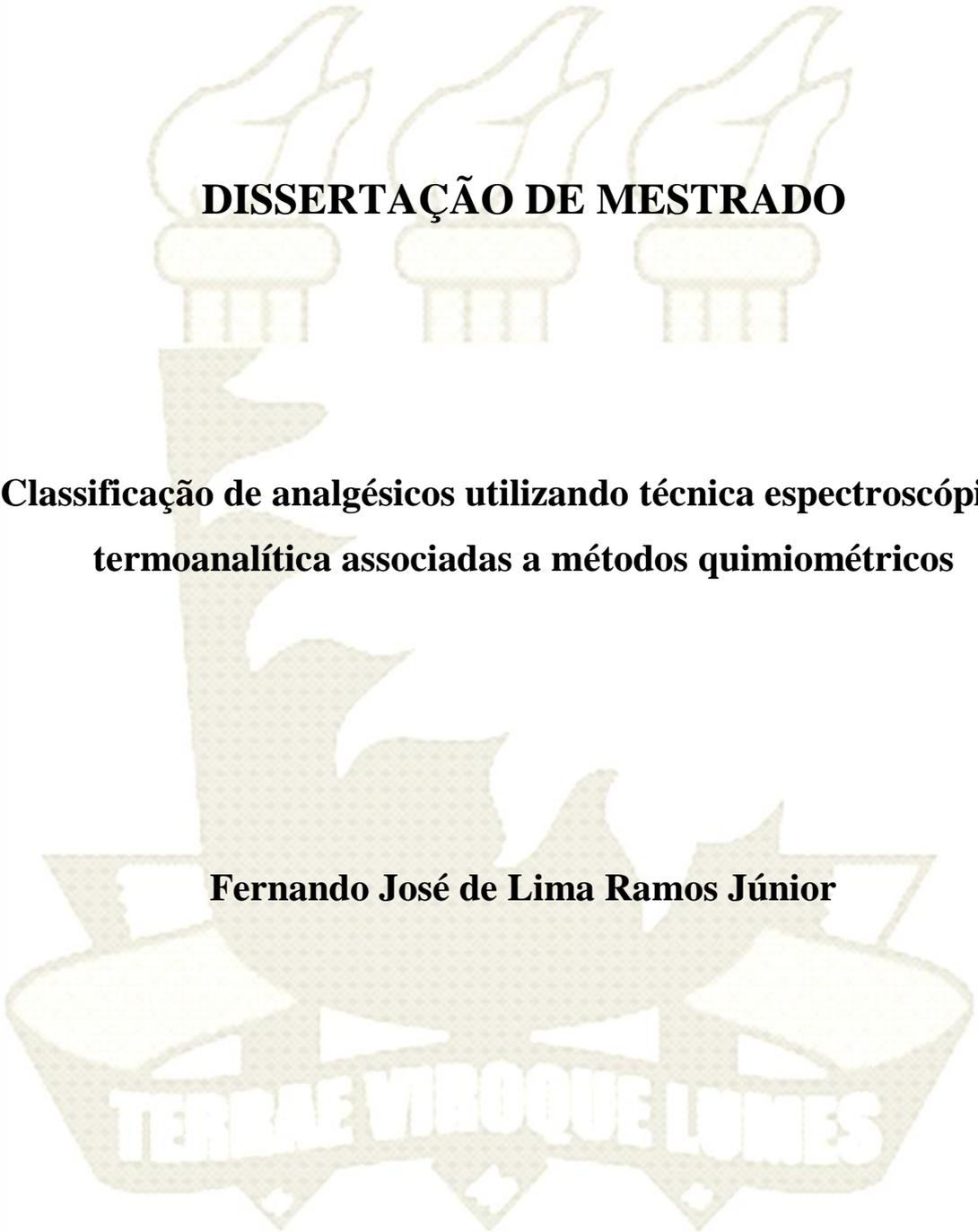




UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Classificação de analgésicos utilizando técnica espectroscópica e termoanalítica associadas a métodos quimiométricos

Fernando José de Lima Ramos Júnior

Campina Grande – PB – Brasil

Fevereiro/2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Classificação de analgésicos utilizando técnica espectroscópica e termoanalítica associadas a métodos quimiométricos

Fernando José de Lima Ramos Júnior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível mestrado, da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: **Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Dantas de Medeiros**

Coorientador: **Prof. Dr. José Germano Vêras Neto**

Campina Grande – PB – Brasil

Fevereiro/2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

R175c Ramos Júnior, Fernando José de Lima.

Classificação de analgésicos utilizando técnica espectroscópica e termoanalítica associadas a métodos quimiométricos [manuscrito] /

Fernando José de Lima Ramos Júnior. - 2014.

74 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

"Orientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Departamento de Farmácia".

"Co-Orientação: Prof. Dr. José Germano Vêras Neto, Departamento de Química".

1. Espectroscopia NIR. 2. Calorimetria Exploratória Diferencial. 3. Paracetamol. 4. Cafeína. 5. Quimiometria. I.

Título.

21. ed. CDD 615.1

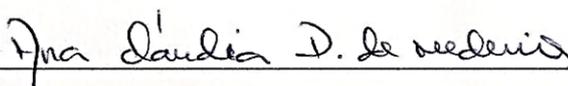
Fernando José de Lima Ramos Júnior

Classificação de analgésicos utilizando técnica espectroscópica e termoanalítica associadas a métodos quimiométricos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível mestrado, da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

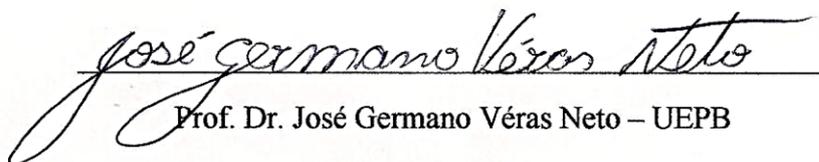
Aprovado em 18 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA



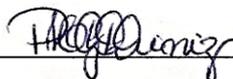
Prof. Dr.^a Ana Cláudia Dantas de Medeiros – UEPB

Orientadora



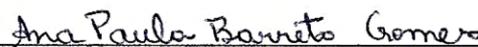
Prof. Dr. José Germano Vêras Neto – UEPB

Coorientador



Dr. Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz – UEPB

Examinador Interno



Prof.^a Dr.^a Ana Paula Barreto Gomes – UFRN

Examinadora Externa

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

REITOR

Prof. Dr. Antonio Guedes Rangel Júnior

VICE-REITOR

Prof. Dr. José Ethan de Lucena Barbosa

PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Prof.^a Dr.^a Maria José Lima da Silva

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Prof.^a Dr.^a Dilma Maria de Brito Melo Trovão

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

**COORDENADORA ADJUNTA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof.^a Dr.^a Karina Lidiane de Alcantra Saraiva

A meu Pai, minha mãe e meu irmão,

Por toda dedicação para comigo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao grandioso DEUS, pela sua imensurável benignidade, misericórdia, proteção e pelo dom da vida.

Aos meus queridos pais, Fernando e Adeziva, pelos ensinamentos, carinho, amor, dedicação, paciência, por sempre acreditarem na minha capacidade, sendo, por isso, os principais responsáveis pelas minhas conquistas e principalmente, pela abdicação de muitos dos seus sonhos para que os meus fossem concretizados.

Ao meu irmão, Felipe, pela paciência e hombridade que sempre me dedicou.

Aos meus professores, por terem sido peças fundamentais das minhas vitórias.

A professora Ana Cláudia e ao professor Germano, pela amizade, confiança, ensinamentos e por me aceitarem como orientando, dando-me o privilégio de aprender com os seus exemplos como ser um bom profissional.

Ao professor Fábio, pelos ensinamentos e a ajuda.

Aos meus amigos, Deysiane, Nathália, Renata, João Paulo e Paulo César, pelos conselhos, hombridade, companheirismo, enfim pela convivência durante esses sete anos.

Ao amigo Valber, pelos ensinamentos e a imensurável ajuda.

A todos que fizeram e fazem parte do LABDEM/LQAQ, pelas amizades construídas e as experiências compartilhadas.

A todos os funcionários da UEPB, pela dedicação e empenho na execução das tarefas diárias, que contribuíram para minha formação acadêmica.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para minhas conquistas.

“Posso todas as coisas naquele que me fortalece” (Filipenses 4:13)

“Porque para Deus nada é impossível” (Lucas 1:37)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
3.1 Indústria farmacêutica e legislação no Brasil	4
3.2 Analgésicos	6
3.2.1 Paracetamol	6
3.2.2 Cafeína	7
3.3 Método padrão para determinação simultânea de fármacos em preparações farmacêuticas	8
3.4 Técnicas alternativas	8
3.4.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	9
3.4.1.1 <i>Aplicações farmacêuticas da DSC</i>	10
3.4.2 Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)	11
3.4.2.1 <i>Aplicações farmacêuticas da espectroscopia NIR</i>	12
3.5 Quimiometria	14
3.5.1 Reconhecimento de padrões	14
3.5.1.1 <i>PCA</i>	14
3.5.1.2 <i>KNN</i>	15
3.5.1.3 <i>LDA</i>	16
3.5.2 Técnicas de seleção de variáveis	17
3.5.2.1 <i>SPA</i>	17
3.5.2.2 <i>GA</i>	17

SUMÁRIO

REFERÊNCIAS	19
ARTIGO I: Calorimetria exploratória diferencial associada a técnicas quimiométricas: modelos para classificação de medicamentos contendo paracetamol	26
Resumo	27
Introdução	28
Metodologia	30
<i>Ingrediente ativo farmacêutico e amostras</i>	30
<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	30
<i>Estudo Quimiométrico</i>	31
Resultados e discussão	31
<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	31
<i>Estudo Quimiométrico</i>	34
<i>Análise exploratória dos dados</i>	35
<i>Classificação SPA-LDA</i>	36
<i>Classificação GA-LDA</i>	37
<i>Classificação KNN</i>	39
Conclusão	40
Agradecimentos	40
Referências	40
ARTIGO II: Espectroscopia no infravermelho próximo e métodos quimiométricos aplicados na classificação de comprimidos contendo paracetamol e cafeína.....	44
Resumo	45
Introdução	46
Metodologia	48
<i>Amostras</i>	48
<i>Análise espectroscópica no infravermelho próximo (NIR)</i>	48
<i>Estudo Quimiométrico</i>	49
Resultados e discussão	49
<i>Espectros NIR</i>	49

SUMÁRIO

<i>Classificação SPA-LDA</i>	50
<i>Classificação GA-LDA</i>	53
<i>Classificação KNN</i>	54
Conclusão	55
Referências	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS i

AINE's	Agentes Anti-inflamatórios não Esteroidais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
Ceme	Central de Medicamentos
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COX	Ciclooxigenase
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
G1	Medicamento Genérico 1
G2	Medicamento Genérico 2
GA	Algoritmo Genético
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
KNN	K-ésimo Vizinho mais Próximo
KS	Kennard-Stone
LDA	Análise Discriminante Linear
M1	Marca 1 dos medicamentos analisados
M2	Marca 2 dos medicamentos analisados
M3	Marca 3 dos medicamentos analisados
MLR	Regressão Linear Múltipla
MS	Ministério da Saúde
NIR	Infravermelho Próximo
PCA	Análise de Componentes Principais
R	Medicamento de Referência
SNV	Padronização Normal de Variação
SPA	Algoritmo das Projeções Sucessivas
UV	Ultravioleta

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1. Estrutura molecular do Paracetamol (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010)	6
Figura 2. Estrutura molecular da cafeína (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010)	7
Figura 3. Tipos de DSC: com compensação de potência (a), com fluxo de calor (b) (Adaptado de BERNAL et al., 2002)	9
Figura 4. Modos de obtenção de dados em espectroscopia NIR:(a) Transmitância, (b) Transflectância, (c) Reflectância difusa, (d) Interactância, (e) Transmitância através de espalhamento médio (PASQUINI, 2003)	11
Figura 5. Classificação KNN de um objeto desconhecido usando $K = 3$ (BRERETON, 2007).....	15
Figura 6. Exemplo de codificação Binária (GOMES, 2012)	18

ARTIGO I

Figura 1. Curvas DSC: paracetamol na forma pura (A); medicamentos da marca M1 (B); medicamentos da marca M2 (C) e medicamentos da Marca M3 (D)	33
Figura 2. Curvas DSC das 37 amostras de medicamentos: brutas (A); após o pré-processamento com SNV (B)	34
Figura 3. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 <i>versus</i> PC2 para as amostras de medicamentos	35
Figura 4. Gráfico do custo de validação para seleção de temperaturas com o SPA-LDA	36
Figura 5. Resultados SPA-LDA: curva média com as temperaturas selecionadas (A); separação das classes (B)	37
Figura 6. Resultados GA-LDA: temperaturas selecionadas (A); separação das classes (B)	38
Figura 7. Erros de classificação no modelo KNN: para as amostras do conjunto de treinamento (A); para as amostras do conjunto de teste (B)	39

ARTIGO II

Figura 1. Espectros dos medicamentos: brutos (A); após o pré-processamento (B)	50
Figura 2. Gráfico de custo associado à seleção de variáveis com o SPA nos dados NIR	51
Figura 3. Resultados SPA-LDA: espectro médio com os comprimentos de onda selecionados pelo SPA (A); gráfico de separação das classes de medicamentos (B)	52
Figura 4. Resultados GA-LDA: comprimentos de onda selecionados pelo GA (A); gráfico de separação das classes de medicamentos (B)	53
Figura 5. Erros de classificação no KNN: para as amostras do conjunto de treinamento (A); para as amostras do conjunto de teste (B)	54

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1. Exemplos da aplicação da DSC na área farmacêutica 10

Tabela 2. Exemplos da aplicação da espectroscopia NIR na área farmacêutica 13

ARTIGO I

Tabela 1. Marcas de medicamentos analisados e seus excipientes 30

Tabela 2. Valores médios dos eventos endotérmicos apresentados nas curvas DSC dos medicamentos analisados 32

ARTIGO II

Tabela 1. Excipientes dos medicamentos analisados 48

Classificação de analgésicos utilizando técnica espectroscópica e termoanalítica associadas a métodos quimiométricos

Autor: **Fernando José de Lima Ramos Júnior**

Orientadora: **Ana Cláudia Dantas de Medeiros**

Coorientador: **José Germano Vêras Neto**

Nos últimos anos ocorreu um aumento significativo no uso de analgésicos, por exemplo, aqueles que contêm o paracetamol como ingrediente ativo farmacêutico, sendo indispensável para a indústria farmacêutica e os órgãos de fiscalização um rigoroso controle na produção desses medicamentos. Para tanto, faz-se necessário o aprimoramento das técnicas com aplicação de metodologias analíticas confiáveis, que sejam, de preferência, rápidas e de baixo custo, como, por exemplo, a Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Entretanto, mesmo essas técnicas possuindo amplo poder analítico, sua utilização é dificultada em amostras como medicamentos, pois os resultados apresentam-se complexos à interpretação direta, fazendo-se necessário o uso de métodos quimiométricos. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi analisar por calorimetria exploratória diferencial e por espectroscopia no infravermelho próximo, associadas a técnicas quimiométricas multivariadas, medicamentos a base de paracetamol e cafeína. Por isso, analisaram-se três marcas de medicamentos por DSC e duas classes de medicamentos por NIR. Tendo as curvas de DSC obtidas em atmosfera de nitrogênio (50 mL min^{-1}), na faixa de temperatura de 92,00 a 190,00 °C, com razão de aquecimento de 10 °C min^{-1} e pré-processadas com a técnica de Padrão Normal de Variação (SNV), e os espectros NIR obtidos num intervalo de 1.950 a 2.500 nm e pré-processados empregando-se a primeira derivada, com o filtro de Savitzky-Golay, polinômio de segunda ordem e janela de 19 pontos. Posteriormente, realizou-se a classificação dos analgésicos pelos modelos Análise Discriminante Linear (LDA) com Algoritmo das Projeções Sucessivas (SPA-LDA) e com Algoritmo Genético (GA-LDA) como técnicas de seleção de variáveis, e com o K-ésimo Vizinho Mais Próximo (KNN), além desses, os dados das curvas DSC também foram submetidos a Análise de Componentes Principais (PCA). Observou-se para os dados obtidos por DSC, que a PCA separou a marca M3 de M1 e M2; o SPA-LDA e GA-LDA apresentaram índice de acerto de 94,74 % para o conjunto de treinamento e 90,00 % para o conjunto de teste e o método KNN classificou as amostras com 100 % de sucesso. Por outro lado, para aqueles obtidos por NIR, no modelo SPA-LDA a taxa de acerto foi 97,77 % e 84,44 %; no GA-LDA 96,66 % e 93,33 %; e no método KNN 100 e 80 %, para o conjunto de treinamento e o de teste, respectivamente. Desse modo, a análise dos resultados obtidos permitiu inferir que as técnicas DSC e NIR associadas a métodos quimiométricos são alternativas eficientes ao uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com a vantagem de alcançarem resultados com rapidez, baixo custo e sem geração de resíduos poluentes, o que torna viável a utilização dessas técnicas para agilizar o controle da qualidade nas indústrias farmacêuticas, bem como, para auxiliar os órgãos de fiscalização na detecção rápida de adulterações em medicamentos.

Palavras-chave: Espectroscopia NIR; Calorimetria Exploratória Diferencial; Paracetamol; Cafeína; Controle da Qualidade; Quimiometria.

**Analgesics classification by using spectroscopic and thermoanalytical technique
associates to chemometric methods**

Author: **Fernando José de Lima Ramos Júnior**

Advisor: **Ana Cláudia Dantas de Medeiros**

Advisor: **José Germano Véras Neto**

In the last years occurred a significant increase in the use of analgesics, for example, those that contain acetaminophen as the active pharmaceutical ingredient, being essential for the pharmaceutical industry and the supervisory organs a rigorous control in the production of these medicines. Thus, it becomes necessary the improvement of techniques with the application of reliable analytical methodologies, which are, preferably, quick and low cost, as, for example, the Near Infrared (NIR) Spectroscopy and the Differential Scanning Calorimetry (DSC). Though, even being techniques with extensive analytical power, its use is hampered in samples such as medicines, because results are presented in a complex way for direct interpretation, making the use of chemometric methods necessary. In this context, the objective of this study was to analyze by differential scanning calorimetry and by near infrared spectroscopy, combined with multivariate chemometric techniques, medicines containing acetaminophen and caffeine. So, three brands of medicines were analyzed by DSC and two classes of medicines by NIR. Having the DSC curves obtained in nitrogen atmosphere (50 mL min^{-1}), in the temperature range from 92.00 to 190.00 °C, with heating rate of 10 ° C min^{-1} and preprocessed with the technique Standard Normal Variate (SNV), and the NIR spectra obtained in the interval from 1950 to 2500 nm and preprocessed employing the first derivative, with the filter Savitzky-Golay, second order polynomial and window of 19 points. Posteriorly, it was performed the analgesics classification using the models Linear Discriminant Analysis (LDA) with Successive Projection Algorithm (SPA) and with Genetic Algorithm (GA-LDA) as variable selection techniques, and the K-Nearest Neighbor (KNN), in addition, the DSC curves data were also submitted to Principal Components Analysis (PCA). It was observed for the data obtained by DSC, that the PCA separated the brand M3 of M1 and M2; SPA-LDA and GA-LDA presented a success rate of 94.74 % for the training set and 90,00 % for the test set and the KNN method classified the samples with 100 % of success. On the other hand, for those obtained by NIR, in the SPA-LDA model the success rate was 97.77 % and 84.44 %, in the GA-LDA 96.66 % and 93.33 %, and in the KNN method 100 % and 80 %, for training set and test set, respectively. Thereby, the analysis of the obtained results showed that DSC and NIR techniques aggregate to chemometric methods are efficient alternatives to the use of High Performance Liquid Chromatography (HPLC), with the advantage of achieving results quickly, low cost and without generating pollutant residues, making feasible the use of these techniques to streamline the quality control in pharmaceutical industries, as well as, to assist the surveillance authorities in the rapid detection of medicines adulteration.

Keywords: NIR Spectroscopy, Differential Scanning Calorimetry, Acetaminophen, Caffeine, Quality Control, Chemometrics.

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês “International Association for the Study of Pain”), dor “*é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com danos reais ou potenciais de tecidos, ou descrito em termos de tais danos*”. Este é, de fato, um fenômeno comum na atualidade graças ao aumento da longevidade e das mudanças nos hábitos de vida das pessoas, que causaram a diminuição da resistência ao sofrimento (VANDENBERGHE & FERRO, 2005; DELLAROZA et. al, 2008).

Como consequência do aumento no número de pessoas que sentem dor, ocorreu um aumento significativo do uso de analgésicos, por exemplo, aqueles que contêm o paracetamol como ingrediente ativo farmacêutico, que estão entre os medicamentos mais comercializados e consumidos no mundo, desde a década de 1940. (BASTIANI et al., 2005; BAGGIO & FORMAGGIO, 2009; SHIROMA et al., 2012; DOGRUL et al., 2012).

