	-2,9
45,9	400,7	46,8	397,0	-1,8	0,9
25,17	219,4	27,0	225,4	-7,4	2,6
28,6	202,3	26,5	197,1	7,5	2,6
35,0	253,1	37,9	273,1	-8,5	-7,9
42,6	301,1	43,5	306,1	-2,1	-1,6
11,3	98,3	10,2	101,3	9,1	2,9
37,5	310,2	41,5	327,1	-10,7	-5,4
45,9	361,6	44,5	362,6	3,0	-0,3
50,8	403,0	51,9	398,3	-2,1	1,2
17,8	104,6	17,9	100,3	-0,7	4,2
17,6	153,4	20,1	144,8	-14,2	5,6
34,3	309,8	36,1	342,9	-5,2	-10,7
34,3	309,8	34,6	318,8	-1,0	-2,9
56,3	420,6	50,3	417,8	10,8	0,7

^aCV = 7,2^bCV = 4,4^aCV = Coeficiente de variabilidade para as amostras de CF.^bCV = Coeficiente de variabilidade para as amostras de PA.

6.2.1. Aplicações

Para verificar o desempenho dos modelos propostos, o método foi aplicado para a determinação simultânea de CF e PA em oito amostras farmacêuticas. Quantidades conhecidas de ambos os analitos foram adicionadas em nível de mg g^{-1} em misturas de excipientes com duas proporções testadas, como descrito na seção experimental (item 4.5). Os compostos foram determinados aplicando os modelos propostos e os resultados são apresentados na Tabela 11. Boas recuperações foram obtidas com erros de previsão aceitáveis para as amostras ensaiadas, entretanto ressaltando a melhor precisão do modelo para PA em relação ao da CF.

Tabela 11. As concentrações de PA e CF (adicionada, encontrada), expressada em mg g^{-1} são médias de três determinações; proporção 1 e 2 = 70:14:9:4:3 e 75:12:8:3:2 m/m, respectivamente.

Am	Pr	PA			CF		
		Ad	Enc	Rec (%)	Ad	Enc	Rec (%)
1		225	218	$97 \pm 3,4$	25,2	25,5	$101 \pm 6,4$
2	1	225	227	$101 \pm 0,8$	25,2	26,8	$106 \pm 6,7$
3		254	259	$102 \pm 5,2$	33,6	30,9	$92 \pm 5,4$
4		254	243	$96 \pm 3,1$	33,6	30,5	$91 \pm 4,4$
5		225	215	$96 \pm 2,2$	25,2	27,2	$108 \pm 7,4$
6	2	225	231	$103 \pm 5,5$	25,2	27,6	$110 \pm 2,5$
7		254	258	$102 \pm 4,0$	33,6	31,3	$93 \pm 5,2$
8		254	245	$97 \pm 4,4$	33,6	31,2	$93 \pm 4,8$

Am = amostra; Pr = proporções; Ad = adicionado; Enc = encontrado; Rec = recuperado; PA = paracetamol, CF = cafeína.

Portanto, os procedimentos espectrofluorimétricos em fase sólida para a determinação simultânea dos compostos acima citados em formulações farmacêuticas foram rápidos, precisos e forneceram resultados satisfatórios, mesmo apresentando elevada sobreposição espectral das bandas. Deste modo, algumas limitações inerentes aos procedimentos analíticos tradicionais, assim como, intensivas etapas de separação, elevado tempo de análise e consumo de reagentes foram reduzidos.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos analíticos para a determinação de AAS e PA em amostras farmacêuticas. Estes métodos atendem as exigências requeridas pela área farmacêutica apresentando faixa de trabalho compatível com os valores encontrados em formulações farmacêuticas, além de boa correlação e baixo desvio padrão relativo. Frente aos outros métodos descritos na literatura, estes apresentaram como principal vantagem o fato de não necessitar da etapa de preparo de amostra, a qual é imprescindível para a maioria dos métodos analíticos e, geralmente, costuma ser uma das maiores fontes de erro, chegando a ser equivalente a 30% [84]. Além disso, os métodos desenvolvidos apresentam menor custo por não necessitarem do emprego de reagentes ou vidrarias, além de possibilitar um elevado número de determinações analíticas por dia. Portanto, estes dois métodos encontram-se aptos para serem empregados em análises rotineiras em indústrias química e/ou farmacêutica.

