

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

NATHALIA DA ROSA LUIZ

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MINIATURIZADO PARA DETERMINAÇÃO  
DE PARACETAMOL MEDIANTE O USO DE ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS E  
DO APLICATIVO *mobile* PHOTOMETRIX PRO PARA CONTROLE DE  
QUALIDADE DE MEDICAMENTOS**

Porto Alegre

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

NATHALIA DA ROSA LUIZ

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MINIATURIZADO PARA DETERMINAÇÃO DO ATIVO PARACETAMOL MEDIANTE O USO DE ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS E DO APLICATIVO *mobile* PHOTOMETRIX PRO PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS**

Projeto Tecnológico apresentado junto à atividade de Ensino “Projeto Tecnológico – Química” do Curso de Química Industrial da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do título Bacharel em Química Industrial.

Prof. Dr. Milton Katsumi Sasaki  
Orientador

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Carla Sirtori  
Co-orientadora

Porto Alegre  
2023

---

CIP - Catalogação na Publicação

Luiz, Nathalia da Rosa  
Desenvolvimento de Método Miniaturizado para  
Determinação de Paracetamol Mediante o Uso de  
Espectrofotometria UV-Vis e do Aplicativo mobile  
PhotoMetrix PRO para Controle de Qualidade de  
Medicamentos / Nathalia da Rosa Luiz. -- 2023.  
60 f.  
Orientador: Milton Katsumi Sasaki.

Coorientadora: Carla Sirtori.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Química, Curso de Química Industrial, Porto Alegre,  
BR-RS, 2023.

1. Paracetamol. 2. Miniaturização. 3. PhotoMetrix  
PRO. 4. Espectroscopia UV-Vis. 5. Química Analítica  
Verde. I. Sasaki, Milton Katsumi, orient. II.  
Sirtori, Carla, coorient. III. Título.

**FOLHA DE APROVAÇÃO**  
NATHALIA DA ROSA LUIZ

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MINIATURIZADO PARA DETERMINAÇÃO DO ATIVO PARACETAMOL MEDIANTE O USO DE ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS E DO APLICATIVO *mobile* PHOTOMETRIX PRO PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS**

Projeto Tecnológico apresentado junto à atividade de Ensino “Projeto Tecnológico – Química” do Curso de Química Industrial da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do título Bacharel em Química Industrial.

**Aprovada em:** Porto Alegre, 29 de agosto de 2023

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Milton Katsumi Sasaki  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

---

Profª Drª Carla Sirtori  
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

---

Dr. Alexandre Della Flora  
Hertz Farmacêutica

---

Cristiane Pontes de Oliveira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Dedico este trabalho ao meu tripé de sustentação de vida: Eliziane, Nathan e Thomas. Essa conquista é nossa, eu amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder o dom da vida, o dom da persistência e perseverança para perseguir este longo caminho da graduação e por colocar pessoas especiais na minha vida para que eu não estivesse sozinha nesta trajetória, pessoas as quais listo abaixo.

Agradeço a minha mãe, Eliziane, por sempre estar me apoiar nestes anos, por suportar e me prover para que eu pudesse focar nos estudos. Mãe, tu és a pessoa mais forte e guerreira que eu conheço e, com certeza, me inspirou para não desistir em nenhum momento na vida, para que pudéssemos chegar ao final desta graduação! Agradeço, também, ao meu irmão, Nathan, por sempre entender quando eu precisava de silêncio para estudar e sempre me ajudar quando necessário. Eu amo vocês!

Agradeço a minha família por estarem junto comigo nesta caminhada, destacando aqui meus primos Douglas, Gabriela, Fernanda e Gabriel, e agregados, Sabrina, Karina e Sandro. Agradeço também a família que me adotou como filha: à minha sogra Terezinha, ao meu sogro Alcei, à minha cunhada Susy, cunhado Jonas e à minha avó emprestada Luiza.

Agradeço, também, aos amigos da vida, Renata, Douglas, Thábata e Maria Julia, por todo apoio até aqui.

Agradeço também as amigas que UFRGS me presenteou. Eu, que achei que ficaria sozinha a graduação inteira, recebi a grata surpresa de ter vocês duas, Náiali e Letícia, como alicerce e escape para encarar a rotina de TM3 e faculdade, cadeiras difíceis, bolsas de iniciação, amoras e árvores entortadas. Obrigada por estarem comigo até o final.

Agradeço a universidade pelas oportunidades de crescimento e os grupos de pesquisa nos quais pude me desenvolver durante a graduação. Destaco o grupo LAPOL, e principalmente ao Giordano, que, muito mais que um simples orientador e colega de trabalho, se tornou um grande amigo. Obrigada por me mostrar o mundo dos polímeros e por me ajudar a me desenvolver como bolsista. Destaco também o grupo GMAPS, por permitir desenvolver o meu projeto e pelas conversas e trocas que me ajudaram no estudo deste trabalho.

Agradeço aos professores Milton e Carla, pela orientação e por toparem este projeto em modo “*flash*”. Obrigada por todas as discussões e orientações dadas até aqui. Agradeço também a professora Angelica pela ajuda e esclarecimento sobre o mecanismo de reação proposto neste trabalho.

Agradeço ao time do setor de Estabilidade da Hertz Farmacêutica, destacando aqui meus gestores Gustavo e Cinthia, e minhas colegas e amigas Suele, Andrielle, Jaíne, Pâmela e

Kellen. Obrigada por terem me dado a oportunidade de estagiar neste setor tão importante na empresa, por terem me ajudado a me desenvolver, me darem as ferramentas para que eu pudesse ir mais além e acreditado no meu potencial desde o início. Obrigada, também, pelas trocas diárias, pelas risadas e brincadeiras que tornam a rotina menos exaustiva.

Por fim, mas não menos importante (na verdade, o extremamente oposto) agradeço ao meu namorado e parceiro de vida, Thomas, por sempre estar comigo nesta caminhada tão árdua que foi a graduação. Obrigada por ter sido tão entusiasta quanto eu nesse projeto, por me ouvir, me dar conforto e me acalantar quando eu precisei, me dar sermão quando era necessário, mas principalmente por estar junto de mim, independente do problema ou situação. Esse projeto também é fruto do teu esforço, e eu agradeço imensamente por tu se fazer presente, quando nem era sua obrigação. NEOQEAV!

“Se você quiser alguém em quem confiar, confie em si mesmo. Quem acredita sempre alcança!”

Russo, Renato

## RESUMO

O controle de qualidade de medicamentos é fundamental para assegurar a qualidade dos produtos farmacêuticos, sendo regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, através da Resolução 658 da Diretoria Colegiada do ano de 2022 que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. O presente trabalho procurou estudar metodologias rápidas, econômicas e sustentáveis para análise de medicamentos com o princípio ativo paracetamol, amplamente utilizado como analgésico e antipirético, para implementação em indústria farmacêutica. As metodologias miniaturizadas são interessantes, neste contexto, pois buscam minimizar o uso de reagentes e solventes, reduzindo o impacto ambiental, além de economizar tempo e recursos. Desta forma, este projeto teve como objetivo a adaptação e miniaturização de um método para determinação de paracetamol. Tal metodologia foi adaptada e aplicada para o uso de espectrofotometria no UV-Vis e via aplicativo *mobile* PhotoMetrix PRO. A partir dos resultados da miniaturização, constatou-se uma redução de até 90% no volume de amostra utilizada e na quantidade de resíduos gerados, além de uma expressiva diminuição de 98% nos custos ao empregar o aplicativo *mobile* PhotoMetrix PRO. A metodologia adaptada foi submetida à avaliação de diferentes parâmetros, como linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), repetibilidade e robustez. Por fim, na etapa final do estudo, os métodos adaptados foram submetidos à análise dos 12 princípios da Química Analítica Verde utilizando o *software* gratuito AGREE (*Analytical GREEnness metric approach*).

**Palavras-chave:** Paracetamol; Miniaturização; PhotoMetrix PRO; Espectroscopia UV-Vis; Química Analítica Verde.

## ABSTRACT

The quality control of medicines is fundamental to ensure the quality of pharmaceutical products and is regulated by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) through the Resolution 658 of the Collegiate Board of Directors in the year 2022, which establishes Good Manufacturing Practices for Medicines. The present study aimed to investigate rapid, cost-effective, and sustainable methodologies for the analysis of medicines containing the active ingredient paracetamol, widely used as an analgesic and antipyretic, for implementation in the pharmaceutical industry. Miniaturized methodologies are interesting in this context as they minimize the use of reagents and solvents, reducing environmental impact and saving time and resources. Thus, this project focused on the adaptation and miniaturization of a method for paracetamol determination. Such methodology was adapted and applied using UV-Vis spectrophotometry and the mobile application PhotoMetrix PRO. The results of miniaturization showed a reduction of up to 90% in the required sample volume and in the amount of generated waste, as well as the significant decrease of 98% in costs when employing the PhotoMetrix PRO mobile application. The adapted methodology was evaluated in terms of different parameters, including linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), repeatability, and robustness. Finally, in the last stage of the study, the adapted methods were subjected to analysis according to the 12 principles of green analytical chemistry using the free software AGREE (Analytical GREENness metric approach).

**Keywords:** Paracetamol; Miniaturization; PhotoMetrix PRO; UV-Vis Spectroscopy; Green Analytical Chemistry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Estrutura Química do Paracetamol.	<b>17</b>
<b>Figura 2</b> – Círculo RGB.	<b>23</b>
<b>Figura 3</b> – Mosaico de Bayer.	<b>23</b>
<b>Figura 4</b> – Representação Esquemática do preparo da reação para metodologia UV-Vis.	<b>28</b>
<b>Figura 5</b> – Placa de poços, contendo a curva de calibração preparada.	<b>29</b>
<b>Figura 6</b> – Compartimento para as amostras aberto, mostrando abertura, onde se encaixa a câmera do celular, iluminação em LED utilizada na cor branca, placa de poços utilizada como compartimento para as amostras.	<b>30</b>
<b>Figura 7</b> – Representação Esquemática do preparo da reação miniaturizada para metodologia PhotoMetrix PRO.	<b>30</b>
<b>Figura 8</b> – Mecanismo de Formação do íon Nitrito.	<b>32</b>
<b>Figura 9</b> – Mecanismo de Nitração e Reação Ácido-Base.	<b>32</b>
<b>Figura 10</b> – Mecanismo de ressonância da carga eletrônica no anel benzênico.	<b>33</b>
<b>Figura 11</b> – Tubos <i>falcon</i> , contendo solução colorimétrica final da curva de calibração preparada.	<b>33</b>
<b>Figura 12</b> – Curva de calibração do Paracetamol em água ultrapurificada, obtida por Espectrofotometria UV-Vis. Faixa linear de 0,050 a 0,70 mg mL <sup>-1</sup> .	<b>35</b>
<b>Figura 13</b> – Curva de calibração do Paracetamol em água ultrapurificada, obtida pelo PhotoMetrix PRO. Faixa linear de 0,050 a 0,70 mg mL <sup>-1</sup> .	<b>38</b>
<b>Figura 14</b> – Curva de calibração miniaturizada do Paracetamol em água ultrapurificada, obtida pelo PhotoMetrix PRO Faixa linear de 0,050 a 0,70 mg mL <sup>-1</sup> .	<b>40</b>
<b>Figura 15</b> – Gráficos de avaliação ambiental via AGREE dos métodos: A - não-miniaturizado; B - miniaturizado e C - miniaturizado PhotoMetrix PRO	<b>42</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Parâmetros da regressão por mínimos quadrados ponderados.	<b>34</b>
<b>Tabela 2</b> – Linearidade, LQ e LD obtidos da curva de calibração avaliada.	<b>34</b>
<b>Tabela 3</b> – Resultados do parâmetro de precisão e exatidão para método em Espectrofotometria UV-Vis.	<b>36</b>
<b>Tabela 4</b> – Resultados do parâmetro de robustez para método em Espectrofotometria UV-Vis.	<b>36</b>
<b>Tabela 5</b> – Linearidade da curva de calibração obtida do software PhotoMetrix PRO.	<b>37</b>
<b>Tabela 6</b> – Resultados do parâmetro de precisão e exatidão para método em PhotoMetrix PRO.	<b>38</b>
<b>Tabela 7</b> – Resultados do parâmetro de robustez para método em PhotoMetrix PRO.	<b>38</b>
<b>Tabela 8</b> – Resultados obtidos da amostra comercial preparada, avaliada em Espectroscopia UV-Vis e PhotoMetrix PRO.	<b>39</b>
<b>Tabela 9</b> – Linearidade da curva de calibração miniaturizada obtida do software PhotoMetrix PRO.	<b>40</b>
<b>Tabela 10</b> – Comparativo de custos entre as metodologias abordadas.	<b>43</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>RGB</b>	Vermelho, Verde, Azul ( <i>Red, Green, Blue</i> )
<b>AGREE</b>	<i>Analytical GREEnness Metric Approach and Software</i>
<b>UV-VIS</b>	Ultravioleta-Visível
<b>POP</b>	Procedimento Operacional Padrão
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>BPF</b>	Boas Práticas de Fabricação
<b>PCA</b>	Análise por Componentes Principais ( <i>Principal Component Analysis</i> )
<b>PLS</b>	Mínimos Quadrados Parciais (Partial Least Squares)
<b>HCA</b>	Análise Hierárquica de Clusters ( <i>Hierarchical Cluster Analysis</i> )
<b>USP</b>	<i>United States Pharmacopeia</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>R</b>	Coefficiente de Correlação
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de Determinação
<b>LD</b>	Limite de Detecção
<b>LQ</b>	Limite de Quantificação
<b>DPR</b>	Desvio Padrão Relativo
<b>Recup.</b>	Recuperação
<b>LED</b>	Diodo Emissor de Luz ( <i>Light-Emitting Diode</i> )
<b>GMAPS</b>	Grupo de Pesquisa em metodologias Analíticas e Processos Avançados
<b>UFRGS</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
3.1 PARACETAMOL .....	17
3.2 INDÚSTRIA FARMACÊUTICA E CONTROLE DE QUALIDADE .....	18
3.3 TÉCNICAS E METODOLOGIAS ANALÍTICAS .....	20
3.4 PHOTOMETRIX PRO.....	22
3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	24
<b>3.5.1 LINEARIDADE</b> .....	<b>24</b>
<b>3.5.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)</b> .....	<b>24</b>
<b>3.5.3 PRECISÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>3.5.4 EXATIDÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>3.5.5 ROBUSTEZ</b> .....	<b>26</b>
3.6 QUÍMICA VERDE .....	26
<b>4. MATERIAIS E METODOLOGIA</b> .....	<b>28</b>
4.1 MATERIAIS .....	28
4.2 METODOLOGIA.....	28
<b>4.2.1 MÉTODO EMPREGANDO ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2.2 MÉTODO EMPREGANDO PHOTOMETRIX PRO</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2.3 VALIDAÇÃO E PREPARO DA CURVAS ANALÍTICAS</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRA COMERCIAL</b> .....	<b>31</b>
<b>5. ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
5.1 MECANISMO DA REAÇÃO COLORIMÉTRICA.....	32
5.2 VALIDAÇÃO EMPREGANDO ESPECTOFOTOMETRIA UV-VIS .....	33
5.3 VALIDAÇÃO EMPREGANDO PHOTOMETRIX PRO .....	36
5.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRA COMERCIAL .....	39
5.5 MÉTODO MINIATURIZADO PARA PHOTOMETRIX PRO .....	39
5.6 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP) .....	41
5.7 AVALIAÇÃO DE IMPACTO AMBIENTAL VIA SOFTWARE LIVRE AGREE.....	41
5.8 AVALIAÇÃO DE CUSTOS.....	42