Nessa visão, portanto, torna-se indispensável para a indústria farmacêutica um rigoroso controle na produção de analgésicos, com a finalidade de se assegurar os padrões de qualidade, bem como para os órgãos de controle e fiscalização, para garantir a segurança e eficácia do medicamento disponibilizado comercialmente. Assim, faz-se necessário o aprimoramento das técnicas com aplicação de metodologias analíticas confiáveis, que sejam, de preferência, céleres e de baixo custo (CORDEIRO et al., 2008).

Dentro desse contexto, a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR, do inglês "near infrared") apresenta vantagens como ferramenta analítica para o controle da qualidade, pois tem uma reconhecida capacidade para análises quantitativas e qualitativas de parâmetros químicos, físicos e físico-químicos, além de ser uma técnica pouco laboriosa, de baixo custo, não-destrutiva da amostra, com medidas rápidas e sem uso de reagentes químicos (SOUZA et al, 2012).

Outra alternativa é a utilização de análise térmica, uma vez que há pouco tratamento das amostras (apenas trituração), não utilizam reagentes químicos e apresentam uma coleta de dados facilitada pela análise quase automática (MILTYK, ANTONOWICZ & KOMSTA, 2010; BÖER et al., 2013).

Assim, estas técnicas analíticas superam alguns inconvenientes da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que necessita de solventes e reagentes caros, de pessoal qualificado para a manipulação analítica e produz resíduos prejudiciais ao meio ambiente (SOUZA et al, 2012; KHANMOHAMMADI et al., 2012).

Entretanto, mesmo a análise térmica e a espectroscopia NIR permitindo a obtenção de uma grande quantidade de dados, a utilização dessas técnicas é dificultada em amostras como medicamentos, pois os resultados apresentam-se complexos à interpretação direta. Para solucionar esse problema pode-se recorrer a métodos quimiométricos, por exemplo, as técnicas de reconhecimento de padrões, com as quais é possível encontrar tendências nos dados a partir da similaridade entre grupos de amostras ou classificar amostras em classes pré-estabelecidas. Sendo assim, os métodos de análise multivariada podem facilitar a interpretação de dados farmacêuticos complexos, promovendo a classificação de amostras (MILTYK, ANTONOWICZ & KOMSTA, 2010; RAJALAHTI & KVALHEIM, 2011; KHANMOHAMMADI et al., 2012; SOUZA et al, 2012; DE SOUZA & POPPI, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Classificar medicamentos a base de paracetamol e cafeína por calorimetria exploratória diferencial e por espectroscopia no infravermelho próximo, associadas a técnicas quimiométricas multivariadas.

2.2 Objetivos específicos

- Construir modelos quimiométricos para classificação de medicamentos analgésicos em suas respectivas marcas por calorimetria exploratória diferencial;
- Construir modelos quimiométricos para classificação de medicamentos analgésicos como referência ou genéricos por espectroscopia no infravermelho próximo.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Indústria farmacêutica e legislação no Brasil

A indústria farmacêutica brasileira passou a existir em meados de 1930 com o surgimento das primeiras empresas com características industriais, logo em seguida, nas décadas de 1940 e 1950, o governo brasileiro incentivou a chegada de empresas internacionais, o que acarretou uma queda brusca nas importações de medicamentos, já que essas empresas produziam o produto final no país (PALMEIRA FILHO; PAN, 2003).

Com a promulgação da Lei 5.772 de 21/12/1971 que instituiu o Código de Propriedade Industrial, o qual não reconhecia patentes de produtos químicos e o decreto 68.806 de 25 de junho de 1971 que criou a Central de Medicamentos (Ceme), houve aumento na produção de cópias dos medicamentos patenteados, o que não foi suficiente para estimular a produção dos fármacos utilizados, que continuaram a ser importados (BURHALDE, 2005; SELAN, KANNEBLEY JÚNIOR & PORTO, 2007; PORTELA et al., 2010).

Assim, na tentativa de impulsionar a produção interna de fármacos houve em 1984 a edição da Portaria Interministerial nº 4, que acarretou na elevação de impostos e medidas de restrição a importação de alguns insumos. Paralelamente a isso foram adotadas medidas de controle nos preços dos medicamentos, que causaram o desabastecimento de alguns produtos avaliados como não-rentáveis e uma paralisação da indústria (PALMEIRA FILHO; PAN, 2003; SELAN, KANNEBLEY JÚNIOR & PORTO, 2007).

Em função desse entrave, na década de 1990 foram adotadas medidas inversas às tomadas nos anos anteriores, a exemplo da adoção de política de redução dos impostos de importação, eliminação das restrições à importação de insumos farmacêuticos, liberação dos preços dos medicamentos, promulgação da Lei de Patentes no Brasil, da Portaria MS 3.916/98 que estabeleceu a Política Nacional de Medicamentos, destacando-se ainda a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a promulgação da Lei 9.787 em 10/02/1999 (Lei dos Genéricos) (PALMEIRA FILHO; PAN, 2003).

A ANVISA possibilitou elevar os padrões sanitários da produção nacional de medicamentos a partir da criação de leis e regulamentos que garantiram a eficácia, segurança e qualidade dos produtos farmacêuticos comercializados. Assim foram instituídas normas, a exemplo das Boas Práticas de Fabricação (BPF), com o que se procurava estabelecer os requisitos mínimos a serem seguidos na fabricação de medicamentos, pretendendo-se, entre outras coisas, que houvesse diminuição dos riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica (contaminação-cruzada, contaminação por partículas, troca ou mistura de produto), os quais

poderiam ser detectados somente pela realização de ensaios nos produtos terminados (PALMEIRA FILHO; PAN, 2003; ANVISA, 2010).

Dessa forma, a partir da norma de Boas Práticas de Fabricação (BPF) passou-se a ser exigido que (ANVISA, 2010):

- todos os processos de fabricação fossem claramente definidos e sistematicamente revisados;
- as etapas que necessitassem de validação passem por esse procedimento;
- os procedimentos fossem desempenhados por pessoal qualificado e devidamente treinado, utilizando instalações e espaço adequados e identificados, munidos de equipamentos, sistemas computadorizados, serviços apropriados, materiais, recipientes e rótulos;
- fossem feitos registros durante a produção para demonstrar que todas as etapas constantes nos procedimentos e instruções tinham sido seguidas, bem como para possibilitar o rastreamento completo de um lote;
- se criasse um sistema eficiente para recolhimento de qualquer lote após sua comercialização ou distribuição;
- medidas para registrar e examinar reclamações sobre desvio da qualidade dos produtos fossem adotadas, procurando investigar as suas causas e tomando as medidas necessárias com relação a tais desvios, além de prevenir reincidências;
- os estabelecimentos com autorização para fabricar medicamentos tivessem um controle da qualidade independente dos demais setores, principalmente da produção.

O controle da qualidade na indústria estava relacionado com (GIL, 2010):

- a amostragem, especificações, ensaios, procedimentos de organização, documentação e procedimentos de liberação, com o intuito de assegurar que os ensaios importantes fossem efetuados e que a liberação dos materiais para uso não fosse efetuada antes de terem uma qualidade considerada satisfatória;
- o estabelecimento, validação e implementação de seus procedimentos;
- a manutenção e o armazenamento dos padrões de referências das substâncias ativas utilizadas;
- a rotulagem correta dos recipientes de materiais e produtos;
- a avaliação dos produtos acabados, considerando as condições de produção, os documentos de fabricação, o cumprimento das especificações do produto terminado e o exame da embalagem final;

- a garantia de monitoramento da estabilidade das substâncias ativas e dos produtos;
- o monitoramento ambiental; e
- todas as decisões relacionadas a qualidade do produto.

Por outro lado, a inserção dos medicamentos genéricos no mercado contribuiu para a expansão e fortalecimento do setor farmacêutico brasileiro e conseqüentemente para o aumento na oferta de medicamentos com preços em média 50 % mais baratos que os de referência. Dessa forma, a melhora na qualidade dos produtos farmacêuticos, associada a sua maior oferta e com preços mais acessíveis colaborou para o Brasil alcançar a sexta posição na classificação global de consumo de medicamentos no ano de 2011, com perspectiva de tornar-se o quarto país em consumo no ano de 2016 (PRÓ GENÉRICOS, 2011; IMS, 2012).

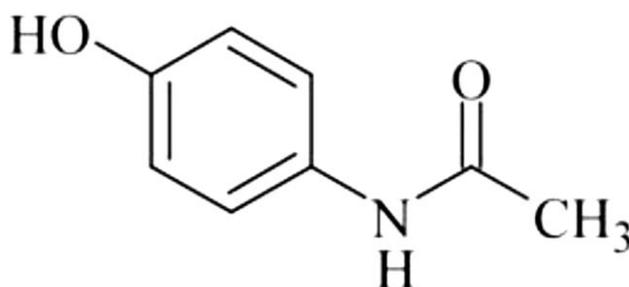
3.2 Analgésicos

Dentre as inúmeras classes de medicamentos utilizadas no Brasil destaca-se a dos analgésicos, em especial os agentes anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's), que, segundo dados da companhia *Boehringer Ingelheim*, apresenta três substâncias que detêm 95 % do mercado brasileiro, sendo os medicamentos que contêm dipirona com 39 %, seguido de paracetamol com 30 % e ácido acetilsalicílico com 26 % das vendas (MELO et al., 2013).

3.2.1 Paracetamol

O paracetamol, amida aromática derivada da fenacetina, denominado acetaminofeno, N-acetil-p-aminofenol ou N-(4-Hidroxifenil)acetamida (Figura 1), foi utilizado pela primeira vez na medicina por Von Mering em 1893 como antipirético e analgésico (SUAREZ, VIEIRA & FATIBELLO-FILHO, 2005).

Figura 1. Estrutura molecular do Paracetamol (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010)



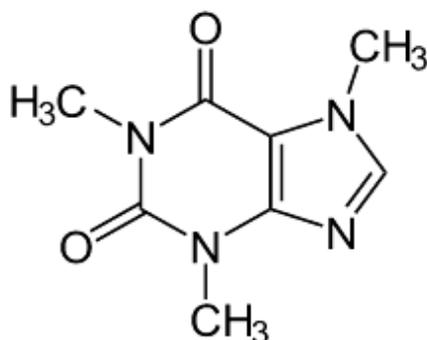
Atualmente, apresenta-se como um substituto da aspirina por apresentar pouca incidência de efeitos colaterais gastrointestinais. Todavia, esta substituição não é indicada em casos de artrite reumatoide devido sua ação anti-inflamatória fraca, que supostamente deve-se a pequena capacidade de inibição da cicloxigenase (COX), na presença de peróxidos como ocorre nas inflamações (LOURENÇÃO et al., 2009; BRUNTON, CHABNER & KNOLLMANN, 2012).

Mesmo apresentando as ações supracitadas quando utilizado de forma individual, é possível encontrar no mercado a combinação do paracetamol com analgésicos narcóticos e não-narcóticos, barbitúricos, anti-histamínicos, antitussígenos, descongestionantes, expectorantes, cafeína, entre outros (BRUNTON, CHABNER & KNOLLMANN, 2012).

3.2.2 Cafeína

A cafeína, denominada 1,3,7-trimetilxantina ou 3,7-Diidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona (Figura 2), é um alcaloide do grupo das xantinas que apresenta como efeitos fisiológicos a secreção do ácido gástrico, diurese e a estimulação do sistema nervoso central (DE MARIA & MOREIRA, 2007; LOURENÇÃO et al., 2009).

Figura 2. Estrutura molecular da cafeína (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010)



Sendo responsável por alterações na resistência física, no humor, no sono e na dor, as quais podem ser apresentadas como um aumento do estado de alerta e diminuição da fadiga, alterações negativas na qualidade do sono, irritabilidade em indivíduos ansiosos e efeito analgésico adjuvante, devido à ação antinociceptiva intrínseca, aparentemente obtida pelo bloqueio dos receptores da adenosina ou alterações na atividade ou síntese das ciclooxigenases em alguns sítios, o que tem contribuído para que essa substância seja comumente associada a analgésicos, a exemplo do paracetamol (DE MARIA & MOREIRA, 2007; TAVARES & SAKATA, 2012; GODOY, GONÇALVES & MORAES, 2012).

3.3 Método padrão para determinação simultânea de fármacos em preparações farmacêuticas

A associação de fármacos é uma prática comum na indústria farmacêutica por possibilitar um aumento dos ganhos terapêuticos com a maior aceitação dos pacientes ao tratamento medicamentoso. Entretanto, a junção de substâncias torna difícil o controle da qualidade, uma vez que a quantificação de qualquer componente da formulação torna-se complicada, sendo recomendado pelos órgãos de fiscalização para o controle da qualidade de medicamentos o uso de métodos cromatográficos (CORDEIRO et al., 2008).

Destaca-se, neste caso, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção ultravioleta (UV), que segundo a farmacopeia americana é o método padrão para quantificação de dois ou mais ingredientes ativos presentes numa mesma formulação. Vale ressaltar, no entanto, que mesmo possuindo um alto poder analítico, a CLAE é uma técnica relativamente complicada, devido, dentre outras coisas, as inúmeras etapas na preparação da amostra, a necessidade de solventes caros e com elevado grau de pureza para as análises, além de pessoal qualificado para a manipulação analítica e a produção de resíduos prejudiciais ao meio ambiente (SUAREZ, VIEIRA & FATIBELLO-FILHO, 2005; LOURENÇÃO et al., 2009; SANTOS et al., 2009; KHANMOHAMMADI et al., 2012; SOUZA et al., 2012).

Por exemplo, segundo a farmacopeia americana (2007), para quantificação simultânea dos ingredientes ativos paracetamol e cafeína presentes em comprimidos são necessários três tipos de solventes (água, metanol e ácido acético glacial), um padrão interno (ácido benzoico), pesagem e trituração de vinte comprimidos, preparação de quatro soluções (uma estoque, uma padrão e duas para ensaio), coluna cromatográfica mantida em temperatura constante, entre outras coisas. Diante de tal complexidade torna-se necessário a busca por metodologias alternativas a CLAE, que sejam rápidas, de menor custo e que possam ser usadas para determinação simultânea de ingredientes ativos farmacêuticos, garantindo a eficácia e segurança dos medicamentos (CORDEIRO et al., 2008).

3.4 Técnicas alternativas

Conscientes da necessidade de pesquisa de técnicas alternativas que superem os inconvenientes dos métodos cromatográficos, pesquisadores têm proposto vários métodos para análise multicomponente empregando técnicas como: voltametria (LOURENÇÃO et al., 2009; SANGHAVI & SRIVASTAVA, 2010), amperometria (SILVA et al., 2011), espectrofluorometria (ALVES & POPPI, 2013), calorimetria exploratória diferencial (DSC) (MILTYK, ANTONOWICZ & KOMSTA, 2010) e espectroscopia no infravermelho próximo

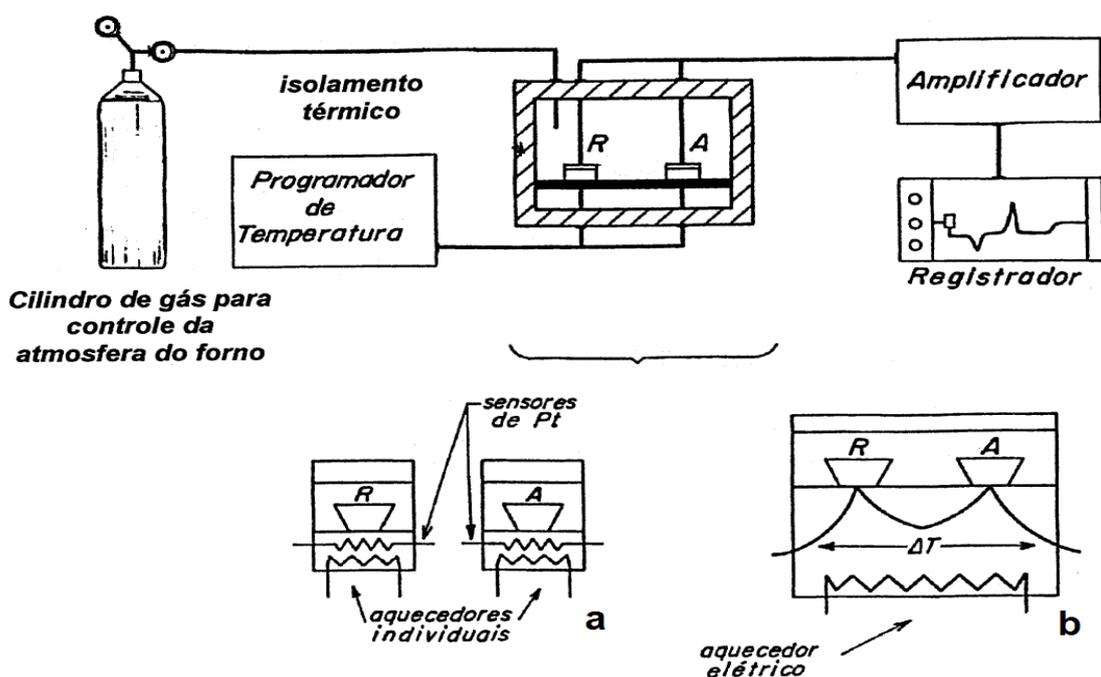
(NIR) (DOU et al., 2007; ITO et al., 2010; FENG, ZHANG & HU, 2010; BOYER et al., 2012).

3.4.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Em análise térmica sistemas foram criados para medir a variação de temperatura e de energia, quando uma substância é submetida a processos de aquecimentos e/ou resfriamentos, possibilitando a avaliação da tendência entálpica, o conteúdo de calor e o calor específico dos materiais estudados. Uma das técnicas desenvolvidas é a DSC, com a qual é possível medir a diferença de energia fornecida a uma substância e a um material de referência, enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura (STORPIRTIS et al., 2009).

Dois tipos de DSC foram criados, a com compensação de potência (Figura 4a) e a com fluxo de calor (Figura 4b). No primeiro tipo é possível manter a amostra e a referência em temperatura constante, pois ambas são aquecidas em fornos separados. Por exemplo, se a amostra sofre mudanças de temperatura procedentes de eventos endotérmicos ou exotérmicos, haverá modificação na potência de entrada do forno correspondente, para mantê-la em condição isotérmica com o material de referência; já no segundo tipo, a amostra e a referência são colocadas no mesmo forno e sofrem aquecimento por uma única fonte de calor (BERNAL et al., 2002; STORPIRTIS et al., 2009).

Figura 3. Tipos de DSC: com compensação de potência (a), com fluxo de calor (b)
(Adaptado de BERNAL et al., 2002)



Distinções a parte, DSC mostra-se vantajosa em relação a diversas técnicas analíticas por (MATHKAR et al., 2009; MILTYK; ANTONOWICZ & KOMSTA, 2010):

- não requerer um padrão de referência para análise de pureza;
- apresentar um tempo total de análise menor quando comparado, por exemplo, aos métodos cromatográficos na determinação de pureza;
- necessitar de quantidades mínimas de amostra (~1-5 mg);
- exigir pouco trabalho manual, já que os materiais praticamente não sofrem tratamento prévio, passando apenas pelo processo de trituração e
- proporcionar baixo custo das análises, pois não são necessários solventes, colunas, placas, entre outras coisas.

3.4.1.1 Aplicações farmacêuticas da DSC

Os dados obtidos com as curvas DSC fornecem informações qualitativas e quantitativas de um material em relação à quantidade de calor envolvida em processos endotérmicos ou exotérmicos. Assim, há possibilidade de analisar mudança de estado físico, modificações na estrutura cristalina, reações de desidratação, de decomposição, de oxirredução, entre outras (STORPIRTIS et al., 2009), caracterizando, com isso, seu emprego em diversos estudos (Tabela 1).