O interesse em determinar simultaneamente um ou mais compostos em uma mesma amostra tem aumentado cada vez mais devido à necessidade de conseguir um maior número de determinações num menor intervalo de tempo. Neste trabalho, foi demonstrado que isto também é possível em matriz sólida, desde que se faça uso de ferramentas estatísticas. Desta maneira, neste trabalho desenvolveu-se um método para determinação simultânea das misturas (CF e AAS) e (CF e PA). Foi demonstrado que apesar de haver forte sobreposição espectral, os modelos construídos apresentaram grandes perspectivas para qualificar e quantificar esses compostos. O processo de calibração multivariada fundamentado em regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR-1) permitiu a melhor modelagem para os compostos em estudos. Todos os modelos apresentaram bom desempenho de

previsão, uma vez que para a maioria das amostras usadas no grupo para validação externa, os resíduos foram inferiores a 10 %.

Desta maneira, este trabalho traz uma contribuição muito importante para a área química e farmacêutica por ter demonstrado que é possível obter informações qualitativas e/ou quantitativas no estado sólido, empregando métodos de calibração univariada para amostras individuais ou para a determinação simultânea de misturas, usando modelos de calibração multivariada. Os métodos propiciam análises rápidas, são não destrutivos, possibilitam realizar análises *in line* e *on line* em processos de produção, não geram resíduos e deste modo contribuem para a nova tendência de química limpa, podendo vir a serem de relevante aplicação tanto em indústrias químicas como farmacêuticas. Entretanto, é necessário ter conhecimento prévio dos excipientes, assim como de suas proporções, para que o método possa ser aplicado.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

As boas características dos métodos apresentados nesta tese, como: ser não destrutivos, possibilitam realizar análises *in line* e *on line* em processos de produção, não geram resíduos e principalmente baixo tempo de análise, pode-se sugerir uma série de propostas que fazem uso destas características peculiares. Como sugestão, seria expandir para outros medicamentos que realmente necessitam de um controle mais rígido na linha de produção, ou seja, para aqueles em que uma pequena alteração na sua composição possa trazer algum risco à saúde humana. Entretanto, para análises fluorimétrica é essencial que o composto de interesse apresente fluorescência natural, uma vez que, no estado sólido não é possível realizar etapas prévias de derivatização.

Outro estudo interessante, está relacionado a homogeneidade da mistura de componentes sólidos para a produção de comprimidos, pois na indústria farmacêutica há uma preocupação muito grande em relação a este parâmetro.