<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>48</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>59</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O controle de qualidade de medicamentos é um processo crucial para garantir a segurança, a eficácia e a confiabilidade dos produtos farmacêuticos disponibilizados no mercado, sendo regulamentado pela ANVISA. Dentre os diversos princípios ativos amplamente utilizados, o paracetamol, também conhecido como acetaminofeno, destaca-se por sua eficácia como analgésico e antipirético, sendo encontrado em uma ampla gama de formulações farmacêuticas.<sup>3,13</sup>

Com o objetivo de atender às demandas de um controle de qualidade ágil, econômico e amigável ao meio ambiente, têm sido buscadas metodologias que sejam baratas, rápidas e simples. Essa abordagem procura otimizar os processos de análise, reduzindo custos operacionais e diminuindo o tempo necessário para a obtenção de resultados confiáveis. Além disso, ao priorizar métodos analíticos mais acessíveis e sustentáveis, é possível contribuir com a diminuição dos efeitos ambientais negativos. Nesse contexto, as metodologias miniaturizadas são interessantes, pois buscam minimizar o uso de reagentes e solventes, reduzindo o impacto ambiental, além de economizar tempo e recursos.<sup>23</sup>

Atualmente, uma ferramenta que tem ganhado destaque e demonstrado eficiência em diversos cenários, especialmente em ambientes com recursos laboratoriais limitados, é o aplicativo PhotoMetrix PRO. Esse aplicativo está disponível para *download* em dispositivos móveis com os principais sistemas operacionais. O PhotoMetrix PRO opera com base no princípio do sistema de cores RGB, que divide as cores em três grupos, cada um apresentando picos de sensibilidade em torno do vermelho (*red* - R), verde (*green* - G) e azul (*blue* - B).<sup>24</sup>

Essa abordagem inovadora permite a realização de análises precisas e confiáveis, tornando-se uma ótima opção para utilização em metodologias colorimétricas. Sua acessibilidade e facilidade de uso o tornam uma ferramenta valiosa para indústrias de diversas áreas que buscam uma alternativa prática, eficiente e barata nas análises químicas qualitativas e quantitativas de substâncias.

Por fim, a adoção de novas metodologias analíticas também deve ser considerada sob a perspectiva dos princípios da Química Analítica Verde. Nesse contexto, estão sendo desenvolvidas diversas ferramentas para auxiliar os pesquisadores a realizar essa avaliação. Neste estudo, utilizou-se o *software* gratuito AGREE para medir o quão “amigáveis ambientalmente” são o método analisado e as propostas miniaturizadas.<sup>32</sup>

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de método colorimétrico de determinação do princípio ativo paracetamol em amostra comercial utilizando espectrofotometria UV-Vis e, posteriormente, a miniaturização para uso do aplicativo *mobile* PhotoMetrix PRO e, desta forma, avaliar a viabilidade de implementação do *software* para controle de qualidade na indústria farmacêutica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar e validar um método de determinação de paracetamol para amostra comercial empregando espectrofotometria UV-Vis e o aplicativo *mobile* Photometrix PRO;
- Avaliar a viabilidade de miniaturização do método espectrofotométrico, utilizando como instrumento de análise o Photometrix PRO;
- Comparar os métodos validados em relação à frequência analítica, conformidade com os princípios da Química Verde empregando o aplicativo AGREE e análise econômica;
- Elaborar um POP da metodologia desenvolvida em UV-Vis e no aplicativo Photometrix PRO, visando sua disponibilização ao público em geral (empresas, instituições de ensino e/ou pesquisa privadas e públicas).

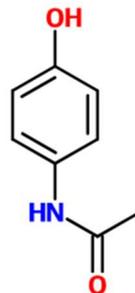
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 PARACETAMOL

O paracetamol, também conhecido como acetaminofeno, é um medicamento com propriedades analgésicas e antipiréticas, que ajuda a aliviar a febre em adultos e crianças, reduzindo a temperatura corporal quando esta está acima de 37°C.<sup>1</sup> É indicado, ainda, para aliviar temporariamente dores leves a moderadas, tais como dor associada a gripes e resfriados comuns, dor de cabeça, dor de dente, dor nas costas, dores musculares, dores relacionadas à artrite, cólica menstrual e reações pós-vacinais.<sup>2</sup> O paracetamol/acetaminofeno é um dos analgésicos e antipiréticos mais populares e amplamente utilizados em todo o mundo em formulações de uso único ou combinadas com outros componentes.<sup>3</sup>

O paracetamol apresenta-se como pó cristalino branco, é inodoro e ligeiramente solúvel em água, cerca de 14 mg/mL na temperatura de 25°C, e possui uma faixa de fusão compreendida entre 169,0 e 170,5°C. Sua fórmula molecular é C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>, o que corresponde a uma massa molar de 151,16 g mol<sup>-1</sup>. A Figura 1 apresenta a estrutura química do fármaco.<sup>4</sup>

**Figura 1.** Estrutura Química do Paracetamol.



Fonte: A autora.

A dose terapêutica convencional do paracetamol varia de acordo com a via de administração e é de 325 a 1000 mg em adultos, a serem administrados a cada 4-6 horas, com um máximo de 4000 mg por dia. Em crianças, a dose varia de 40 a 480 mg, com um máximo de 5 doses diárias, dependendo do peso e da idade.<sup>5</sup> Em adultos, a dose de 1 g é considerada a dose máxima eficaz, portanto, doses superiores não resultam em aumento da atividade analgésica, além de poder aumentar a toxicidade do medicamento.<sup>6</sup>

O grupo fenol presente na molécula do paracetamol é facilmente oxidado, o que desempenha um papel essencial em seu mecanismo de ação. O paracetamol atua como substrato e inibidor das peroxidases da COX-1 e COX-2. Além disso, por meio da sua oxidação, o paracetamol também pode inibir outras peroxidases, como a mieloperoxidase.<sup>7</sup>

Em adultos, a hepatotoxicidade pode ocorrer com a ingestão de uma dose única de 10 a 15 g (ou, aproximadamente, de 150 a 250 mg/kg) de paracetamol. Além disso, doses de 20 a 25 g (ou mais) são potencialmente fatais.<sup>5</sup> A maioria do metabolismo oxidativo do paracetamol ocorre no fígado, principalmente na zona III centrolobular, devido à maior concentração do citocromo P450 nessa região. Em casos mais graves, a lesão pode se estender para as zonas I e II, levando à destruição de todo o tecido hepático.<sup>6</sup>

O paracetamol é classificado como um medicamento de venda livre, podendo, portanto, ser adquirido sem a necessidade de qualquer prescrição médica. Este aspecto facilita o aumento do seu consumo, já que está disponível para compra sem restrições. A disponibilidade sem qualquer prescrição médica contribui para a prática da automedicação e do uso indiscriminado do paracetamol.<sup>8</sup>

Um levantamento realizado pelo IQVIA Brasil, no período de junho de 2021 a junho de 2022, identificou os dez medicamentos mais vendidos no país, sendo que, dentre estes, dois apresentavam o paracetamol como princípio ativo em sua composição. A venda desses dois medicamentos atingiu a marca de 62,7 milhões de unidades, o que correspondeu a cerca de 15% dos dez medicamentos mais vendidos. Esse estudo considerou fontes diversas, buscando o levantamento mais amplo possível, como redes de farmácias, farmácias independentes, atacadistas e farmácias *online*.<sup>9</sup>

Neste contexto, o controle de qualidade do paracetamol torna-se extremamente importante para garantir a qualidade dos produtos que contenham o fármaco em suas formulações. Para favorecer esse controle de qualidade, o desenvolvimento de metodologias analíticas mais rápidas, robustas e eficazes é fundamental, principalmente para avaliar, de forma precisa e confiável, a concentração do princípio ativo, assim como, para identificar impurezas e para assegurar a conformidade em relação a padrões internacionais de qualidade. O desenvolvimento dessas metodologias analíticas contribui para a segurança, a eficácia e a qualidade dos produtos contendo paracetamol, o que pode beneficiar tanto pacientes, quanto a indústria farmacêutica como um todo.

### 3.2 INDÚSTRIA FARMACÊUTICA E CONTROLE DE QUALIDADE

A indústria farmacêutica pode ser caracterizada como um conjunto de oligopólios com produtos diversos em segmentos de classes terapêuticas específicas; é um setor que se dedica à pesquisa, ao desenvolvimento, à produção e à comercialização de medicamentos e outros produtos relacionados à saúde.<sup>10</sup> Atualmente, a indústria farmacêutica global abrange mais de 10 mil empresas em onze países, sendo que os Estados Unidos são o maior produtor e também

o maior consumidor desse mercado.<sup>11</sup> No Brasil, atualmente, existem cerca de 400 indústrias farmacêuticas, que estão concentradas principalmente na região sudeste. Essas empresas desempenham um papel significativo na economia nacional, gerando aproximadamente 50 mil empregos diretos e 250 mil empregos indiretos.<sup>12</sup>

A fabricação e a comercialização de medicamentos passam por um longo e complexo processo, que pode demandar meses ou até mesmo anos de pesquisas, testes e elevados investimentos. Em média, necessita-se cerca de uma década de desenvolvimento e bilhões de reais para o desenvolvimento de um único medicamento. Esse processo é indispensável para assegurar a eficácia e a segurança do medicamento.<sup>10</sup>

No Brasil, as indústrias de medicamentos têm a responsabilidade de assegurar a qualidade dos produtos destinados ao público em geral. Para alcançar esses objetivos, elas devem obedecer a RDC Nº 658, de 30 de março de 2022, que dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, regulamentadas pela ANVISA. Essas diretrizes estabelecem os critérios e requisitos que as empresas farmacêuticas devem seguir para garantir a fabricação de medicamentos em condições controladas, em conformidade com os regulamentos e normas aplicáveis. Fatores como infraestrutura, processos de fabricação, controle de matérias-primas, validação de processos são abordados nessas diretrizes.<sup>13</sup>

O controle de qualidade é um desses aspectos que desempenham papel de extrema importância nas indústrias farmacêuticas, garantindo que a qualidade, segurança, eficácia e credibilidade de seus produtos sejam asseguradas para a população que utilizará esses medicamentos. A definição proposta pela RDC-658/2022 diz:

O Controle de Qualidade é a parte das BPF referente à coleta de amostras, às especificações e à execução de testes, bem como à organização, à documentação e aos procedimentos de liberação que asseguram que os testes relevantes e necessários sejam executados, e que os materiais não sejam liberados para uso, ou que produtos não sejam liberados para comercialização ou distribuição, até que a sua qualidade tenha sido considerada satisfatória.<sup>13</sup>

O controle de qualidade é um conceito que engloba um conjunto de operações, como programação, coordenação e execução, com o objetivo de verificar e garantir que os produtos atendam aos padrões de qualidade estabelecidos. Esse processo envolve a realização de análises e medições para avaliar as características e propriedades dos produtos, comparando-os com os critérios pré-definidos de qualidade. Essas análises e medições podem abranger diversos aspectos, como composição, pureza, potência, segurança, durabilidade, entre outros, dependendo do tipo de produto em questão. Ao implementar processos de controle de

qualidade rigorosos, as indústrias farmacêuticas podem verificar e monitorar cada etapa da produção, desde a seleção das matérias-primas até a fabricação final do medicamento. Isso permite identificar e corrigir eventuais falhas ou desvios que possam comprometer a qualidade ou segurança do produto.<sup>14</sup>

### 3.3 TÉCNICAS E METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Para alcançar os objetivos preconizados no controle de qualidade de medicamentos, são empregadas ferramentas analíticas e métodos instrumentais que permitem a determinação e quantificação do teor de substâncias ativas, impurezas e outros parâmetros relevantes. Nos últimos anos, as técnicas analíticas instrumentais têm se destacado graças aos avanços tecnológicos, especialmente em relação a sistemas analíticos mais robustos e eficientes. Essas técnicas podem ser agrupadas em áreas, sendo principais as técnicas cromatográficas e as técnicas espectroscópicas, cada uma delas possui características distintas e capacidade de detectar e/ou quantificar diferentes espécies químicas de interesse, também conhecidas como analitos.<sup>15</sup>

As técnicas cromatográficas baseiam-se em processos físico-químicos de separação de componentes de uma amostra, e estão intimamente ligadas às técnicas de detecção. As separações ocorrem através da distribuição dos solutos analisados entre duas fases: a fase móvel e a fase estacionária, que possuem interações diferentes com cada soluto analisado.<sup>16</sup>

