

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

PAULA CONSUL KAZMIRCZAK

**APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E FERRAMENTAS
DE ANÁLISE MULTIVARIADA NA AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS COMERCIAIS DE CAPTOPRIL**

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

PAULA CONSUL KAZMIRCZAK

**APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E FERRAMENTAS
DE ANÁLISE MULTIVARIADA NA AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS COMERCIAIS DE CAPTOPRIL**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico - Química” do Curso de Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção do grau de Químico Industrial pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão
Orientador

Porto Alegre
2016

Às pessoas que mais amo, Ana Lia Consul Kazmirczak e Claudio Kazmirczak.

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor orientador, Dr. Marco Flôres Ferrão, pela paciência, ensinamentos e confiança depositada.

Aos meus colegas de trabalho, Dra. Emanuelli Gracioli, Guilherme Noschang, Jonathan Martins, Dr. Júlio Endres, Noemi Borges, Rubens Thomaz e Salete Satte, pelos conselhos, apoio, compreensão e pela amizade.

À Dra. Maria Cândida Mendes da Fundação de Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, pela disponibilidade, dedicação e empenho em me ajudar.

Ao Dr. Adamastor Rodrigues Tôrres da Universidade Federal da Paraíba, por gentilmente fornecer os espectros do padrão de captopril e excipientes.

Ao prof. Dr. Aloir Antonio Merlo, ao Dr. Júlio Vaghetti e à equipe do LAMAT-UFRGS pela enorme força que me deram.

A todos os meus amigos, em especial à Flávia Sonaglio, Laís Ferreira, Luana Benetti e Lucas Barnett, que sempre estiveram ao meu lado e me ajudaram durante o longo caminho que percorremos na faculdade.

E principalmente aos meus amados pais, Ana e Claudio, minhas irmãs, Fernanda e Renata, e meu namorado, Juliano, por sempre acreditarem em mim, me incentivarem e por me darem todo o suporte necessário.

RESUMO

O captopril é um agente anti-hipertensivo frequentemente indicado em casos de hipertensão arterial sistêmica, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio e nefropatia diabética. Possui elevada estabilidade química, porém sofre oxidação quando exposto ao calor e umidade, dimerizando a dissulfeto de captopril, considerado a principal impureza do medicamento. Devido a importância do fármaco, deve-se ter um controle rigoroso sobre o processo de produção. Nesse contexto, propõe-se a utilização da espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier empregando reflexão total atenuada (FTIR-ATR) em conjunto com ferramentas de análise multivariada como a análise por componentes principais (PCA) e a análise por hierarquia de agrupamentos (HCA) para avaliar a conformidade de formulações farmacêuticas comerciais de captopril. Dessa forma, foi demonstrada a eficácia da técnica na verificação da concentração do ativo nos comprimidos analisados, além da avaliação da homogeneidade entre diferentes laboratórios fabricantes, no que diz respeito a composição dos excipientes dos comprimidos. Para avaliar a potencialidade da metodologia proposta na verificação de alterações estruturais de componentes do fármaco, foi testada a degradação de duas maneiras distintas, aquecendo-se as amostras em estufa a 80°C, sendo um grupo previamente solubilizado em água e outro levado diretamente no estado sólido. Como resultado da análise quimiométrica, obteve-se segregação do grupo solubilizado em relação ao restante das amostras, indicando a possibilidade de utilização da metodologia no controle de qualidade das indústrias farmacêuticas. No entanto, a degradação promovida nas amostras sólidas não pode ser verificada por meio dessa técnica.

Palavras-chave: Captopril. Degradação. Espectroscopia no infravermelho médio. Análise multivariada. Análise por componentes principais (PCA). Análise por hierarquia de agrupamentos (HCA).

ABSTRACT

Captopril is an antihypertensive agent often recommended in cases of systemic arterial hypertension, heart failure, myocardial infarction and diabetic nephropathy. Although this agent has high chemical stability, it undergoes oxidation when exposed to heat and moisture, dimerizing to captopril disulfide, which is considered the drug main impurity. Because of the importance of this drug, strict control over the production process must be performed. Following this context, it is proposed to use Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FTIR-ATR) together with multivariate analysis tools, such as principal component analysis (PCA) and hierarchical clusters analysis (HCA), to evaluate the compliance of captopril commercial pharmaceutical formulations. Therefore, it was demonstrated the technique efficacy to verify the active ingredient concentration in the analyzed tablets. In addition, it was also evaluated the homogeneity between different manufacturers laboratories, regarding the composition of the tablet excipients. In order to evaluate the proposed methodology potential to verify the structural alterations of drug components, degradation was analysed heating the samples up in an oven at 80 °C through two different approaches: one group was previously solubilized in water and the other group was analysed in the solid state itself. As result of the multivariate analysis, segregation of the solubilized group was obtained when compared to the rest of the samples, indicating the possibility of use the methodology for the quality control of the pharmaceutical industries. However, the degradation induced in the solid samples could not be verified by this technique.

Key-words: Captopril. Degradation. Infrared spectroscopy. Multivariate analysis. Principal components analysis (PCA). Hierarchical clusters analysis (HCA).

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	Espectroscopia por reflexão total atenuada
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
HCA	Análise por hierarquia de agrupamentos
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IECA	Inibidor da enzima conversora da angiotensina
iPCA	Análise por componentes principais por intervalos
MSC	Correção do espalhamento multiplicativo
PC	Componente principal
PCA	Análise por componentes principais
SNV	Padronização normal de sinal
UV/Vis	Ultravioleta/Visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura química do 1-[(2S)-3-Mercapto-2-metil-1-oxopropil]-L-prolina.....	12
Figura 2 – Fórmula estrutural do dissulfeto de captopril.....	12
Figura 3 – Tipos de vibrações moleculares. Nota: + indica movimento para fora da página, na direção do leitor; e – indica movimento para longe do leitor. ¹⁸	14
Figura 4 – Representação de um sistema ATR com múltiplas reflexões.	15
Figura 5 – Espectros de infravermelho das amostras após alisamento, obtidos na região de 4000 a 650 cm ⁻¹	24
Figura 6 – Espectros FTIR-ATR pré-tratados das amostras, onde somente a região entre 1800 a 701 cm ⁻¹ foi selecionada.	25
Figura 7 – Dendrograma dos fármacos analisados. As letras após o código de cada amostra representam as triplicas realizadas.	26
Figura 8 – Gráfico de escores da PC1 em função da PC2 para as amostras de captopril.....	27
Figura 9 – Gráfico de <i>loadings</i> da PC1.....	28
Figura 10 – Gráfico de <i>loadings</i> para a PC2.....	29
Figura 11 – Espectros FTIR-ATR alisados e normalizados das amostras CA01, CA04, CA06, CA08 e CA10, na região de 4000 a 650 cm ⁻¹	30
Figura 12 – Espectros FTIR-ATR alisados e normalizados das amostras DA01, DA04, DA06, DA08 e DA10, na região de 4000 a 650 cm ⁻¹	30
Figura 13 – Espectros FTIR-ATR alisados e normalizados das amostras DS01, DS04, DS06, DS08 e DS10, na região de 4000 a 650 cm ⁻¹	31
Figura 14 – Dendrograma das amostras CA, DA e DS, realizado para a região de impressão digital do fármaco.....	32
Figura 15 – Gráfico de <i>loadings</i> dos espectros das amostras CA, DA e DS, divididos em 9 intervalos equidistantes.	32
Figura 16 – Gráficos de pesos da PC1 x PC2 para os intervalos 1, 2, 3 e 8. Nota: as amostras do grupo CA estão representadas em roxo; as da classe DA estão em vermelho; e as DS em azul claro.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações das amostras de captopril.	22
Tabela 2 – Valor dos consumíveis para análise por UV/Vis.	36
Tabela 3 – Custo da análise de 100 amostras por UV/Vis.....	36
Tabela 4 – Valor dos consumíveis utilizados para análise por HPLC.	37
Tabela 5 – Custo de 100 análises por HPLC.....	37
Tabela 6 – Custos da análise de 100 amostras por infravermelho.	38

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	10
2	ESTADO DA ARTE	11
2.1	CAPTOPRIL	11
2.2	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	13
2.2.1	Espectrômetros com transformada de Fourier	14
2.2.2	Espectroscopia por reflexão total atenuada	14
2.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA	15
2.3.1	Pré-tratamento dos dados	16
2.3.1.1	Técnicas de alisamento (<i>Smoothing</i>)	16
2.3.1.2	Normalização	16
2.3.1.3	Derivadas	17
2.3.1.4	Outras correções comuns	17
2.3.1.5	Pré-processamento	18
2.3.2	Análise exploratória dos dados	18
2.3.2.1	Análise por componentes principais (PCA)	18
2.3.2.2	Análise por hierarquia de agrupamentos (HCA)	19
3	OBJETIVOS	21
3.1	GERAL	21
3.2	ESPECÍFICOS	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	AVALIAÇÃO DA UNIFORMIDADE ENTRE FORMULAÇÕES	24
5.2	AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO FÁRMACO	29
6	AVALIAÇÃO DE CUSTOS	35
6.1	PROCEDIMENTO DESCRITO PELA FARMACOPEIA	35
6.1.1	Uniformidade de doses unitárias	35
6.1.2	Ensaio de pureza: limite de dissulfeto de captopril	36
6.2	CUSTO DO ENSAIO UTILIZANDO FTIR-ATR	37
7	CONCLUSÕES	39
8	SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO	40
9	REFERÊNCIAS	41
	ANEXO A – ESPECTROS FTIR-ATR PRÉ-TRATADOS	44

1 APRESENTAÇÃO

A produção e comercialização de fármacos deve seguir rigorosamente os preceitos da legislação vigente no que diz respeito à pureza de compostos ativos bioquimicamente e dos outros componentes presentes na composição dos medicamentos (excipientes). Além disso, deve garantir que o processo de fabricação não introduza variáveis indesejáveis de maneira que inviabilize a distribuição de lotes produzidos.

A estabilidade dos compostos que compõem uma formulação farmacêutica é outro critério bastante importante e que merece atenção e destaque em estudos que envolvem o setor farmacêutico. Isso porque o uso de um medicamento fora dos padrões exigidos, além de não produzir o efeito esperado no organismo, pode acarretar sérios danos à saúde.

Em virtude disso, a conformidade dos lotes deve ser verificada periodicamente, e utilizando-se de metodologias analíticas adequadas para a validação de cada parâmetro estabelecido. Assim, o uso de técnicas pouco morosas facilita o controle do processo, possibilitando correções na linha de produção quando detectada alguma divergência, evitando prejuízos às indústrias e consumidores.

No caso do captopril, já foi demonstrado em diversos estudos que os produtos originados em sua degradação, seja ocasionado por uma oxidação, ou por meio da fotólise, podem alterar as características do fármaco. Nesse contexto, torna-se evidente a necessidade de estabelecer uma metodologia capaz de identificar possíveis alterações em sua estrutura.