Além disso, como a fluorescência é sensível ao tamanho das partículas, também é possível realizar estudos a fim de controlar o tamanho das mesmas, a qual é uma etapa muito importante para avaliar a eficácia dos medicamentos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kateman G, Buydens L. Quality control and analytical chemistry, 2nd edn., New York, 1993, 317p.
2. Meyer J, Karst U. Determination of paracetamol (acetaminophen) by HPLC with post-column enzymatic derivatization and fluorescence detection, **Chromatographia** 54 (2001) 163.
3. Martos NR, Gomez FA, Diaz AM, Vallvey LFC. Application of liquid chromatography to the simultaneous determination of acetylsalicylic acid, caffeine, codeine, paracetamol, pyridoxine, and thiamine in pharmaceutical preparations. **J. AOAC Int.** 84 (2001) 676.
4. Villari A, Micali N, Fresta M, Puglisi G. Spectrofluorimetry at zero angle: Determination of salicylic acid in an acetylsalicylic acid pharmaceutical formulation, **Analyst** 119 (1994) 1561.
5. Prepn.: Gerhardt C, Ann. 1853, 87, 149. Manufacturing from salicylic acid and acetic anhydride: Faith, Keyes and Clark's *Industrial Chemicals*, Ed.: Lowenheim, F. A.; Moran MK, Wiley-Interscience, New York, 4th ed., 117, 1975.
6. Mingoia Q. Química Farmacêutica, editora: Universidade de São Paulo, 1965, 138p.
7. Watson HR, Bergqvist D. Antithrombotic agents after peripheral transluminal angioplasty: a review of the studies, methods and evidence for their use, **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.** 19 (2000) 445.
8. Ahern DK, Gorkin I, Anderson JL, Tierney C, Hallstrom A, Ewart C, Capone RJ, Schron E, Kornfeld D, Herd JA, Richardson DW, Follick MJ. Biobehavioral variables and mortality or cardiac arrest in the cardiac arrhythmia pilot study (CAPS), **Am. J. Card.** 66 (1990) 59.
9. Coryell W, Noyes R, House JD. Mortality among outpatients with anxiety disorders, **Am. J. Psychol.** 146 (1986) 508.
10. British Pharmacopoeia, Volume II, HMSO: London, 2002; 2367p.

11. Kuntz D, Brossel R. Analgesic effect and clinical tolerance of paracetamol 500 mg plus caffeine 50 mg Versus paracetamol 400 mg plus dextropropoxyphen 30 mg for back pain, **Presse Med.** 25 (1996) 1171.
12. Shayiq RM, Roberts DW, Rothstein K, Snawder JE, Benson W, Ma X, Black M. Repeat exposure to incremental doses of acetaminophen provides protection against acetaminophen-induced lethality in mice: An explanation for high acetaminophen dosage in humans without hepatic injury, **Hepatology** 29 (1999) 451.
13. Cole KJ, Costill DL, Starling RD, Goodpaster BH, Trappe SW, Fink WJ. Effect of caffeine ingestion on perception of effort and subsequent work production, **Int. J. Sport. Nutr.** 6 (1996) 14.
14. Maughan RJ, Griffin J. Caffeine ingestion and fluid balance: a review, **J. Hum. Nutr. Diet.** 16 (2003) 411.
15. Sawynok J. Pharmacological rationale for the clinical use of caffeine, **Drugs** 49 (1995) 37.
16. Shirlow MJ, Mathers CD. A study of caffeine consumption and symptoms - indigestion, palpitations, tremor, headache and insomnia, **Int. J. Epidemiol.** 14 (1985) 239.
17. Mehta A, Jain AC, Mehta MC, Billie M. Caffeine and cardiac arrhythmias. An experimental study in dogs with review of literature, **Acta Cardiol.** 52 (1997) 273.
18. Franeta JT, Agbaba D, Eric S, Aleksic M, Vladimirov S. HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets, **Farmaco** 57 (2002) 709.
19. Altun ML, Ceyhan T, Kartal M, Atay T, Ozdemir N, Cevheroglu S. LC method for the analysis of acetylsalicylic acid, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations, **J. Pharm. Biomed. Anal.** 25 (2001) 93.
20. Nozal MJ, Bernal JL, Toribio L, Jimenez JJ, Martin MT. Validation of the removal of acetylsalicylic acid - Recovery and determination of residues on various surfaces by high performance liquid chromatographic, **J. Chromatogr. A** 870 (2000) 69.