As metodologias cromatográficas oferecem diversas vantagens. Em primeiro lugar, destacam-se pela alta sensibilidade dos equipamentos, capazes de detectar analitos em medidas de  $\text{ng L}^{-1}$ , ou inferiores a essa concentração, permitindo a análise de amostras com baixas concentrações. Além disso, as separações entre os analitos podem ser realizadas em poucos minutos, o que agiliza o processo de análise. O aspecto quantitativo e qualitativo da cromatografia é outro benefício, proporcionando a obtenção de informações detalhadas sobre as concentrações e perfis dos componentes presentes nas amostras. A versatilidade da cromatografia também é importante, pois é aplicável a uma ampla variedade de amostras, sejam elas orgânicas ou inorgânicas.<sup>17</sup>

Entretanto, o custo de aquisição destes tipos de equipamentos é alto, requerendo do laboratório um investimento bastante substancial. Além disso, há também os custos com fases móveis e colunas cromatográficas, que são contínuos por demandar reposição periódica.<sup>17</sup> Outra limitação está relacionada às questões ambientais, uma vez que a técnica de Cromatografia Líquida requer o uso de solventes orgânicos para a eluição dos componentes de uma amostra. A acetonitrila e o metanol são os solventes mais comumente utilizados em

modo reverso devido às suas propriedades únicas, como capacidade de dissolução de uma grande variedade de solutos, acidez reduzida, baixa reatividade química, baixa absorção na região ultravioleta, alta miscibilidade com água, baixa viscosidade e compatibilidade com a espectrometria de massas. No entanto, esses solventes apresentam alto nível de toxicidade e, portanto, importante impacto ambiental, o que torna necessário considerar a quantidade de resíduos gerados e os riscos associados ao seu uso.<sup>18</sup>

Por sua vez, nas técnicas espectroscópicas, a resposta analítica é obtida pela interação do analito, seja ele orgânico ou inorgânico, com a radiação eletromagnética em determinados comprimentos de onda; sendo que as radiações nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho fornecem energia que causam as transições eletrônicas. A técnica é fundamentada na lei de Lambert-Beer, expressa na Equação 1, que estabelece que em um determinado comprimento de onda, a absorvância depende da concentração de espécies absorventes no meio em que a radiação atravessa.<sup>19</sup>

$$A = \varepsilon \times b \times C \quad (1)$$

onde A é a absorvância,  $\varepsilon$  é a absorvidade molar, b é o caminho ótico percorrido pelo feixe de radiação e C é a concentração molar da espécie absorvente.

As técnicas espectroscópicas são divididas em espectroscopia atômica e espectroscopia molecular. Na espectroscopia atômica, o foco está na absorção da radiação por átomos específicos, enquanto na espectroscopia molecular (ou espectrofotometria), a absorção da radiação é observada para moléculas ou grupos químicos específicos.<sup>15</sup> Dentre as técnicas espectrofotométricas, a espectrofotometria na região UV-Vis é uma das variantes mais empregadas, devido a sua robustez, ao custo relativamente reduzido e ao elevado número de aplicações propostas.<sup>20</sup>

A espectrofotometria no UV-Vis oferece diversas vantagens como técnica analítica, pois possibilita o desenvolvimento de métodos rápidos, permitindo a obtenção de resultados em pouco tempo. Além disso, é de fácil operação, o que facilita sua utilização por diferentes usuários. Sua versatilidade permite a análise de uma ampla gama de amostras e substâncias. A técnica envolve procedimentos simples, o que simplifica a preparação das amostras. Além disso, é conhecida por proporcionar resultados exatos e precisos. A instrumentação necessária para a espectrofotometria UV-Vis é facilmente adquirida e está amplamente disponível em laboratórios. Além disso, é uma técnica de baixo custo por determinação, o que a torna acessível e econômica para uso em diversas áreas de pesquisa.<sup>21</sup>

A espectrofotometria no UV-Vis apresenta, entretanto, algumas desvantagens como técnica analítica. Uma delas é a dificuldade na determinação de analitos em baixas

concentrações, uma vez que a sensibilidade da técnica pode ser limitada nesses casos. Além disso, a largura da banda obtida no espectro de UV-Vis torna a técnica não seletiva, ou seja, pode haver sobreposição de sinais de diferentes componentes da amostra, dificultando a identificação e quantificação específica de um analito. Para melhorar a seletividade e a sensibilidade, é muitas vezes necessária uma preparação prévia específica da amostra.<sup>22</sup>

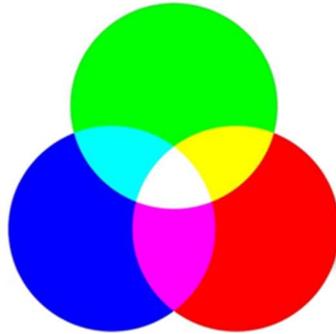
### 3.4 PHOTOMETRIX PRO

Alternativamente aos métodos espectrofotométricos, a utilização de estratégias de aquisição e processamento de imagens (obtidas com o uso de equipamentos portáteis) tem sido crescente, pois oferece uma solução mais simples, e resulta em economia de tempo, além de redução de custos. Uma ferramenta importante nesse contexto é o aplicativo PhotoMetrix PRO que possibilita, por exemplo, o monitoramento das condições de um processo utilizando *smartphone*.<sup>23</sup>

O PhotoMetrix foi desenvolvido em 2015 com o objetivo de ser uma ferramenta para análises químicas explorando a decomposição de imagens digitais (obtidas por câmeras de *smartphones*) e o processamento destas imagens com o mesmo aparelho, o que permitiria seu uso para análises *in situ*. O aplicativo é baseado na teoria das cores de Thomas Young (1801), que afirmou que os cones (células fotossensíveis na retina do olho) são subdivididos em três grupos que apresentam maiores sensibilidades próximo das cores vermelho (R), verde (G) e azul (B).<sup>24</sup>

Em seus estudos, Thomas observou que, ao projetar luz através de filtros nas cores vermelha, azul e verde, e sobrepondo-as, diferentes efeitos podiam ser observados. Primeiramente, quando os três círculos se sobrepunham, a luz branca era produzida, o que foi surpreendente, considerando-se que já se sabia que a luz branca era composta por um espectro contínuo de cores. Em segundo lugar, quando duas cores se coincidiam, outras cores eram produzidas. Por exemplo, a sobreposição de vermelho e azul resultava na cor magenta, enquanto a sobreposição de vermelho e verde produzia a cor amarela. Young também descobriu que, ao variar a quantidade relativa de vermelho, azul e verde na área de sobreposição, era possível obter uma ampla gama de cores, incluindo diferentes tons para cada uma delas. Outra observação importante feita por Young foi que nenhuma das três cores primárias aditivas, vermelho, verde e azul (RGB), podia ser produzida pela mistura de apenas duas delas. Essas cores primárias aditivas eram chamadas assim porque seus efeitos resultavam da adição das diferentes intensidades luminosas. A Figura 2 representa o esquema do experimento de Young.<sup>25</sup>

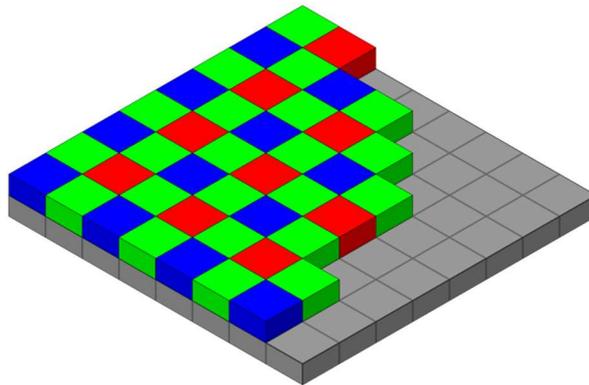
**Figura 2.** Círculo RGB



Fonte: ARTY, David. **Teoria das Cores:** guia sobre teoria e harmonia das cores no design. Guia sobre teoria e harmonia das cores no Design. Disponível em: <https://chiefofdesign.com.br/teoria-das-cores/#subtitulo02>. Acesso em: 09 jul. 2023.

As câmeras de celulares possuem sensores que transformam a radiação em sinal digital, mas, inicialmente, capturam imagens em tons monocromáticos. Para obter imagens coloridas, os sensores são combinados com um mosaico de filtros chamado Bayer, conforme Figura 3. Esse mosaico é composto por filtros de cores vermelho, verde e azul, dispostos em uma grade quadrada sobre os fotossensores. A disposição específica desses filtros de cor permite criar uma imagem colorida quando os dados dos sensores são processados adequadamente. Através desse processamento, o aplicativo consegue mensurar e decompor as imagens analisadas.<sup>26</sup>

**Figura 3.** Mosaico de Bayer



Fonte: JOSE, Barreiros; NICOLAS, Magne; DANILO, Chavez; EDUARDO, Avalos. Multispectral NDVI aerial image system for vegetation analysis by using a consumer camera. **2014 Ieee International Autumn Meeting On Power, Electronics And Computing (Ropec)**, México, nov. 2014. IEEE.

O Photometrix PRO, que é uma versão posterior ao Photometrix, possibilita a realização de calibração e amostragem (ou previsão) nos modos de análise univariada e multivariada. Em ambos os modos, os coeficientes angulares, lineares e de regressão são

calculados. No modo multivariado, há as opções de análise de componentes principais (PCA), regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) e análise hierárquica de agrupamento (HCA).<sup>23</sup> O método PLS é um modelo baseado em variáveis latentes (fatores), onde o objetivo é tentar alcançar a máxima congruência possível entre cada fator espectral e o fator de concentração correspondente, obtendo assim a melhor relação entre as projeções (pontuações) do previsto e os dados de concentração medidos.<sup>23</sup>

### 3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O desempenho adequado de qualquer técnica analítica depende de dois parâmetros essenciais: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos utilizados no processamento dos dados. Para garantir a utilidade e a aplicabilidade de um método analítico durante as atividades de rotina em um laboratório, é necessário estabelecer limites para esses parâmetros por meio da estimativa das chamadas "figuras de mérito", em um processo conhecido como validação.<sup>27</sup>

Para a realização da mesma existem compêndios oficiais e diretrizes legais que servem de guia para a execução da mesma como, por exemplo, RDC 166/2017 da ANVISA, USP, ICH Q2-R1 (ICH, 1995) e o FDA, avaliando geralmente os parâmetros de especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão e robustez, podendo haver variações conforme o tipo de método a ser utilizado. De maneira geral, a validação de um método assegura que o mesmo é apropriado para a sua finalidade, além de auxiliar na garantia de máxima eficácia e segurança dos medicamentos.<sup>28</sup>

#### 3.5.1 LINEARIDADE

De acordo com a RDC 166/2017, a linearidade de um método é evidenciada pela sua habilidade de obter respostas analíticas que variam diretamente de acordo com a concentração de um analito presente na amostra. Nos testes de linearidade, deve-se ser avaliado, entre outras coisas, a associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes R e R<sup>2</sup> em que o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990. Além disso, a homoscedasticidade, característica de um modelo de regressão linear que implica que a variância dos erros seja constante ao longo do tempo, deve ser investigada, para utilização dos métodos de mínimos quadrados adequado.<sup>29</sup>

#### 3.5.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O LD é a quantidade mais baixa que o método consegue detectar a presença do analito, ou seja, o limite mínimo no qual existe uma resposta analítica para uma determinada

concentração do analito analisado. Por sua vez o LQ é quantidade mais baixa do analito que se pode quantificar, com determinada precisão e exatidão, o analito presente na amostra. Ambos os limites podem ser estimados de diferentes formas: método visual, método da relação sinal/ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica. Neste trabalho, o método baseado em parâmetros da curva analítica foi utilizado.<sup>29</sup>

A RDC 166/2017 traz os cálculos dos limites de detecção e quantificação, respectivamente como:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad (3)$$

em que  $\sigma$  é o desvio padrão, determinado através do método escolhido, e IC é a inclinação da curva analítica. Neste trabalho, o  $\sigma$  utilizado foi o desvio padrão dos resíduos.<sup>29</sup>

### 3.5.3 PRECISÃO

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. De acordo com a RDC 166/2017, a precisão é avaliada de três formas: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Na repetibilidade, deve-se avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesmo equipamento, em uma única análise, utilizando, no mínimo, nove determinações, contemplando a faixa linear do método, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível ou seis réplicas a cem por cento da concentração do teste individualmente preparadas. Na avaliação da precisão intermediária, examina-se a proximidade dos resultados obtidos na análise da mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias distintos, conduzida por analistas diferentes, utilizando as mesmas amostras da repetibilidade. Por fim, na reprodutibilidade, o método é executado em outro laboratório para verificar a consistência dos resultados em diferentes ambientes.<sup>29</sup>

A precisão é verificada pela dispersão dos resultados, sendo calculado o DPR da série de medições conforme a seguinte fórmula:

$$DPR = \frac{DP \times 100}{CMD} \quad (4)$$

em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.<sup>29</sup>

#### 3.5.4 EXATIDÃO

A exatidão de um método analítico é determinada pela concordância entre os resultados individuais do método em estudo e um valor teórico (considerado como verdadeiro). As amostras avaliadas na exatidão seguem a avaliação da precisão, utilizando três concentrações diferentes - baixa, média e alta - em triplicata.<sup>29</sup>

A exatidão deve ser expressa pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, chamada de recuperação, dada pela equação 5, além do DPR entre as replicatas.<sup>29</sup>

$$Recup. = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100 \quad (5)$$

#### 3.5.5 ROBUSTEZ

A robustez é um parâmetro comumente avaliado durante o desenvolvimento do método analítico, que indica sua capacidade de resistir a pequenas e intencionais variações das condições analíticas, sendo avaliado com os mesmos critérios utilizados para a exatidão. Conforme a RDC 166/2017, para métodos espectroscópicos, a avaliação da robustez se dá na variação do pH da solução e diferentes lotes ou fabricantes dos solventes.<sup>29</sup>

### 3.6 QUÍMICA VERDE

A Química Verde busca implementar estratégias e abordagens que visam eliminar ou minimizar o uso de substâncias tóxicas para o meio ambiente e à saúde humana, reduzir a geração de resíduos prejudiciais e promover o emprego de solventes reutilizáveis.<sup>30</sup> As áreas mais abordadas da Química Analítica em relação à Química Verde são separação e preparação da amostra, pois são as principais consumidoras de solventes e outros reagentes que podem resultar em uma quantidade significativa de resíduos.<sup>31</sup>

A Química Analítica Verde, então, demanda o desenvolvimento de métricas dedicadas para medir o grau verde das metodologias analíticas. O sistema métrico para a avaliação ambiental de metodologias analíticas deve ser caracterizado por parâmetros diferentes comparados à área de síntese de produtos químicos. Os 12 princípios da Química Analítica Verde são:<sup>32</sup>

- ✓ Princípio 1. Técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar o tratamento da amostra;
- ✓ Princípio 2. O tamanho mínimo da amostra e o número mínimo de amostras são objetivos;
- ✓ Princípio 3. As medições *in situ* devem ser realizadas/priorizadas;
- ✓ Princípio 4. A integração de processos analíticos e de operações economiza energia e reduz o uso de reagentes;
- ✓ Princípio 5. Métodos automatizados e miniaturizados devem ser selecionados;
- ✓ Princípio 6. A derivatização deve ser evitada;
- ✓ Princípio 7. A geração de um grande volume de resíduos deve ser evitada e o gerenciamento adequado de resíduos deve ser executado;
- ✓ Princípio 8. Os métodos multianalito ou multiparâmetros são preferíveis aos métodos que usam um analito de cada vez;
- ✓ Princípio 9. O uso de energia deve ser minimizado;
- ✓ Princípio 10. Reagentes obtidos de fontes renováveis devem ser preferidos;
- ✓ Princípio 11. Os reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos;
- ✓ Princípio 12. A segurança do operador deve ser aumentada.