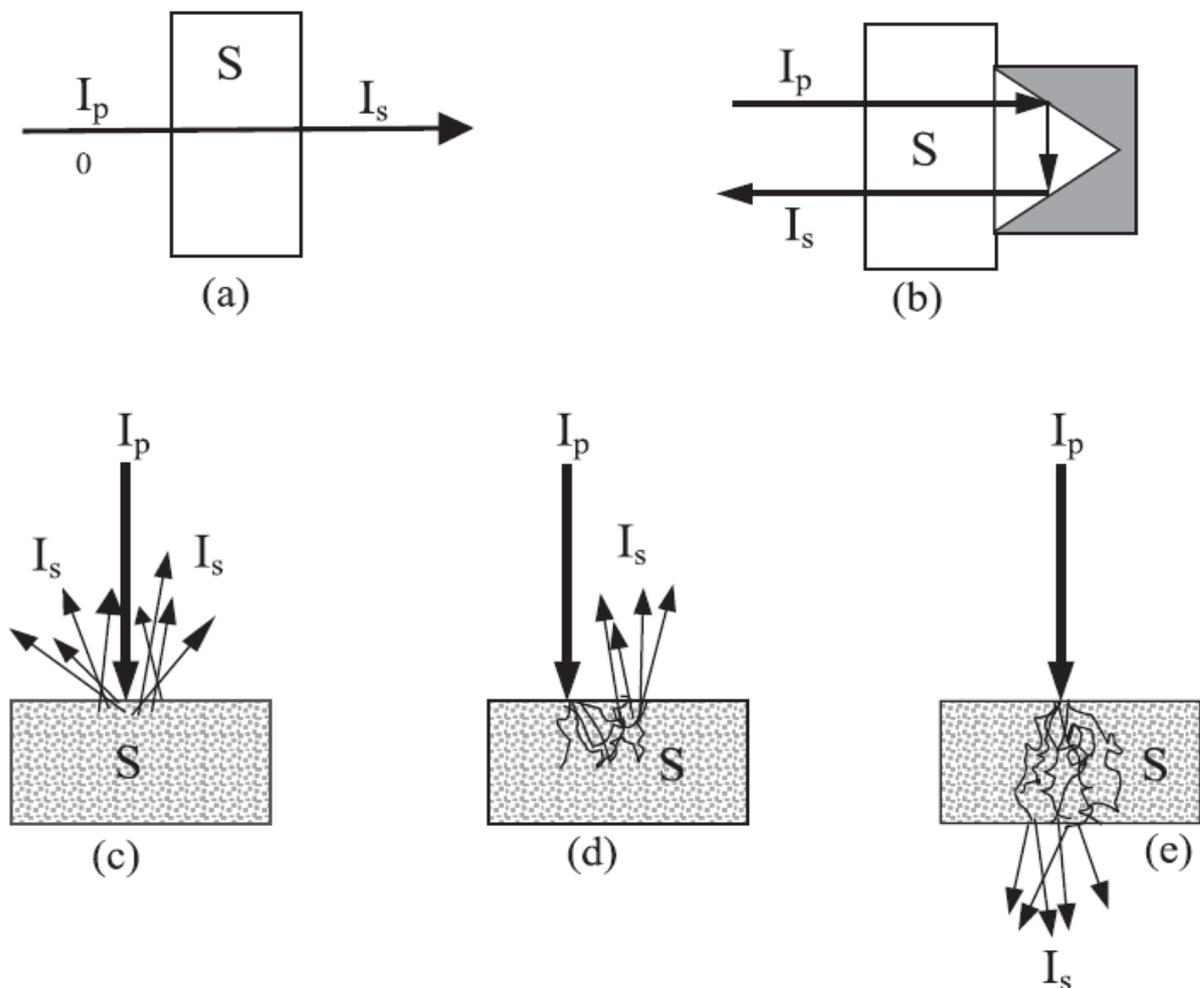
Tabela 1. Exemplos da aplicação da DSC na área farmacêutica

Tipo de Amostra	Aplicação	Ref.
Matéria-prima	Caracterização do tacrolimo.	(BÖER et al., 2013)
Matéria-prima	Avaliação da pureza polimórfica da nateglinida.	(BRUNI et al., 2011)
Matéria-prima	Avaliação da pureza de substâncias químicas de referência.	(GAO, DING & HU, 2011)
Matéria-prima	Estudo de compatibilidade entre cetoprofeno e excipientes farmacêuticos.	(TIȚA et al., 2011)
Comprimidos	Caracterização da sinvastatina.	(OLIVEIRA et al., 2010)
Matéria-prima	Avaliação da pureza de padrões de referência.	(MATHKAR et al., 2009)
Matéria-prima	Comparação da qualidade tecnológica.	(MEDEIROS et al., 2007)

3.4.2 Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)

A espectroscopia NIR é uma técnica espectroscópica vibracional, que emprega a energia de fótons em comprimentos de onda que variam de 750 a 2500 nm, promovendo a interação entre as ondas eletromagnéticas do infravermelho próximo e os constituintes de uma amostra. Inicialmente era uma técnica com um único tipo de medição, a qual era obtida a partir de informações provenientes de parte da radiação difusa refletida, por uma amostra sólida. Atualmente, apresenta várias formas de medidas para obtenção de resultados, como transmitância, transflectância, reflectância difusa, interactância e transmitância através de espalhamento médio (Figura 3) (PASQUINI, 2003).

Figura 4. Modos de obtenção de dados em espectroscopia NIR: (a) Transmitância, (b) Transflectância, (c) Reflectância difusa, (d) Interactância, (e) Transmitância através de espalhamento médio (PASQUINI, 2003)



Na medição por transmitância (Figura 4a) e transflectância (Figura 4b) as medidas são realizadas com a ajuda de cubetas de vidros ou quartzo, cujos caminhos ópticos variam de 1 a 50 mm e são determinados com base na região espectral escolhida para análise. Por ser uma forma especial de obtenção de resultados de transmitância, a transflectância difere apenas pelo caminho óptico do feixe de radiação que é dobrado, passando duas vezes pela amostra; na refletância difusa (Figura 4c), forma de medida comumente utilizada para sólidos (pó, placa, filme), a luz incide na amostra, penetra e reflete trazendo informações espectrais, podendo o caminho da luz no interior da amostra ser considerado aleatório por apresentar várias reflexões, algumas após percorrer alguns constituintes da matriz; no modo interactância (Figura 4d) há uma maior possibilidade de interação do feixe de luz com a amostra, permitindo que sejam obtidas mais informações sobre seus constituintes e por transmitância através de espalhamento médio (Figura 4e), tem sido utilizada para quantificação de ingredientes ativos farmacêuticos, pois o caminho óptico mais longo pode fornecer informações mais bem correlacionadas com o seu teor médio (PASQUINI, 2003; SOUZA & FERRÃO, 2006).

De modo geral, os sinais espectrais da região do NIR são decorrentes de sobretons e bandas de combinação das transições vibracionais fundamentais de C-H, N-H, O-H e S-H, o que torna os espectros comumente largos e sobrepostos, dificultando uma atribuição precisa de picos. Mesmo assim, graças a sua rapidez na aquisição de dados, por não destruir e/ou provocar qualquer dano à amostra, minimizar a geração de resíduos, permitir a análise de componentes que estejam em concentrações aproximadamente superiores a 0,5 % m/m e obter resultados que permitem a determinação de moléculas e variáveis qualitativas, esta técnica vem sendo empregada com frequência nas áreas agrícola, alimentícia, médica, têxtil, de cosméticos, de polímeros, de tintas, ambiental, petroquímica, florestal e farmacêutica (LIMA et al., 2009; MANTANUS et al., 2009; MUÑIZ et al., 2012; DE SOUZA et al., 2013).

3.4.2.1 Aplicações farmacêuticas da espectroscopia NIR

Vários parâmetros farmacêuticos podem ser analisados pela espectroscopia no NIR, pois seus espectros apresentam informações sobre a composição química e as propriedades físicas das amostras (ROGGO et al., 2007). Assim, essa técnica é utilizada com diferentes finalidades na área farmacêutica (Tabela 2).

Tabela 2. Exemplos da aplicação da espectroscopia NIR na área farmacêutica

Tipo de Amostra	Aplicação	Ref.
Comprimidos	Quantificação de polimorfo contaminante.	(HENNIGAN & RYDER, 2013)
Comprimidos	Determinação da espessura de revestimento.	(BIKIARIS et al., 2012)
Comprimidos	Quantificação simultânea de azitromicina e artesunato.	(BOYER et al., 2012)
Comprimidos	Quantificação do ingrediente ativo farmacêutico e uniformidade de conteúdo.	(CRUZ & BLANCO, 2011)
Pellets	Determinação do teor de umidade.	(MANTANUS et al., 2009)
Suspensão	Determinação do teor de alumínio.	(LAI et al., 2007)
Cápsulas	Identificação de matérias-primas e uniformidade de conteúdo.	(PARIS et al., 2006)

3.5 Quimiometria

A chegada dos computadores aos laboratórios permitiu que métodos analíticos como a espectroscopia NIR e a DSC gerassem um grande volume de resultados complexos, o que tornou necessária a aplicação de técnicas mais robustas para sua interpretação, pois as teorias da química clássica não podiam explicá-los. Dentre as técnicas utilizadas, destacam-se as quimiométricas, que iniciaram seu desenvolvimento na primeira metade de 1970 e atualmente são aplicadas na resolução de problemas que envolvam métodos químico-analíticos a partir do uso de processos matemáticos, estatísticos e computacionais para selecionar, interpretar, classificar e prever informações de interesse químico (DE BARROS NETO; SCARMINIO & BRUNS, 2006; OTTO, 2007; DE SOUZA & POPPI, 2012; FERREIRA NETO, 2012).

Com essa variedade de funções, tornou-se possível a identificação de amostras, a análise de misturas complexas e a determinação simultânea de analitos sem a necessidade de uma prévia separação dos componentes das misturas ou pré-processamentos das amostras. Assim, de acordo com a finalidade pretendida, é possível empregar diferentes ferramentas para tratamento dos dados, dentre elas destaca-se as de reconhecimento de padrões (NUNES, 2008; DE SOUZA & POPPI, 2012).

3.5.1 Reconhecimento de padrões

São métodos que permitem verificar as similaridades e diferenças entre grupos de amostras, que foram submetidas a algum tipo de análise, podendo ser empregadas com diferentes objetivos e são classificadas em técnicas não supervisionadas, a exemplo da análise de componentes principais (PCA, do inglês, Principal Component Analysis); e técnicas supervisionadas, dentre eles o K-ésimo vizinho mais próximo (KNN, do inglês, “K-Nearest Neighbor”) e a análise discriminante linear (LDA, do inglês, “Linear Discriminant Analysis”) (DE BARROS NETO; SCARMINIO & BRUNS, 2006; BERRUETA; ALONSO-SALCES & HÉBERGER, 2007; CORREIA & FERREIRA, 2007; ROGGO et al., 2007; PONTES, 2009, DE SOUZA & POPPI, 2012).

3.5.1.1 PCA

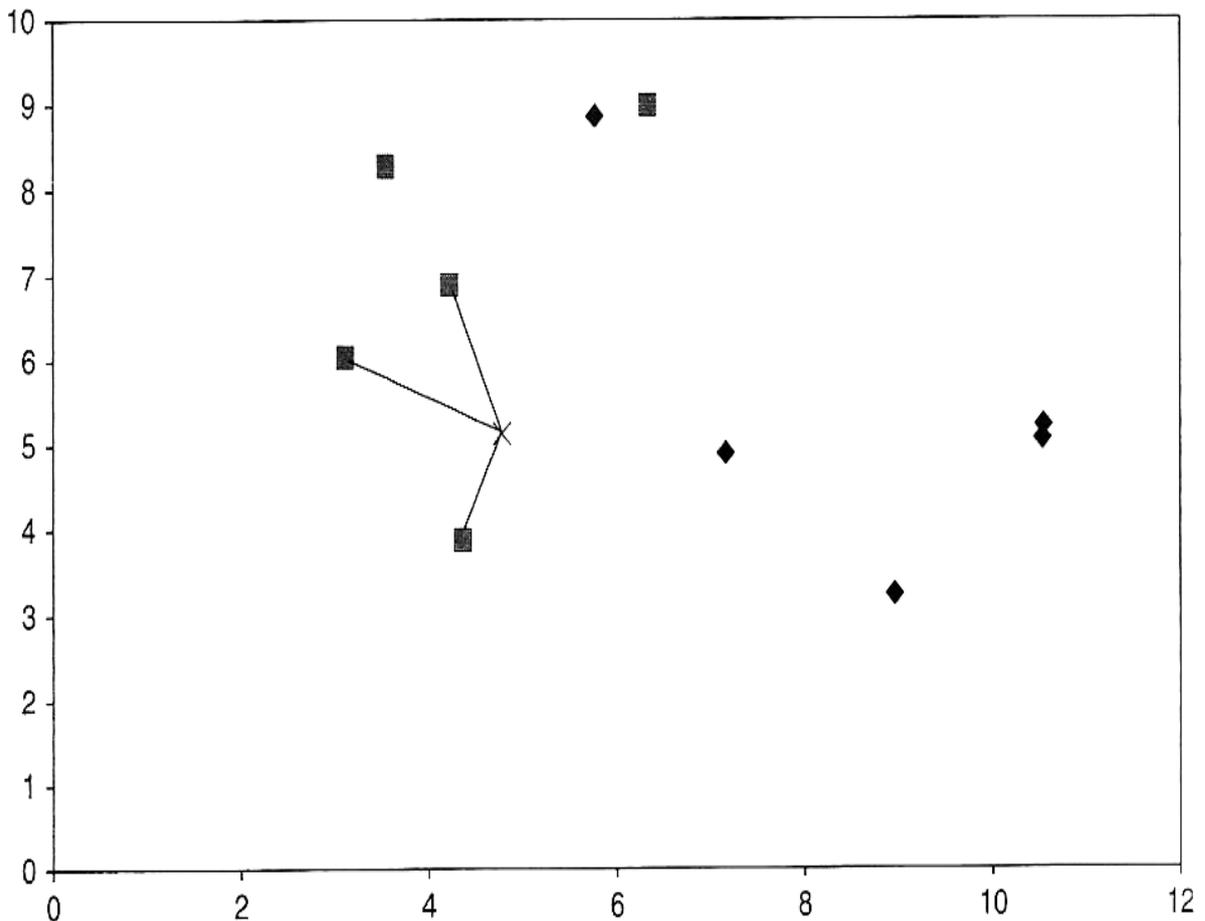
A PCA é uma das técnicas mais empregadas no tratamento de dados multivariados, sendo utilizada comumente para visualização da estrutura desses dados, descobrir semelhança entre as amostras, detectar amostras anômalas (“outliers”) e diminuir a dimensionalidade do conjunto de dados (SABIN, FERRÃO & FURTADO, 2004; DE SOUZA & POPPI, 2012).

A redução da dimensionalidade permite que sejam expressas, em um menor número de novas variáveis (componentes principais), as informações mais importantes do conjunto de variáveis originais. Assim, com a PCA é possível representar o conjunto de dados em componentes principais (PC, do inglês, "Principal Component"), possibilitando observar as características dos dados em poucas dimensões (DE SOUZA & POPPI, 2012; TEÓFILO, 2013).

3.5.1.2 KNN

No método KNN, a distância euclidiana de um objeto desconhecido é calculada em relação às k -ésimas amostras vizinhas, sendo considerado pertencente à classe que tenha a maioria das amostras do conjunto de treinamento que possuam as menores distâncias em relação a amostra desconhecida (Figura 5). (DE BARROS NETO; SCARMINIO & BRUNS, 2006; ROGGO et al., 2007; OTTO, 2007).

Figura 5. Classificação KNN de um objeto desconhecido usando $K = 3$ (BRERETON, 2007)



Mesmo sendo um método que apresenta simplicidade matemática, os resultados de classificação obtidos com o KNN são bons, tanto quanto os obtidos por outras técnicas mais complexas de reconhecimento de padrão. Além disso, sua utilização mostra-se vantajosa por (BERRUETA; ALONSO-SALCES & HÉBERGER, 2007):

- não estar sujeita a interferências estatísticas, a exemplo da distribuição normal das variáveis e
- não depender do espaço de distribuição das classes.

3.5.1.3 LDA

A LDA, uma das técnicas de padrão supervisionado mais utilizada, pode ser considerada como um método de redução de dimensionalidade, pois tem como fundamento a determinação de funções discriminantes lineares, que aumentam a variância interclasse e diminui a variância intraclasse (BERRUETA; ALONSO-SALCES & HÉBERGER, 2007; PONTES, 2009).

A função discriminante é conseguida pela combinação linear das variáveis originais. Assim, se um estudo de classificação oferecer “c” classes de amostras, “c – 1” funções discriminantes poderão ser determinadas se o número de variáveis for maior do que “c” (PONTES, 2009).

O excesso de variáveis é uma das principais limitações da técnica LDA, pois restringe a escolha e o desempenho desse método de reconhecimento de padrão, uma vez que muitas dessas variáveis são redundantes e/ou não informativas e outras são importantes, mas inicialmente são desconhecidas (PONTES, 2009).

Nesse contexto, portanto, considerando que a técnica LDA apresenta problemas, como, por exemplo (PONTES, 2009):

- necessidade de um número de amostras maior que o número de variáveis a serem incluídas no modelo;
- adequação exclusivamente para conjuntos de dados de pequenas dimensões e
- habilidade de generalização afetada por problemas de colinearidade.

Seu uso para fins de classificação necessita de seleção de variáveis (PONTES, 2009).

3.5.2 Técnicas de seleção de variáveis

Problemas relacionados ao tamanho da matriz são comuns em análises multivariadas, pois a melhoria da informática permitiu o desenvolvimento de equipamentos ágeis na produção de grandes quantidades de informações, muitas sem utilidade para construção de um modelo que relacione o sinal analítico medido com o parâmetro de interesse. Nestes casos, torna-se necessária a utilização de algoritmos de seleção de variáveis, com os quais é descoberto o subconjunto de preditores que podem melhorar os resultados ou mantê-los constante em termo de erros (PONTES, 2009; GOMES, 2012). Dentre eles destacam-se o algoritmo das projeções sucessivas (SPA, do inglês, “Successive Projections Algorithm”) e o algoritmo genético (GA, do inglês, “Genetic Algorithm”).

3.5.2.1 SPA

Proposto por Araújo et al. (2001), o SPA foi inicialmente proposto para minimizar os problemas de colinearidade na regressão linear múltipla (MLR, do inglês, “Multiple Linear Regression”), sendo posteriormente estendido para solucionar os problemas de classificação quando a LDA é utilizada. Tal fato foi possível graças à minimização de colinearidade proporcionada pelo SPA (PONTES, 2009; SOARES et al., 2010).

Segundo Soares et al. (2010), essa técnica apresenta duas fases fundamentais:

- Na primeira, são realizadas operações de projeção na matriz de respostas instrumentais, sendo essas projeções utilizadas para gerar as redes de variáveis cujos elementos são escolhidos para apresentarem a menor colinearidade e
- Na segunda, a partir das cadeias originadas na primeira fase são tirados os subconjuntos de variáveis, os quais são avaliados por um índice de desempenho, que em SPA-LDA, por exemplo, relaciona-se ao risco de erros de classificação.

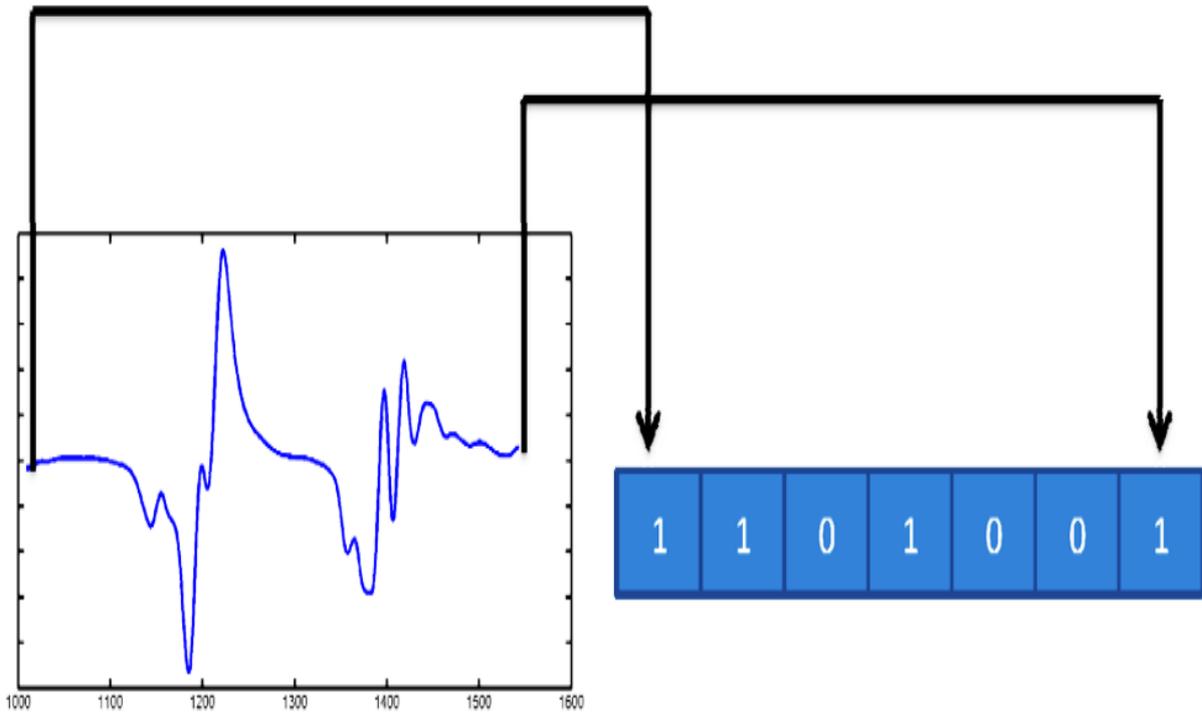
3.5.2.2 GA

A partir da “Teoria da Evolução das Espécies” de Charles Darwin, John H. Holland, pesquisador da Universidade de Michigan, propôs em 1960 o Algoritmo Genético para otimizar sistemas complexos, que veio ganhar força somente duas décadas após seu lançamento graças a sua versatilidade, aos ótimos resultados que eram obtidos e principalmente a popularização dos computadores, com o surgimento de sistemas céleres e potentes (COSTA FILHO & POPPI, 1999; GOMES, 2012; MELO et al., 2013).