No presente trabalho, propõe-se a utilização da espectroscopia no infravermelho médio em conjunto com a análise estatística multivariada para avaliar a composição química das formulações estudadas e a concentração do captopril nos comprimidos. Além disso, demonstra-se a possibilidade de aplicação dessa técnica no controle de qualidade de uma indústria farmacêutica na verificação de alterações promovidas após a degradação induzida do medicamento.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 CAPTOPRIL

A hipertensão arterial sistêmica, caracterizada por níveis elevados e sustentados da pressão arterial, é objeto de preocupação para saúde pública, uma vez que constitui um dos principais fatores de risco para a população.^{1,2}

A falta de controle da doença pode levar a alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos como coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares.²

O tratamento adequado deve ser determinado por profissionais da saúde, analisando, para tanto, o agente anti-hipertensivo mais indicado para cada caso, quando o tratamento medicamentoso for necessário.

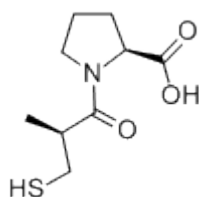
Estão disponíveis no mercado brasileiro drogas anti-hipertensivas classificadas de acordo com o mecanismo de ação em diuréticos, inibidores adrenergéticos, vasodilatadores diretos, antagonistas dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora da angiotensina, bloqueadores dos receptores AT₁ da angiotensina II e inibidores diretos da renina.³

O captopril é um agente inibidor da enzima conversora da angiotensina (IECA). Atua impedindo a conversão da angiotensina I em angiotensina II, sendo essa a responsável pela vasoconstrição das arteríolas, além de favorecer a retenção de sódio e água pelo organismo.^{4,5,6} Dessa maneira, o captopril mostra-se eficaz no tratamento da hipertensão arterial.

Tendo sido o primeiro IECA desenvolvido, é ainda considerado o mais favorável à qualidade de vida, além de apresentar o menor custo entre os agentes desse tipo. Além do tratamento da hipertensão, é também indicado em casos de insuficiência cardíaca congestiva, infarto do miocárdio e nefropatia diabética.^{7,8,9}

Esse medicamento possui como agente ativo o 1-[(2S)-3-Mercapto-2-metil-1-oxopropil]-L-prolina (C₉H₁₅NO₃S), conhecido comercialmente como captopril, cuja fórmula estrutural está representada na Figura 1. Sua massa molar é de 217,29 Da, e a faixa de fusão encontra-se entre 105°C a 108°C, apresentando-se, portanto, como um sólido cristalino de coloração branca com ligeiro odor de enxofre.^{10,11}

Figura 1 – Representação da estrutura química do 1-[(2S)-3-Mercapto-2-metil-1-oxopropil]-L-prolina.

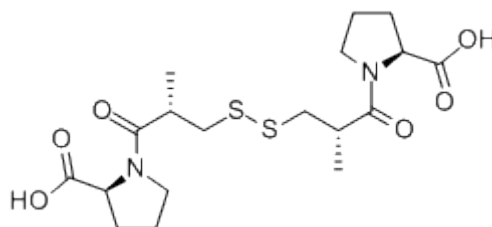


Os medicamentos comercializados devem conter de 90,0% a 110,0% da quantidade declarada de $C_9H_{15}NO_3S$ pelo fabricante, e não deve exceder a 3,0% a quantidade de dissulfeto de captopril ($C_{18}H_{28}N_2O_6S_2$).¹⁰ Outros componentes presentes são amido, ácido esteárico, celulose microcristalina, dióxido de silício e lactose, os quais compõem os excipientes dos comprimidos.¹²

O captopril apresenta elevada estabilidade no estado sólido, porém dimeriza a dissulfeto de captopril quando em solução.¹¹ Essa degradação é resultado da oxidação do grupo tiol presente no captopril, a qual pode ser acelerada a altas temperaturas e pela exposição dos comprimidos à umidade do ar.^{13,14,15}

A estrutura do dissulfeto de captopril está ilustrada na Figura 2.

Figura 2 – Fórmula estrutural do dissulfeto de captopril.



Também os excipientes higroscópicos, como é o caso da celulose microcristalina e do dióxido de silício,¹⁶ podem favorecer o processo de degradação oxidativa do ativo, em função da maior retenção de água pelos comprimidos, reduzindo, assim, a concentração do captopril e elevando os níveis de seu respectivo dímero na formulação farmacêutica.¹⁵

A fim de assegurar que todos os parâmetros estejam em concordância com os padrões de qualidade exigidos e requeridos pelo registro do produto, devem-se implementar e seguir rigorosamente as Boas Práticas de Fabricação em uma indústria farmacêutica.

Assim, visando atender aos requisitos de Controle da Qualidade exigidos pela RDC n. 17, de 16 de abril de 2010, em especial ao que se refere o Art. 11, inciso VII, torna-se essencial o desenvolvimento de uma metodologia capaz de determinar em tempo real a uniformidade existente entre os medicamentos produzidos, seja dentro de um mesmo lote, ou entre lotes distintos.

Além da verificação da conformidade do medicamento produzido, deve-se ter um controle sobre sua estabilidade durante todo o período de validade da formulação farmacêutica.¹⁷ Para isso, faz-se necessário um estudo de acompanhamento a longo prazo, em conjunto com a avaliação da estabilidade sob condições forçadas de armazenamento (estabilidade acelerada), seguindo as diretrizes da resolução RE n. 1, de 29 de julho de 2005 da ANVISA, com a finalidade de assegurar a manutenção dos critérios descritos nas farmacopeias.

2.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A região do espectro correspondente à radiação infravermelha (com números de onda de aproximadamente 12.800 a 10 cm^{-1}) possui grande interesse para o químico, tanto no que diz respeito à identificação de compostos, como na quantificação dos mesmos.¹⁸

Convencionou-se dividir o espectro em três regiões: radiação infravermelha próxima (entre aproximadamente 12.800 a 4.000 cm^{-1}), média (de 4.000 a 200 cm^{-1}) e distante (correspondendo a aproximadamente 200 a 10 cm^{-1}),¹⁸ cada uma possibilitando aplicações específicas.

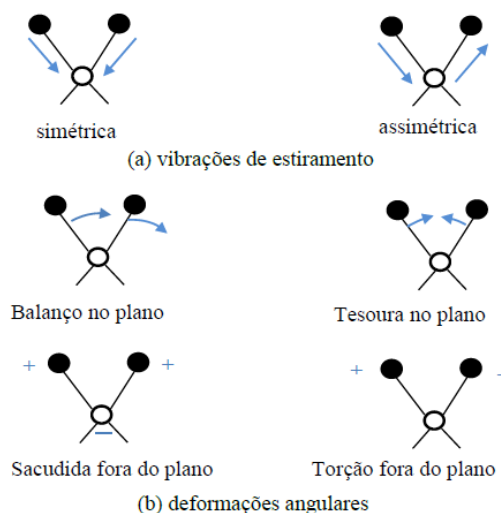
Os espectrômetros de infravermelho se diferenciam de acordo com a região do espectro pela qual operam, sendo os mais utilizados aqueles que possuem aplicação na radiação do infravermelho médio, com equipamentos do tipo transformada de Fourier (FTIR).¹⁹

São conhecidos espectros de absorção, emissão e reflexão da radiação infravermelha causados pelas variações de energia sofridas por espécies moleculares durante transições entre os estados vibracionais e rotacionais, resultando, dessa maneira, em alterações no momento de dipolo das moléculas.^{18,19}

As vibrações sofridas pelas ligações em uma molécula são classificadas como de estiramento quando há variação na distância entre os átomos que participam da ligação, ou de deformação angular, fenômeno esse que provoca alteração nos

ângulos de uma ligação. Os diferentes tipos de vibrações conhecidos (Figura 3) podem coexistir simultaneamente em uma molécula, podendo-se observar, inclusive, acoplamentos dessas.¹⁸

Figura 3 – Tipos de vibrações moleculares. Nota: + indica movimento para fora da página, na direção do leitor; e – indica movimento para longe do leitor.¹⁸



2.2.1 Espectrômetros com transformada de Fourier

A utilização de instrumentos no infravermelho médio tornou-se bastante difundida a partir da década de 1980, quando espectrômetros com transformada de Fourier passaram a ser comercializados a um custo mais acessível.¹⁸

Até esse momento, a maior parte dos equipamentos que trabalhavam nessa região espectral era do tipo dispersivo, o que restringia sua aplicação a análises qualitativas. Entretanto, os instrumentos interferométricos, por possuírem melhores limites de detecção e relação sinal/ruído, possibilitaram um aumento considerável nos tipos de aplicações da radiação no infravermelho médio.^{18,20}

Diversos modelos de equipamentos utilizam a transformada de Fourier no tratamento dos dados.²⁰ Entre eles, encontram-se os espectrômetros no infravermelho empregando acessórios de reflexão.

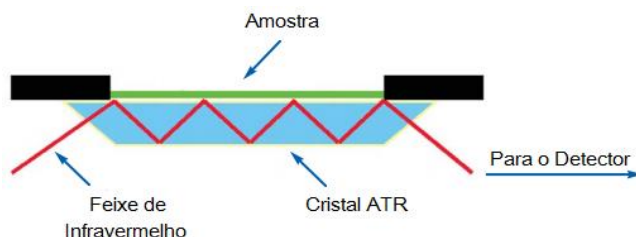
2.2.2 Espectroscopia por reflexão total atenuada

A espectroscopia por reflexão total atenuada (ATR), também conhecida como de reflexão interna, é uma técnica robusta que possibilita análises rápidas com o mínimo de manuseio das amostras.²¹

A técnica está baseada nas múltiplas reflexões sofridas pela radiação infravermelha que ocorrem dentro de um cristal de alto índice de refração, como por exemplo o seleneto de zinco. Aumentando-se o ângulo de incidência, aumenta-se também a fração do feixe que é refletida. Acima de certo ângulo crítico de incidência, observa-se reflexão total desse feixe. No entanto, antes de ocorrer a reflexão, a radiação entra em contato com o meio menos denso, penetrando alguns micrômetros no mesmo.²² Essa radiação é conhecida como onda evanescente.^{18,21}

Assim, se depositarmos uma amostra, seja sólida ou líquida, sobre um cristal de ATR, a radiação evanescente entrará em contato com a porção superficial da amostra, mais próxima ao cristal, sofrendo absorção de parte da radiação pelas moléculas que a compõem, e será posteriormente refletida para o detector, conforme representado na Figura 4. A atenuação do feixe ocorrerá, portanto, em virtude desse fenômeno.¹⁸

Figura 4 – Representação de um sistema ATR com múltiplas reflexões.



Como pode ser observado pela figura, várias reflexões ocorrem no interior do cristal antes de atingir o detector, e, conseqüentemente, uma maior atenuação do feixe será observada, aumentando, assim, a relação sinal/ruído.¹⁸

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA

Ao realizar uma análise instrumental, milhares de dados são coletados e armazenados em um computador. Essa grande quantidade de informação dificulta a interpretação visual e pode levar a conclusões incorretas acerca da análise ou negligenciar algum dado importante mascarado na matriz de resultados.^{23,24}

Em virtude disso, uma análise estatística faz-se necessária para reduzir a quantidade de variáveis, agrupando e comprimindo os dados, retendo a informação química, facilitando assim a interpretação pelo analista. Essa é uma tarefa da análise multivariada dos dados, também conhecida como quimiometria, quando esta é aplicada a dados de natureza química.^{25,26}

Existem diversas transformações matemáticas aplicáveis à quimiometria. Nos atentaremos apenas àquelas que dizem respeito às técnicas de agrupamento por métodos hierárquicos e por análise empregando componentes principais.