Recentemente, pesquisadores desenvolveram o *software* AGREE com o propósito de oferecer uma ferramenta fácil e gratuita que permite medir o grau de adesão de um método aos 12 princípios da Química Analítica Verde. O *software* converte esses princípios em pontuações, fornecendo uma métrica para avaliar os procedimentos analíticos numa escala de 0 a 1. Ele calcula as pontuações para cada critério individualmente e, ao final da avaliação, o resultado é o produto da avaliação de cada critério individual. Com base nas pontuações, o *software* gera um gráfico circular, apresentando a pontuação final no centro e os doze princípios ao seu redor. O desempenho de cada critério é representado por uma escala de cores, em que o vermelho indica baixo desempenho, o amarelo indica desempenho normal e o verde indica bom desempenho.<sup>32</sup>

## 4. MATERIAIS E METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAIS

O padrão utilizado no preparo da solução estoque ( $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) de paracetamol foi adquirido da Delaware®. Para a curva de calibração, foram diluídas alíquotas da solução estoque de paracetamol preparadas em volume de 10 mL. A água ultrapurificada utilizada no preparo das soluções foi obtida do sistema de purificação Milli-Q® EQ 7000 da Millipore Sigma®.

Para a reação colorimétrica, foram preparadas quatro soluções reagentes: Ácido Clorídrico 6M, Nitrito de Sódio 10% (m/v), Ácido Sulfâmico 15% (m/v) e Hidróxido de Sódio 10% (m/v). Para o preparo das mesmas, foram utilizados Ácido Clorídrico 37% (v/v), da marca Dinâmica®, Nitrito de Sódio, da marca Merck®, Ácido Sulfâmico, da marca Synth®, e Hidróxido de Sódio, também da marca Synth®. Todas as soluções utilizaram como diluente a mesma água ultrapurificada utilizada no preparo da curva de calibração.

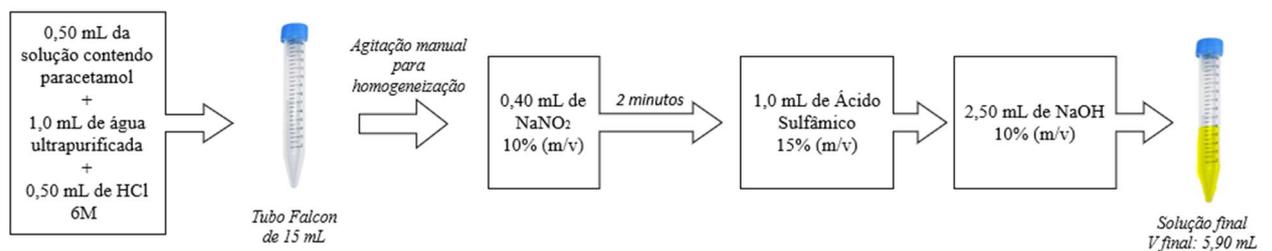
### 4.2 METODOLOGIA

A metodologia adotada neste estudo é fundamentada e adaptada da pesquisa conduzida por Chafetz *et al.* em 1971, conforme descrito no artigo intitulado "*Selective Colorimetric Determination of Acetaminophen*". O referido artigo apresenta uma abordagem quantitativa colorimétrica para determinar a concentração do composto ativo utilizando ácido nitroso como reagente.<sup>33</sup>

#### 4.2.1 MÉTODO EMPREGANDO ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

O método para espectrofotometria UV-Vis consistiu na utilização das soluções descritas no item 4.1 além da água ultrapurificada. A representação esquemática, vista na Figura 4, demonstra o preparo da reação para metodologia UV-Vis com as proporções utilizadas de cada solução.

**Figura 4.** Representação Esquemática do preparo da reação para metodologia UV-Vis.



Fonte: A autora.

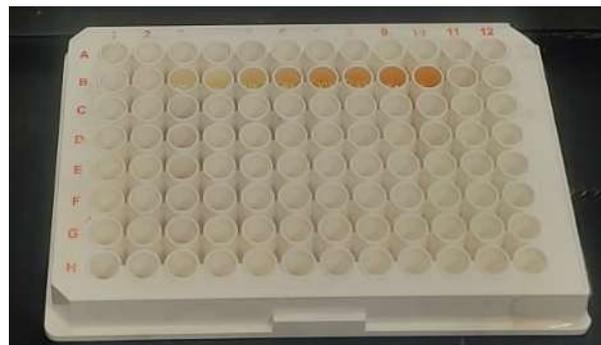
Os sinais analíticos gerados pela reação entre a amostra, contendo concentrações conhecidas de paracetamol, e ácido nitroso foram medidos por espectrofotometria na região do visível em um comprimento de onda de 430 nm, utilizando cubeta de quartzo de caminho óptico 1,0 cm, no espectrofotômetro UV-VIS Varian Cary 50, disponível pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### 4.2.2 MÉTODO EMPREGANDO PHOTOMETRIX PRO

Inicialmente, o aplicativo PhotoMetrix PRO foi instalado em um celular da marca Xiaomi e modelo Redmi Note 9S, com sistema operacional Android 10. No aplicativo, a opção do método PLS foi selecionada dentro da seção de *Multivariate Analysis*. Após essa configuração, a aba de calibração foi acessada para iniciar a leitura das soluções-padrão e a aba de amostragem para a leitura das amostras.

Para garantir a estabilidade das medições, o *smartphone* foi posicionado de maneira fixa acima de um compartimento destinado às amostras, permitindo que somente a câmera tivesse acesso à parte interna da caixa. Além disso, foram mantidos constantes parâmetros como a distância entre a câmera e a amostra (distância focal), iluminação interna e o uso de placa de poços para a colocação das amostras a serem analisadas. Na Figura 5, é possível observar a placa de poços, em que foram aplicados 400  $\mu$ L de cada ponto da curva de calibração em cada um dos poços.

**Figura 5.** Placa de poços, contendo a curva de calibração preparada.



Fonte: A autora.

O compartimento destinado às amostras foi confeccionado utilizando uma caixa de madeira, com dimensões de 20 cm de largura, 30 cm de comprimento e 10 cm de altura. A mesma foi adaptada utilizando fita LED branca como iluminação interna, sendo pintado seu interior com cor preta. A Figura 6 mostra o compartimento confeccionado para análise das amostras.

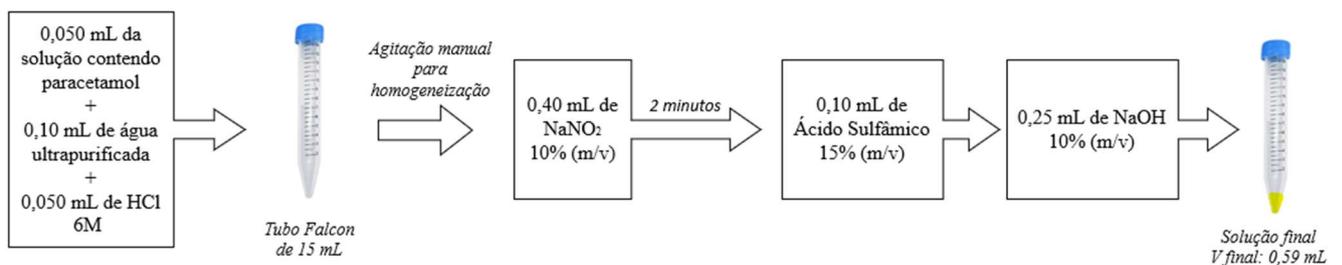
**Figura 6.** Compartimento para as amostras aberto, mostrando abertura, onde se encaixa a câmera do celular, iluminação em LED utilizada na cor branca, placa de poços utilizada como compartimento para as amostras.



Fonte: A autora.

O método empregado para espectrofotometria UV-Vis também foi submetido a avaliação no *software* PhotoMetrix PRO. Posteriormente, realizou-se o estudo de miniaturização visando reduzir em 10 vezes o volume final da metodologia. A Figura 7 traz a representação esquemática do preparo da reação miniaturizada para PhotoMetrix PRO.

**Figura 7.** Representação Esquemática do preparo da reação miniaturizada para metodologia PhotoMetrix PRO.



Fonte: A autora.

#### 4.2.3 VALIDAÇÃO E PREPARO DA CURVAS ANALÍTICAS

A avaliação do método iniciou-se através do preparo de uma curva analítica a partir do padrão de paracetamol. A curva de calibração baseou-se em níveis diferentes de concentração. As soluções empregadas foram preparadas nos dias dos experimentos, com o propósito de evitar qualquer variação na concentração das soluções utilizadas.

A validação do método foi realizada utilizando critérios estabelecidos pela RDC 166/2017<sup>34</sup> que dispõe sobre a validação de métodos analítico. Foram avaliados os critérios de linearidade, utilizando método de mínimos quadrados, LQ, LD, DPR%, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez. A curva analítica foi realizada em quintuplicata de cada ponto, para avaliação da linearidade. Já para os parâmetros de repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez foram utilizados três pontos da curva em triplicata para avaliação dos parâmetros.

Os experimentos foram realizados no laboratório do GMAPS, no Instituto de Química da UFRGS.

#### *4.2.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRA COMERCIAL*

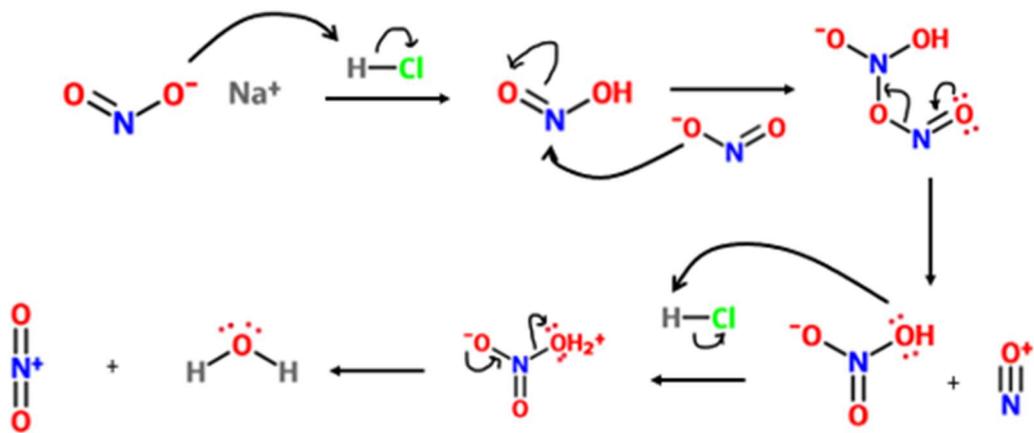
Com o intuito de avaliar a eficácia da metodologia de quantificação de paracetamol, foi realizada uma reação colorimétrica em uma amostra comercial. Essa amostra pertencia à classe farmacêutica de solução em gotas, apresentando uma concentração inicial de 200 mg mL<sup>-1</sup>, conforme indicado na bula do medicamento. Com o propósito de conduzir o teste, a amostra foi devidamente diluída para alcançar uma concentração final de 0,40 mg mL<sup>-1</sup>. Após a conclusão da reação, a amostra foi submetida à leitura em espectrofotômetro UV-Vis e no PhotoMetrix Pro. Essa abordagem foi adotada com o objetivo de comparar os resultados obtidos por ambas as técnicas analíticas.