Na seleção de variáveis, o GA envolve cinco passos. O primeiro relaciona-se a codificação das variáveis como se fossem cromossomos biológicos, sendo utilizada, neste

caso, a codificação binária na qual cada variável é um gene e recebe valor 0 ou 1, significando respectivamente não incluída ou incluída no modelo (Figura 6) (GOMES, 2012).

Figura 6. Exemplo de codificação Binária (GOMES, 2012)



No segundo passo, um gerador randômico cria uma população inicial aleatória, garantido que não haverá influência do meio externo. No passo seguinte, ocorre a avaliação da capacidade de originar melhores respostas (aptidão), no caso da seleção de variáveis, quando maior a aptidão menor o erro de predição obtido (COSTA FILHO & POPPI, 1999; GOMES, 2012).

Os resultados com boa aptidão são escolhidos para próxima fase do algoritmo, a reprodução, na qual a partir do cruzamento aleatório de pares de cromossomos as características dominantes começam a prevalecer na população, levando a convergência do algoritmo. Conjuntamente com essa etapa, ocorre a mutação, na qual há substituição de 0 ou 1 e vice e versa, em um gene de alguns indivíduos. Ao final, o subconjunto de variáveis que produzir o melhor resultado é a solução apresentada pelo GA (COSTA FILHO & POPPI, 1999; GOMES, 2012).

REFERÊNCIAS

- ALVES, J.C.L.; POPPI, R.J. Pharmaceutical analysis in solids using front face fluorescence spectroscopy and multivariate calibration with matrix correction by piecewise direct standardization. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol.103, p.311-318, 2013.
- ANVISA. RDC nº 17, de 16 de abril de 2010.
- ARAÚJO, M.C.U.; SALDANHA, T.C.B.; GALVÃO, R.K.H.; YONEYAMA, T.; CHAME, H.C.; VISANI, V. The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol.57, p.65-73, 2001.
- BAGGIO, M.A.; FORMAGGIO, F.M. Automedicação: desvelando o descuidado de si dos profissionais de enfermagem. *Revista Enfermagem UERJ*, vol.17, n.2, p.224-228, 2009.
- BASTIANI, A.; ABREU, L.C.; SILVEIRA, K.L.; LIMBERGER, J.B. O uso abusivo de medicamentos. *Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde*, vol.6, n.1, p.27-33, 2005.
- BERNAL, C.; COUTO, A.B.; BREVIGLIERI, S.T.; CAVALHEIRO, E.T.G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. *Química Nova*, vol.25, n.5, p.849-855, 2002.
- BERRUETA, L.A.; ALONSO-SALCES, R.M.; HÉBERGER, K. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, vol.1158, p.196-214, 2007.
- BIKIARIS, D.; KOUTRI, I.; ALEXIADIS, D.; DAMTSIOS, A.; KARAGIANNIS, G. Real time and non-destructive analysis of tablet coating thickness using acoustic microscopy and infrared diffuse reflectance spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, vol.438, p.33-44, 2012.
- BÖER, T.M.; PROCÓPIO, J.V.V.; NASCIMENTO, T.G.; MACÊDO, R.O. Correlation of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC–MS in the characterization of tacrolimus. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.73, p.18-23, 2013.
- BOYER, C.; GAUDIN, K.; KAUSS, T.; GAUBERT, A.; BOUDIS, A.; VERSCHOLDEN, J.; FRANC, M.; ROUSSILLE, J.; BOUCHER, J.; OLLIARO, P.; WHITE, N. J.; MILLET, P.; DUBOST, J.-P. Development of NIRS method for quality control of drug combination artesunate–azithromycin for the treatment of severe malaria. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.67-68, p.10-15, 2012.
- BRERETON, R.G. *Applied chemometrics for scientists*, Inglaterra, Wiley, 2007, cap.5.

- BRUNI, G.; BERBENNI, V.; MILANESE, C.; GIRELLA, A.; CARDINI, A.; LANFRANCONI, S.; MARINI, A. Determination of the nateglinide polymorphic purity through DSC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.54, p.1196-1199, 2011.
- BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman*, 12 ed., São Paulo, AMGH, 2012, cap.34.
- BURHALDE, A.J. Indústria farmacêutica brasileira e mundial: uma revisão histórica de suas origens e de seu desenvolvimento. *Opinio: Revista de Ciências Empresariais, Políticas e Sociais*, n.15, p.63-66, 2005.
- CORDEIRO, G.A.; PERALTA-ZAMORA, P.; NAGATA, N.; PONTAROLLO, R. Determinação de misturas de sulfametoxazol e trimetoprima por espectroscopia eletrônica multivariada. *Química Nova*, vol.31, n.2, p.254-260, 2008.
- CORREIA, P.R.M.; FERREIRA, M.M.C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Química Nova*, vol.30, n.2, p.481-487, 2007.
- COSTA FILHO, P.A.; POPPI, R.J. Algoritmo genético em química. *Química Nova*, vol.22, n.3, p.405-411, 1999.
- CRUZ, J.; BLANCO, M. Content uniformity studies in tablets by NIR-CI. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.56, p.408-412, 2011.
- DE BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. 25 anos de quimiometria no Brasil. *Química Nova*, vol.29, n.6, p.1401-1406, 2006.
- DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. *Química Nova*, vol.30, n.1, p.99-105, 2007.
- DE SOUZA, A.M.; BREITKREITZ, M.C.; FILGUEIRAS, P.R.; ROHWEDDER, J.J.R.; POPPI, R.J. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. *Química Nova*, vol.36, n.7, p.1057-1065, 2013.
- DE SOUZA, A.M.; POPPI, R.J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. *Química Nova*, vol.35, n.1, p.223-229, 2012.

DELLAROZA, M.S.G.; FURUYA, R.K.; CABRERA, M.A.S.; MATSUO, T.; TRELHA, C.; YAMADA, K.N.; PACOLA, L. Caracterização da dor crônica e métodos analgésicos utilizados por idosos da comunidade. *Revista da Associação Médica Brasileira*, vol.54, n.1, p.36-41, 2008.

DOGRUL, A.; SEYREK, M.; AKGUL, E.O.; CAYCI, T.; KAHRAMAN, S.; BOLAY, H. Systemic paracetamol-induced analgesic and antihyperalgesic effects through activation of descending serotonergic pathways involving spinal 5-HT7 receptors. *European Journal of Pharmacology*, vol.677, p.93-101, 2012.

DOU, Y.; QU, N.; WANG, B.; CHI, Y.Z.; REN, Y.L. Simultaneous determination of two active components in compound aspirin tablets using principal component artificial neural networks (PC-ANNs) on NIR spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, [vol.3, n.2, p.193-199, 2007.

Farmacopéia Brasileira, 5 ed., volume 2, Brasília, 2010.

FENG, Y.-C.; ZHANG, X.-B.; HU, C.-Q. Construction of identification system for non-invasive analysis of macrolides tablets using near infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.51, p.12–17, 2010.

FERREIRA NETO, F. *Determinação do teor de diclofenaco sódico em comprimidos por espectroscopia no infravermelho próximo – NIR com calibração multivariada – PLS*. Natal, Programa de Pós-Graduação em Química – UFRN, 2012. Dissertação de mestrado.

GAO, J.-M.; DING, L.-X.; HU, C.-Q. A comparative uncertainty study of the purity assessment of chemical reference substances using differential scanning calorimetry (DSC) and mass balance method. *Thermochimica Acta*, vol.525, p.1-8, 2011.

GIL, E.S. *Controle físico-químico de qualidade de medicamentos*, 3 ed., São Paulo, Pharmabooks, 2010, cap.4.

GODOY, H.R.V.; GONÇALVES, F.B.; MORAES, C.F. Associação de cafeína ao paracetamol no tratamento da dor. *Revista de Medicina e Saúde de Brasília*, vol.1, n.3, p.169-173, 2012.

GOMES, A.A. *Algoritmo das Projeções Sucessivas aplicado à seleção de variáveis em regressão PLS*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química – UFPB, 2012. Dissertação de Mestrado.

HENNIGAN, M.C.; RYDER, A.G. Quantitative polymorph contaminant analysis in tablets using Raman and near infra-red spectroscopies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol.72, p.163-171, 2013.

IMS. Institute for Healthcare Informatics. *The global use of medicines: outlook through 2016*. Disponível em: http://www.imshealth.com/deployedfiles/ims/Global/Content/Insights/IMS%20Institute%20for%20Healthcare%20Informatics/Global%20Use%20of%20Meds%202011/Medicines_Outlook_Through_2016_Report.pdf. Acesso em: 28 de novembro de 2013.

ITO, M.; SUZUKI, T.; YADA, S.; NAKAGAMI, H.; TERAMOTO, H.; YONEMOCHI, E.; TERADA, K. Development of a method for nondestructive NIR transmittance spectroscopic analysis of acetaminophen and caffeine anhydrate in intact bilayer tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.53, p.396-402, 2010.

KHANMOHAMMADI, M.; SOLEIMANI, M.; MOROVVAT, F.; GARMARUDI, A. B.; KHALAFBEIGI, M.; GHASEMI, K. Simultaneous determination of paracetamol and codeine phosphate in tablets by TGA and chemometrics. *Thermochimica Acta*, vol.530, p.128-132, 2012.

LAI, X.; ZHENG, Y.; SØNDERGAARD, I.; JOSEPHSEN, H.; LØWENSTEIN, H.; LARSEN, J.N.; IPSEN, H.; JACOBSEN, S. Determination of aluminium content in aluminium hydroxide formulation by FT-NIR transmittance spectroscopy. *Vaccine*, vol.25, n.52, p.8732-8740, 2007.

LIMA, K.M.G.; RAIMUNDO JR., I.M.; SILVA, A.M.S.; PIMENTEL, M.F. Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. *Química Nova*, vol.32, n.6, p.1635-1643, 2009.

LOURENÇÃO, B. C.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; MAZO, L. H.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. *Talanta*, vol.78, p.748-752, 2009.

MANTANUS, J.; ZIÉMONS, E.; LEBRUN, P.; ROZET, E.; KLINKENBERG, R.; STREEL, B.; EVRARD, B.; HUBERT, P.H. Moisture content determination of pharmaceutical pellets by near infrared spectroscopy: Method development and validation. *Analytica Chimica Acta*, vol.642, p.186-192, 2009.

MATHKAR, S.; KUMAR, S.; BYSTOL, A.; OLAWOORE, K.; MIN, D.; MARKOVICH, R.; RUSTUM, A. The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.49, p.627-631, 2009.

MEDEIROS, A. C. D.; CORREIA, L. P.; SIMÕES, M. O. S.; MACÊDO, R. O. Technological quality determination of pharmaceutical disintegrant by DSC cooling and DSC photovisual. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol.88, p.311-315, 2007.

- MELO, C. A. D.; SILVA, P.; GOMES, A. A.; FERNANDES, D. D. S.; VÉRAS, G.; MEDEIROS, A. C. D. Classification of Tablets containing dipyrone, caffeine and orphenadrine by near infrared spectroscopy and chemometric tools. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol.24, n.6, p.991-997, 2013.
- MILTYK, W.; ANTONOWICZ, E.; KOMSTA, Ł. Recognition of tablet content by chemometric processing of differential scanning calorimetry curves – An acetaminophen example. *Thermochimica Acta*, vol.507-508, p.146-149, 2010.
- MUÑIZ, G.I.B.; MAGALHÃES, W.L.E.; CARNEIRO, M.E.; VIANA, L.C. Fundamentos e estado da arte da espectroscopia no infravermelho próximo no setor de base florestal. *Ciência Florestal*, vol.22, n.4, p.865-875, 2012.
- NUNES, P. G. A. *Uma nova técnica para seleção de variáveis em calibração multivariada aplicada às espectroscopias UV-VIS e NIR*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química – UFPB, 2008. Tese de Doutorado.
- OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L.; MUSSEL, W.N.; VIANNA-SOARES, C.D.; PIANETTI, G.A. Análise térmica aplicada à caracterização da sinvastatina em formulações farmacêuticas. *Química Nova*, vol.33, n.8, p.1653-1657, 2010.
- OTTO, M. *Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry*, 2 ed., Weinheim, Wiley-VCH, 2007, caps.1 e 5.
- PALMEIRA FILHO, P.L.; PAN, S.S.K. *Cadeia farmacêutica no Brasil: avaliação preliminar e perspectivas*. BNDES Setorial. Rio de Janeiro, n.18, 22p., 2003.
- PARIS, I.; JANOLY-DUMENIL, A.; PACI, A.; MERCIER, L.; BOURGET, P.; BRION, F.; CHAMINADE, P.; RIEUTORD, A. Near infrared spectroscopy and process analytical technology to master the process of busulfan paediatric capsules in a university hospital. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.41, n.4, p.1171-1178, 2006.
- PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol.14, n.2, p.198-219, 2003.
- PONTES, M.J.C. *Algoritmo das projeções sucessivas para seleção de variáveis espectrais em problemas de classificação*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química – UFPB, 2009. Tese de Doutorado.
- PORTELA, A.S.; LEAL, A.A.F.; WERNER, R.P.B.; SIMÕES, M.O.S.; MEDEIROS, A.C.D. Políticas públicas de medicamentos: trajetória e desafios. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, vol.31, n.1, p.09-14, 2010.

PRÓ GENÉRICOS. *Mercado: Raio-X do setor no Brasil*. Disponível em: <<http://www.progenericos.org.br/index.php/mercado>>, Acessado em 27 de novembro de 2013.

RAJALAHTI, T.; KVALHEIM, O.M. Multivariate data analysis in pharmaceuticals: a tutorial review. *International Journal of Pharmaceutics*, vol.417, p.280-290, 2011.

ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; LEMA-MARTINEZ, C.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.44, p.683-700, 2007.

SABIN, J.G.; FERRÃO, M.F.; FURTADO, J.C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol.40, n.3, p.387-396, 2004.

SANGHAVI, B.J.; SRIVASTAVA, A.K. Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen, aspirin and caffeine using an in situ surfactant-modified multiwalled carbon nanotube paste electrode. *Electrochimica Acta*, vol.55, p.8638-8648, 2010.

SANTOS, W.T.P.; GIMENES, D.T.; DE ALMEIDA, E.G.N.; EIRAS, S.P.; ALBUQUERQUE, Y.D.T.; RICHTER, E.M. Simple flow injection amperometric system for simultaneous determination of dipyron and paracetamol in pharmaceutical formulations. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol.20, n.7, p.1249-1255, 2009.

SELAN, B.; KANNEBLEY JÚNIOR, S.; PORTO, G. S. *Relatório setorial sobre inovação tecnológica na indústria farmacêutica brasileira: uma análise a partir dos indicadores de inovação*. Parque tecnológico de Ribeirão Preto, 79p., 2007.

SHIROMA, L.Y.; SANTHIAGO, M.; GOBBI, A.L.; KUBOTA, L.T. Separation and electrochemical detection of paracetamol and 4-aminophenol in a paper-based microfluidic device. *Analytica Chimica Acta*, vol.725, p.44-50, 2012.

SILVA, W.C.; PEREIRA, P.F.; MARRA, M.C.; GIMENES, D.T.; CUNHA, R.R.; SILVA, R.A.B.; MUNOZ, R.A.A.; RICHTER, E.M. A simple strategy for simultaneous determination of paracetamol and caffeine using flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection. *Electroanalysis*, vol.23, n.12, p.2764-2770, 2011.

SOARES, A.S.; GALVÃO, R.K.H.; ARAÚJO, M.C.U.; SOARES, S.F.C.; PINTO, L.A. Multi-Core computation in chemometrics: case studies of voltammetric and NIR spectrometric analyses. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol.21, n.9, p.1626-1634, 2010.

SOUZA, J.A.L.; ALBUQUERQUE, M.M.; GRANGEIRO JR, S.; PIMENTEL, M.F.; SANTANA, D.P.; SIMÕES, S.S. Quantification of captopril disulphide as a degradation product in captopril tablets using near infrared spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, vol.62, p.35-41, 2012.

SOUZA, J.S.; FERRÃO, M.F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I: dosagem por regressão multivariada. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol.42, n.3, p.437-445, 2006.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. *Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2009, cap.4.

SUAREZ, W. T.; VIEIRA, H. J.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos empregando um sistema de análise por injeção em fluxo com geração de ácido nitroso. *Eclética Química*, vol.30, n.1, p.21-28, 2005.

TAVARES, C.; SAKATA, R.K. Caffeine in the Treatment of Pain. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, vol.62, n.3, p.387-401, 2012.

TEÓFILO, R.F. *Métodos quimiométricos: uma visão geral - conceitos básicos de quimiometria*, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, vol.1, 2013.

TIȚA, B.; FULIAȘ, A.; BANDUR, G.; MARIAN, E.; TIȚA, D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.56, p.221-227, 2011.

United States Pharmacopoeia 30, NF 25, 2007. CD-ROM.

VANDENBERGHE, L.; FERRO, C.L.B. Terapia de grupo embasada em psicoterapia analítica funcional como abordagem terapêutica para dor crônica: possibilidades e perspectivas. *Revista Psicologia: Teoria e Prática*, vol.7, n.1, p.137-151, 2005.

ARTIGO I

Calorimetria exploratória diferencial associada a técnicas
quimiométricas: modelos para classificação de medicamentos
contendo paracetamol

Calorimetria exploratória diferencial associada a técnicas quimiométricas: modelos para classificação de medicamentos contendo paracetamol

Fernando José de L. Ramos Júnior¹, Valber E. Almeida², Felipe Hugo A. Fernandes¹, Cleildo P. Santana¹, Germano Vêras², Ana Cláudia D. Medeiros^{1*}

¹Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, 58429-500, Campina Grande, PB, Brasil.

*E-mail: anaclaudia@uepb.edu.br.

²Laboratório de Química Analítica e Quimiometria, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual da Paraíba, 58429-500, Campina Grande-PB, Brasil.

Resumo

Vários métodos baseados em técnicas analíticas são utilizados no controle da qualidade de preparações farmacêuticas que contenham o paracetamol, como, por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência. Contudo, essa técnica apresenta alguns inconvenientes como tempo de análise elevado e utilização de equipamento de alto custo. Como alternativa têm-se as técnicas termoanalíticas que são céleres e reproduzíveis. Apesar da grande quantidade de dados, o processamento quimiométrico das curvas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é raro na literatura. Neste contexto, objetivou-se construir modelos quimiométricos, a partir de curvas DSC, para classificação de comprimidos que contenham paracetamol. Foi analisado o ingrediente ativo paracetamol e três marcas de medicamentos diferentes, contendo paracetamol e cafeína (37 lotes). As curvas de DSC foram analisadas em atmosfera de nitrogênio (50 mL min^{-1}), na faixa de temperatura de $92,00$ a $190,00 \text{ }^\circ\text{C}$, com razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Os dados foram pré-processados com a técnica de Padrão Normal de Variação (SNV) e posteriormente passaram por uma análise de componentes principais (PCA). O algoritmo *Kennard-Stone* foi utilizado para particionar as 29 amostras entre treinamento (19) e teste (10). As amostras de treinamento foram utilizadas para construção dos modelos de classificação com validação cruzada por Análise Discriminante Linear com Algoritmo das Projeções Sucessivas (SPA-LDA) e com Algoritmo Genético (GA-LDA), como técnicas de seleção de variáveis, e K-ésimos Vizinhos Mais Próximos (KNN). As amostras de teste foram utilizadas para avaliar a qualidade dos modelos quimiométricos construídos. Os eventos térmicos apresentados nas curvas de DSC possivelmente estavam relacionados ao polimorfismo do paracetamol. A PCA separou a marca M3 de M1 e M2. No SPA-LDA, seis temperaturas foram suficientes para discriminar com sucesso os grupos de amostras. Já no GA-LDA, só foram necessárias quatro temperaturas. No método KNN, o melhor resultado apresentado foi com um vizinho mais próximo, pois classificou as amostras com 100 % de sucesso. Os métodos PCA, SPA-LDA, GA-LDA e KNN associados à análise DSC, por demonstrarem viabilidade para diferenciação entre analgésicos de diferentes marcas, são boas alternativas para identificação de possíveis medicamentos falsificados pertencentes a essas classes de medicamentos.

Palavras chave: Técnicas de reconhecimento de padrões, DSC, análise térmica, acetaminofeno.

Introdução

O paracetamol (acetaminofeno, N-acetil-p-aminofenol) é uma amida aromática, utilizada desde 1893 como antipirético e analgésico, sendo considerado na atualidade como um substituto da aspirina devido a pouca incidência de efeitos colaterais gastrointestinais. Esse ingrediente ativo apresenta três formas polimórficas: a estável (forma I ou monoclínica), a metaestável (forma II ou ortorrômbica) e a instável (forma III) (LOURENÇÃO et al., 2009; GAISFORD; BUANZ & JETHWA, 2010; ZIMMERMANN & BARANOVIC, 2011; KHANMOHAMMADI et al., 2012).