Antes de iniciar o estudo estatístico propriamente dito, devem ser feitas algumas modificações na matriz de resultados com a finalidade de reduzir as flutuações decorrentes da análise instrumental (ruído aleatório), constituído de uma mistura de erros experimentais de medida, de amostragem e de outras fontes de variabilidade.^{24,27}

Esse pré-tratamento dos dados pode ser aplicado tanto às amostras como às variáveis. As transformações de dados que são aplicáveis às amostras envolvem técnicas de alisamento e correções na linha de base. Já as ferramentas conhecidas como pré-processamentos são realizadas sobre as variáveis e produzem diferentes efeitos sobre o resultado, devendo, portanto, selecioná-las de acordo com o tipo de aplicação desejada.²⁴

2.3.1 Pré-tratamento dos dados

2.3.1.1 Técnicas de alisamento (*Smoothing*)

O alisamento dos dados é utilizado para reduzir o erro aleatório, aumentando, assim, a razão sinal/ruído.^{24,26}

Essa transformação é realizada selecionando-se no espectro uma janela com número ímpar de comprimentos de onda onde todas as intensidades dos sinais dentro desse intervalo são utilizadas para determinar o valor de um único sinal, aplicado ao centro dessa janela. Em seguida, move-se a janela, fazendo a mesma transformação aos sinais adjacentes, percorrendo e alisando, dessa maneira, todo o espectro.^{24,28}

Um método bastante utilizado é o alisamento de Savitzky-Golay, no qual calcula-se a média ponderada dos pontos contidos na janela selecionada, onde os pesos são obtidos através de um ajuste polinomial.²⁶

2.3.1.2 Normalização

A normalização é uma técnica utilizada quando se pretende manter todas as variáveis de um conjunto de dados em uma escala definida,²⁹ sendo aplicada para cada amostra separadamente.²⁴

Nessa transformação, todos os valores coletados para uma amostra são divididos por um fator comum.³¹ Destaca-se aqui a normalização realizada utilizando-se um fator correspondente à máxima intensidade registrada durante a aquisição dos dados. Dessa maneira, o módulo máximo que cada variável poderá assumir será igual à unidade.²⁴

2.3.1.3 Derivadas

O deslocamento e a inclinação sofridos pela linha de base em um espectro de infravermelho obtido por ATR podem ser corrigidos pela aplicação das derivadas aos dados espectrais.^{26,28}

Além disso, as derivadas também possibilitam a resolução de picos parcialmente sobrepostos visto que cada máximo de intensidade no espectro corresponde ao zero no gráfico da primeira derivada (no momento em que cruza a linha de base) e ao ponto mínimo para a derivada segunda. Assim, fica evidenciada a posição de cada pico do espectro.^{24,29}

Como desvantagem, essa técnica diminui a razão sinal/ruído. No entanto, conserva a relação entre a integral de um pico e a concentração, mantendo a informação quantitativa.²⁴

2.3.1.4 Outras correções comuns

Dois técnicas importantes de transformação dos dados são a Correção do espalhamento multiplicativo (MSC) e a Padronização normal de sinal (SNV) utilizadas quando se pretende corrigir efeitos aditivos e multiplicativos de espalhamento de luz,²⁴ causados por fenômenos físicos, como tamanho de partícula, rugosidade e opacidade, os quais provocam alterações na linha de base dos espectros.^{26,28}

Diferentemente das derivadas, a MSC e a SNV mantêm a forma do espectro e a inclinação do background.²⁴

Por se tratarem de transformações de origens distintas, é possível aplicar tanto a SNV quanto a MSC conjuntamente com as derivadas.²⁴

2.3.1.5 Pré-processamento

Existem diversos tipos de tratamentos de dados aplicáveis às variáveis, como centrar os dados na média, autoescalamiento, escalamento pela variância ou pela amplitude, sendo os dois primeiros os mais utilizados.²⁴

Para centrar os dados na média deve-se encontrar a média das intensidades de absorbância em cada comprimento de onda e subtrai-la do valor de cada variável correspondente. Essa técnica é utilizada em análises espectroscópicas quando se pretende reduzir a interferência causada pelo deslocamento da linha de base sobre o resultado analítico.^{24,26}

Já o autoescalamiento é utilizado quando se analisa diversos parâmetros que apresentam unidades ou ordens de grandezas distintas, garantindo idêntico peso a cada uma das variáveis sobre o resultado final. Para tanto, deve-se proceder da mesma maneira que a técnica anterior, porém, dividindo o resultado obtido pelo respectivo desvio padrão. Dessa maneira, elimina-se a escala, que pode variar a cada parâmetro estudado, e garante igual importância a cada uma das variáveis.^{24,30}

2.3.2 Análise exploratória dos dados

Finalizado o pré-tratamento dos dados, as variáveis passam a conter essencialmente informações relativas à composição das amostras, estando agora livres de interferências provenientes do seu preparo e das leituras instrumentais.²⁸ Sendo assim, é possível iniciar a investigação de parâmetros capazes de organizar e classificar os objetos de acordo com suas semelhanças.

A seguir são apresentados os métodos exploratórios utilizados no presente trabalho.

2.3.2.1 Análise por componentes principais (PCA)

A PCA é utilizada quando se deseja reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados sem alterar as relações químicas existentes entre as amostras, com o objetivo de auxiliar a interpretação dos resultados analíticos. Para tanto, são estabelecidas novas variáveis, denominadas componentes principais (PCs), as quais são ortogonais entre si e representam as maiores variabilidades entre as amostras.^{24,31,32}

As PCs são obtidas através de transformações lineares da matriz \mathbf{X} de dados originais, de acordo com a Equação 1.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

onde \mathbf{T} é a matriz de *scores*, constituído pelas coordenadas das amostras na nova variável; \mathbf{P} é a matriz de pesos (*loadings*), representada pelos coeficientes das combinações lineares das variáveis originais; e \mathbf{E} corresponde à matriz de resíduos.³²

Utilizando-se desse algoritmo, podemos, portanto, avaliar de forma eficiente as similaridades entre as amostras, agrupando aquelas que possuem grandes correlações químicas e as discriminando das que possuem características diversas. Além disso, é possível identificar quais parâmetros (variáveis) são mais relevantes ao resultado que se pretende alcançar.^{25,33}

Em certos casos a PCA aplicada a todo o espectro não é capaz de diferenciar as amostras. Como alternativa, pode-se utilizar a análise por componentes principais por intervalos (iPCA), onde o espectro é dividido em um número pré-determinado de intervalos igualmente espaçados, e, para cada segmento, realiza-se uma PCA a fim de investigar o intervalo que possui maior variância, descobrindo-se, assim, quais bandas de absorção do infravermelho são mais representativas no estudo da diferenciação de amostras relativamente semelhantes.³⁴

2.3.2.2 Análise por hierarquia de agrupamentos (HCA)

Assim como a PCA, a HCA atua no sentido de facilitar a interpretação de análises que possuem um grande número de variáveis, correlacionadas ou não entre si.³³

A similaridade existente entre as amostras investigadas, utilizando-se de algoritmos para HCA, é verificada de maneira bastante prática, visto que as proximidades entre as amostras são apresentadas em um esquema bidimensional, chamado dendrograma.³⁵

A construção do dendrograma faz-se determinando a distância entre as amostras no espaço multidimensional. Assim, inicia-se o cálculo matemático verificando quais possuem maior proximidade. Em seguida, toma-se essas duas amostras como um conjunto, ao qual relaciona-se a próxima amostra com maior similaridade ao mesmo, considerando-as então como um novo, e único grupo, composto agora por três objetos. Dessa maneira, segue-se correlacionando as distâncias aos grupos que vão se formando, até que todas as amostras tenham sido agrupadas.²⁵

Existem diversas maneiras de se calcular a distância entre dois pontos A e B, d_{AB} . A mais utilizada pelos químicos em estudos quimiométricos é a distância Euclideana, definida conforme a Equação 2.

$$d_{AB} = \left[\sum_{j=1}^J (x_{aj} - x_{bj})^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

sendo x_{aj} e x_{bj} as 'j-ésimas' variáveis das amostras A e B, respectivamente, contidas no espaço multidimensional R^J .²⁴

A partir de um dendrograma pode-se inferir também sobre amostras anômalas (*outliers*), sendo estas as que possuem as maiores distâncias no espaço amostral.²⁴

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Desenvolver uma metodologia para verificação da homogeneidade e estabilidade de fármacos utilizando espectroscopia no infravermelho médio em conjunto com técnicas de análise multivariada com o propósito de aplicação no controle de qualidade de uma indústria farmacêutica.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Caracterizar formulações comerciais de captopril através de FTIR-ATR;
2. Avaliar semelhanças e diferenças existentes entre as amostras provenientes de diferentes laboratórios farmacêuticos através de algoritmos para PCA e HCA;
3. Promover a degradação dos fármacos e observar a potencialidade do FTIR-ATR na identificação desse processo;
4. Com auxílio da ferramenta iPCA, identificar as bandas vibracionais relevantes ao processo exploratório que possibilitem a identificação da degradação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliadas dez amostras do fármaco captopril, provenientes de sete laboratórios diferentes, considerando-se medicamentos genéricos ou não, e variando-se a dosagem do ativo para um determinado fabricante, escolhido em função do menor custo quando da aquisição (amostras 08 a 10). A identificação de cada amostra é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Informações das amostras de captopril.

Amostra	Laboratório	Dosagem de captopril * [mg]	Massa do comprimido [mg]	Concentração de captopril [mg/g]
CA01	Cimed**	25	79,4	314,9
CA02	Geolab	25	100,2	249,5
CA03	Neo Química	25	170,7	146,5
CA04	Legrand**	25	149,8	166,9
CA05	União Química**	25	132,1	189,3
CA06	Neo Química**	25	169,8	147,2
CA07	Medley**	25	101,2	247,0
CA08	Teuto**	25	87,6	285,4
CA09	Teuto**	12,5	52,2	239,5
CA10	Teuto**	50	120,6	414,6

* Dosagem por comprimido informada pelo laboratório fabricante.

** Medicamento genérico.

As amostras foram pesadas e maceradas em gral de ágata. A massa de cada comprimido está indicada na Tabela 1, bem como a concentração do ativo em cada comprimido, calculada com base na massa registrada.

A aquisição dos espectros se deu na região do infravermelho médio, de 4000 a 650 cm^{-1} , utilizando o espectrômetro Spectrum 400 da Perkin Elmer, com acessório para ATR acoplado, com resolução de 4 cm^{-1} . Foram acumuladas 32 varreduras para cada espectro, e as amostras foram analisadas em triplicata.

Avaliou-se também a degradação do fármaco, dissolvendo-se as amostras 01, 04, 06, 08 e 10 em água milli-Q e deixando-as em estufa a 80°C por aproximadamente 2,5 dias. Evaporou-se toda a água e adquiriu-se novos espectros de infravermelho.