## 5. ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 5.1 MECANISMO DA REAÇÃO COLORIMÉTRICA

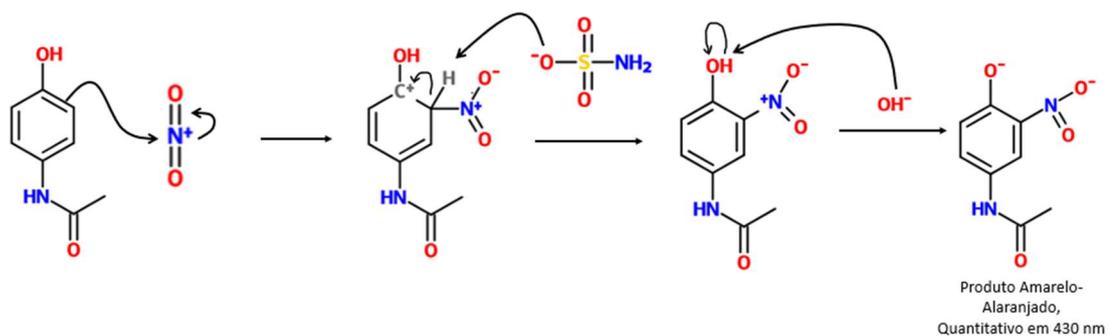
A metodologia empregada no presente estudo consiste na utilização de uma solução de Ácido Clorídrico e solução de Nitrito de Sódio para promover a geração de ácido nitroso *in situ*, conforme Figura 8. O ácido nitroso gera o íon nitrito  $\text{NO}_2^+$ , que reage por substituição eletrofílica do tipo nitração do anel benzênico da molécula de paracetamol. Após 2 minutos, adiciona-se Ácido Sulfâmico que também auxilia na reação de nitração e consome o excesso de ácido nitroso presente na reação. Em seguida, procede-se à adição de Hidróxido de Sódio ao meio reacional, resultando em uma reação ácido-base em que o hidrogênio do grupo fenila da molécula é atacado, deixando o oxigênio do grupamento com carga negativa. Ambas reações podem ser visualizadas na Figura 9. A carga negativa gerada no oxigênio pode ser estabilizada por ressonância pelo anel aromático, visto na Figura 10. O produto final formado tem absorvância na faixa de 430 nm, conferindo a este uma coloração amarelo-alaranjada.<sup>35, 36</sup>

Figura 8. Mecanismo de Formação do íon Nitrito.



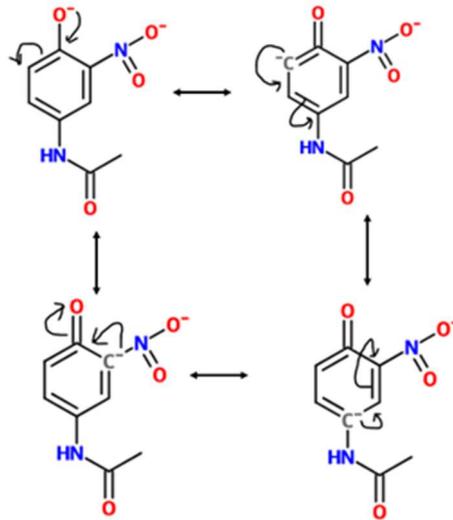
Fonte: A autora.

Figura 9. Mecanismo de Nitração e Reação Ácido-Base.



Fonte: A autora.

**Figura 10.** Mecanismo de ressonância da carga eletrônica no anel benzênico.



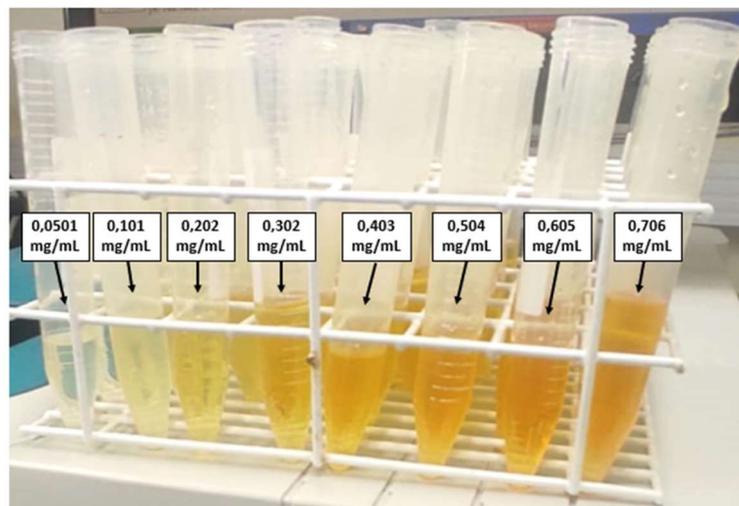
Fonte: A autora.

## 5.2 VALIDAÇÃO EMPREGANDO ESPECTOFOTOMETRIA UV-VIS

Os ensaios preliminares envolveram o emprego de soluções padrão preparadas em água ultrapura em diversas concentrações a fim de encontrar os limites da técnica de determinação de paracetamol. Foi possível verificar respostas analíticas na faixa de concentração de paracetamol compreendida entre 0,0504 e 0,706 mg mL<sup>-1</sup>.

A curva de calibração analítica utilizada continha sete pontos crescentes: 0,0504; 0,101; 0,202; 0,302; 0,403; 0,504; 0,605 e 0,706 mg mL<sup>-1</sup>. A Figura 11 mostra a variação da coloração das soluções conforme aumento da concentração de paracetamol nas mesmas.

**Figura 11.** Tubos *falcon*, contendo solução colorimétrica final da curva de calibração preparada.



Fonte: A autora.

Os pontos da curva para determinação de paracetamol foram analisados em quintuplicata e, em todos os pontos, observou-se a cor amarela de maneira instantânea ao adicionar o reagente hidróxido de sódio ao meio reacional. Além disso, foi observado linearidade entre o aumento de sinal analítico obtido na técnica espectrofotométrica, pelo aumento da intensidade da cor, e o aumento da concentração de paracetamol.

Em relação a homoscedasticidade da curva, o teste de Cochran, método utilizado para verificar se três ou mais conjuntos combinados de frequências ou proporções diferem significativamente entre si, indicou que a curva possuía heterocedasticidade. Então, conforme indicado no Guia de Validação 10 da ANVISA<sup>37</sup>, para análise de linearidade, realizou-se o método de mínimos quadrados ponderados. A regressão realizada se demonstrou bastante significativa, obtendo valores de p-valor e F de significância satisfatórios, ou seja, abaixo de 5%. A Tabela 1 apresenta os resultados para o teste F da análise de variância obtido da regressão por mínimos quadrados ponderados.

**Tabela 1.** Parâmetros da regressão por mínimos quadrados ponderados.

	gl	SQ	MQ	F <i>calculado</i>	F <i>tabelado</i>	F de <i>significação</i>	p-valor
<b>Regressão</b>	2	0,9079	0,4539	37354	3,245	$7,087 \times 10^{-62}$	0,000
<b>Resíduo</b>	38	$4,618 \times 10^{-4}$	$1,125 \times 10^{-5}$				
<b>Total</b>	40	0,9083					

*Legenda:*

gl- graus de liberdade

SQ – Soma dos Quadrados

MQ – Quadrados Médios

Fonte: A autora.

Os resultados dos parâmetros de linearidade, LQ e LD do método empregado na espectrofotometria UV-Vis, estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Linearidade, LQ e LD obtidos da curva de calibração avaliada.

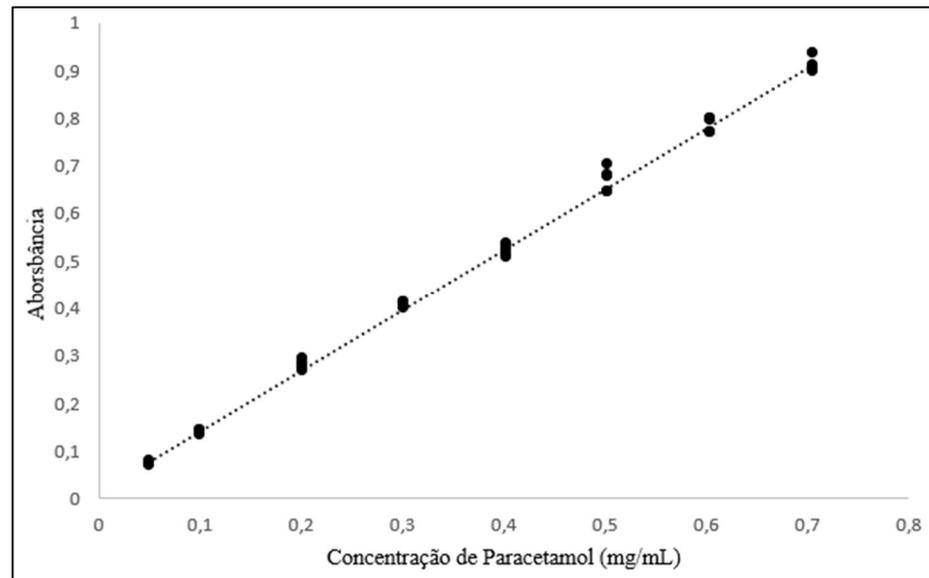
$\lambda$ (nm)	Faixa Linear (mg mL <sup>-1</sup> )	Equação da Reta	R <sup>2</sup>	R	LD - 95% (mg mL <sup>-1</sup> )	LQ - 95% (mg mL <sup>-1</sup> )
<b>430</b>	0,050 – 0,706	$y = 1,32x + 0,00568$	1,00	1,00	0,0425	0,0722

Fonte: A autora.

Como pode ser observado, a curva apresentou linearidade nas concentrações testadas, obtendo valores de R = 1,00, estando de acordo com a RDC 166/2017, que estabelece que o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990. Além disso, em um nível de confiança de 95%, foi possível determinar o LD e LQ do método como sendo 0,0085 e 0,0258 mg mL<sup>-1</sup>,

respectivamente. A Figura 12 apresenta a curva de calibração (concentração de paracetamol *versus* os valores obtidos de absorbância) para os pontos realizados em quintuplicata.

**Figura 12.** Curva de calibração do Paracetamol em água ultrapurificada, obtida por Espectrofotometria UV-Vis. Faixa linear de 0,050 a 0,70 mg mL<sup>-1</sup>.



Fonte: A autora.

Além da análise de linearidade, foram realizadas avaliações dos parâmetros de exatidão, precisão e robustez. Através da equação da reta obtida, tornou-se possível determinar as concentrações em amostras, ao adicionar o valor de absorbância das mesmas obtido em 430 nm na análise espectrofotométrica.

No que diz respeito à exatidão e precisão, procedeu-se à preparação de triplicatas para três níveis diferentes da curva de calibração, contendo concentração baixa (0,10 mg mL<sup>-1</sup>), média (0,30 mg mL<sup>-1</sup>) e altas (0,50 mg mL<sup>-1</sup>), totalizando nove determinações, conforme estabelecido pela RDC 166/2017.

Para a avaliação da robustez, foram preparados, também em triplicata, os mesmos pontos da curva utilizados na avaliação da exatidão e precisão, porém variando o volume de hidróxido de sódio utilizado na etapa final do preparo. Esse procedimento teve como objetivo verificar se a variação de pH entre as soluções impacta na recuperação da metodologia.

Em todos os três parâmetros (exatidão, precisão e robustez), foram avaliados o DPR entre as replicatas e a recuperação. Os resultados das análises de exatidão/precisão e robustez podem ser observados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

**Tabela 3.** Resultados do parâmetro de precisão e exatidão para método em Espectrofotometria UV-Vis.

Conc. Teórica (mg/mL)	Repetibilidade			Precisão Intermediária		
	Conc. Predita (mg mL <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	DPR (%)	Conc. Predita (mg mL <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	DPR (%)
0,101	0,102	101,2	2,39	0,104	103,6	4,12
0,302	0,290	95,8	1,40	0,305	101,0	3,44
0,504	0,487	96,5	0,57	0,500	99,1	0,64

Fonte: A autora.

Conforme evidenciado na Tabela 3, os três níveis de concentração avaliados apresentaram resultados satisfatórios. Em todos os casos analisados, o DPR se apresentou menor que 5,0%, indicando uma precisão adequada e consistente. Além disso, os valores de recuperação foram superiores a 95,0%, o que demonstra a eficácia do método na determinação das concentrações esperadas. Esses resultados destacam que o procedimento utilizado é exato e preciso.

**Tabela 4.** Resultados do parâmetro de robustez para método em Espectrofotometria UV-Vis.

Conc. Teórica (mg/mL)	Vol. NaOH: 2,00 mL			Vol. NaOH: 2,25 mL			Vol. NaOH: 2,50 mL		
	Conc. Predita (mg mL <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	DPR (%)	Conc. Predita (mg mL <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	DPR (%)	Conc. Predita (mg mL <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	DPR (%)
0,101	0,097	95,9	1,23	0,099	98,2	3,06	0,100	99,7	3,69
0,302	0,300	99,3	2,50	0,295	97,5	0,98	0,299	99,0	0,96
0,504	0,496	98,4	1,48	0,496	98,4	0,29	0,494	98,0	1,41

Fonte: A autora.

Ao analisar os resultados obtidos para o parâmetro de robustez, observados na Tabela 4, observa-se que a variação do pH não exerce influência significativa na determinação da concentração. Isso é evidenciado pelo alto percentual de recuperação, que foi superior a 95,0%, bem como pelos valores do DPR entre as replicatas, que foram inferiores a 5,0%, demonstrando resultados satisfatórios e consistentes. Portanto, podemos concluir que o método é robusto mesmo diante de variações no pH.

### 5.3 VALIDAÇÃO EMPREGANDO PHOTOMETRIX PRO

De modo a comparar os resultados, as mesmas soluções previamente preparadas e utilizadas para a etapa validação empregando a técnica UV-Vis foram avaliadas no *software* PhotoMetrix PRO. Essa abordagem permitiu uma análise comparativa dos dados obtidos por ambas as metodologias, proporcionando uma visão abrangente sobre o emprego da

metodologia através do *software* em relação ao método tradicional por espectrofotometria UV-Vis.

Durante a avaliação do método no PhotoMetrix PRO, os parâmetros da curva são calculados automaticamente pelo aplicativo, logo, o LQ e o LD não foram avaliados conforme a validação feita pelo espectrofotômetro UV-Vis. Além disso, ao contrário da técnica espectrofotométrica, na qual o resultado da leitura da amostra é expresso como um sinal analítico de absorção, o aplicativo mobile PhotoMetrix PRO fornece diretamente valores de concentração como resultado. Durante a construção da curva de calibração nesse aplicativo, a intensidade da coloração da amostra é transformada em histogramas nas cores vermelho, verde e azul. O *software* realiza ajustes utilizando fatores de correção, o que permite gerar diferentes resultados a partir de uma única curva realizada. Com base nesses histogramas e ajustes, o aplicativo fornece a concentração predita da amostra.