Vários métodos baseados em técnicas analíticas são utilizados no controle da qualidade de preparações farmacêuticas que contenham o paracetamol como, por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência que é indicada pela farmacopeia americana (2007). Contudo, essa técnica apresenta alguns inconvenientes, principalmente quando aplicada a produtos farmacêuticos em fase sólida, pois necessita de várias etapas para preparação das amostras, requer solventes e reagentes de elevado grau de pureza, produz resíduos prejudiciais ao meio ambiente, necessita de pessoal qualificado para a manipulação analítica e o equipamento utilizado é de alto custo (LOURENÇÃO et al., 2009; KHANMOHAMMADI et al., 2012; SOUZA et al., 2012).

Por outro lado, as técnicas termoanalíticas, como a calorimetria exploratória diferencial (DSC), quando utilizada individualmente ou associada a outros métodos é comprovadamente rápida, pois quase não há tratamento das amostras, exige pouco trabalho manual, não há necessidade de solventes, colunas e placas, além da análise ser quase automática com fácil coleta de dados. Assim, desde 1950 elas vêm sendo utilizadas com diferentes finalidades na tecnologia farmacêutica, entre elas: caracterização e decomposição térmica de drogas, avaliação da estabilidade, determinação de pureza, estudos de compatibilidade de formulações farmacêuticas e detecção de polimorfismo (BAZZO & SILVA, 2005; MEDEIROS et al., 2007; FREIRE et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; FORD & MANN, 2012; BÖER et al., 2013).

Vale ressaltar, entretanto, que apesar da análise térmica ser um método consolidado e de amplo poder analítico que permite a obtenção de grande quantidade de dados, a interpretação das curvas DSC para retirada de informações com qualidade torna-se difícil, pois muitas substâncias podem apresentar pontos de fusão parecidos, além de ocorrerem fenômenos como o polimorfismo ou interação entre compostos que modificam o ponto de fusão das amostras (MILTYK; ANTONOWICZ & KOMSTA, 2010).

Nestes casos, torna-se necessário a aplicação da quimiometria para permitir, por exemplo, a classificação de medicamentos com a finalidade de avaliar possíveis falsificações, pois possibilita a identificação de amostras, a análise de misturas complexas e a determinação simultânea de analitos sem a necessidade de uma prévia separação dos componentes das misturas ou pré-processamentos das amostras (NUNES, 2008).

Dentre os modelos quimiométricos que possibilitam a avaliação das similaridades e diferenças entre grupos de amostras, destacam-se os métodos não supervisionados, a exemplo da análise de componentes principais (PCA) e os métodos supervisionados, dentre eles o K-ésimo vizinho mais próximo (KNN) e a análise discriminante linear (LDA) (DE BARROS NETO; SCARMINIO & BRUNS, 2006; ROGGO et al., 2007; DE SOUZA & POPPI, 2012).

A PCA é utilizada para visualização da estrutura de dados multivariados, descobrir semelhança entre as amostras, detectar amostras anômalas (outliers) e diminuir a dimensionalidade do conjunto de dados (DE SOUZA & POPPI, 2012).

O KNN classifica um objeto sem interferências estatísticas como a distribuição normal das variáveis e sem depender do espaço de distribuição das classes e a LDA obtém uma função discriminante que separa, mais que possível, duas classes. Entretanto, a presença de muitas variáveis independentes pode gerar informações redundantes que prejudicam a classificação pela LDA, o que faz necessário a utilização de técnicas de seleção de variáveis, como o Algoritmo das projeções sucessivas (SPA) e o Algoritmo genético (GA) (BERRUETA; ALONSO-SALCES & HÉBERGER, 2007; MELO et al., 2013).

Proposto por Araújo et al. (2001), o SPA foi inicialmente utilizado para minimizar os problemas de colinearidade na regressão linear múltipla (MLR), sendo posteriormente estendido para solucionar os problemas de classificação quando a LDA é utilizada. Já o GA é atualmente uma das técnicas de seleção de variáveis mais difundida, por apresentar excelentes resultados para otimização em grande escala, por não exigir informações sobre o gradiente de resposta; não ter seu desempenho na otimização afetado por descontinuidades na superfície de resposta e não reduzir sua eficiência na presença de mínimos locais (COSTA FILHO & POPPI, 1999; SOARES et al., 2010; MELO et al., 2013).

Neste contexto, sabendo que o processamento quimiométrico das curvas DSC é raro na literatura (MILTYK; ANTONOWICZ & KOMSTA, 2010), objetivou-se construir modelos quimiométricos a partir de curvas DSC para classificação de comprimidos que contenham paracetamol.

Metodologia

Ingrediente ativo farmacêutico e amostras

Foi analisado o ingrediente ativo paracetamol e comprimidos contendo paracetamol (500mg) e cafeína (65mg), adquiridos no mercado local de Campina Grande, Brasil. As amostras de medicamento pertenciam a três marcas diferentes M1, M2 e M3, sendo 19 lotes para M1, 10 lotes para M2 e 8 lotes para M3, os quais apresentavam diferentes excipientes (Tabela 1).

Tabela 1. Marcas de medicamentos analisados e seus excipientes

M1	M2	M3
Amido de milho	Celulose microcristalina	Sorbitol em pó
Amido pré-gelatinizado	Amido pré-gelatinizado	Sacarina sódica
Amidoglicolato de Sódio	Amidoglicolato de Sódio	Bicarbonato de sódio
Celulose microfina	Copovidona	
Corante amarelo FD&C nº 6 laca alumínio	Croscarmelose Sódica	Lauril sulfato de sódio
Corante vermelho 40 laca alumínio	Corante vermelho 40 laca alumínio	Dimeticona
Dióxido de titânio	Dióxido de titânio	Ácido cítrico
Estearato de magnésio	Estearato de magnésio	Carbonato de sódio
Hipromelose	Hipromelose + Macrogol	
Macrogol	Água purificada	Água purificada qs
	Povidona	Povidona
	Ácido esteárico	

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC foram obtidas em um equipamento DSC, modelo Q20, marca TA Instruments[®], utilizando-se aproximadamente 2 mg da amostra, em atmosfera de nitrogênio (50 mL min⁻¹), na faixa de temperatura de 92,00 a 190,00 °C, com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. As curvas foram plotadas utilizando o software Universal Analysis 2000.

Estudo Quimiométrico

No software Unscrambler 9.8 foi empregado o pré-processamento dos dados com a técnica de padronização normal de variação (SNV) e posteriormente realizou-se uma análise de componentes principais (PCA).

Em ambiente Matlab 2011a, empregando o algoritmo *Kennard-Stone* (KS), o conjunto total de amostras foi particionado em conjunto de treinamento (19 amostras) e conjunto de teste (10 amostras), para construção dos seguintes modelos: SPA-LDA, GA-LDA e KNN.

As 19 amostras do conjunto de treinamento foram utilizadas para obter os parâmetros do modelo e para realizar sua validação cruzada. Já as 10 amostras de teste foram utilizadas para avaliar a capacidade discriminante dos modelos quimiométricos construídos em relação as amostras fora do conjunto de calibração.

Resultados e discussão

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Na curva DSC do paracetamol foi observado um pico endotérmico em 171 °C ($\Delta = 168,70 \text{ J g}^{-1}$), com temperatura inicial em 169,24 °C e final em 179,14 °C (Figura 1A), o qual está relacionado ao processo de fusão do fármaco, pois, segundo o Merck Index (2013), a fusão deste fármaco ocorre numa faixa de temperatura entre 169,00 a 170,50 °C.

O polimorfismo do paracetamol foi estudado por Martino et al. (1997), os quais obtiveram três formas polimórficas caracterizadas para o paracetamol, as quais são relatadas na literatura. A forma encontrada no mercado é a forma I, identificada como um cristal monoclinico; a forma II foi identificada como ortorrômbica e a forma III foi caracterizada como uma forma instável, a qual não pode ser estudada, devido a sua instabilidade térmica. Com a fusão do paracetamol, observa-se a forma I em 169,00 a 170,50 °C, quando se procede a um novo aquecimento após resfriamento da mesma amostra, a forma vítrea recristalizada apresenta-se como forma II, a qual funde entre 157,00 a 158,00 °C (MEDEIROS, 2001).

Todavia, Nichols e Frampton (1998), ao analisarem gráficos de DSC do paracetamol identificaram para forma II, três eventos endotérmicos: o primeiro evento ao longo do intervalo de 115,00 a 128,00 °C, o segundo com início em cerca de 157,00 °C e o terceiro com início em cerca de 169,00 °C, que correspondiam, na ordem de aumento da temperatura,

a uma conversão da forma II em I, seguida pela fusão da forma II não-convertida e, finalmente, a fusão da forma I.

Da mesma forma, Giordano et al. (2002), visualizaram picos endotérmicos em 167,00 °C (fusão da Forma I) e em 157,00 °C (fusão da Forma II), para o ingrediente ativo puro. E, quando analisaram o fármaco em sistema de mistura, com um excipiente farmacêutico, observaram um pico endotérmico próximo de 170,00 °C, característico do processo de fusão da forma I. O mesmo também foi observado por Medeiros (2001), que ao realizar uma comparação das curvas DSC de dois comprimidos de paracetamol diferentes, com o do fármaco, percebeu que não houve indícios de interação entre o fármaco e os excipientes usados na sua formulação. Nesse trabalho, os comprimidos apresentaram um comportamento térmico semelhante ao fármaco, mostrando que os comprimidos são farmacologicamente equivalentes, do ponto de vista térmico, pois apresentaram picos endotérmicos na mesma faixa de fusão do fármaco.

Nas curvas DSC dos comprimidos que foram analisados neste estudo (Figura 1B, 1C, 1D), foram visualizados vários eventos endotérmicos (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios dos eventos endotérmicos apresentados nas curvas DSC dos medicamentos analisados

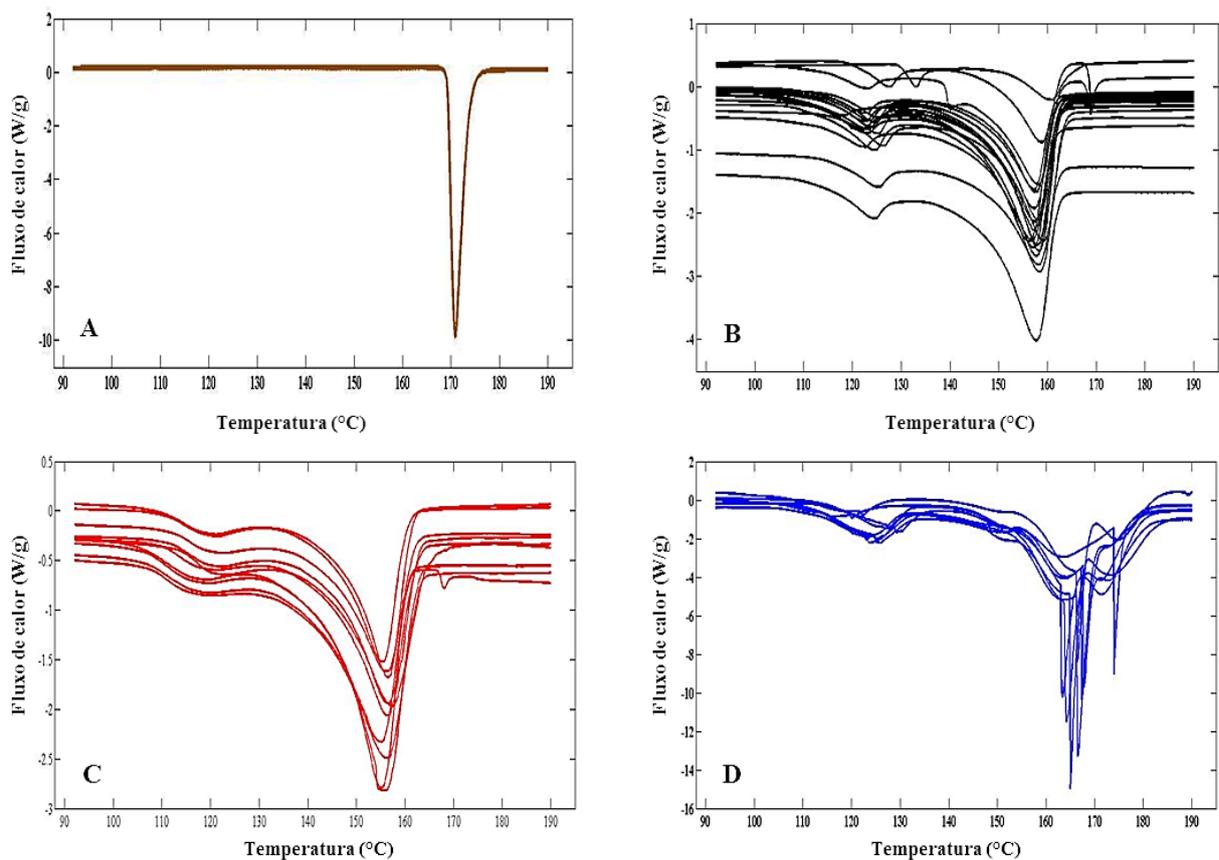
M1	M2	M3
124,00°C ($\Delta = 16,85 \text{ J g}^{-1}$)	119,70°C ($\Delta = 9,19 \text{ J g}^{-1}$)	123,00°C ($\Delta = 103,46 \text{ J g}^{-1}$)
157,70°C ($\Delta = 120,29 \text{ J g}^{-1}$)	156,00°C ($\Delta = 122,21 \text{ J g}^{-1}$)	147,50°C ($\Delta = 47,92 \text{ J g}^{-1}$)
169,00°C ($\Delta = 5,96 \text{ J g}^{-1}$)		164,00°C ($\Delta = 258,57 \text{ J g}^{-1}$)
		165,00°C ($\Delta = 166,50 \text{ J g}^{-1}$)
		167,00°C ($\Delta = 430,25 \text{ J g}^{-1}$)
		168,00°C ($\Delta = 93,38 \text{ J g}^{-1}$)
		174,00°C ($\Delta = 71,44 \text{ J g}^{-1}$)

Considerando os estudos citados anteriormente, observou-se que os eventos térmicos apresentados nas curvas de DSC dos medicamentos foram sugestivos de polimorfismo do

paracetamol, podendo ser descritos como: conversão da forma II em forma I, para as amostras M1 (124,00 °C), M2 (119,70 °C) e M3 (123,00 °C); fusão da forma II, para as amostras M1 (157,70 °C), M2 (156,00 °C) e M3 (147,50 °C); e fusão da forma I, para M1 (169,00 °C) e M3, que apresentou picos endotérmicos entre 164,00 a 174,00 °C.

O polimorfismo possivelmente aconteceu porque as etapas do processo de produção podem ter contribuído para que ocorressem modificações polimórficas no ingrediente ativo ou pode ter ocorrido mudança de uma forma metaestável para uma estável, mesmo os medicamentos estando dentro do prazo de validade (OLIVEIRA, YOSHIDA & GOMES, 2011).

Figura 1. Curvas DSC: paracetamol na forma pura (A); medicamentos da marca M1 (B); medicamentos da marca M2 (C) e medicamentos da Marca M3 (D)



Foi possível perceber que ocorreram variações nos eventos térmicos do paracetamol nas formulações farmacêuticas. Rodrigues et al. (2008), ao realizarem estudo termoanalítico de comprimidos contendo metronidazol, também identificaram variações nos eventos

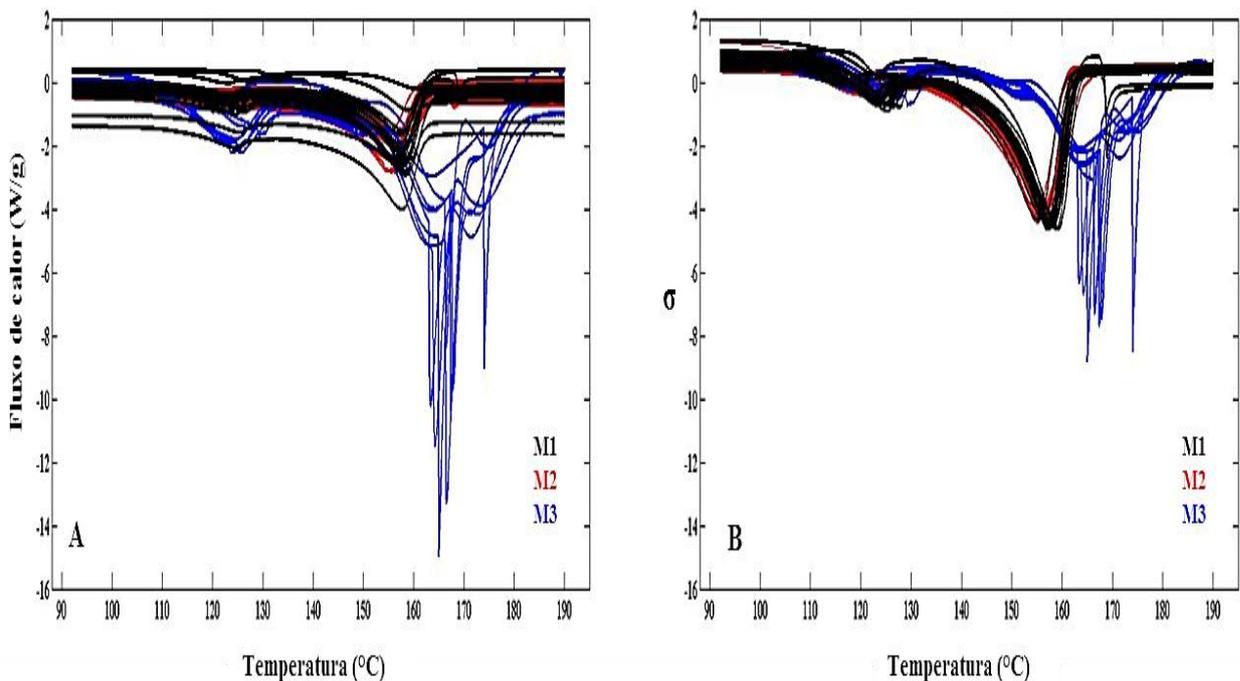
endotérmicos do ingrediente ativo em formulações e afirmaram que possivelmente decorreram de uma fusão prévia de algum excipiente, com consequente solubilização do fármaco ou até mesmo devido o desenvolvimento de compostos eutéticos.

Estudo Quimiométrico

As curvas DSC das 40 amostras de medicamentos passaram por um pré-tratamento por SNV, que preservou o seu perfil e promoveu uma redução na variação da sobreposição entre as curvas (Figura 2A e 2B).

Miltyk, Antonowicz & Komsta (2010), também realizaram estudo quimiométrico de curvas DSC e mostraram que a utilização da técnica SNV contribuiu para remoção de alterações indesejadas e ao mesmo tempo conservou a forma do sinal obtido.

Figura 2. Curvas DSC das 37 amostras de medicamentos: brutas (A); após o pré-processamento com SNV (B)



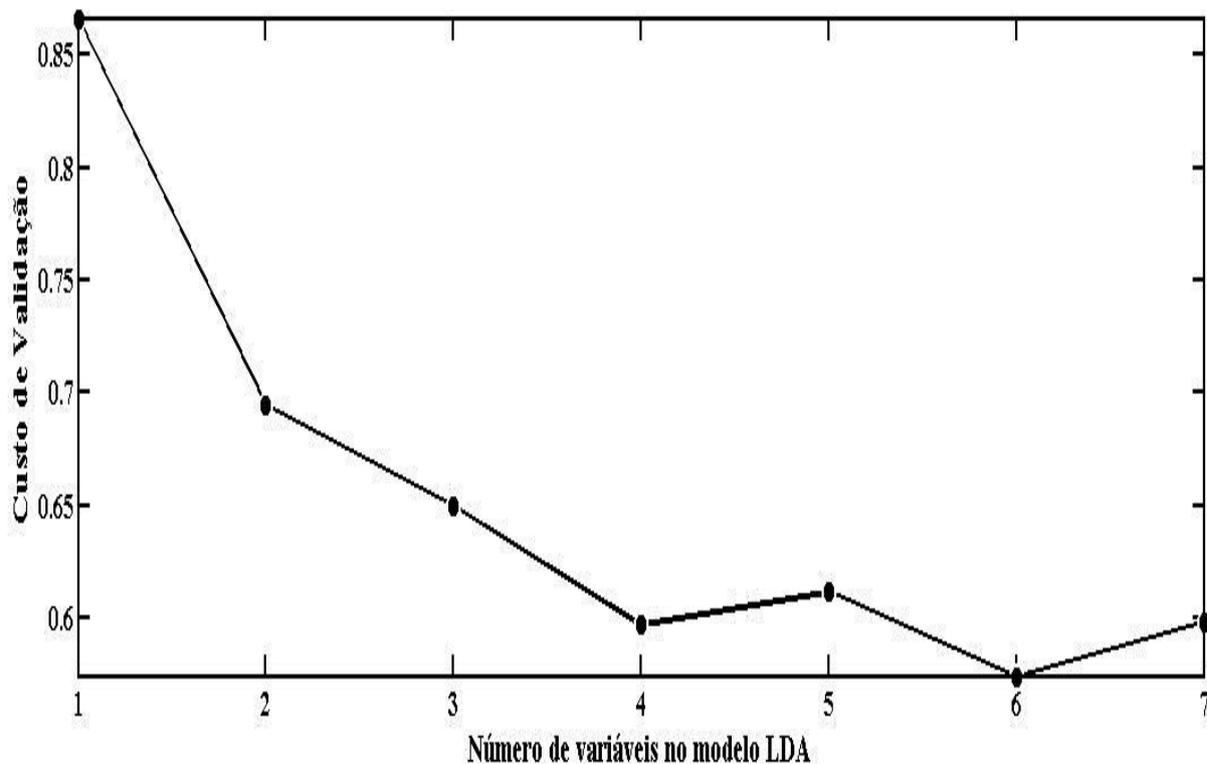
Nas curvas DSC (Figura 2A e 2B) visualizou-se que as amostras pertencentes às marcas M1 e M2 possuíam perfis muito semelhantes, diferindo dos apresentados pela marca M3. Tal fato possivelmente decorreu do polimorfismo do paracetamol, das variações nas pesagens das amostras e da semelhança na composição entre as marcas M1 e M2, que

A partir dos resultados obtidos da PCA foram construídos modelos de classificação com as amostras pertencentes às marcas M1 e M2 a fim de separá-las.