Esse conjunto de amostras foi identificado pelo código DS, seguido do número da amostra. Os mesmos fármacos também foram levados à estufa a 80°C, no estado sólido, para avaliação da degradação por exposição ao calor em ambiente livre de umidade. Esse conjunto foi denominado DA.

Os espectros realizados para avaliar a degradação, bem como novos espectros das amostras originais, foram registrados em duplicata, na região de 4000 a 650 cm^{-1} , em espectrômetro da Bruker Alpha, empregando ATR com cristal de diamante, resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras. A troca do equipamento se deu em virtude de o espectrômetro inicialmente utilizado ter saído de funcionamento.

O pré-tratamento dos dados foi realizado com auxílio do software livre ChemoStat, aplicando-se filtro de Savitzky-Golay, com polinômio de grau 1 e janela de 13 pontos. Em seguida os espectros foram normalizados em um intervalo de 0 a 1, e aplicou-se a primeira derivada, também em uma janela de 13 pontos, seguida da transformação SNV.

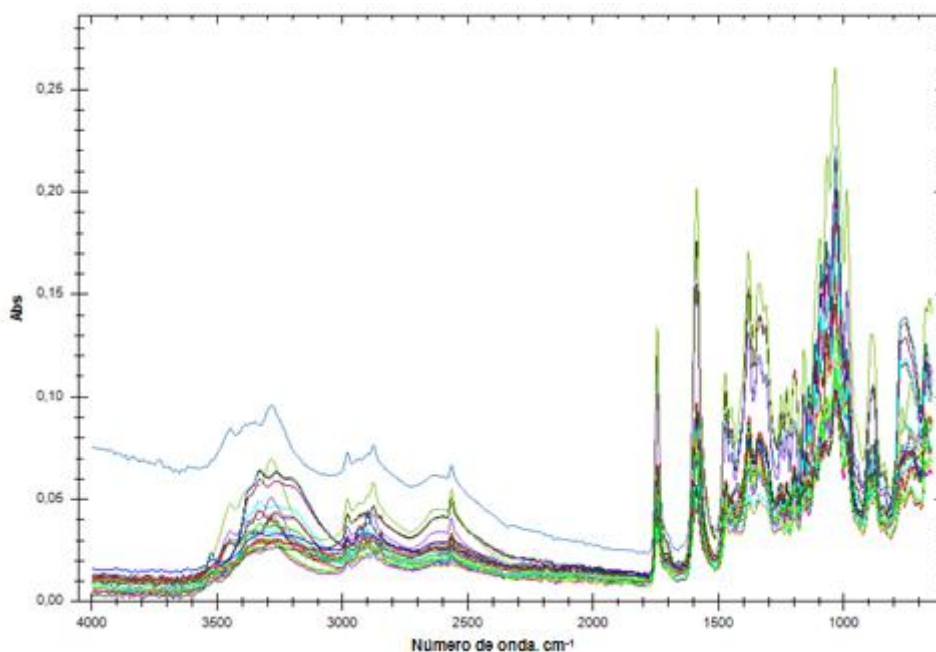
A análise exploratória dos dados foi realizada a partir do estudo das PCAs e HCAs obtidas igualmente por meio do software ChemoStat. Para tanto, os dados foram centrados na média.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA UNIFORMIDADE ENTRE FORMULAÇÕES

Os espectros das triplicatas das dez amostras obtidos na região do infravermelho médio estão apresentados na Figura 5, os quais foram alisados a fim de aumentar a relação sinal/ruído.

Figura 5 – Espectros de infravermelho das amostras após alisamento, obtidos na região de 4000 a 650 cm^{-1} .

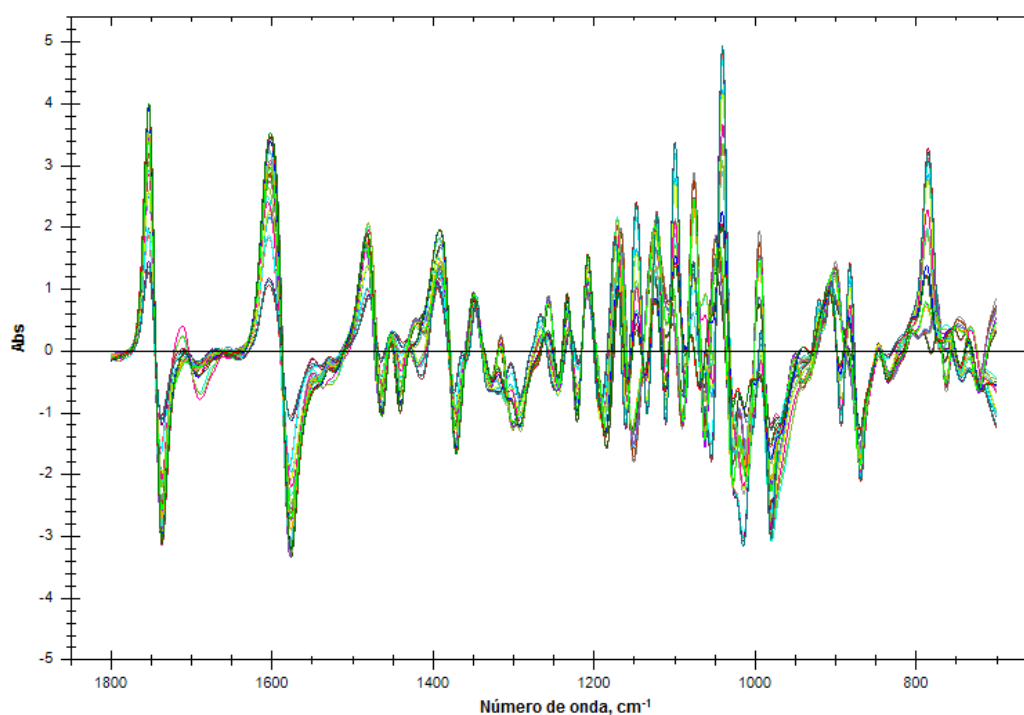


As principais bandas observadas no espectro da Figura 5 correspondem às seguintes: Entre 700 cm^{-1} e 600 cm^{-1} ocorre absorção pela ligação C-S; em 1320 cm^{-1} e em 1400 cm^{-1} aparecem duas bandas provenientes, respectivamente, de deformações axial de C-O e angular de O-H de ácido carboxílico; as bandas em aproximadamente 1600 cm^{-1} e 1730 cm^{-1} correspondem ao estiramento da ligação C=O de amida I e de ácido carboxílico, respectivamente; a banda de deformação axial de S-H de mercaptanas ocorre em 2550 cm^{-1} e a de O-H de ácido carboxílico é observada entre 3300 cm^{-1} e 2500 cm^{-1} .

Através da análise da Figura 5, pode-se verificar que a região de maior variabilidade espectral compreende as bandas aproximadamente entre 1800 a 701 cm^{-1} , sendo, portanto, considerada a região de impressão digital dos fármacos. Por esse motivo, essa foi a faixa selecionada para estudo.

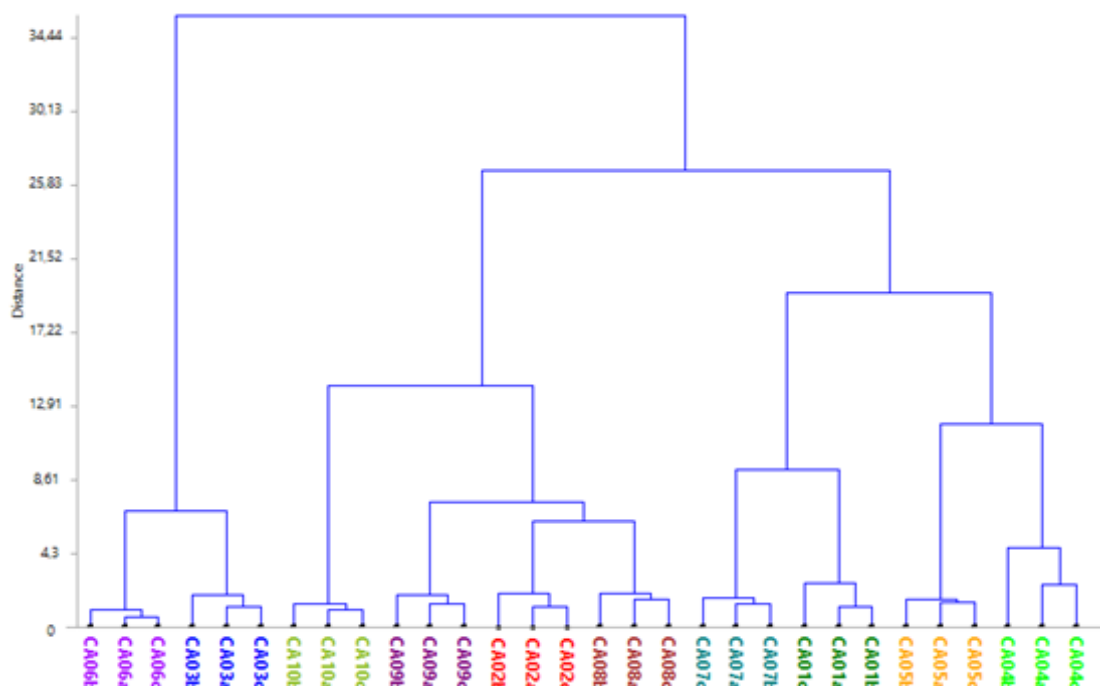
Com a finalidade de reduzir as interferências provenientes da amostragem e ruídos experimentais originados durante a aquisição dos espectros, além do filtro de Savitzky-Golay, aplicou-se também a normalização, e em seguida a primeira derivada, a qual, além de corrigir a variação na linha de base, auxilia também na visualização da posição de cada banda de absorção. Como última transformação para o pré-tratamento dos dados, efetuou-se a SNV com o objetivo de corrigir efeitos físicos resultantes das leituras no espectrômetro. Os espectros resultantes dessas transformações estão apresentados na Figura 6.

Figura 6 – Espectros FTIR-ATR pré-tratados das amostras, onde somente a região entre 1800 a 701 cm^{-1} foi selecionada.



A partir dos dados pré-tratados dos espectros das amostras comerciais, iniciou-se o estudo quimiométrico dos fármacos, obtendo-se primeiramente o dendrograma mostrado na Figura 7 para HCA.

Figura 7 – Dendrograma dos fármacos analisados. As letras após o código de cada amostra representam as triplicas realizadas.



A HCA representa a distância Euclidiana entre as amostras no espaço multidimensional. Assim, percebe-se rapidamente, pelo dendrograma da Figura 7, que as amostras CA03 e CA06 são as mais distintas quando comparadas ao restante dos fármacos. Entretanto, as mesmas encontram-se bastante próximas entre si, indicando elevada semelhança química entre elas.

Essa proximidade pode ser explicada pela procedência das amostras. Como ambas são fabricadas pelo mesmo laboratório, suas formulações devem ser bem similares, embora uma delas seja declarada com medicamento genérico.

Outras correlações podem ser retiradas da HCA, no entanto optou-se por realizar uma PCA para possibilitar o estudo das segregações em função dos fatores obtidos, relacionando-as às bandas de infravermelho representadas por cada componente principal (*loadings*).