No contexto do presente trabalho, todas as curvas empregadas foram ajustadas com 3 fatores de correção. A Tabela 5 traz a linearidade definida pelo aplicativo PhotoMetrix PRO.

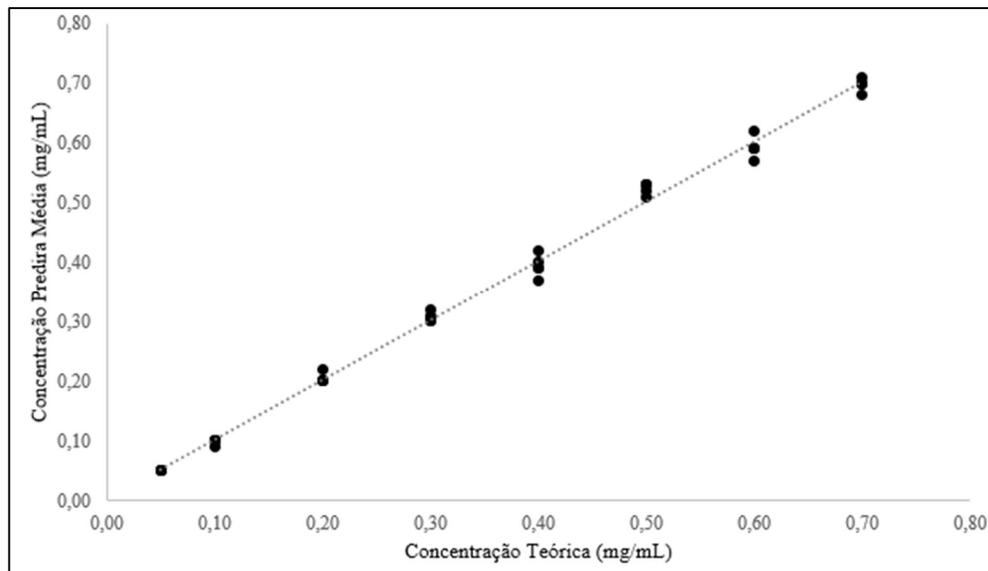
**Tabela 5.** Linearidade da curva de calibração obtida do software PhotoMetrix PRO.

<b>Ponto da Curva Analítica</b>	<b>Concentração Referência (mg/mL)</b>	<b>Concentração Predita Média (mg/mL)</b>	<b>DPR (%)</b>
<b>1</b>	0,050	0,050	0,00
<b>2</b>	0,10	0,098	4,56
<b>3</b>	0,20	0,20	4,38
<b>4</b>	0,30	0,31	2,92
<b>5</b>	0,40	0,40	4,59
<b>6</b>	0,50	0,52	1,71
<b>7</b>	0,60	0,59	3,02
<b>8</b>	0,71	0,70	1,57

Fonte: A autora.

Em relação a linearidade, a curva de calibração obteve coeficiente de determinação  $R^2$  igual a 0,994. Já o coeficiente de correlação R obtido foi de 0,997, estando este coerente com o estabelecido na RDC 166/2017. Além disso, o DPR entre as quintuplicatas dos pontos está abaixo de 5,0%, considerado satisfatório. A Figura 13 traz a curva obtida do *software* PhotoMetrix PRO, relacionado a concentração referência e a Concentração Predita Média.

**Figura 13.** Curva de calibração do Paracetamol em água ultrapurificada, obtida pelo PhotoMetrix PRO. Faixa linear de 0,050 a 0,70 mg mL<sup>-1</sup>.



Fonte: A autora.

As Tabelas 6 e 7 trazem os resultados da validação, respectivamente relacionadas a repetibilidade/precisão intermediária e robustez realizadas para PhotoMetrix PRO.

**Tabela 6.** Resultados do parâmetro de precisão e exatidão para método em PhotoMetrix PRO.

Conc. Teórica (mg/mL)	Repetibilidade			Precisão Intermediária		
	Conc. Predita (mg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)	Conc. Predita (mg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)
0,10	0,09	89,1	0,00	0,16	163,0	3,53
0,30	0,34	114,4	1,68	0,32	105,7	1,82
0,50	0,48	96,0	2,08	0,51	102,0	1,96

Fonte: A autora.

**Tabela 7.** Resultados do parâmetro de robustez para método em PhotoMetrix PRO.

Conc. Teórica (mg/mL)	Vol. NaOH: 2,00 mL			Vol. NaOH: 2,25 mL			Vol. NaOH: 2,50 mL		
	Conc. Predita (mg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)	Conc. Predita (mg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)	Conc. Predita (mg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)
0,10	0,14	136,7	4,22	0,12	122,1	4,68	0,12	115,5	4,94
0,30	0,31	102,6	3,23	0,31	103,8	4,87	0,29	96,0	3,45
0,50	0,49	97,88	3,10	0,52	102,5	1,03	0,49	100,5	2,28

Fonte: A autora.

Como pode ser observado nas Tabelas 6 e 7, o DPR entre as replicatas se apresentou satisfatório, pois obtiveram valores menores que 5,0%. Entretanto, os resultados de

recuperação para todos os parâmetros não apresentaram uma boa exatidão, visto pelos valores que ficaram dispersos na faixa de 89% a 163%. Este fato pode estar relacionado aos fatores que podem influenciar na captura da foto no aplicativo, como, por exemplo, sombreamento da imagem e limpeza dos poços da placa de poços que contém a amostra. Estratégias para entender detalhadamente o que pode explicar esse comportamento e formas de mitigar ou prevenir fatores que influenciem a recuperação deverão ser avaliados em estudo futuro.

#### 5.4 APLICAÇÃO DO METODO EM AMOSTRA COMERCIAL

Os resultados da amostra preparada estão descritos na Tabela 8.

**Tabela 8.** Resultados obtidos da amostra comercial preparada, avaliada em Espectroscopia UV-Vis e PhotoMetrix PRO.

Conc. Teórica (mg/mL)	Espectrofotômetro UV-VIS			PhotoMetrix PRO	
	Absorbância	Conc. Preditada (mg/mL)	Recuperação (%)	Conc. Preditada (mg/mL)	Recuperação (%)
0,40	0,496	0,37	92,9%	0,42	105,0

Fonte: A autora

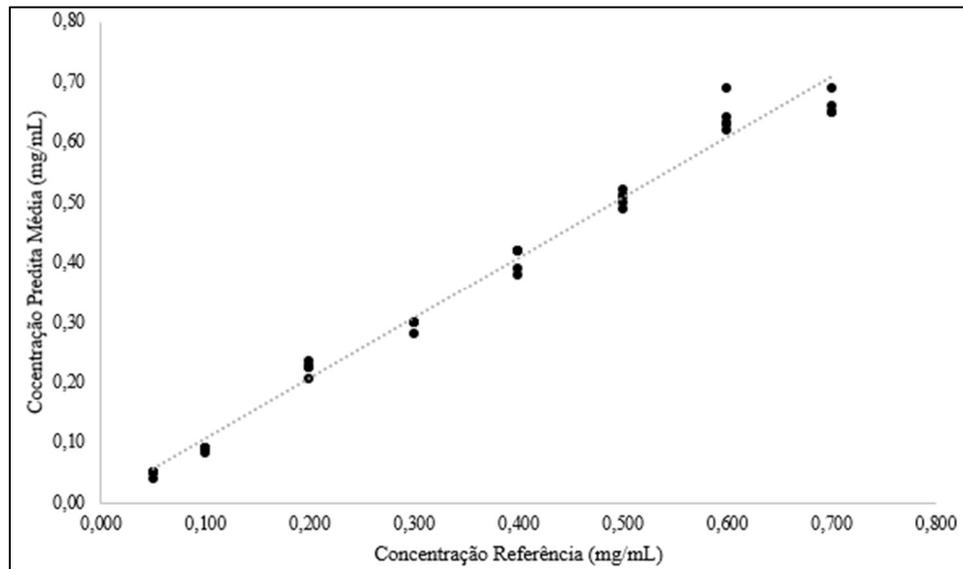
Conforme evidenciado na Tabela 8, é possível observar uma variação na recuperação entre as duas metodologias analisadas. No entanto, mesmo diante dessa diferença, é importante ressaltar que as concentrações encontradas para a amostra apresentaram proximidade a concentração teórica esperada. Essa proximidade sugere que ambas as metodologias fornecem resultados aceitáveis e consistentes, apesar das pequenas divergências observadas.

#### 5.5 MÉTODO MINIATURIZADO PARA PHOTOMETRIX PRO

Após avaliação do método para espectrofotômetro UV-Vis e PhotoMetrix PRO, foi realizada uma nova miniaturização, considerando uma redução em 10 vezes, somente para o PhotoMetrix PRO. A curva obtida apresentou  $R^2$  de 0,992 e coeficiente R o valor de 0,996, considerado satisfatório, conforme RDC 166/2017. A Figura 14 traz a curva de calibração para o método miniaturizada para PhotoMetrix PRO. Já a Tabela 9 demonstra, de forma satisfatória, que os DPRs obtidos das quintuplicatas dos pontos das curvas obtiveram valores abaixo de 5,0%, excetuando o ponto  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ . Entretanto, entre as quintuplicatas do ponto em questão, uma apresentou concentração predita de  $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ , sendo as outras replicatas com concentração predita de  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ . Por ser uma concentração baixa, qualquer mínima variação faz com que o DPR apresente valor alto. Nesse sentido, e

considerando a variabilidade intrínseca do método, considera-se que este ponto está coerente com os demais.

**Figura 14.** Curva de calibração miniaturizada do Paracetamol em água ultrapurificada, obtida pelo PhotoMetrix PRO. Faixa linear de 0,050 a 0,70 mg mL<sup>-1</sup>.



Fonte: A autora.

**Tabela 9.** Linearidade da curva de calibração miniaturizada obtida do software PhotoMetrix PRO.

Ponto da Curva de Calibração	Concentração Referência (mg mL <sup>-1</sup> )	Concentração Predita Média (mg mL <sup>-1</sup> )	DPR (%)
1	0,050	0,05	9,32
2	0,10	0,09	3,02
3	0,20	0,22	4,67
4	0,30	0,30	3,02
5	0,40	0,41	4,80
6	0,50	0,51	2,25
7	0,60	0,64	4,32
8	0,71	0,67	3,50

Fonte: A autora.

Além da curva, foi realizada o preparo da amostra com o método miniaturizado em 10 vezes. A concentração predita para a mesma apresentou valor de 0,38 mg mL<sup>-1</sup>, apresentando uma boa recuperação de 95,0%.

## 5.6 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

Entendendo que a busca por metodologias miniaturizadas e ambientalmente amigáveis pelas indústrias farmacêuticas cresce continuamente, a metodologia desenvolvida e apresentada neste projeto será descrita em um documento do tipo Procedimento Operacional Padrão (POP), documento este amplamente utilizado em indústrias e afins, com o propósito de disponibilizá-lo para o público em geral. O mesmo está apresentado no Apêndice A no presente trabalho.

A elaboração do POP sobre a metodologia desenvolvida tem como objetivo facilitar a implementação e disseminação da metodologia desenvolvida em outros laboratórios farmacêuticos. Ao fornecer diretrizes e procedimentos operacionais claros e acessíveis, busque-se garantir a padronização das análises de controle de qualidade relacionadas à determinação de princípios ativos como o paracetamol. Adicionalmente, a disponibilização do POP método adaptado permitirá que outros laboratórios farmacêuticos tenham acesso a metodologia proposta, estudem sobre a mesma, para que possam sanar suas limitações, além de otimizá-la e implementá-la na rotina.

Além disso, disponibilizar o POP ao público em geral servirá, também, para dar visibilidade e disseminar o *software* PhotoMetrix PRO, enfatizando assim sua relevância e aplicabilidade em diversos contextos analíticos.

## 5.7 AVALIAÇÃO DE IMPACTO AMBIENTAL VIA SOFTWARE LIVRE AGREE

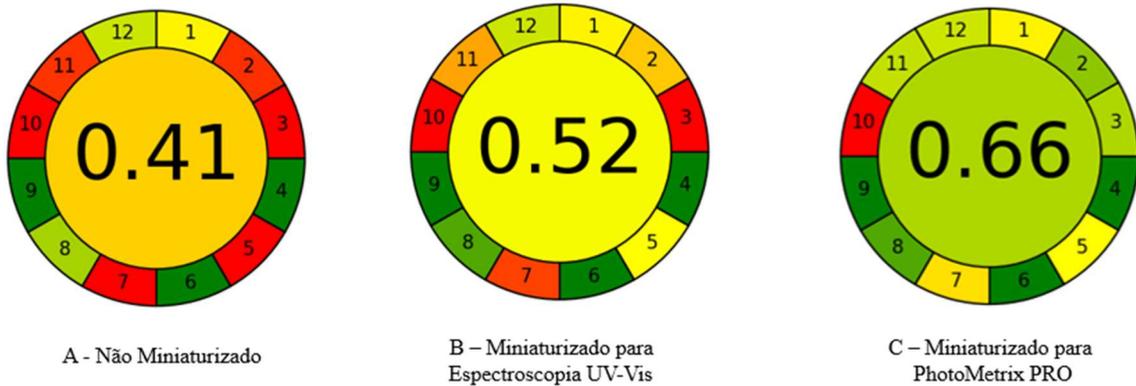
A avaliação ambiental dos métodos, tanto o não-miniaturizado quanto o miniaturizado com o uso do aplicativo mobile PhotoMetrix PRO, foi realizada em conformidade com os 12 princípios significativos da Química Analítica Verde, por meio do *software* livre AGREE.