21. Qi ML, Wang P, Leng YX, Gu JL, Fu RN. Simple HPLC method for simultaneous determination of acetaminophen, caffeine and chlorpheniramine maleate in tablet formulations, **Chromatographia** 56 (2002) 295.
22. Marin A, Garcia E, Garcia A, Barbas C. Validation of a HPLC quantification of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations: capsules and sachets, **J. Pharm. Biomed. Anal.** 29 (2002) 701.
23. Trinder P. Rapid determination of salicylate in biological fluids, **Biochem. J.** 57 (1954) 301.
24. Ortega-Barrales P, Ruiz-Medina A, Fernandez-de Cordova ML, Molina-Diaz A. A flow-through solid-phase spectroscopic sensing device implemented with FIA solution measurements in the same flow cell: determination of binary mixtures of thiamine with ascorbic acid or acetylsalicylic acid, **Anal. Bioanal. Chem.** 373 (2002) 227.
25. Sena MM, Fernandes JCB, Rover L, Poppi RJ, Kubota LT. Application of two- and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid mixtures using ultraviolet spectrophotometry, **Anal. Chim. Acta** 409 (2000) 159.
26. Medina AR, de Cordova MLF, Molina-Diaz A. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid by means of a FI ultraviolet pls multioptosensing device, **J. Pharm. Biomed. Anal.** 21 (1999) 983.
27. Nogowska M, Muszalska I, Zajac M. Simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine in pharmaceutical preparations, **Chem. Anal.** 44 (1999) 1041.
28. Sultan SM, Alzamil IZ, Alrahman AMA, Altamrah SA, Asha Y. Use of cerium(iv) sulfate in the spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceutical preparations, **Analyst** 111 (1986) 919.
29. Sultan SM. Spectrophotometric determination of paracetamol in drug formulations by oxidation with potassium dichromate, **Talanta** 34 (1987) 605.
30. Verma KK, Jain A, Stewart KK. Flow-injection spectrophotometric determination of acetaminophen in drug formulations, **Anal. Chim. Acta** 261 (1992) 261.
31. Bouhsain Z, Garrigues S, MoralesRubio A, delaGuardia M. Flow injection spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceuticals by means

- of on-line microwave-assisted hydrolysis and reaction with 8-hydroxyquinoline (8-quinolinol), **Anal. Chim. Acta** 330 (1996) 59.
32. Ramos ML, Tyson JF, Curran DJ. Determination of acetaminophen by flow injection with on-line chemical derivatization: Investigations using visible and FTIR spectrophotometry, **Anal. Chim. Acta** 364 (1998) 107.
33. Criado A, Cardenas S, Gallego M, Valcarcel M. Continuous flow spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceuticals following continuous microwave assisted alkaline hydrolysis, **Talanta** 53 (2000) 417.
34. Canada MJA, Reguera MIP, Medina AR, de Cordova MLF, Diaz AM. Fast determination of paracetamol by using a very simple photometric flow-through sensing device, **J. Pharm. Biomed. Anal.** 22 (2000) 59.
35. Van Staden JF, Tsanwani M. Determination of paracetamol in pharmaceutical formulations using a sequential injection system, **Talanta** 58 (2002) 1095.
36. Catarino RIL, Garcia MBQ, Lapa RAS, Lima JLFC, Barrado E. Sequential determination of salicylic and acetylsalicylic acids by amperometric multisite detection flow injection analysis, **J. AOAC Int.** 85 (2002) 1253.
37. Quintino MDM, Corbo D, Bertotti M, Angnes L. Amperometric determination of acetylsalicylic acid in drugs by batch injection analysis at a copper electrode in alkaline solutions, **Talanta** 58 (2002) 943.
38. Garrido JMPJ, Lima JLFC, Matos CD. Flow injection determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical preparations with an amperometric detector, **Collect. Czech. Chem. Commun.** 65 (2000) 954.
39. Ferreira VJF, Cavalheiro ACV, Fagnani E, de Moraes M, Pezza L, Pezza HR, Melios CB. An electrode of the second kind for aspirin determination in tablet formulations, **Anal. Sci.** 15 (1999) 249.
40. Carvalho RM, Neto GD, Kubota LT. Microbiosensor for salicylate based on modified carbon fibre, **Anal. Lett.** 33 (2000) 425.
41. Carvalho RM, Neto GD, Kubota LT. Influence of different carbon fibers on salicylate microbiosensor performance, **Electroanalysis** 13 (2001) 131.
42. Zen JM, Ting YS. Simultaneous determination of caffeine and acetaminophen in drug formulations by square-wave voltammetry using a chemically modified electrode, **Anal. Chim. Acta** 342 (1997) 175.