Conforme indicado pelo software ChemoStat, as duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) representam 91,91% da variabilidade total dos dados, sendo consideradas bastante representativas na análise exploratória das amostras de acordo com as semelhanças espectrais.

Primeiramente avaliou-se o gráfico de pesos (scores) da PC1 *versus* PC2, mostrado na Figura 8. Por esse gráfico observa-se agrupamento entre as amostras CA02, CA08, CA09 e CA10, contidas na elipse, as quais apresentam valores

semelhantes para PC1. Essa componente positiva representa as bandas relacionadas principalmente ao ativo captopril, conforme pode ser observado por comparação do gráfico de *loadings* dessa PC (Figura 9) com o espectro do padrão de captopril que sofreu o mesmo pré-tratamento das amostras, apresentado no Anexo A.

Por apresentarem aproximadamente o mesmo valor para PC1, pode-se concluir que possuem concentrações semelhantes do princípio ativo. Somente a amostra CA10 possui concentração superior às demais. Essas observações podem ser confirmadas através das informações contidas na Tabela 1.

Figura 8 – Gráfico de escores da PC1 em função da PC2 para as amostras de captopril.

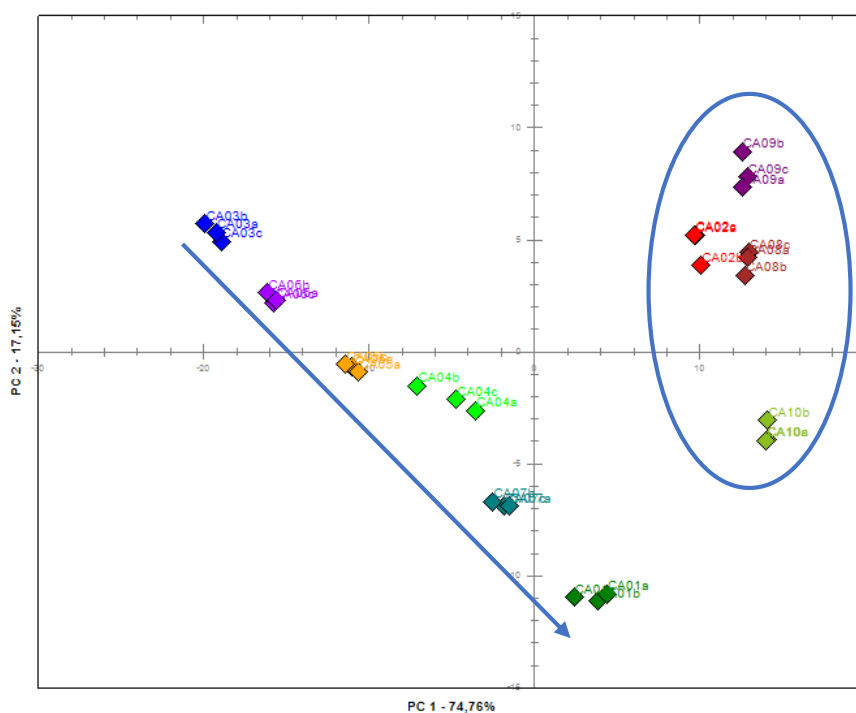
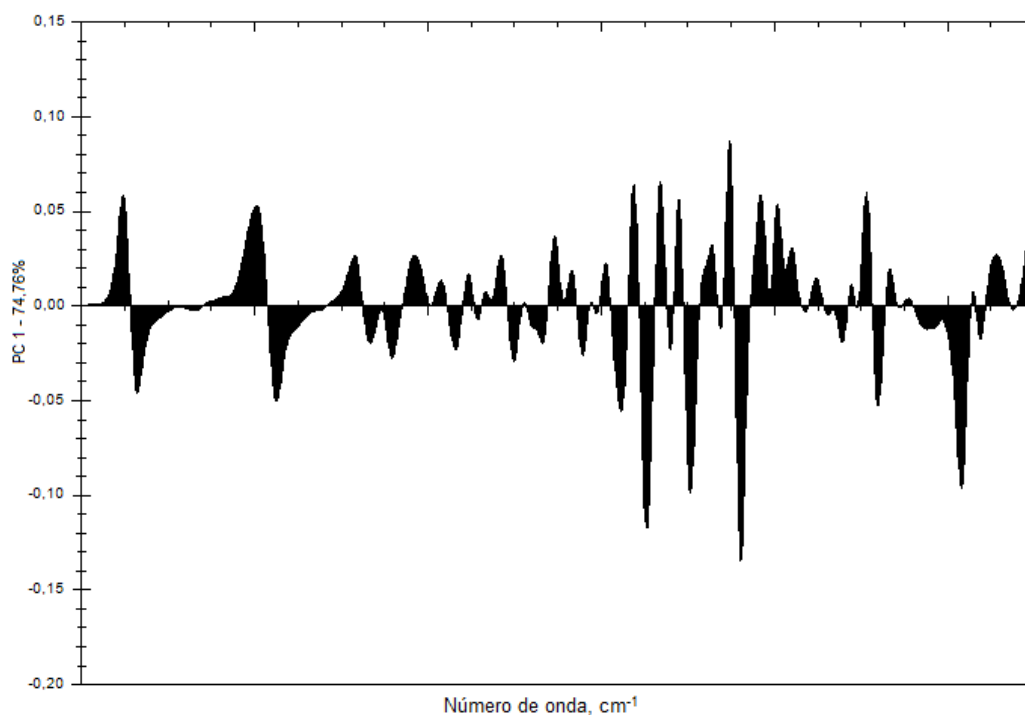


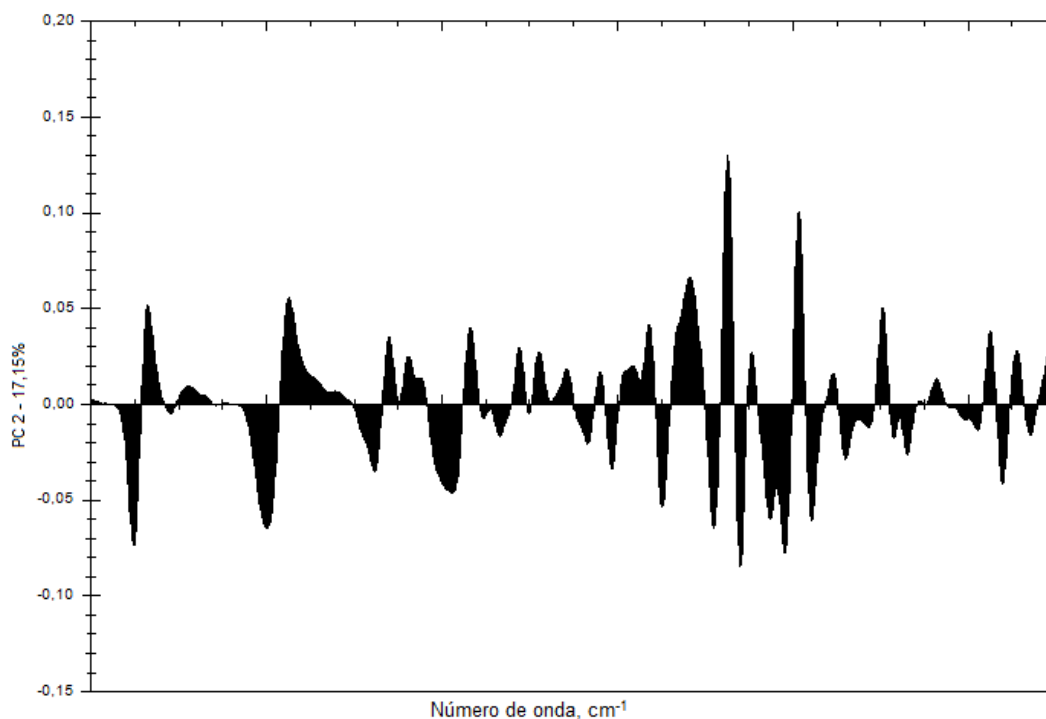
Figura 9 – Gráfico de *loadings* da PC1.



As demais amostras demonstram uma tendência linear, indicando uma composição da fase excipiente bastante semelhante, porém distinta das anteriores. A posição da seta no gráfico indica um aumento da concentração do ativo. Assim, percebe-se que as amostras CA01 e CA07 são as que possuem maiores concentrações de captopril, ou seja, aquelas que possuem menores massas por comprimido (comparando-se amostras que apresentam a mesma dosagem), conforme exposto na Tabela 1, seguidas pela CA04 e CA05, cujas massas são intermediárias, e por último tem-se as mais diluídas, ou seja, as amostras CA03 e CA06, as quais possuem as maiores massas e conseqüentemente, maior influência dos excipientes representados pelas componentes negativa da PC1 e positiva para PC2, cujas principais bandas de absorção encontram-se aproximadamente em 1400, 1000 e 800 cm^{-1} , verificadas por comparação do gráfico da Figura 10 com o espectro dos excipientes apresentado no Anexo A.

Essas bandas são bem características do amido e da lactose, porém, os outros componentes encontrados nos comprimidos, assim como contaminantes, também podem colaborar para o aparecimento de bandas nessa região.

Figura 10 – Gráfico de *loadings* para a PC2.



5.2 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO FÁRMACO

A degradação do medicamento foi avaliada para as amostras 01, 04, 06, 08 e 10 por possuírem as composições mais distintas dentro do espaço amostral.

Os espectros alisados e normalizados das amostras comerciais (CA) estão apresentados na Figura 11. As amostras sólidas que passaram por aquecimento em estufa (DA) estão mostradas na Figura 12, e as que foram dissolvidas em água antes do aquecimento (DS) estão mostradas na Figura 13.

Figura 11 – Espectros FTIR-ATR alisados e normalizados das amostras CA01, CA04, CA06, CA08 e CA10, na região de 4000 a 650 cm^{-1} .

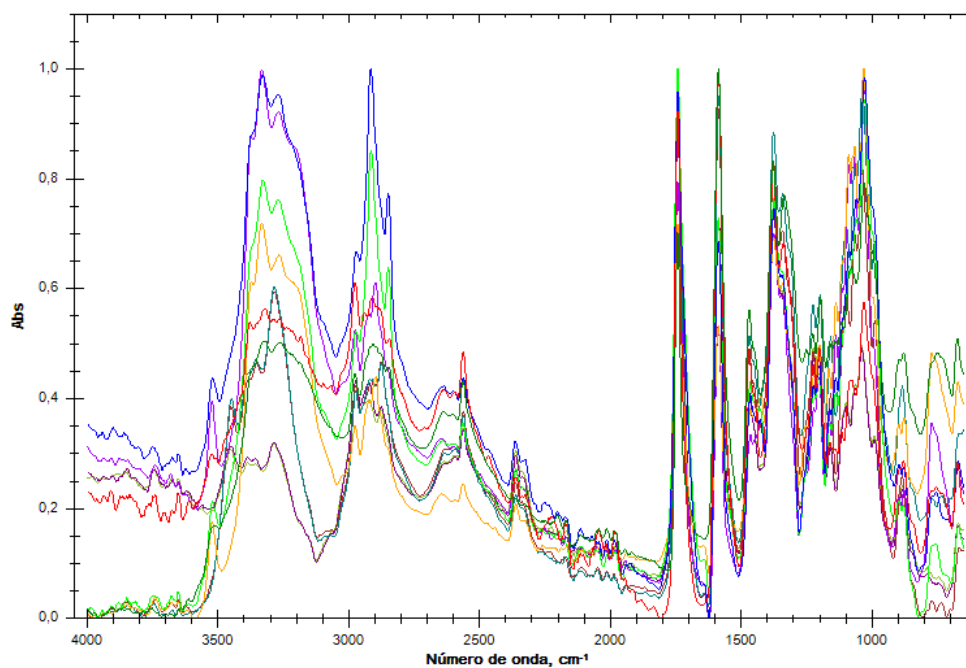


Figura 12 – Espectros FTIR-ATR alisados e normalizados das amostras DA01, DA04, DA06, DA08 e DA10, na região de 4000 a 650 cm^{-1} .