Os resultados foram representados em um gráfico semelhante a um relógio, no qual a pontuação final é indicada no centro e 12 segmentos ao redor representam os 12 princípios analisado. O desempenho de cada critério é representado em uma escala de cores vermelho-amarelo-verde, indicando a eficiência ambiental de cada princípio avaliado (sendo o verde indicativo de melhor desempenho).

Além disso, o peso de cada princípio é representado pela largura de cada segmento no gráfico, sendo importante ressaltar que, neste trabalho, foram considerados pesos iguais para os 12 princípios. Os valores detalhados para cada critério estão apresentados no Apêndice B deste trabalho. A Figura 15 traz os gráficos gerados pelo *software* AGREE, para os métodos

não miniaturizado, miniaturizado para espectrofotometria UV-Vis e miniaturizado para PhotoMetrix PRO.

**Figura 15.** Gráficos de avaliação ambiental via AGREE dos métodos: A - não-miniaturizado; B - miniaturizado e C - miniaturizado PhotoMetrix PRO



Fonte: A autora.

Os gráficos obtidos na avaliação demonstram que os métodos miniaturizado e miniaturizado com o uso do PhotoMetrix PRO possuem pontuações mais próximas de 1, o que indica que são metodologias mais alinhadas com os princípios da química analítica verde em comparação com o método não miniaturizado. Ambos os métodos, especialmente o método miniaturizado com o PhotoMetrix PRO, são considerados mais adequados aos 12 princípios da Química Analítica Verde de acordo com o *software* AGREE. Um destaque importante entre os 12 princípios é a redução significativa de 88% no volume de resíduos e reagentes utilizados nos métodos adaptados. Essa redução ressalta a busca por práticas mais “ambientalmente amigáveis” no desenvolvimento de metodologias analíticas.

## 5.8 AVALIAÇÃO DE CUSTOS

Neste estudo, a avaliação de custos concentrou-se nos diferentes reagentes e equipamentos utilizados em três metodologias: o método não-miniaturizado de determinação de paracetamol, a metodologia miniaturizada e a metodologia miniaturizada com o uso da ferramenta PhotoMetrix PRO. A análise dos custos baseou-se na rotina de produção e controle de qualidade de uma indústria farmacêutica, na qual o paracetamol, na forma farmacêutica de solução gotas, é o "produto principal" ou "carro-chefe" de vendas. Nesse contexto, a produção média estimada seria de 10 lotes por semana e cada lote deveria ser analisado em triplicata. Para os cálculos de custos, foram considerados os valores obtidos no

catálogo da Sigma Aldrich® em julho de 2023, a fim de estabelecer o impacto financeiro de cada uma das metodologias analisadas.

**Tabela 10.** Comparativo de custos entre as metodologias abordadas

	<b>Método não miniaturizado</b>	<b>Método miniaturizado</b>	<b>Método miniaturizado PhotoMetrix PRO</b>
<b>Custo por amostra</b>	R\$ 1,42	R\$ 0,27	R\$ 0,03
<b>Custo por lote</b>	R\$ 4,26	R\$ 0,82	R\$ 0,08
<b>Custo semanal</b>	R\$ 42,60	R\$ 8,19	R\$ 0,82
<b>Custo mensal*</b>	R\$ 170,40	R\$ 32,76	R\$ 3,28
<b>Custo anual**</b>	R\$ 2.215,20	R\$ 425,88	R\$ 42,58

\*considerando quatro semanas compondo um mês; \*\*considerando cinquenta e duas semanas compondo um ano.

Fonte: A autora, baseado no catálogo da Sigma Aldrich®, em julho de 2023.

É possível observar, na Tabela 10, uma diferença significativa nos custos ao comparar o método antes e depois da miniaturização. A implementação da metodologia miniaturizada, utilizando a técnica espectrofotométrica, resultou em uma redução de cerca de 80% nos custos anuais totais. Além disso, ao empregar o PhotoMetrix PRO, houve uma impressionante redução de aproximadamente 98% nos custos totais anuais. Esses resultados reforçam o potencial da miniaturização e do uso do PhotoMetrix PRO como uma abordagem econômica e eficiente no controle de qualidade de produtos farmacêuticos, proporcionando uma alternativa vantajosa do ponto de vista financeiro para a indústria farmacêutica.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adaptação da metodologia de determinação de paracetamol, mediante o uso de espectrofotometria UV-Vis se mostrou robusta e com boa repetibilidade, tendo em vista os resultados de validação obtidos no presente trabalho, de acordo com os parâmetros avaliados pelo RDC 166, da ANVISA. Entretanto, empregando o PhotoMetrix PRO, o mesmo não apresentou boa exatidão.

Os resultados da validação da metodologia miniaturizada, utilizando o PhotoMetrix PRO, demonstraram boa robustez e repetibilidade, validando sua aplicação no controle de qualidade de medicamentos contendo paracetamol. Embora tenham sido identificadas algumas limitações na exatidão do PhotoMetrix PRO, a possibilidade de ajustes e aprimoramentos abrem caminho para futuras otimizações, como adequações a caixa utilizada para iluminação das amostras e a utilização de uma câmera externa do tipo sonda, e aplicações mais abrangentes dessa ferramenta inovadora.

Ambos os métodos miniaturizados revelaram-se viáveis, mais acessíveis e ambientalmente amigáveis. No entanto, a abordagem empregada para o PhotoMetrix foi considerada ainda mais "verde" pelo *software* livre AGREE, notada pela significativa redução no volume de amostra utilizado, que passou de 50 mL no método proposto por Chafetz para apenas 0,60 mL. Além disso, essa metodologia apresentou uma redução de custos de até 98%, proporcionando uma economia substancial. Esses resultados enfatizam a efetividade do PhotoMetrix PRO em termos de sustentabilidade, viabilizando uma abordagem ainda mais favorável tanto do ponto de vista ambiental quanto financeiro.

Por fim, disponibilizar um POP que contenha a metodologia adaptada para as indústrias farmacêuticas terá um significativo impacto. Isso não apenas aumentará a visibilidade do *software* PhotoMetrix PRO, mas também abrirá portas para amplas oportunidades de implementação na esfera industrial. Além disso, ao fornecer o método adaptado, estudado neste projeto, permitirá uma análise aprofundada das limitações identificadas, visando otimizá-las para um uso mais eficaz e integrado na rotina do controle de qualidade industrial.

## REFERÊNCIAS

1. BOSCH, M. E.; SÁNCHEZ, A.J. R.; ROJAS, F. S.; OJEDA, C. B. Determination of Paracetamol: Historical Evolution. **Journal Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 3, p. 291-321, set. 2006.
2. **PARACETAMOL (ACETAMINOFENO)**. Disponível em: [https://guiafarmaceutico.hsl.org.br/paracetamol-\(acetaminofeno\)](https://guiafarmaceutico.hsl.org.br/paracetamol-(acetaminofeno)). Acesso em: 13 jul. 2023.
3. Józwiak-Bebenista, M.; Nowak, J. Z. Paracetamol: Mechanism of Action, Applications and Safety Concern. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 71, n.1, p. 11-23, jan. 2014.
4. KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. 1. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1976. 783 p.
5. GOLDMAN, L.; GILMAN, A. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. 2001, 2148 p.
6. BERTOLINI, A.; FERRARI, A.; OTTANI, A.; GUERZONI, S.; TACCHI, R.; LEONE, S. Paracetamol: New Vistas of an Old Drug. **CNS Drug Reviews**, v. 12, n. 3-4, p. 250–275, 2006.
7. GRAHAM, G. G., DAVIES, M. J., DAY, R. O., MOHAMUDALLY, A., SCOTT, K. F. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. **Inflammopharmacology**, v. 21, n. 3, p. 201–232, mai. 2013.
8. PINTO, N. Q. O.; SILVA, G. A.; SANTOS, E. C. G.; BRITO, N. J. N. Atuação do profissional farmacêutico frente ao uso de paracetamol como medicamento de venda livre. **FACIDER-Revista Científica**, n. 7, 2015.
9. TELES, J. **Os 10 medicamentos mais vendidos nas farmácias brasileiras**. Disponível em: <https://site.abcfarma.org.br/os-10-medicamentos-mais-vendidos-nas-farmacias-brasileiras/>. Acesso em: 13 jul. 2023.
10. OLIVEIRA, E. A.; LABRA, M. E.; BERMUDEZ, J. A produção pública de medicamentos no Brasil: uma visão geral. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.22, n.11, p.2379-2389, 2006.
11. ISSE, K. F. **A indústria farmacêutica nacional e a importância dos medicamentos genéricos no seu desenvolvimento**. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Economia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
12. BRITO, A. C. F.; PONTES, D. L. A indústria Farmacêutica. Indústria Química e Sociedade, aula 06, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.
13. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 658, de dezembro de 2022. Disponível em: < [www.anvisa.gov.br/legis](http://www.anvisa.gov.br/legis)> Acessado em: 15 jul. 2023.

14. ROCHA, T. G.; GALENDE, S. B. A Importância do Controle de Qualidade na Indústria Farmacêutica. **Unigá Review**, v. 20, n. 2, p. 97-103, 2014.
15. JUNIOR, S. V. Análise Química Instrumental e sua Aplicação em Controle de Qualidade de Biocombustíveis. **Embrapa: Circular Técnica**, v. 1, n. 3, p. 1-7, 2010.
16. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2010.
17. COLLINS, C. H.; MANFREDI J. F.; VALENTE A. L. P.; MURTA, A. L. M.; MCNAIR, H. M. O que é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). **Química Nova**, v. 6, n. 2. p. 46-49, 1983.
18. SILVA, B. S. **Cromatografia verde**. 2021. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 2021.
19. PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. **Introduction to spectroscopy**, 5 ed., Cengage Learning, 2015.
20. LOBINSKI, R.; MARCZENKO, Z.; Recent Advances in Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. Recent Advances in Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. **Crit. Rev. Anal. Chem.** v. 23, 55, 1992.
21. MAGALHAES, L.M., SEGUNDO, M.A., REIS, S., LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Anal Chim Acta**, v. 613, n. 1. p. 1-19, 2008.
22. SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S.R. **Principles of Instrumental Analysis**. 7<sup>o</sup> ed., Cengage Learning, 2018.
23. HELFER, G. A.; MAGNUS, V. S.; BÖCK, F. C.; TEICHMANN, A.; FERRÃO, M. F.; COSTA, A. B. PhotoMetrix: an application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 2, n. 28, p. 328-335, jun. 2016.
24. BÖCK, F. C.; HELFER, G. A.; COSTA, A. B.; DESSUY, M. B.; FERRÃO, M. F. PhotoMetrix and colorimetric image analysis using smartphones. **Journal Of Chemometrics**, v. 34, n. 12, p. 1-19, 19 jun. 2020. Wiley.
25. CRÓSTA, A. P. **Processamento Digital De Imagens de Sensoriamento Remoto**. Campinas: Ed. Unicamp, 1992.
26. HAMANN, R. **Como funciona o sensor da câmera do seu smartphone**. Disponível em: <https://www.tecmundo.com.br/celular/104419-como-funciona-sensor-camera-digital-smartphone-celular.htm>. Acesso em: 09 jul. 2023.

27. RIBEIRO, F. A. de L. FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.
28. GÖRÖG, S. The changing face of pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v.26, n.1, p. 12-17, 2007.
29. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 166, 24 de julho de 2017. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/legis](http://www.anvisa.gov.br/legis)> Acessado em: 15 jul. 2023
30. KOEL, Mihkel. Do we need Green Analytical Chemistry? **Green Chemistry**. [S.I.], p. 923-931. nov. 2016.
31. M. Kaljurand and M. Koel, Recent Advancements on Greening Analytical Separation, **Crit. Rev. Anal. Chem.**, 2011, 41, 2–20
32. PENA-PEREIRA, F.; Wojnowski, W.; Tobiszewski, M. CONCORDO — Abordagem e Software de Métrica Analítica GREENness. **Anal. Chem.** 2020, 92, 10076–10082
33. CHAFETZ, L.; DALY, R. E.; SCHRIFTMAN, H.; LOMNER, J. J. Selective Colorimetric Determination of Acetaminophen. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 60, n. 3, p. 463-466, mar. 1971.
34. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 166, de dezembro de 2017. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/legis](http://www.anvisa.gov.br/legis)> Acessado em: 15 jul. 2023.
35. MUKHOPADHYAY, S., BATRA, S. Applications of Sodium Nitrite in Organic Synthesis. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 38, p. 6424–6451, ago. 2019
36. SYKES, P. **Guia de Mecanismos da Química Orgânica**, Livro Técnico, 1969,
37. ANVISA – Guia nº 10/2017. Disponível em: <<https://www.farmaceuticas.com.br/wp-content/uploads/2017/09/Guia-10-v1-Tratamento-estatistico-validacao-analitica.pdf>> Acessado em: 23 jul. 2023.

## APÊNDICE A

# PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA O DOSEAMENTO DE PARACETAMOL EM PRODUTOS DA CLASSE FARMACÊUTICA SOLUÇÃO GOTAS

### 1. OBJETIVO

Este documento estabelece o procedimento operacional padrão para a metodologia de doseamento de Paracetamol em produtos da classe farmacêutica solução gotas. Este procedimento está baseado no estudo descrito por Lester Chafetz em 1971. Este método pode ser aplicado em indústria farmacêutica e/ou ensino educacional.

### 2. DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

- CHAFETZ, L.; DALY, R. E.; SCHRIFTMAN, H.; LOMNER, J. J. Selective Colorimetric Determination of Acetaminophen. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 3, p. 463-466, mar. 1971.
- HELFER, G. A.; MAGNUS, V. S.; BÖCK, F. C.; TEICHMANN, A.; FERRÃO, M. F.; COSTA, A. B. PhotoMetrix: an application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, Campinas, v. 2, n. 28, p. 328-335, jun. 2016.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A metodologia adotada neste estudo é fundamentada e adaptada da pesquisa conduzida por Chafetz et al. em 1971, conforme descrito no artigo intitulado "Selective Colorimetric Determination of Acetaminophen". A reação característica dessa metodologia resulta, em meio alcalino, na formação de uma substância com coloração amarelo-alaranjada, cujo máximo de absorvância situa-se em um comprimento de onda de 430 nm.