43. Wang CY, Hu XY, Leng ZZ, Yang GJ, Jin GD. Differential pulse voltammetry for determination of paracetamol at a pumice mixed carbon paste electrode, **Anal. Lett.** 34 (2001) 2747.
44. Quintino MSM, Araki K, Toma HE, Angnes L. Batch injection analysis utilizing modified electrodes with tetra-ruthenated porphyrin films for acetaminophen quantification, **Electroanalysis** 14 (2002) 1629.
45. Martos NR, Diaz AM, Navalon A, Paya ID, Vallvey LFC. Simultaneous spectrofluorimetric determination of (acetyl)salicylic acid, codeine and pyridoxine in pharmaceutical preparations using partial least-squares multivariate calibration, **J. Pharm. Biomed. Anal.** 23 (2000) 837.
46. Navalon A, Blanc R, del Olmo M, Vilchez JL. Simultaneous determination of naproxen, salicylic acid and acetylsalicylic acid by spectrofluorimetry using partial least-squares (PLS) multivariate calibration, **Talanta** 48 (1999) 469.
47. Calatayud JM, Benito CG. Flow-injection spectrofluorimetric determination of paracetamol, **Anal. Chim. Acta** 231 (1990) 259.
48. Pulgarin JAM, Bermejo LFG. Flow-injection stopped-flow spectrofluorimetric kinetic determination of paracetamol based on its oxidation reaction by hexacyanoferrate(III), **Anal. Chim. Acta** 333 (1996) 59.
49. Murillo JA, Garcia LF. Application of first derivative fluorescence spectrometry to the simultaneous determination of paracetamol and salicylamide in pharmaceuticals, **Anal. Lett.** 29 (1996) 423.
50. Eustaquio A, Blanco M, Jee RD, Moffat AC. Determination of paracetamol in intact tablets by use of near infrared transmittance spectroscopy, **Anal. Chim. Acta** 383 (1999) 283.
51. Merckle P, Kovar KA. Assay of effervescent tablets by near-infrared spectroscopy in transmittance and reflectance mode: acetylsalicylic acid in mono and combination formulations, **J. Pharm. Biomed. Anal.** 17(1998) 365.
52. Laasonen M, Harmia-Pulkkinen T, Simard C, Rasanen M, Vuorela H. Development and validation of a near-infrared method for the quantitation of caffeine in intact single tablets, **Anal. Chem.** 75 (2003) 754.
53. Eustaquio A, Graham P, Jee RD, Moffatt AC, Trafford AD. Quantification of paracetamol in intact tablets using near-infrared transmittance spectroscopy, **Analyst** 123 (1998) 2303.

54. Szostak R.; Mazurek S. Quantitative determination of acetylsalicylic acid and acetaminophen in tablets by FT-Raman spectroscopy, **Analyst** 127 (2002) 144.
55. Scotter CNG. No-destructive spectroscopic techniques for the measurement of food quality, **Trends Food. Sci. Tech.** 8 (1997) 285.
56. Beyer J, Steffens KJ. Calibration models for determination of water content in pharmaceutical excipients using near-infrared spectroscopy (NIRS), **Pharm. Ind.** 65 (2003) 186.
57. Deshpande SS. Principles and applications of luminescence spectroscopy, **Crit. Rev. Food Sci.** 41 (2001) 155.
58. Skoog DA, Leary LL, Principles of Instrumental Analysis. 4th ed. Saunders, New York, 1992.
59. Lakowicz, J. R. Topics in Fluorescence Spectroscopy. Ed. Plenum Press, New York and London, vol.4, p.501, 1994.
60. Nijegorodov NJ, Downey WS. The influence of planarity and rigidity on the absorption and fluorescence parameters and intersystem crossing rate-constant in aromatic-molecules, **J. Phys. Chem.** 98 (1994) 5639.
61. Kowalski BR, Bender CF. Pattern-recognition - powerful approach to interpreting chemical data, **J. Am. Chem. Soc.** 94 (1972) 5632.
62. Thomas EV. A primer on multivariate calibration, **Anal. Chem.** 66 (1994) 795 A.
63. Dinc E, Ozdemir A, Baleanu D. An application of derivative and continuous wavelet transforms to the overlapping ratio spectra for the quantitative multiresolution of a ternary mixture of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in tablets, **Talanta** 65 (2005) 36.
64. Beebe KR, Pell RJ, Seasholtz MB. Chemometrics: "A Practical Guide", Wiley, NEW York 1998.
65. Sena MM, Poppi RJ, Frighetto RTS, Valarini PJ. Evaluation of the use of chemometric methods in soil analysis, **Quim. Nova** 23 (2000) 547.
66. Crouch SR, Coello J, MasPOCH S, Porcel M. Evaluation of classical and three-way multivariate calibration procedures in kinetic-spectrophotometric analysis, **Anal. Chim. Acta** 424 (2000) 115.