Classificação SPA-LDA

A quantidade de variáveis necessárias, para que o risco de classificação incorreta tivesse a menor probabilidade possível, no modelo SPA-LDA, foi determinada a partir do mínimo da função de custo de validação. Assim, como pode ser verificado na Figura 3, para se alcançar os melhores resultados, o número de variáveis selecionadas foi de seis temperaturas.

Figura 4. Gráfico do custo de validação para seleção de temperaturas com o SPA-LDA

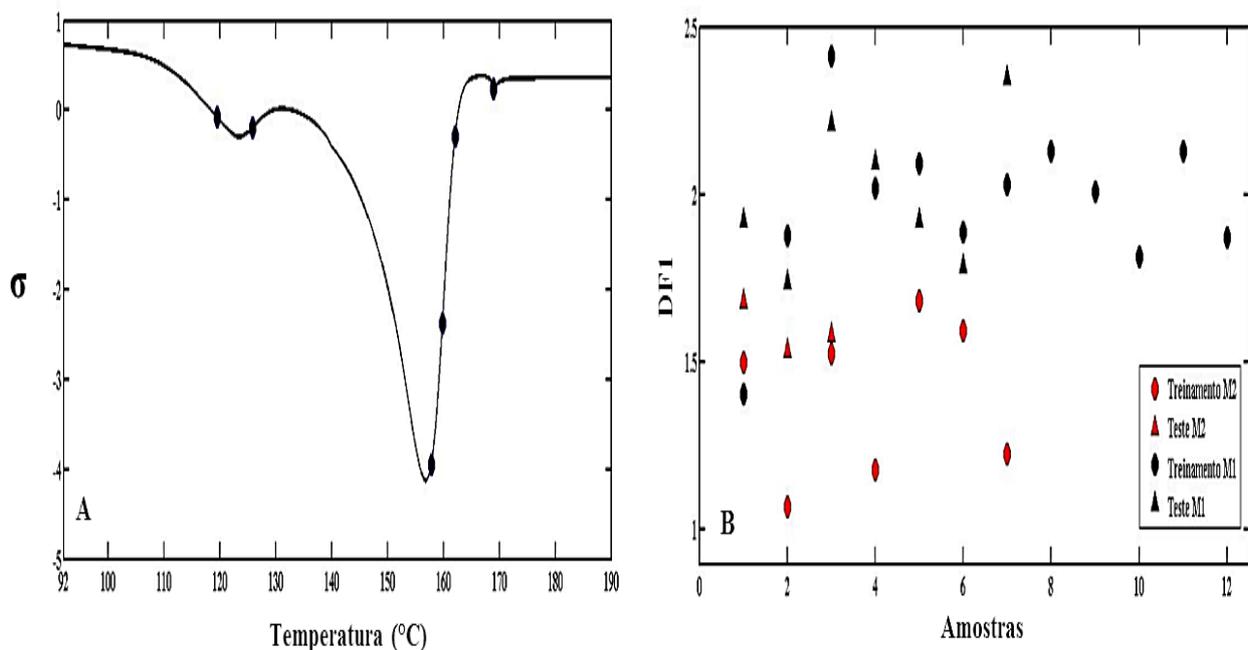


As temperaturas selecionadas pelo modelo SPA correspondiam a 119,50, 125,80, 157,80, 159,80, 162,10 e 168,90 °C, estavam espalhadas em diferentes regiões das curvas DSC e foram sugestivas de uma conversão da forma II em I, da fusão da forma II não-convertida e fusão da forma I do paracetamol, respectivamente (Figura 4A).

O modelo SPA-LDA construído com as seis variáveis selecionadas permitiu uma boa separação inter-classe, com um índice de acerto de 94,74 % para o conjunto de treinamento

(01 erro num total de 19 amostras) e 90 % para o conjunto de teste (01 erro num total de 10 amostras), sendo possível observar na Figura 4B que houve a formação de dois grupos de amostras, os quais correspondiam às marcas M1 e M2, que não foram separadas pela análise exploratória dos dados.

Figura 5. Resultados SPA-LDA: curva média com as temperaturas selecionadas (A); separação das classes (B)



O provável polimorfismo apresentado pelo paracetamol certamente foi o responsável pela discriminação entre as amostras, pois segundo Araujo et al. (2012), esse fenômeno é capaz de provocar variações nas características físico-químicas das substâncias, como, por exemplo, modificações no comportamento térmico.

Classificação GA-LDA

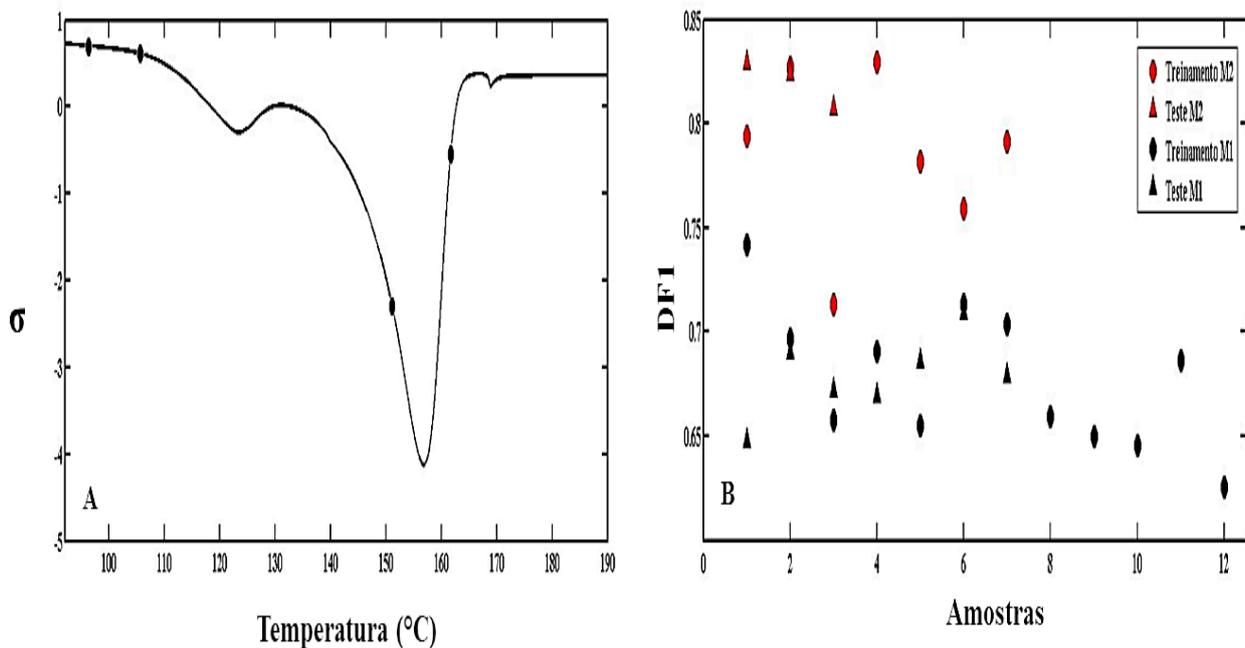
O modelo GA também foi utilizado na seleção das variáveis para o LDA e resultou num total de quatro temperaturas selecionadas que correspondiam a 96,30, 105,60, 151,10 e 161,70 °C (Figura 5A).

Dentre as temperaturas selecionadas pelo GA as de 151,10 e 161,70 °C foram sugestivas de eventos térmicos do paracetamol, que possivelmente correspondiam a fusão da forma II não-convertida. Por outro lado, as temperaturas de 96,30 e 105,60 °C não

apresentaram nenhum evento térmico e a seleção dessas variáveis possivelmente decorreu de diferenças na sobreposição entre as curvas DSC (Figura 2), que mesmo após o pré-tratamento ainda persistiram, pois essa alteração provavelmente procedeu não só de falhas físicas do equipamento, mas também de pequenas variações na pesagem das amostras, já que a massa utilizada foi de aproximadamente 2 mg. Nessa visão Storpiertis et al. (2009) propuseram que os perfis das curvas originadas na DSC são alterados devido inúmeros fatores que podem estar relacionados ao equipamento e/ou a amostra.

O modelo GA-LDA, construído utilizando uma população de 10 indivíduos, 100 gerações, probabilidade de crossover de 0,6, probabilidade de mutação de 0,1 e as quatro variáveis selecionadas entre as 981 disponíveis, apresentou um índice de acerto de 94,74 % para o conjunto de treinamento (1 erro num total de 19 amostras) e 90 % para o conjunto de teste (1 erro num total de 10 amostras) (Figura 5B).

Figura 6. Resultados GA-LDA: temperaturas selecionadas (A); separação das classes (B)



O provável polimorfismo do paracetamol, mesmo de forma menos intensa que no modelo SPA-LDA, também colaborou para diferenciação entre as duas marcas de medicamentos no modelo GA-LDA, pois das quatro variáveis selecionadas nesse modelo duas estavam relacionadas com este evento.

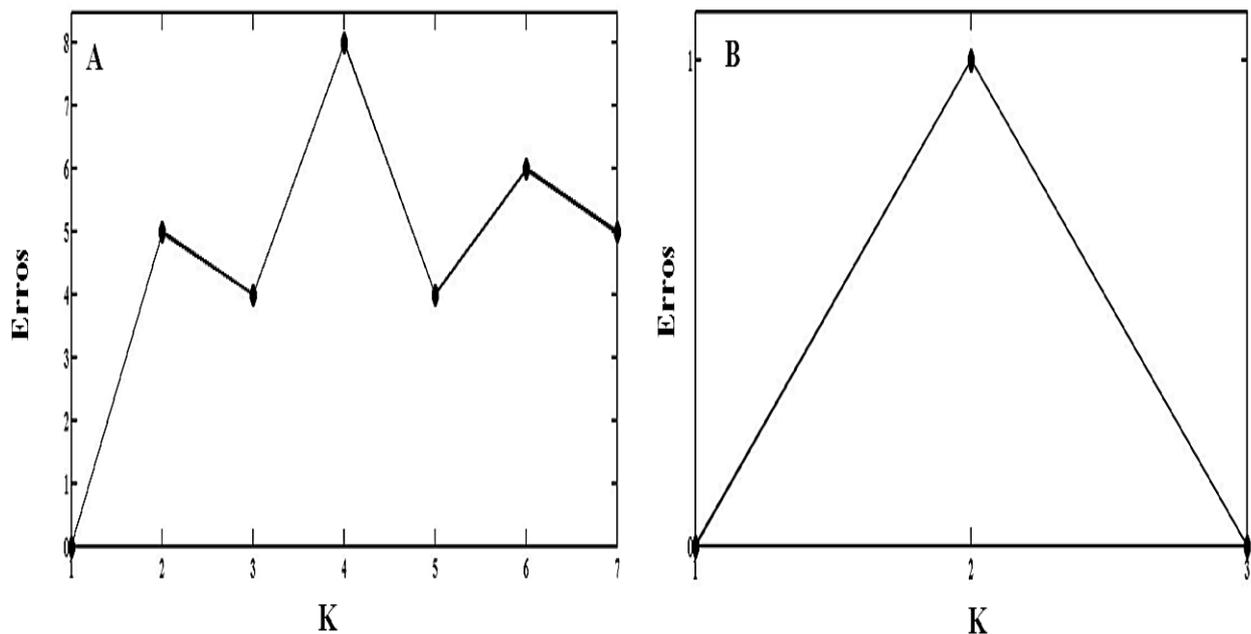
Classificação KNN

Para reforçar os resultados obtidos nas técnicas anteriores, o conjunto de amostras pertencente às marcas M1 e M2 também foi submetido ao algoritmo KNN. Esse modelo foi construído com a faixa de temperatura de 92,00 a 190,00 °C, e com a comparação da distância das amostras do conjunto de teste, com as amostras de cada uma das classes do conjunto de treinamento, sendo considerada dentro de uma dada classe, a amostra que tivesse o maior número de vizinhos pertencentes a essa classe.

Para validação cruzada do modelo utilizou-se o conjunto de treinamento e foram feitos teste com até 7 vizinhos mais próximos. Dos resultados obtidos o que melhor foi alcançado utilizou apenas um vizinho mais próximo, pois apresentou 100 % de sucesso na classificação das amostras pertencentes a esse conjunto (Figura 6A).

Para o conjunto de teste foram avaliados os modelos com até 3 vizinhos mais próximos, sendo o melhor resultado obtido com apenas um vizinho mais próximo, pois as amostras foram separadas corretamente sem erros do tipo I e tipo II (Figura 6B).

Figura 7. Erros de classificação no modelo KNN: para as amostras do conjunto de treinamento (A); para as amostras do conjunto de teste (B)



Os resultados obtidos permitiram a separação correta entre as três marcas de medicamentos (M1, M2 e M3), possibilitando uma futura distinção entre produtos de qualidade comprovadas, daqueles que passaram por possíveis falsificações. Além disso, a similaridade dos resultados com aqueles alcançados nas outras técnicas utilizadas mostraram

que mesmo sem rebuscamento matemático, essa técnica apresentou-se eficiente. Corroborando com este resultado, Berrueta; Alonso-Salces & Héberger (2007), afirmaram que mesmo sendo um método com simplicidade matemática, os resultados de classificação obtidos com o KNN são bons tanto quanto os obtidos por outras técnicas mais complexas de reconhecimento de padrão.

Conclusão

O provável polimorfismo do paracetamol, componente ativo farmacêutico majoritário na formulação, forneceu informações para análise exploratória dos dados e para construção dos modelos discriminantes que permitiram a classificação dos analgésicos pela marca (M1, M2, M3). Da mesma forma, as variáveis que estavam fora dos eventos térmicos presentes nas curvas de DSC foram capazes de auxiliar na distinção, pois apresentaram informações adequadas para individualizar cada uma das amostras.

Das técnicas utilizadas a GA-LDA pode ser considerada a de melhor aplicabilidade, pois proporcionou redução do número de variáveis selecionadas.

Os métodos PCA, SPA-LDA, GA-LDA e KNN utilizados para o tratamento dos dados provenientes da análise DSC são boas alternativas para identificação de possíveis medicamentos falsificados que contenham o paracetamol, pois demonstraram viabilidade para diferenciação entre comprimidos pertencentes a diferentes marcas e que continham esse analgésico como ingrediente ativo farmacêutico.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CERTBIO/UEPB pelas análises.

Referências

- ARAÚJO, G.L.B.; PITALUGA JR, A.; ANTONIO, S.G.; SANTOS, C.O.P.; MATOS, J.R. Polimorfismo na produção de medicamentos. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, vol.33, n.1, p.27-36, 2012.
- ARAÚJO, M.C.U.; SALDANHA, T.C.B.; GALVÃO, R.K.H.; YONEYAMA, T.; CHAME, H.C.; VISANI, V. The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol.57, p.65-73, 2001.
- BAZZO, G.C.; SILVA, M.A.S. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol.41, n.3, p.315-322, 2005.

- BERRUETA, L.A.; ALONSO-SALCES, R.M.; HÉBERGER, K. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, vol.1158, p.196-214, 2007.
- BÖER, T.M.; PROCÓPIO, J.V.V.; NASCIMENTO, T.G.; MACÊDO, R.O. Correlation of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC–MS in the characterization of tacrolimus. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.73, p.18-23, 2013.
- CORREIA, P.R.M.; FERREIRA, M.M.C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Química Nova*, vol.30, n.2, p.481-487, 2007.
- COSTA FILHO, P.A.; POPPI, R.J. Algoritmo genético em química. *Química Nova*, vol.22, n.3, p.405-411, 1999.
- DE BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. 25 anos de quimiometria no Brasil. *Química Nova*, vol.29, n.6, p.1401-1406, 2006.
- DE SOUZA, A.M.; POPPI, R.J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. *Química Nova*, vol.35, n.1, p.223-229, 2012.
- FORD, J.L.; MANN, T.E. Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol.64, p.422-430, 2012.
- FREIRE, F.D.; ARAGÃO, C.F.S.; LIMA E MOURA, T.F.A.; RAFFIN, F.N. Compatibility study between chlorpropamide and excipients in their physical mixtures. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol.97, p.355-357, 2009.
- GAISFORD, S.; BUANZ, A.B.M.; JETHWA, N. Characterisation of paracetamol form III with rapid-heating DSC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.53, p.366-370, 2010.
- GIORDANO, F.; ROSSI, A.; BETTINI, R.; SAVIOLI, A.; GAZZANIGA, A.; NOVÁK, Cs. Thermal behavior of paracetamol-polymeric excipients mixtures. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol.68, p.575-590, 2002.
- KHANMOHAMMADI, M.; SOLEIMANI, M.; MOROVVAT, F.; GARMARUDI, A. B.; KHALAFBEIGI, M.; GHASEMI, K. Simultaneous determination of paracetamol and codeine phosphate in tablets by TGA and chemometrics. *Thermochimica Acta*, vol.530, p. 128-132, 2012.
- LOURENÇÃO, B.C.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C.; MAZO, L.H.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. *Talanta*, vol.78, p. 748-752, 2009.
- MARTINO, P. Di; CONFLANT, P.; DRACHE, M.; HUVENNE, J. P. & GUYOT-HERMANN, A. M. Preparation and physical characterization of forms II and III of paracetamol. *Journal of Thermal Analysis*, vol. 48, p. 447 – 458, 1997.

- MEDEIROS, A.C.D. *Aplicação da análise térmica no estudo de drogas anti-inflamatórias*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – UFPB, 2001. Dissertação (Mestrado).
- MEDEIROS, A.C.D.; CORREIA, L.P.; SIMÕES, M.O.S.; MACÊDO, R.O. Technological quality determination of pharmaceutical disintegrant by DSC cooling and DSC photovisual. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol.88, p.311-315, 2007.
- MELO, C.A.D.; SILVA, P.; GOMES, A.A.; FERNANDES, D.D.S.; VÉRAS, G.; MEDEIROS, A.C.D. Classification of Tablets containing dipyron, caffeine and orphenadrine by near infrared spectroscopy and chemometric tools. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol.24, n.6, p.991-997, 2013.
- MILTYK, W.; ANTONOWICZ, E.; KOMSTA, Ł. Recognition of tablet content by chemometric processing of differential scanning calorimetry curves – An acetaminophen example. *Thermochimica Acta*, vol.507-508, p.146-149, 2010.
- NICHOLS, G.; FRAMPTON, C.S. Physicochemical Characterization of the Orthorhombic Polymorph of Paracetamol Crystallized from Solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol.87, n.6, p.684-693, 1998.
- NUNES, P.G.A. *Uma nova técnica para seleção de variáveis em calibração multivariada aplicada às espectroscopias UV-VIS e NIR*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química – UFPB, 2008. Tese (Doutorado).
- OLIVEIRA, A.H.; MOURA, E.A.; PINTO, M.F.; PROCÓPIO, J.V.V.; SOUZA, V.G.; SOUZA, F.S.; MACÊDO, R.O. Thermal characterization of raw material pentoxifylline using thermoanalytical techniques and Pyr-GC/MS. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol.106, p.763-766, 2011.
- OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. *Química Nova*, vol.34, n.7, p.1224-1230, 2011.
- OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L.; MUSSEL, W.N.; VIANNA-SOARES, C.D. PIANETTI, G.A. Análise térmica aplicada à caracterização da sinvastatina em formulações farmacêuticas. *Química Nova*, vol.33, n.8, p.1653-1657, 2010.
- OTTO, M. *Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry*, 2 ed., Weinheim, Wiley-VCH, 2007, caps.1 e 5.
- RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.M.; SILVA, M.A.S.; MATOS, J.R. Caracterização termoanalítica e estudo do perfil de dissolução de comprimidos contendo metronidazol. *Latin American Journal of Pharmacy*, vol.27, n.4, p.528-534, 2008.
- ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; LEMA-MARTINEZ, C.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.44, p.683-700, 2007.