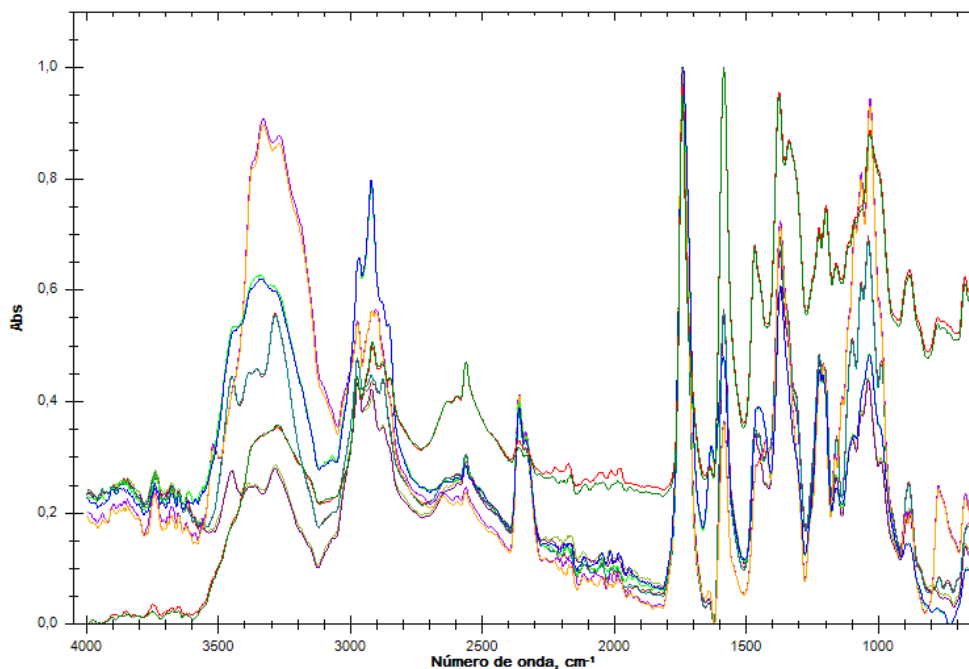
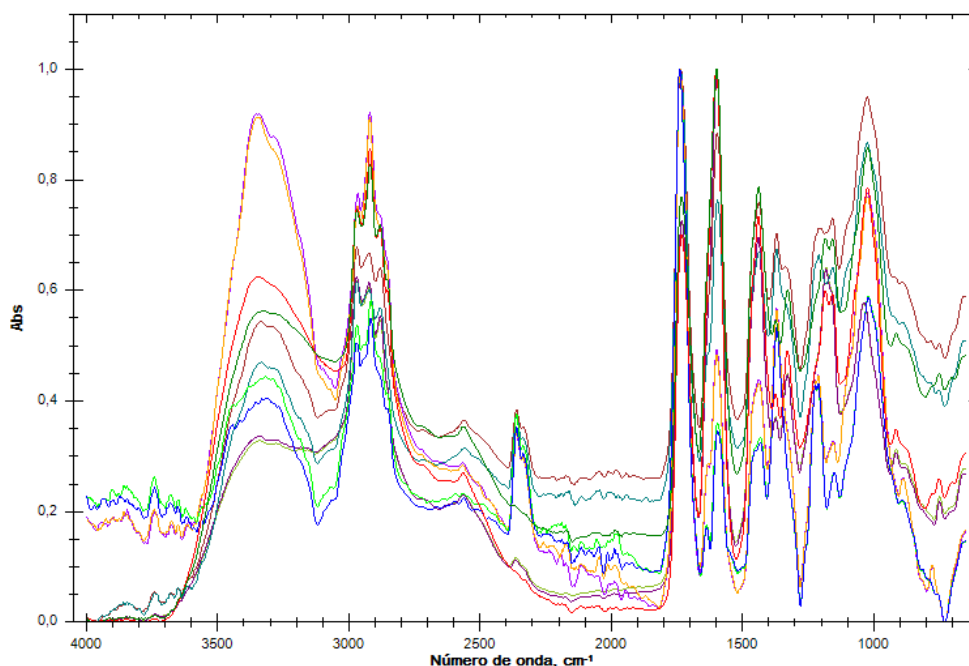


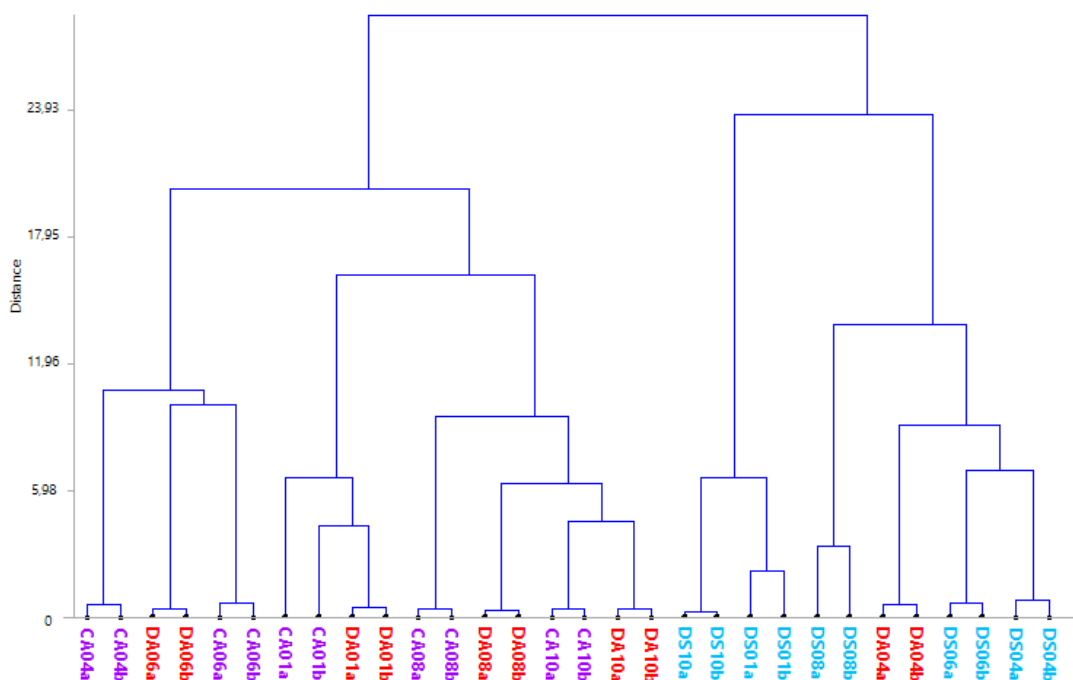
Figura 13 – Espectros FTIR-ATR alisados e normalizados das amostras DS01, DS04, DS06, DS08 e DS10, na região de 4000 a 650 cm^{-1} .



Seguindo-se o mesmo procedimento descrito anteriormente, selecionou-se apenas a região de impressão digital, entre 1800 a 701 cm^{-1} , e aplicou-se as mesmas transformações utilizadas nos espectros das amostras originais antes de dar início à análise exploratória dos dados.

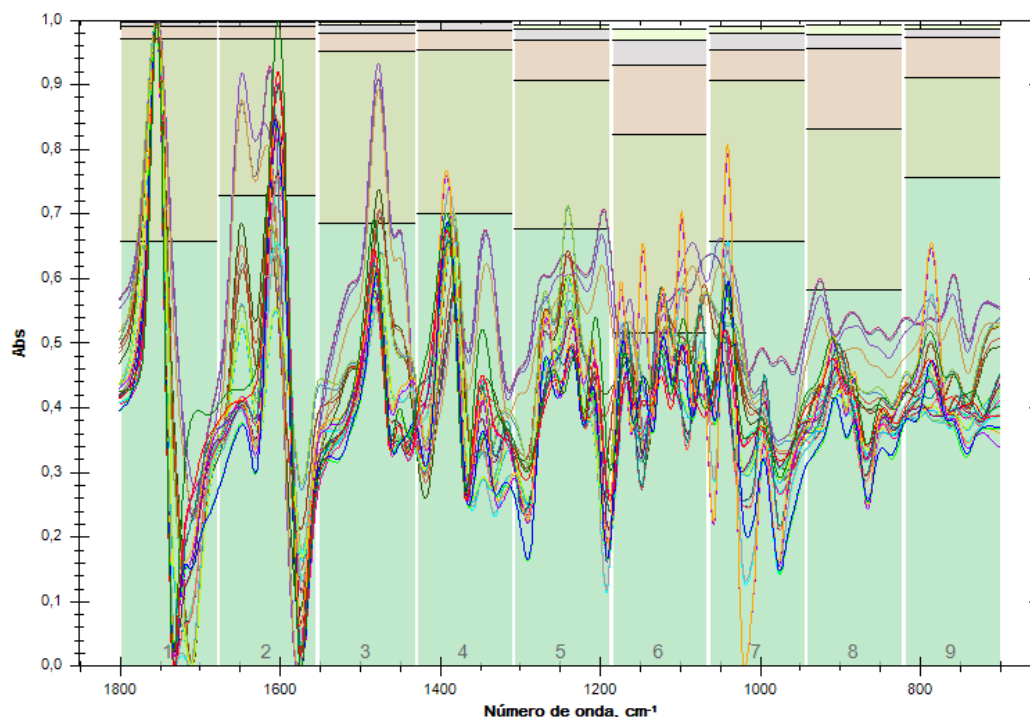
A HCA mostrada na Figura 14 demonstra uma segregação do conjunto DS em relação ao restante das amostras, indicando uma modificação significativa nos produtos quando comparado à degradação do tipo DA. No entanto, a amostra DA04 mostrou-se mais susceptível à degradação, agrupando-se aos produtos do grupo DS.

Figura 14 – Dendrograma das amostras CA, DA e DS, realizado para a região de impressão digital do fármaco.



Para identificar as bandas relacionadas ao processo de degradação, utilizou-se a iPCA, dividindo-se o espectro em 9 intervalos equidistantes. Cada um desses intervalos está indicado na Figura 15.