67. Wold S, Esbensen K, Geladi P. Principal component analysis, **Chemom. Intell. Lab. Sys.** 2 (1987) 37.
68. Geladi P, Kowalski BR. Partial least-squares regression: a tutorial, **Anal. Chem. Acta** 185 (1986) 1.
69. Haaland DM, Thomas EV. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of quantitative information, **Anal. Chem.** 60 (1988) 1193.
70. Kowalski BR, Seasholtz MB. Recent developments in multivariate calibration **J. Chemom.** 5 (1991) 129.
71. Ferreira MMC, Antunes AM, Melgo MS, Volpe PLO. Chemometrics I: Multivariate calibration, a tutorial, **Quim. Nova** 22 (1999) 724.
72. Otto M, Chemometrics - Statistics and computer application in analytical chemistry, Willey-VCH (1999) 314 p.
73. Williams PC, "Variables Affecting Near-Infrared Reflectance Spectroscopy Analysis", in Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, P. William and K. Norris, Eds. (American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Mn, 1990), 7th ed., p. 147.
74. Rowe R, Sheskey P, Weller P. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 4th Edition, 776p, 2003.
75. Lund W. The Pharmaceutical Codex. Principles and Practice of Pharmaceutics. Ed. The Pharmaceutical Press, 1116p, 1994.
76. Liu YS, Ware WRJ. Photophysics of polycyclic aromatic-hydrocarbons adsorbed on silica-gel surfaces .1. fluorescence lifetime distribution analysis - an ill. **J. Phys. Chem.** 97 (1993) 5980.
77. Kurfürst U. Solid Sample Analysis, Springer-Verlag, 1998, 247p.
78. A.C.S. Committee on Environmental Improvement; Sub-committee on Environmental Analytical Chemistry, **Anal. Chem.** 52 (1980) 2242.
79. VOGEL - Mendham J, Denney RC, Barnes JD, Thomas MJK. Análise Química Quantitativa, 6^a edição, Editora LTC, 2002, 462p.

80. Shibasaki J, Konishi R, Yamada K, Fluorometric-determination of acetaminophen and its conjugates in whole-blood, **Chem. Pharm. Bull.** 28 (1980) 669.
81. Rall TW. Drugs used in the treatment of asthma. In: Gilmar AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (eds). *The pharmacological basis of therapeutics*. 8Ed. New York: Pergamon Press, 1990, 618-673.
82. Bouhsain Z, Garrigues S, DelaGuardia M. PLS-UV spectrophotometric method for the simultaneous determination of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceutical formulations, **Fresenius J. Anal. Chem.** 357 (1997) 973.
83. Bouhsain Z, Garrigues S, DelaGuardia M. Simultaneous stopped-flow determination of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceutical formulations by Fourier transform infrared spectrometry with partial least-squares data treatment, **Analyst** 121 (1996) 1935.
84. Keith LH. *Principles of environmental sampling*, editor Washington, DC: ACS, 1991, 458p.