SOARES, A.S.; GALVÃO, R.K.H.; ARAÚJO, M.C.U.; SOARES, S.F.C.; PINTO, L.A. Multi-Core computation in chemometrics: case studies of voltammetric and NIR spectrometric analyses. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol.21, n.9, p.1626-1634, 2010.

SOUZA, J.A.L.; ALBUQUERQUE, M.M.; GRANGEIRO JR, S.; PIMENTEL, M.F.; SANTANA, D.P.; SIMÕES, S.S. Quantification of captopril disulphide as a degradation product in captopril tablets using near infrared spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, vol.62, p.35-41, 2012.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. *Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2009, cap.4.

The Merck Index, 15 ed., The Royal Society of Chemistry, 2013, p.47.

United States Pharmacopoeia 30, NF 25, 2007. CD-ROM.

ZIMMERMANN, B.; BARANOVIĆ, G. Thermal analysis of paracetamol polymorphs by FT-IR spectroscopies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.54, p.295-302, 2011.

ARTIGO II

Espectroscopia no infravermelho próximo e métodos
quimiométricos aplicados na classificação de comprimidos
contendo paracetamol e cafeína

Espectroscopia no infravermelho próximo e métodos quimiométricos aplicados na classificação de comprimidos contendo paracetamol e cafeína

Fernando José de L. Ramos Júnior¹, Valber E. Almeida², Germano Vêras²,
Ana Cláudia D. Medeiros^{1*}

¹Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, 58429-500, Campina Grande, PB, Brasil.

*E-mail: anaclaudia@uepb.edu.br.

²Laboratório de Química Analítica e Quimiometria, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual da Paraíba, 58429-500, Campina Grande-PB, Brasil.

Resumo

A associação de fármacos é uma prática comum na indústria farmacêutica, entretanto, a junção de substâncias torna difícil o controle da qualidade, sendo recomendado, por exemplo, o uso da cromatografia líquida de alta eficiência. Todavia, essa técnica apresenta alguns inconvenientes, como a necessidade de solventes caros e com elevado grau de pureza, pessoal qualificado para a manipulação analítica, além de produzir resíduos prejudiciais ao meio ambiente. Diante de tal complexidade, pesquisadores têm proposto para controle da qualidade de preparações farmacêuticas sólidas a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), que necessita da utilização de métodos quimiométricos para interpretação dos resultados. Assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver modelos quimiométrico a partir de espectros NIR, para classificação de medicamentos contendo paracetamol e cafeína, a fim de viabilizar uma futura distinção entre produtos referência e genéricos de possíveis produtos falsificados. Analisaram-se três classes de medicamentos que continham paracetamol e cafeína (R, G1 e G2). Os experimentos foram realizados num intervalo espectral de 1.950 a 2.500 nm e essa faixa foi pré-processada empregando-se a primeira derivada, com o filtro de Savitzky-Golay, polinômio de segunda ordem e janela de 19 pontos. O algoritmo Kennard-Stone (KS) foi utilizado para particionar o conjunto total de amostras em treinamento (90 amostras) e teste (45 amostras). As amostras de treinamento foram utilizadas para construção dos modelos de classificação com validação cruzada por Análise Discriminante Linear com Algoritmo das Projeções Sucessivas (SPA-LDA) e com Algoritmo Genético (GA-LDA) como técnicas de seleção de variáveis e K-ésimos Vizinhos Mais Próximos (KNN). As 45 amostras de teste foram utilizadas para avaliar a qualidade dos modelos quimiométricos construídos. Os picos apresentados nos espectros estavam associados a região do primeiro sobretom relativa a ligação C=O e a região de combinação relativa as ligações N-H, C-C, OH, CH, CH₃. No modelo SPA-LDA, vinte e sete variáveis foram suficientes para discriminar os grupos de amostras com uma taxa de acerto de 97,77 % para o conjunto de treinamento e de 84,44 % para o de teste. Já no GA-LDA, vinte e quatro comprimentos de onda foram necessários, mostrando que o modelo foi eficaz na classificação de 96,66 % das amostras de treinamento e 93,33 % das amostras de teste. No método KNN o melhor resultado foi obtido com cinco vizinhos mais próximos, pois o modelo apresentou nove erros de classificação. Os resultados alcançados comprovam a viabilidade dos modelos SPA-LDA, GA-LDA e KNN para classificar medicamentos de referência e genéricos que contenham paracetamol e cafeína, o que possibilita uma futura diferenciação entre produtos originais dos falsificados.

Palavras chave: reconhecimento de padrões, NIR, excipientes, medicamentos de referência, genéricos, controle da qualidade.

Introdução

Medicamentos são produtos provenientes da indústria farmacêutica preparados com o objetivo de prevenir, amenizar ou curar doenças. Na atualidade, um problema global cada vez mais comum com esses produtos farmacêuticos é a adulteração (HOLZGRABE & MALET-MARTINO, 2011; XAVIER & SOUSA, 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2005), medicamentos adulterados são aqueles intencional e criminosamente rotulados de forma incorreta com relação à identificação e/ou fonte. Esta prática tem proporcionado a distribuição de fármacos sem padrões de qualidade, segurança e eficácia e atinge desde medicamentos para o tratamento de doenças graves como também os mais simples, a exemplo dos analgésicos (HOLZGRABE & MALET-MARTINO, 2011; AMES & SOUZA, 2012; DECONINCK et al., 2012; MELO et al., 2013).

Neste caso, no Brasil, torna-se necessário uma maior atenção para os agentes anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's), pois segundo dados da companhia Boehringer Ingelheim essa classe apresenta três substâncias que detêm 95 % do mercado brasileiro, sendo os medicamentos que contêm dipirona com 39 %, seguido de paracetamol com 30 % e ácido acetilsalicílico com 26 % das vendas (MELO et al., 2013).

O paracetamol (acetaminofeno, N-acetil-p-aminofenol, N-(4-Hidroxifenil)acetamida) é uma amida aromática derivada da fenacetina que foi utilizada pela primeira vez na medicina por Von Mering em 1893 como antipirético e analgésico. Contudo, mesmo apresentando essas ações terapêuticas quando utilizado de forma individual, é possível encontrá-lo no mercado em combinação com a cafeína (1,3,7-trimetilxantina, 3,7-Diidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona), um alcaloide do grupo das xantinas, que apresenta efeito analgésico adjuvante devido a ação antinociceptiva intrínseca (LOURENÇÃO et al., 2009; TAVARES & SAKATA, 2012; GODOY, GONÇALVES & MORAES, 2012).

A associação de fármacos é uma prática comum na indústria farmacêutica, entretanto, a junção de substâncias torna difícil o controle da qualidade uma vez que a quantificação de qualquer componente da formulação torna-se complicada, sendo recomendado o uso de métodos cromatográficos, a exemplo da cromatografia líquida de alta eficiência (CORDEIRO et al., 2008).

Vale ressaltar, no entanto, que mesmo possuindo um alto poder analítico, essa é uma técnica relativamente complicada, devido, dentre outras coisas, as inúmeras etapas na preparação da amostra, a necessidade de solventes caros e com elevado grau de pureza para as análises, além de pessoal qualificado para a manipulação analítica e a produção de resíduos

prejudiciais ao meio ambiente. Sendo assim, torna-se de difícil aplicação principalmente para produtos farmacêuticos em fase sólida (LOURENÇÃO et al., 2009; KHANMOHAMMADI et al., 2012; SOUZA et al., 2012).

Diante de tal complexidade, pesquisadores têm proposto a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) para controle da qualidade de preparações farmacêuticas sólidas (CRUZ & BLANCO, 2011; BIKIARIS et al., 2012; BOYER et al., 2012; HENNIGAN & RYDER, 2013). Todavia, os sinais espectrais da região do NIR são comumente largos e sobrepostos, uma vez que derivam de sobretons e bandas de combinação das transições vibracionais fundamentais de C-H, N-H, O-H e S-H, dificultando uma atribuição precisa de picos (LIMA et al., 2009; DE SOUZA et al., 2013).

Dessa forma, uma alternativa útil na interpretação dos dados obtidos por NIR seria a aplicação da quimiometria, que permite, por exemplo, a verificação das similaridades e diferenças entre grupos de amostras, com métodos como o K-ésimo vizinho mais próximo (KNN) e a Análise discriminante linear (LDA) (DE BARROS NETO; SCARMINIO & BRUNS, 2006; CORREIA & FERREIRA, 2007).

No método KNN, a classificação é realizada a partir do cálculo da distância euclidiana de um objeto desconhecido em relação às k-ésimas amostras vizinhas. Já na LDA, faz-se necessário além das funções discriminantes lineares, que permitem um aumento da variância interclasse e uma diminuição da variância intraclasse, sendo necessário, entretanto, selecionar variáveis com técnicas como Algoritmo das projeções sucessivas (SPA) e o Algoritmo genético (GA) (DE BARROS NETO; SCARMINIO & BRUNS, 2006; BERRUETA; ALONSO-SALCES & HÉBERGER, 2007; ROGGO et al., 2007; MELO et al., 2013).

O SPA foi proposto para minimizar problemas na regressão linear múltipla (MLR), posteriormente, graças à minimização da colinearidade proporcionada, foi utilizado em problemas de classificação na LDA. O GA, diferentemente, foi proposto em 1960 para otimizar sistemas complexos, tornando-se na atualidade uma das técnicas de seleção de variáveis mais utilizada (ARAÚJO et al., 2001; COSTA FILHO & POPPI, 1999; SOARES et al., 2010; MELO et al., 2013).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver modelos quimiométrico a partir de espectros NIR, para classificação de medicamentos contendo paracetamol e cafeína, a fim de viabilizar uma futura distinção entre produtos referência e genéricos de possíveis produtos falsificados.

Metodologia

Amostras

Comprimidos contendo paracetamol (500 mg) e cafeína (65 mg) foram adquiridos em farmácias do estado da Paraíba (Brasil). Os medicamentos pertenciam a 15 lotes de um medicamento referência (R), 15 lotes de um genérico 1 (G1) e 15 lotes de um genérico 2 (G2). Os medicamentos genéricos continham os mesmos excipientes e se assemelhavam com os apresentados pelo medicamento de referência (Tabela 1).

Tabela 1. Excipientes dos medicamentos analisados

R	G1	G2
Amido de milho	Celulose microcristalina	Celulose microcristalina
Amido pré-gelatinizado	Amido pré-gelatinizado	Amido pré-gelatinizado
Amidoglicolato de sódio	Amidoglicolato de sódio	Amidoglicolato de sódio
Celulose microfina	Copovidona	Copovidona
Corante amarelo FD&C nº 6 laca alumínio	Croscarmelose sódica	Croscarmelose sódica
Corante vermelho 40 laca alumínio	Corante vermelho 40 laca alumínio	Corante vermelho 40 laca alumínio
Dióxido de titânio	Dióxido de titânio	Dióxido de titânio
Estearato de magnésio	Estearato de magnésio	Estearato de magnésio
Hipromelose	Hipromelose + macrogol	Hipromelose + macrogol
Macrogol	Água purificada	Água purificada
	Povidona	Povidona
	Ácido esteárico	Ácido esteárico

Análise espectroscópica no infravermelho próximo (NIR)

Os experimentos foram realizados num intervalo espectral de 1.950 a 2.500 nm, resolução de 2 nm, utilizando o espectrofotômetro Lambda 750 UV/VIS/NIR, marca PerkinElmer®, equipado com acessório de reflectância difusa The Praying Mantis™ (DRP),

marca Harrick. Para análise foram triturados comprimidos de cada um dos 45 lotes e coletados três espectros, totalizando 135 espectros obtidos. Para obtenção e armazenamento dos dados foi utilizado o software PerkinElmer UV WinLab.

Estudo Quimiométrico

A faixa de trabalho foi pré-processada empregando-se a primeira derivada, com o filtro de Savitzky-Golay, polinômio de segunda ordem e janela de 19 pontos com o software Unscrambler 9.8. Em seguida, empregando o algoritmo Kennard-Stone (KS) o conjunto total de amostras foi particionado em conjunto de treinamento (90 amostras, sendo 30 R, 30 G1 e 30 G2) e de teste (45 amostras, sendo 15 R, 15 G1 e 15 G2) que foram utilizados para construção e validação dos modelos análise discriminante linear com algoritmo das projeções sucessivas (SPA-LDA), análise discriminante linear com algoritmo genético (GA-LDA) e K-ésimo vizinho mais próximo (KNN) em ambiente Matlab 2011a.

As 90 amostras do conjunto de treinamento foram utilizadas para obter os parâmetros do modelo e para realizar sua validação cruzada, já as 45 amostras de teste foram utilizadas para avaliar a capacidade discriminante dos modelos quimiométricos construídos em relação as amostras fora do conjunto de calibração.

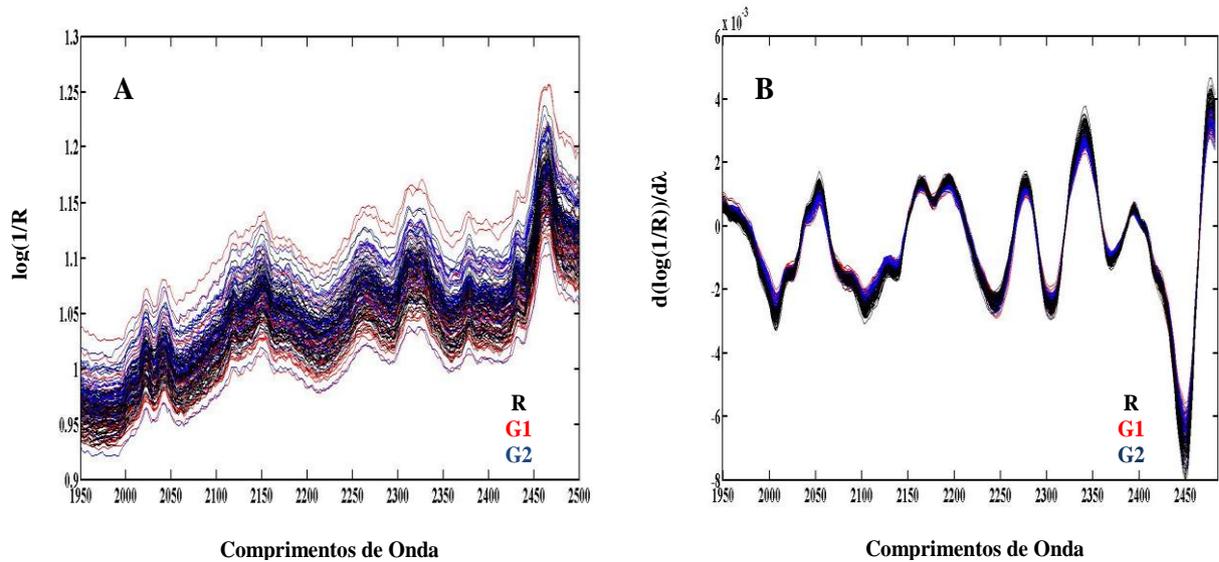
Resultados e discussão

Espectros NIR

Na Figura 1A são observados os 135 espectros brutos dos três tipos de medicamentos: Referência (R), Genérico 1 (G1) e Genérico 2 (G2), obtidos no intervalo de 1.950 a 2.500 nm. A análise desses espectros permitiu visualizar uma alteração do perfil da linha de base, a qual foi ajustada com a utilização da primeira derivada, filtro de Savitzky-Golay, polinômio de segunda ordem e janela de 19 pontos (Figura 1B).

O emprego do pré-processamento dos espectros NIR tornou-se fundamental na análise quimiométrica com a finalidade de remover alterações indesejadas para melhorar, por exemplo, os resultados de um modelo de classificação subsequente (RINNAN, VAN DEN BERG & ENGELSEN, 2009).

Figura 1. Espectros dos medicamentos: brutos (A); após o pré-processamento (B)



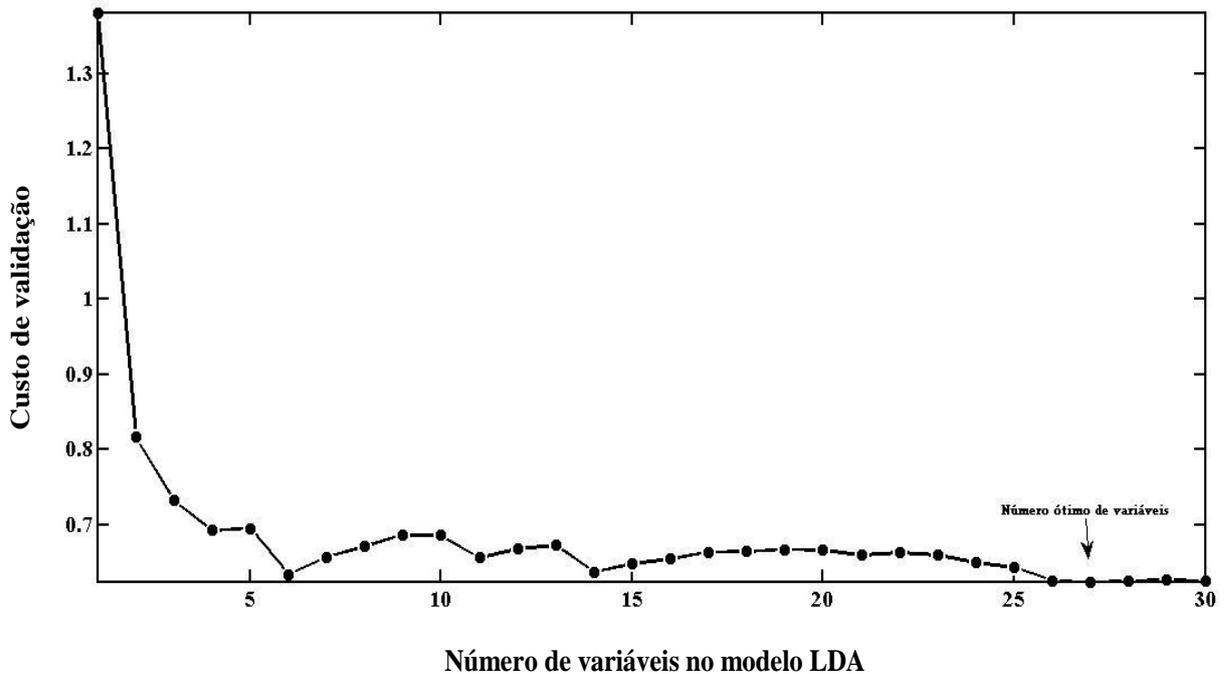
Com a análise da Figura 1B foi possível perceber que as amostras pertencentes a R, G1 e G2 apresentavam os espectros NIR com perfis semelhantes e sobrepostos, o que possivelmente procedeu da similaridade na composição das amostras, pois G1 e G2 apresentavam os mesmo excipientes, os quais se assemelhavam com os de R (Tabela 1). Observou-se também que os picos apresentados nos espectros estavam associados tanto a região do primeiro sobretom relativo a ligação C=O (1.950 a 2.050 nm), como também a região de combinação relativa as ligações N-H, C-C, OH, CH, CH₃ (2.050 a 2.500 nm) (XIAOBO et al., 2010).

Assim, devido à complexidade e a semelhança apresentadas pelos espectros NIR, a distinção entre as amostras só foi possível com a aplicação da quimiometria, que permite a seleção, interpretação, classificação e previsão de informações químicas (OTTO, 2007; DE SOUZA & POPPI, 2012).

Classificação SPA-LDA

Foi selecionado o número ótimo de variáveis na construção do modelo SPA-LDA com intuito de reduzir os erros de classificação a partir da função de custo G, que corresponde ao risco médio de uma classificação, levando-se em conta o número de variáveis selecionadas. Dessa forma, o mínimo ideal de erros foi obtido com vinte e sete comprimentos de onda selecionados, uma vez que a utilização de 6 e 14 variáveis causaram vários erros de classificação (Figura 2).

Figura 2. Gráfico de custo associado à seleção de variáveis com o SPA nos dados NIR



As variáveis selecionadas pelo SPA a partir dos dados NIR estavam localizadas em diferentes posições dos espectros, indicados na Figura 3A.

Os comprimentos de onda localizados na região de primeiro sobretom (1.952 a 2.010 nm) estão associados a vibrações de C=O presente nas estruturas químicas do amidoglicolato de sódio, estearato de magnésio, ácido esteárico, povidona, copovidona, croscarmelose sódica, paracetamol e cafeína. Já os comprimentos de onda localizados na região de combinação (2.052 a 2.480 nm) estão associados a transição NH presente na povidona e a vibrações: de NH do paracetamol; de C-C presentes no amido de milho, amido pré-gelatinizado, amidoglicolato de sódio, celulose microfina, celulose microcristalina, estearato de magnésio, hipromelose, macrogol, povidona, copovidona, croscarmelose sódica, ácido esteárico, paracetamol e cafeína; de OH da estrutura da água purificada, amido de milho, amido pré-gelatinizado, amidoglicolato de sódio, celulose microfina, celulose microcristalina, hipromelose, macrogol, ácido esteárico e paracetamol; de estiramento CH que compõem as estruturas do amido de milho, amido pré-gelatinizado, amidoglicolato de sódio, de deformação do CH presente na celulose microfina e celulose microcristalina e de grupo metil (CH₃) presentes na copovidona, paracetamol e cafeína.