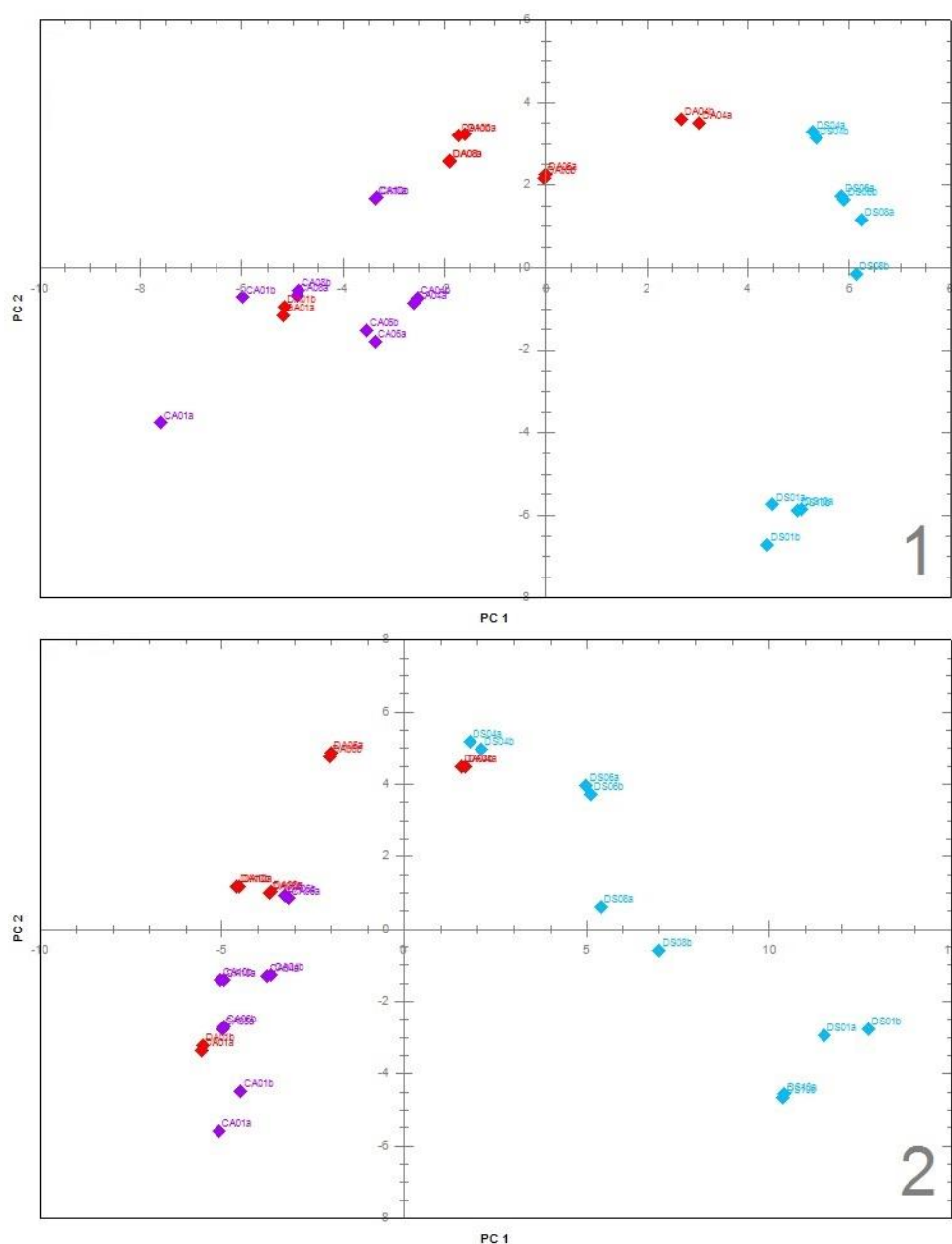
Figura 15 – Gráfico de *loadings* dos espectros das amostras CA, DA e DS, divididos em 9 intervalos equidistantes.

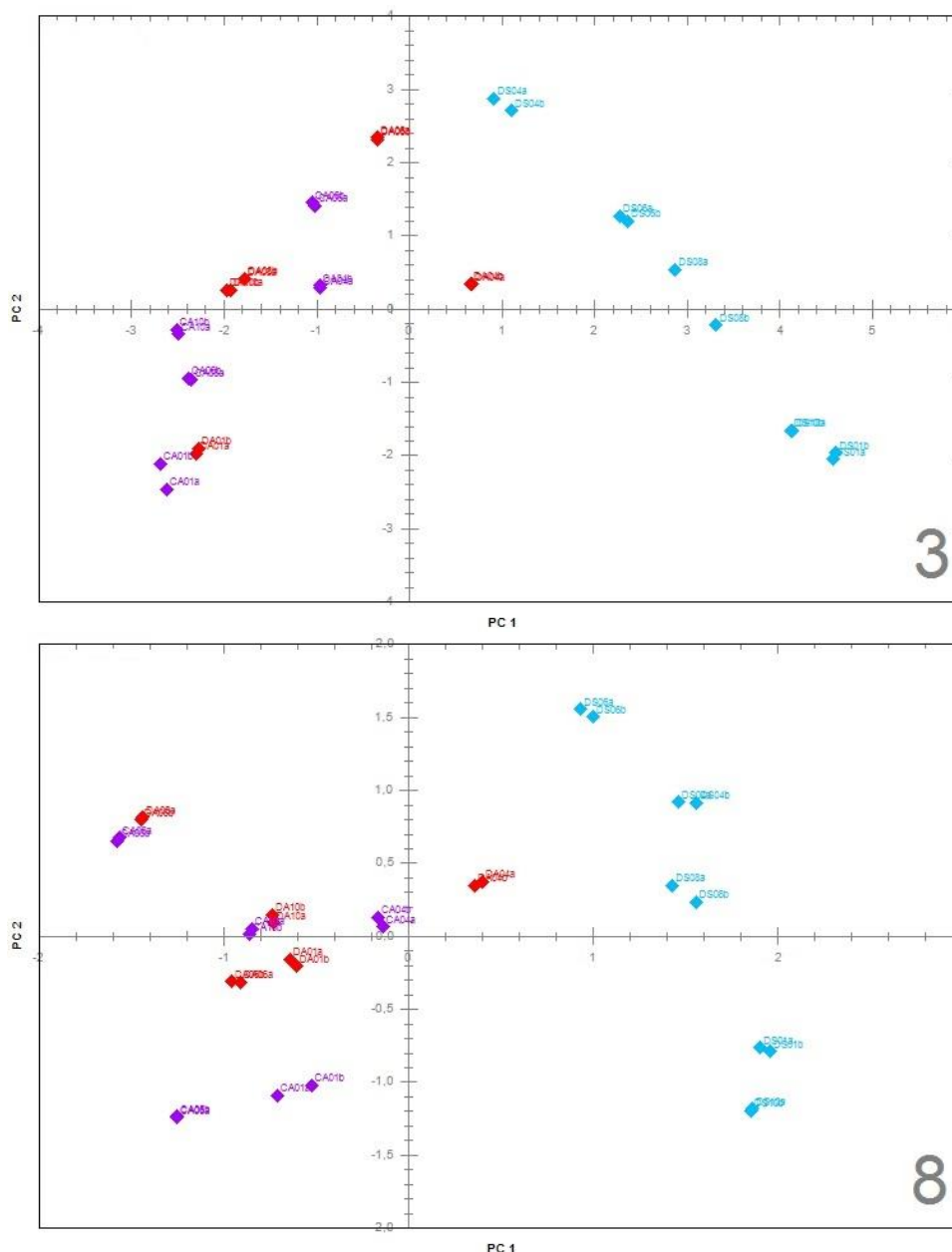


As colunas indicadas por cores diferentes no gráfico da Figura 15 representam as cinco primeiras PCs para cada um dos intervalos destacados. A altura de cada coluna corresponde ao percentual de variância representado por cada PC.

Analisando-se os gráficos de escores da PC1 *versus* PC2 para cada intervalo da iPCA, observa-se que as regiões 1, 2, 3 e 8, mostradas na Figura 16, discriminam as amostras da mesma maneira que a HCA da Figura 14.

Figura 16 – Gráficos de pesos da PC1 x PC2 para os intervalos 1, 2, 3 e 8. Nota: as amostras do grupo CA estão representadas em roxo; as da classe DA estão em vermelho; e as DS em azul claro.





Os intervalos selecionados correspondem, respectivamente, às regiões de 1800 a 1678, 1677 a 1555, 1554 a 1432 e 944 a 823 cm^{-1} . Em todos os casos, a PC1 diferencia o grupo DS do restante das amostras, à exceção da DA04, conforme exposto anteriormente.

Assim, a componente positiva da PC1, verificada pelo gráfico de *loadings* da Figura 15, contém informações relativas ao processo de degradação.

Embora não seja possível garantir o que ocorre durante a degradação analisando-se somente os espectros de infravermelho, é provável que tenha havido a dimerização do captopril quando solubilizado em água, conforme descrito na literatura^{13,14,15}, no entanto essa degradação não pode ser confirmada pelo método apresentado nesse trabalho.

6 AVALIAÇÃO DE CUSTOS

A análise de custos se deu por comparação da metodologia sugerida nesse trabalho em relação ao procedimento proposto pela Farmacopeia Brasileira para avaliação da uniformidade de doses unitárias e ensaios de pureza. Para os cálculos, considerou-se os gastos para análise de um grupo de 100 amostras.

6.1 PROCEDIMENTO DESCRITO PELA FARMACOPEIA

6.1.1 Uniformidade de doses unitárias

De acordo com a Farmacopeia¹⁰, a técnica utilizada para análise da uniformidade de conteúdo exige dissolução de cada comprimido separadamente em balão volumétrico contendo 5 mL de água com posterior adição de mistura etanol e água (1:1) até a metade do volume do balão. Em seguida, deixar em ultrassom por 15 minutos, seguido de agitação mecânica por mais 15 minutos. Completar o volume com a mesma mistura, homogeneizar e filtrar a solução. Diluir com o mesmo solvente até concentração de 0,002% (m/v). Preparar solução padrão de mesma concentração e medir as absorvâncias de todas as soluções preparadas em espectrofotômetro UV/Vis em 212 nm. Utilizar mistura de etanol:água (1:1) para ajuste do zero no equipamento. Calcular a quantidade de captopril em cada comprimido a partir das leituras realizadas.

Assim, para análise de um comprimido com dosagem de 25 mg de captopril, deve-se dissolvê-lo em um balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se uma concentração de 0,025% do ativo. Em seguida, realiza-se uma diluição de 12,5x, retirando uma alíquota de 2 mL e completando a 25 mL com o solvente indicado. Dessa maneira, obtém-se a concentração final desejada, utilizando, assim, 59 mL de etanol por amostra.

Outras diluições poderiam ser realizadas visando a mesma concentração final, no entanto sugere-se uma única diluição evitando-se gasto com solvente.

Além da amostra, deve-se preparar também a solução padrão de captopril de mesma concentração. Para isso, é necessário pesar 0,002g do padrão e diluir a 100 mL.

Os valores do solvente e padrão utilizados estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valor dos consumíveis para análise por UV/Vis.

Consumíveis	Quantidade	Preço (R\$)
Etanol, ACS	1 L	475,00
Captopril, ≥ 98%	5 g	1.262,00
Papel filtro quantitativo, 12,5 cm	100 u	24,00

A Tabela 3 indica o custo aproximado para análise de 100 amostras, considerando o preparo de uma única solução de padrão de captopril.