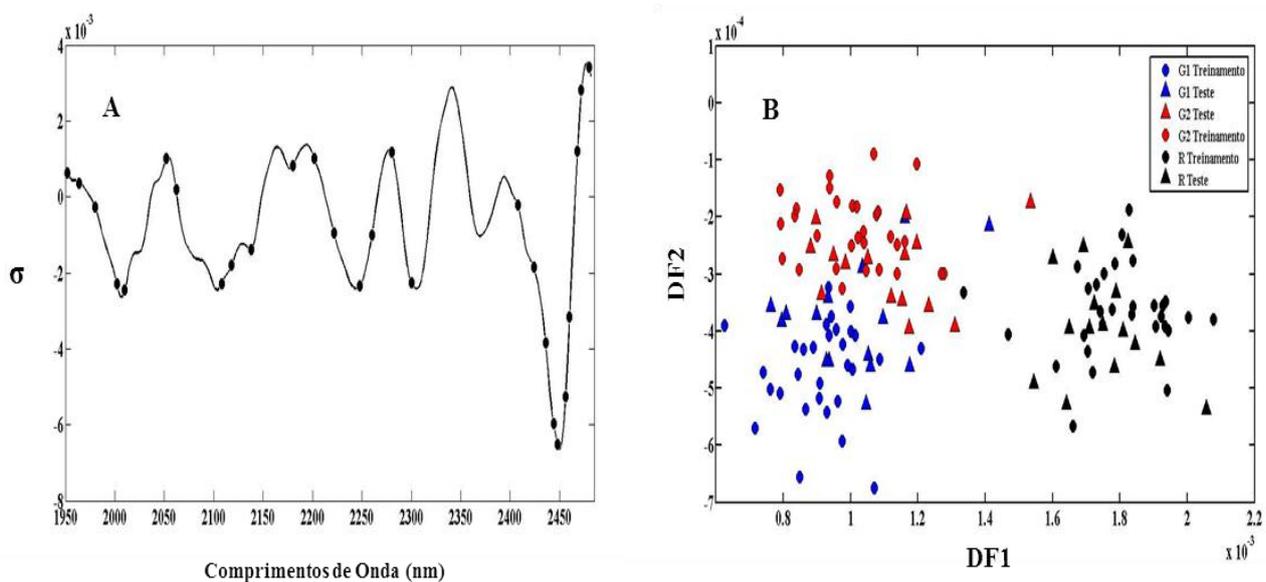
A espectroscopia NIR possibilita a análise de componentes que estejam em concentrações aproximadamente superiores a 0,5% m/m (DE SOUZA et al., 2013), dessa forma, possivelmente essa técnica foi capaz de detectar o sobretom e bandas de combinação

exibidos pelos excipientes, os ingredientes ativos e possíveis impurezas que podiam estar presentes nos medicamentos.

Assim, os excipientes povidona (vibrações de C=O, C-C e de transição NH), copovidona (vibrações de C=O, C-C, CH₃), croscarmelose sódica (vibrações de C=O, C-C), água purificada (vibração de OH) e ácido esteárico (vibrações de C=O, C-C, OH), que estavam presentes nos medicamentos genéricos (G1 e G2) e ausentes nos medicamentos de referência (R) (Tabela 1), como também, possíveis impurezas existentes nas amostras podem ter contribuído para classificação (Figura 3B).

As impurezas podem ser oriundas de várias fontes, como: matérias prima, subprodutos, catalisadores, reagentes, dentre outras (VIEIRA, REDIGUIERI & REDIGUIERI, 2013). Logo, como os medicamentos pertenciam a vários lotes e foram fabricados por empresas distintas, que provavelmente utilizavam matérias prima de origens diferentes, as possíveis impurezas presentes nos medicamentos não possuíam semelhanças.

Figura 3. Resultados SPA-LDA: espectro médio com os comprimentos de onda selecionados por SPA (A); gráfico de separação das classes de medicamentos (B)



Os resultados da classificação realizada pelo modelo SPA-LDA, construído com as vinte e sete variáveis selecionadas, permitiu observar a formação de três grupos de amostras (Figura 3B), dois grupos bem próximos um do outro e localizados a esquerda do gráfico, pertencentes aos genéricos (G1 e G2) e um outro grupo mais afastado e localizado a direita, pertencente ao referência (R). O modelo apresentou uma taxa de acerto de 97,77 % para o conjunto de treinamento (2 erros num total de 90 amostras) e de 84,44 % para o conjunto de teste (7 erros num total de 45 amostras).

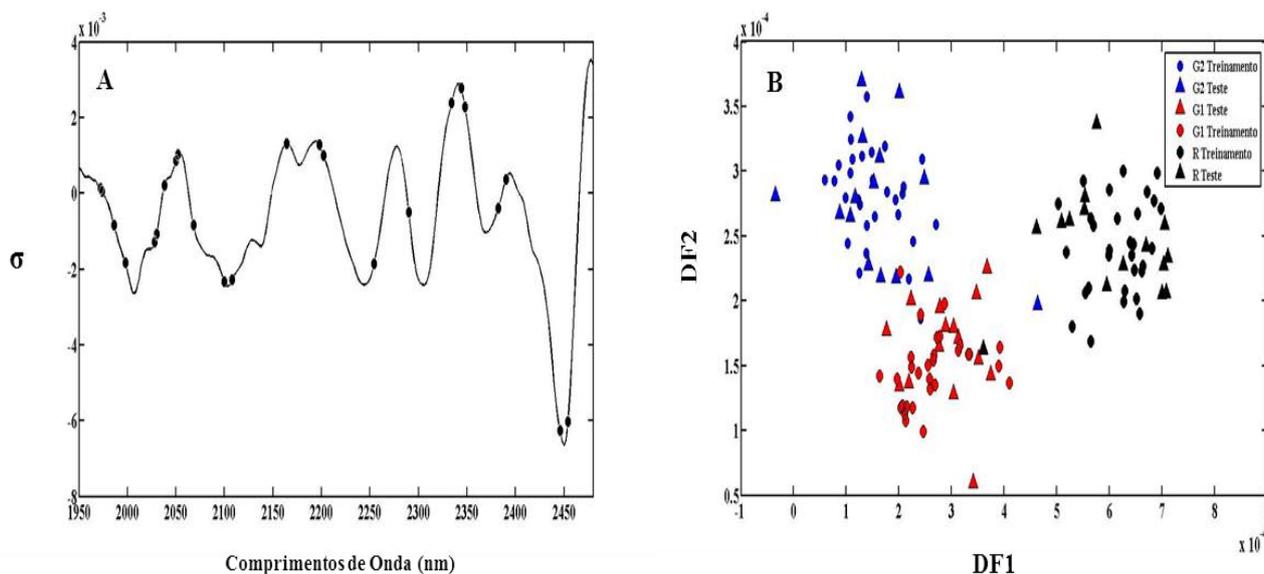
Esses erros possivelmente estão relacionados a igualdade entre os excipientes de G1 e G2 (Tabela 1) e/ou a produtos de degradação, que segundo Vieira, Redigueri & Redigueri (2013), comumente apresentam similaridade com a estrutura química do ingrediente ativo farmacêutico, uma vez que são provenientes de modificações químicas nos fármacos.

Classificação GA-LDA

No modelo GA-LDA, o emprego do algoritmo genético proporcionou a seleção de vinte e quatro comprimentos de onda, localizados nas regiões de primeiro sobretom (1.972 a 2.038 nm) e de combinação (2.050 a 2.454 nm), os quais foram atribuídos às vibrações fundamentais de C=O, N-H, C-C, OH, CH, CH₃ (Figura 4A).

A capacidade de discriminação do modelo GA-LDA, construído utilizando uma população de 10 indivíduos, 100 gerações, probabilidade de crossover de 0,6, probabilidade de mutação de 0,1 e as vinte e quatro variáveis selecionadas entre as 265 disponíveis, foi confirmada com os conjuntos de treinamento e teste (Figura 4B), mostrando que o modelo foi eficaz na classificação de 96,66 % das amostras de treinamento (3 erros num total de 90 amostras) e de 93,33 % das amostras de teste (3 erros num total de 45 amostras).

Figura 4. Resultados GA-LDA: comprimentos de onda selecionados pelo GA (A); gráfico de separação das classes de medicamentos (B)



Assim como no modelo SPA-LDA, provavelmente a separação dos medicamentos aconteceu devido a seleção de variáveis que estavam relacionadas com vibrações de grupos funcionais e/ou ligações presentes em impurezas ou nos excipientes que não estavam contidos

nos medicamentos de referência. Da mesma forma, a persistência de erros de classificação possivelmente procedeu da presença de produtos de degradação.

Vale destacar, entretanto, que houve diferença entre os modelos no que se refere a quantidade dos erros de classificação, pois ocorreu diminuição de um erro no conjunto de treinamento e de quatro erros no conjunto de teste. Esse episódio possivelmente aconteceu porque as variáveis selecionadas pelo GA foram diferentes das escolhidas pelo SPA e provavelmente continham outras informações, as quais facilitaram a distinção entre as amostras no conjunto de teste e dificultaram no conjunto de treinamento.

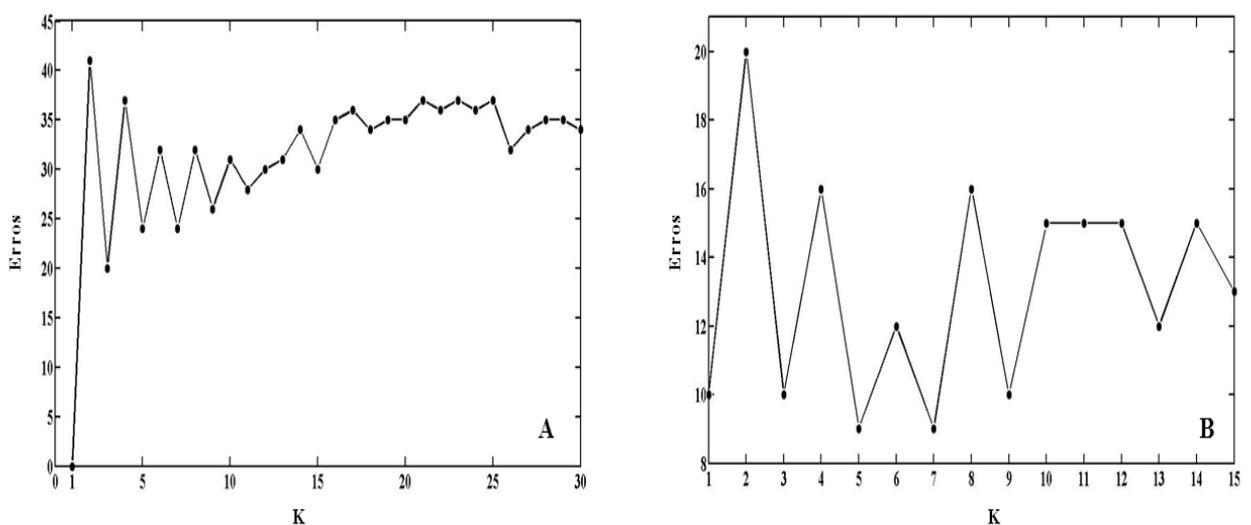
Classificação KNN

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos nas técnicas SPA-LDA e GA-LDA, aplicou-se o algoritmo KNN ao conjunto de amostras. Para tanto, construiu-se o modelo com a faixa espectral de trabalho (1.950 a 2.500 nm) e comparando-se a distância das amostras do conjunto de teste, com as amostras de cada uma das classes do conjunto de treinamento. Dessa forma, uma dada amostra de medicamento foi considerada como pertencente a uma das classes (G1, G2 ou R) que apresentasse o maior número de seus vizinhos mais próximos.

Para validação cruzada do modelo utilizou-se o conjunto de treinamento e foram feitos testes com até 30 vizinhos mais próximos, obtendo-se o melhor resultado com a utilização de apenas um vizinho, pois 100 % das amostras foram classificadas com sucesso (Figura 5A).

Para o conjunto de teste foram avaliados até 15 vizinhos mais próximos, sendo o melhor resultado obtido com cinco vizinhos, pois o modelo apresentou apenas nove erros de classificação, o que representa uma taxa de classificação correta de 80 % (Figura 5B).

Figura 5. Erros de classificação no KNN: para as amostras do conjunto de treinamento (A); para as amostras do conjunto de teste (B)



O método KNN promoveu a separação entre as três classes de medicamentos (G1, G2 e R), possibilitando uma futura distinção entre produtos pertencentes a medicamentos de referência ou genérico, de possíveis produtos falsificados. Segundo Berrueta; Alonso-Salces & Héberger (2007), essa técnica permite a classificação de amostras com qualidade semelhante às outras técnicas de reconhecimento de padrão.

Conclusão

A espectroscopia NIR associada a métodos quimiométricos provou ser uma técnica rápida, de baixo custo, que não gera resíduos poluentes e é útil para análises que envolvam medicamentos.

Os resultados alcançados comprovam a viabilidade dos modelos SPA-LDA, GA-LDA e KNN para classificar medicamentos de referência e genéricos que contenham paracetamol e cafeína, o que possibilita uma futura diferenciação entre produtos com qualidade dos falsificados.

Comparando-se as técnicas quimiométricas utilizadas a GA-LDA foi a de melhor aplicabilidade, pois apresentou o menor número de erros de classificação, utilizando menos variáveis para construção do modelo.

Referências

- AMES, J.; SOUZA, D.Z. Falsificação de medicamentos no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, vol.46, n.1, p.154-159, 2012.
- ARAÚJO, M.C.U.; SALDANHA, T.C.B.; GALVÃO, R.K.H.; YONEYAMA, T.; CHAME, H.C.; VISANI, V. The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol.57, p.65-73, 2001.
- BERRUETA, L.A.; ALONSO-SALCES, R.M.; HÉBERGER, K. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, vol.1158, p.196-214, 2007.
- BIKIARIS, D.; KOUTRI, I.; ALEXIADIS, D.; DAMTSIOS, A.; KARAGIANNIS, G. Real time and non-destructive analysis of tablet coating thickness using acoustic microscopy and infrared diffuse reflectance spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, vol.438, p.33-44, 2012.
- BOYER, C.; GAUDIN, K.; KAUSS, T.; GAUBERT, A.; BOUDIS, A.; VERSCHOLDEN, J.; FRANC, M.; ROUSSILLE, J.; BOUCHER, J.; OLLIARO, P.; WHITE, N. J.; MILLET, P.; DUBOST, J.-P. Development of NIRS method for quality control of drug combination artesunate–azithromycin for the treatment of severe malaria. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.67-68, p.10-15, 2012.

- CORDEIRO, G.A.; PERALTA-ZAMORA, P.; NAGATA, N.; PONTAROLLO, R. Determinação de misturas de sulfametoxazol e trimetoprima por espectroscopia eletrônica multivariada. *Química Nova*, vol.31, n.2, p.254-260, 2008.
- CORREIA, P.R.M.; FERREIRA, M.M.C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Química Nova*, vol.30, n.2, p.481-487, 2007.
- COSTA FILHO, P.A.; POPPI, R.J. Algoritmo genético em química. *Química Nova*, vol.22, n.3, p.405-411, 1999.
- CRUZ, J.; BLANCO, M. Content uniformity studies in tablets by NIR-CI. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.56, p.408-412, 2011.
- DE BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. 25 anos de quimiometria no Brasil. *Química Nova*, vol.29, n.6, p.1401-1406, 2006.
- DE SOUZA, A.M.; BREITKREITZ, M.C.; FILGUEIRAS, P.R.; ROHWEDDER, J.J.R.; POPPI, R.J. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. *Química Nova*, vol.36, n.7, p.1057-1065, 2013.
- DE SOUZA, A.M.; POPPI, R.J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. *Química Nova*, vol.35, n.1, p.223-229, 2012.
- DECONINCK, E.; SACRÉ, P.Y.; COOMANS, D.; DE BEER, J. Classification trees based on infrared spectroscopic data to discriminate between genuine and counterfeit medicines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.57, p.68-75, 2012.
- GODOY, H.R.V.; GONÇALVES, F.B.; MORAES, C.F. Associação de cafeína ao paracetamol no tratamento da dor. *Revista de Medicina e Saúde de Brasília*, vol.1, n.3, p.169-173, 2012.
- HENNIGAN, M.C.; RYDER, A.G. Quantitative polymorph contaminant analysis in tablets using Raman and near infra-red spectroscopies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol.72, p.163-171, 2013.
- HOLZGRABE, U.; MALET-MARTINO, M. Analytical challenges in drug counterfeiting and falsification – The NMR approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.55, p.679-687, 2011.
- KHANMOHAMMADI, M.; SOLEIMANI, M.; MOROVVAT, F.; GARMARUDI, A. B.; KHALAFBEIGI, M.; GHASEMI, K. Simultaneous determination of paracetamol and codeine phosphate in tablets by TGA and chemometrics. *Thermochimica Acta*, vol.530, p.128-132, 2012.

- LIMA, K.M.G.; RAIMUNDO JR., I.M.; SILVA, A.M.S.; PIMENTEL, M.F. Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. *Química Nova*, vol.32, n.6, p.1635-1643, 2009.
- LOURENÇÃO, B. C.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; MAZO, L. H.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. *Talanta*, vol.78, p.748-752, 2009.
- MELO, C.A.D.; SILVA, P.; GOMES, A.A.; FERNANDES, D.D.S.; VÉRAS, G.; MEDEIROS, A.C.D. Classification of Tablets containing dipyron, caffeine and orphenadrine by near infrared spectroscopy and chemometric tools. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol.24, n.6, p.991-997, 2013.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Medicamentos falsificados: Diretrizes para desenvolvimento de medidas de combate a medicamentos falsificados*. Brasília, 2005.
- OTTO, M. *Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry*, 2 ed., Weinheim, Wiley-VCH, 2007, caps.1 e 5.
- RINNAN, Å.; VAN DEN BERG, F.; ENGELSEN, S.B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *Trends in Analytical Chemistry*, vol.28, n.10, 2009.
- ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; LEMA-MARTINEZ, C.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.44, p.683-700, 2007.
- SOARES, A.S.; GALVÃO, R.K.H.; ARAÚJO, M.C.U.; SOARES, S.F.C.; PINTO, L.A. Multi-Core computation in chemometrics: case studies of voltammetric and NIR spectrometric analyses. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol.21, n.9, p.1626-1634, 2010.
- SOUZA, J.A.L.; ALBUQUERQUE, M.M.; GRANGEIRO JR, S.; PIMENTEL, M.F.; SANTANA, D.P.; SIMÕES, S.S. Quantification of captopril disulphide as a degradation product in captopril tablets using near infrared spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, vol.62, p.35-41, 2012.
- TAVARES, C.; SAKATA, R.K. Caffeine in the Treatment of Pain. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, vol.62, n.3, p.387-401, 2012.
- VIEIRA, F.P.; REDIGUIERI, C.F.; REDIGUIERI, C.F. *A regulação de medicamentos no Brasil*. Porto Alegre: Artmed, 2013, cap.23.

XAVIER, M.P.; SOUSA, S.F. Análise do teor de ácido acetilsalicílico 100mg em comprimidos comercializados no município de Gurupi-TO. *Revista Amazônia*, vol.1, n.3, p.35-42, 2013.

XIAOBO, Z.; JIEWEN, Z.; POVEY, M.J.W.; HOLMES, M.; HANPIN, M. Variables selection methods in near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, vol.667, p.14-32, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho alcançou os objetivos pretendidos ao conseguir discriminar amostras de medicamentos analgésicos que continham paracetamol e cafeína, a partir da associação da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e da Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) a quimiometria. Dessa forma, fica viabilizada uma futura diferenciação entre medicamentos contendo esses analgésicos e que estejam dentro dos padrões de qualidade, daqueles possivelmente falsificados.

A análise dos resultados obtidos permitiu inferir que as técnicas DSC e NIR associadas a métodos quimiométricos são alternativas eficientes ao uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com a vantagem de alcançarem resultados com rapidez, baixo custo e sem geração de resíduos poluentes, o que torna viável a utilização dessas técnicas para agilizar o controle da qualidade nas indústrias farmacêuticas, bem como, para auxiliar os órgãos de fiscalização na detecção rápida de adulterações em medicamentos.

Por fim, torna-se indispensável destacar que a ampliação do conhecimento sobre os métodos quimiométricos na área farmacêutica faz-se necessário, para permite a utilização de outras técnicas que também sejam ágeis e eficientes, com o intuito de reduzir os riscos de intoxicação ou ineficácia terapêutica, provocadas pelas preparações farmacêuticas cujo controle da qualidade não foi eficiente.