Tabela 3 – Custo da análise de 100 amostras por UV/Vis.

Solução	Etanol		Captopril		Papel filtro		Custo Total (R\$)
	Quant.	R\$	Quant.	R\$	Quant.	R\$	
100 amostras	590 mL	304,00	-	0,50	100 u	24,00	328,50
Padrão	50 mL		2,0 mg		-		

Para avaliar o custo com mão de obra, considera-se o tempo para análise de 100 amostras, em duplicata, de cerca de 5 horas.

6.1.2 Ensaio de pureza: limite de dissulfeto de captopril

A Farmacopeia¹⁰ indica a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector UV a 220 nm para a quantificação do dímero do captopril. A coluna deve ser empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (5 µm), com dimensões de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, mantida à temperatura ambiente. Utilizar uma mistura de ácido fosfórico a 0,11% (v/v) e metanol (45:55) como fase móvel, com fluxo de 1 mL/minuto.

Preparar uma solução de dissulfeto de captopril a 1 mg/mL em fase móvel. Pipetar 3 mL dessa solução para balão de 100 mL e completar com fase móvel (Solução teste).

Para preparar a Solução amostra deve-se pesar e pulverizar 20 comprimidos. Transferir quantidade do pó equivalente a 50 mg de captopril para balão volumétrico de 50 mL, acrescentar 30 mL de Fase móvel, deixar em ultrassom por 15 minutos e agitar mecanicamente durante 15 minutos. Completar o volume com o mesmo solvente. Homogeneizar e filtrar.

Injetar, separadamente, 20 µL da Solução teste e da Solução amostra. A área do pico relativo ao dissulfeto de captopril obtido na Solução amostra não deve ser superior à área do pico relativo ao dissulfeto de captopril obtido na Solução teste.

A Tabela 4 indica os valores dos consumíveis necessários nessa análise.

Tabela 4 – Valor dos consumíveis utilizados para análise por HPLC.

Consumíveis	Quantidade	Preço (R\$)
Ácido fosfórico, 49-51%, grau HPLC	500 mL	564,00
Metanol, grau HPLC, ≥99,9%	1 L	108,00
Filtro de seringa, 0,45 µm	500 unidades	1660,00
Dissulfeto de captopril	10 mg	745,00

A Tabela 5 descreve o custo aproximado para 100 análises por HPLC, considerando um tempo de corrida de 8 minutos¹⁷. Para o cálculo, desconsiderou-se o tempo de estabilização do equipamento e o tempo de injeção.

Tabela 5 – Custo de 100 análises por HPLC.

Consumíveis	Quantidade	R\$
Ácido fosfórico	1 mL	1,13
Metanol	531 mL	57,35
Filtro de seringa	100 unidades	332,00
Dissulfeto de captopril (Solução Teste)	10,0 mg	745,00
Custo Total (R\$)		1135,48

Estima-se que a determinação de dissulfeto de captopril por HPLC necessite de 1660 minutos para 100 análises, em duplicata, considerando tempo de preparo de amostra e de corrida, equivalendo a aproximadamente 28 horas de trabalho. Para um turno de 8 horas por dia de um analista, esse ensaio levaria 3,5 dias.

6.2 CUSTO DO ENSAIO UTILIZANDO FTIR-ATR

Para realizar a análise por infravermelho, necessita-se apenas de papel macio e acetona para realizar a limpeza do cristal de ATR. Na Tabela 6 estão descritos os custos desse ensaio para 100 amostras.

Tabela 6 – Custos da análise de 100 amostras por infravermelho.

Número de amostras	Acetona, ACS		Papel para limpeza		Custo Total (R\$)
	Quantidade	Custo (R\$)	Quantidade	Custo (R\$)	
100	1 L	25,00	4 rolos	7,00	32,00

Adquirindo espectros de infravermelho dos comprimidos é possível avaliar tanto a uniformidade entre as amostras, como a presença do dímero do captopril em uma única análise, reduzindo-se, assim, custos de ensaio e tempo de análise.

Com relação ao custo com mão de obra, a análise por infravermelho é bastante vantajosa em virtude do tempo reduzido do ensaio. Assim, 100 amostras, em duplicata, podem ser analisadas por FTIR-ATR em aproximadamente 15 horas. Soma-se a isso o tempo para tratamento e interpretação dos dados de cerca de 1 hora, resultando, portanto, em 2 dias de trabalho, considerando um turno de 8 horas por dia.

7 CONCLUSÕES

A utilização da espectroscopia no infravermelho médio em conjunto com ferramentas de análise multivariada como a análise por hierarquia de agrupamentos (HCA) e a análise por componentes principais (PCA) permitiu a verificação da uniformidade existente entre formulações produzidas por diferentes laboratórios, incluindo um estudo sobre o comportamento da PCA ao se variar a concentração do ativo. Além disso, o método mostrou-se eficaz na identificação da degradação do fármaco através do algoritmo para análise por componentes principais por intervalos (iPCA).

Essa análise indica a possibilidade de utilização da metodologia proposta no controle de qualidade de uma indústria farmacêutica, visto que, havendo uma quantidade representativa de amostras, seria possível identificar rapidamente um lote de produtos cujas especificações não estivessem de acordo com os parâmetros estabelecidos.

Como vantagens do método tem-se a rapidez e simplicidade da técnica, baixo custo por análise, além de não utilizar reagentes químicos, e exigir o mínimo de manipulação das amostras.

8 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO

As diferenças entre cada formulação poderiam ser verificadas mais claramente obtendo-se espectros de FTIR-ATR separadamente para cada componente do excipiente do medicamento. Assim, utilizando-se de métodos de análise multivariada seria possível inferir sobre a autenticidade das amostras.

Já a determinação da concentração do ativo nos comprimidos poderia ser realizada através de análises quantitativas por FTIR-ATR, verificando, dessa maneira, a conformidade com a legislação vigente.

Além disso, sugere-se a utilização da cromatografia para confirmação das interpretações realizadas através do infravermelho.

9 REFERÊNCIAS

1. OMBUENA, P. B., et al. Hipertensión arterial y prediabetes. **Med Clin (Barc)**, v. 147, n. 9, p. 387–392, 2016.
2. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq Bras Cardiol**, v. 95 (1), supl.1, p 1-51, 2010.
3. CORRÊA, T. D., et al. Hipertensão arterial sistêmica: atualidades sobre sua epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Arq Med ABC**, v. 31, n. 2, p. 91-101, 2005.
4. MUSCARÁ, M. N; RIBEIRO, W. Características farmacocinéticas de antagonistas de cálcio, inibidores da ECA e antagonistas de angiotensina II em humanos. **Rev Bras Hipertens** v. 8, n. 1, p. 114-124, 2001.
5. GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 2003. 1647 p.
6. NOBREGA, I. M. F. **Desenvolvimento farmacotécnico e estudo da estabilidade de comprimidos à base de captopril**. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade federal de Pernambuco, Recife, 2006.
7. OPIE L. H. **Angiotensin converting enzyme inhibitors: scientific basis for clinical use**. 2. ed. New York: Authors' Publishing House, 1994. 316 p.
8. VALENTINI, S. R. **Atributos da validação da metodologia analítica do captopril num programa de garantia de qualidade**. 2002. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
9. MAHMOUD, W. M.; KUMMERER, K. Captopril and its dimer captopril disulfide: photodegradation, aerobic biodegradation and identification of transformation products by HPLC-UV and LC-ion trap-MSⁿ. **Chemosphere**, v. 88, n. 10, p. 1170-1177, 2012.
10. ANVISA. **Farmacopeia Brasileira: Monografias**, 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Fundação Oswaldo Cruz, 2010, 904 p.
11. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – FISPQ. Captopril. Disponível em: <<http://www.merckgroup.com>>. Acesso em 12 de agosto de 2016.
12. Captopril: Bula. Disponível em: <<http://www.teuto.com.br>>. Acesso em 12 de agosto de 2016.
13. HILLAERT, S.; VAN-DEN-BOSSCHE, W. Determination of captopril and its degradation products by capillary electrophoresis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 21, n. 1, p. 65-73, 1999.

14. FEKETE, P. Pharmaceutical Technology of Tensiomin. **Acta. Pharm. Hung.**, v. 67, n. 4, p. 113-121, 1997.
15. SOUZA, J. A. L., et al. Quantification of captopril disulphide as a degradation product in captopril tablets using near infrared spectroscopy and chemometrics, **Vibrational Spectroscopy**, v. 62, p. 35-41, 2012.
16. FERREIRA, A. O. **Guia prático da farmácia magistral**, 4. ed., Juiz de Fora: Pharmabooks, 2011, 1438 p.
17. TORRES, A. R. **Cartas de controle multivariadas aplicadas na revisão periódica de produtos e no estudo da estabilidade em uma indústria farmacêutica nacional**. 2015. 114 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.
18. HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.
19. SMITH, B. C. **Infrared spectral interpretation: a systematic approach**. Boca Raton: CRC Press, 1999. 265 p.
20. SMITH, B. C. **Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2011. 207 p.
21. FERRÃO, M. F. **Aplicação de técnicas espectroscópicas de reflexão no infravermelho no controle de qualidade de farinha de trigo**. 2000. 234 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
22. FAHRENFORT, J. Attenuated total reflection: A new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds. **Spectrochim. Acta**, v. 17, n. 7, p. 698-709, 1961.
23. NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.
24. FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria – conceitos, métodos e aplicações**. Campinas: Unicamp, 2015. 493 p.
25. NETO, J. M. M.; MIOTA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Quim. Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.
26. 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. **Quim. Nova**, v. 35, n. 1, p. 223-229, 2012.

27. RAJALAHTI, T.; KVALHEIM, O. M. Multivariate data analysis in pharmaceuticals: a tutorial review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, n. 1-2, p. 280-290, 2011.
28. RINNAN, A.; BERG, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201-1222, 2009.
29. BRERETON, R. G. **Chemometrics: applications of mathematics and statistics to laboratory systems**. Chichester: Ellis Horwood, 1993. 307 p.
30. LAVINE, B. K. Signal processing and data analysis. In: HASWEL, S. J. **Practical guide to chemometrics**. New York: Marcel Dekker, 1992. Cap. 7, p. 211-238.
31. LI, L., et al. Overview of principal component analysis algorithm. **Optik - International Journal for Light and Electron Optics**, v. 127, n. 9, p. 3935-3944, 2016.
32. MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S. C. N.; FERREIRA, M. M. C. Aplicação da análise exploratória na diferenciação de vegetais. **Braz. J. Food Technol.**, v. 2, n. 1-2, p. 73-79, 1999.
33. CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 481-487, 2007.
34. WORKSHOP EM SISTEMAS E PROCESSOS INDUSTRIAIS, 2. 2013. Santa Cruz do Sul. **Análise de componentes principais por intervalos (iPCA) como método de seleção de região espectral no infravermelho próximo para discriminação de óleos vegetais**. Rio Grande do Sul, 2013, 10 p.
35. BEEBE K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. New York: John Wiley e Sons, 1997.

ANEXO A – ESPECTROS FTIR-ATR PRÉ-TRATADOS