A metodologia empregada consiste na utilização de uma solução de Ácido Clorídrico e solução de Nitrito de Sódio para promover a geração de ácido nitroso *in situ*. O ácido nitroso gera o íon nitrito  $\text{NO}_2^+$ , que reage por substituição eletrofílica do tipo nitração do anel benzênico da molécula de paracetamol. Após 2 minutos, adiciona-se Ácido Sulfâmico que também auxilia na reação de nitração e consumir o excesso de ácido nitroso presente na reação. Em seguida, procede-se à adição de Hidróxido de Sódio ao meio reacional, atacando o hidrogênio do radical hidroxila do paracetamol, formando a molécula que dá a característica da solução amarelo-

alaranjada, de absorvência 430 nm. A Figura 1 traz o mecanismo proposto.

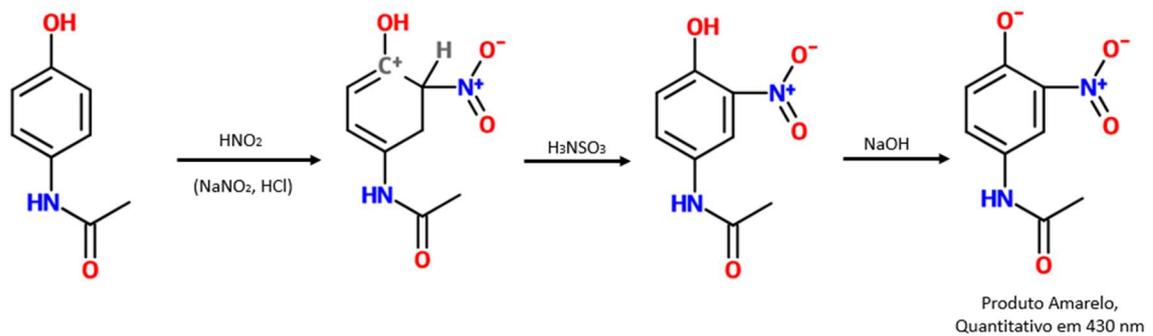


Figura 1. Mecanismo proposto.

#### 4. METODOLOGIA/DETALHAMENTO:

##### 4.1. PREPARO DOS REAGENTES EMPREGADOS:

- a) **Ácido Clorídrico 6N:** Diluir 51 mL de Ácido Clorídrico 37% em 100 mL de água ultrapurificada.
- b) **Nitrito de Sódio 10% (m/v):** Pesar 10g de Nitrito de Sódio. Solubilizar em 80 mL água ultrapurificada. Aguardar arrefecimento até temperatura ambiente. Após transferir para balão de 100 mL e avolumar.
- c) **Ácido Sulfâmico 15% (m/v):** Pesar 15g de Nitrito de Sódio. Solubilizar em 80 mL água ultrapurificada. Aguardar arrefecimento até temperatura ambiente. Após transferir para balão de 100 mL e avolumar.
- d) **Hidróxido de Sódio 10% (m/v):** Pesar 10g de Nitrito de Sódio. Solubilizar em 80 mL água ultrapurificada. Aguardar a solução esfriar até temperatura ambiente. Após transferir para balão de 100 mL e avolumar.

**IMPORTANTE: Sempre que é realizada uma nova solução de Nitrito de Sódio a curva analítica deverá ser refeita obrigatoriamente.**

- e) **Solução Padrão Estoque de Paracetamol (SPEP):** pesar cerca de 25 mg do padrão de paracetamol. Transferir o conteúdo pesado para balão de 25 mL com auxílio de 15 mL de água ultrapurificada. Homogeneizar manualmente. Caso seja necessário, utilizar ultrassom para completa dissolução do padrão. Após, completar o balão com o mesmo diluente. Concentração final: 1,0 mg/mL.

- f) **Solução Amostra:** Pipetar lentamente 0,40 mL da amostra (cuja concentração é 200 mg/mL) para balão volumétrico de 10 mL e avolumar com água ultrapurificada. Homogeneizar manualmente. Após, transferir 0,50 mL da solução preparada para outro balão de 10 mL, avolumar também com água ultrapurificada e homogeneizar manualmente. Concentração alvo: 0,40 mg mL<sup>-1</sup>.

#### 4.2 PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO:

**4.2.1 Curva de calibração:** a partir da SPEP preparada anteriormente, preparar 8 amostras diluindo as alíquotas da SPEP conforme descrito na Tabela 1:

**Tabela 1.** Diluições para a Curva de Calibração de Paracetamol

Nº	Concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	Volume do balão (mL)	Volume de SPEP (mL)
1	0,05	5	0,25
2	0,10	5	0,50
3	0,20	5	1,00
4	0,30	5	1,50
5	0,40	5	2,00
6	0,50	5	2,50
7	0,60	5	3,00
8	0,71	5	3,50

#### 4.3 REAÇÃO COLORÍMETRICA:

##### 4.3.1 Branco:

- Pipetar 1,50 mL de água ultrapurificada para tubo *falcon* de 15 mL;
- Pipetar 0,50 mL de Ácido Clorídrico 6N. Agitar manualmente;
- Pipetar 0,40 mL de Nitrito de Sódio 10% (p/v). A partir da inserção do reagente ao meio, contabilizar 2 minutos;
- Imediatamente após o término dos 2 minutos, adicionar ao tubo falcon 1,0 mL de Ácido Sulfâmico cuidadosamente, pois há formação de gás.
- Adicionar 2,50 mL de Hidróxido de Sódio 10% (m/v).
- Aguardar retorno para temperatura ambiente para proceder com a leitura.

##### 4.3.2 Curva de Calibração:

- Pipetar 1,0 mL de água ultrapurificada para tubo falcon de 15 mL;
- Adicionar 0,50 mL de solução nível da curva de calibração. Homogeneizar manualmente.
- Pipetar 0,50 mL de Ácido Clorídrico 6N. Homogeneizar manualmente;
- Pipetar 0,40 mL de Nitrito de Sódio 10% (p/v). Agitar para promover homogeneização. A partir da inserção do reagente ao meio, contabilizar 2 minutos;

- e) Imediatamente após o término dos 2 minutos, adicionar ao tubo falcon 1,0 mL de Ácido Sulfâmico cuidadosamente, pois há formação de gás.
- f) Adicionar 2,50 mL de Hidróxido de Sódio 10% (m/v).
- g) Aguardar retorno para temperatura ambiente para proceder com a leitura.

#### 4.3.3 Amostra:

- a) Pipetar 1,0 mL de água ultrapurificada para tubo falcon de 15 mL;
- b) Adicionar 0,50 mL da solução amostra. Homogeneizar manualmente.
- c) Pipetar 0,50 mL de Ácido Clorídrico 6N. Homogeneizar manualmente;
- d) Pipetar 0,40 mL de Nitrito de Sódio 10% (p/v). Agitar para promover homogeneização. A partir da inserção do reagente ao meio, contabilizar 2 minutos;
- e) Imediatamente após o término dos 2 minutos, adicionar ao tubo falcon 1,0 mL de Ácido Sulfâmico cuidadosamente, pois há formação de gás.
- f) Adicionar 2,50 mL de Hidróxido de Sódio 10% (m/v).
- g) Aguardar retorno para temperatura ambiente para proceder com a leitura.

**Após retorno a temperatura ambiente, proceder com a leitura do branco, da curva de calibração e da amostra em espectrofotômetro UV-Vis.**

#### 4.4 ANÁLISE NO UV-VIS

- h) As amostras devem ser analisadas por UV-Vis Varian Cary, localizado na sala E208.
- i) Ligar o computador e o monitor. O Espectrofotômetro irá se ajustar automaticamente;
- j) Abrir o programa SCAN;
- k) Clicar na aba SETUP:
- l) Em BASELINE, selecionar a opção Baseline Correction;
- m) Em REPORTS, selecionar a opção Select for ASCII (cvs);
- n) Em AUTO STORE, selecionar a opção Storage on (Prompt at end);
- o) Clicarem OK.
- p) Após lavar a cubeta com água ultrapura, colocar cerca de 4 mL de branco na cubeta e colocá-la no compartimento de leitura do UV-VIS;

*Nota: Verificar se não há bolhas na parte externa da cubeta, limpando a mesma com papel macio.*

- q) Clicar em ZERO → OK → BASELINE → OK
- r) Ambientar a cubeta com a amostra a ser analisada e preencher a mesma com a amostra;
- s) Clicar em START → OK → FINISH → Salvar a amostra na pasta E-210, localizada no

computador do UV.

- t) Anotar a utilização do equipamento no caderno localizado na sala do equipamento;
- u) Fechar o programa, desligar o computador e o monitor.

#### 4.4 CÁLCULO PARA AS AMOSTRAS DO UV-VIS

**O Cálculo da quantidade de paracetamol presente na amostra deverá ser realizado através da curva de calibração:**

##### **Curva de calibração:**

$$\text{Absorbância} = 1,32 \times [\text{Concentração Paracetamol}] + 0,00568$$

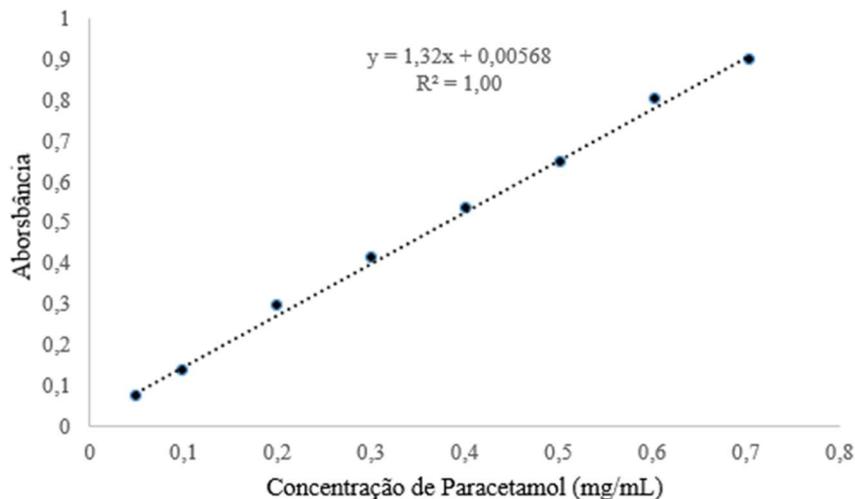


Figura 2. Curva de Calibração

#### 4.5 ANÁLISE NO PHOTOMETRIX PRO

##### 4.5.1 Iniciando o PhotoMetrix PRO

4.5.1.1 Inicialmente, instalar no celular, através da loja de aplicativos disponível, o programa PhotoMetrix PRO.

4.5.1.2 Abrir o software, no qual aparecerá a tela inicial do mesmo, conforme Figura 3.

4.5.1.3 Clicar em *Settings*: verificar se o flash está no modo “On”, inserir o *e-mail* para o qual serão exportados os dados e ajustar “*Region of interest*” para 8x8, conforme Figura 4.



Figura 3. Tela Inicial do PhotoMetrix PRO

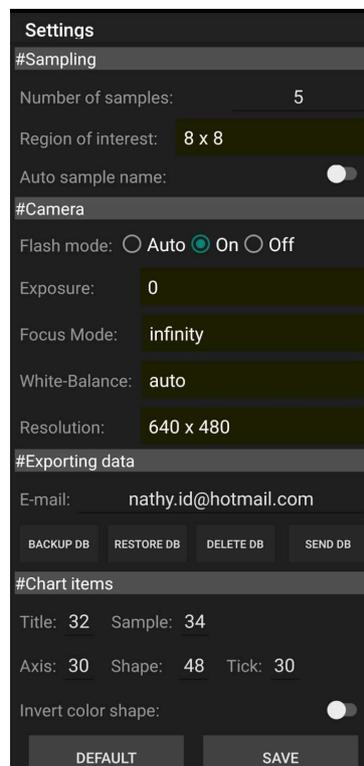


Figura 4. Tela de Configurações (*Settings*)

4.5.1.4 De volta à tela inicial (Figura 3), clicar em *Multivariate Analysis*;

4.5.1.5 Na tela de *Multivariate Analysis*, vista na Figura 5, clicar em PLS – *Partial Least Squares*.

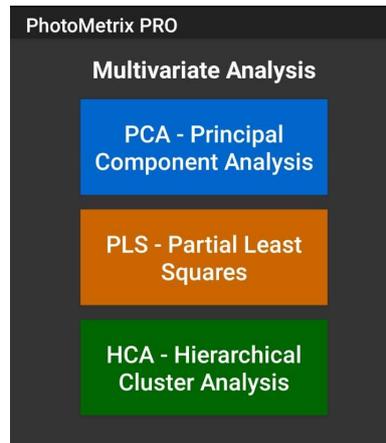


Figura 5. Menu em *Multivariate Analysis*

#### 4.5.2 Calibração da Curva

4.5.2.1 No menu “PLS”, visto na Figura 6, clicar em “Calibration”;

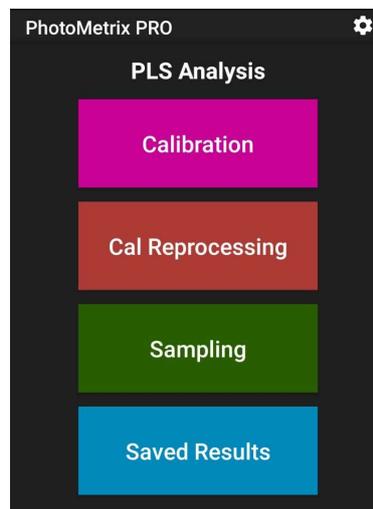


Figura 6. Menu “PLS”

4.5.2.2 Na aba de calibração, de acordo com a Figura 7, preencher os dados solicitados, atentando-se para o número de amostras em “Number os Samples” que corresponde aos pontos da curva de calibração. Após preenchimento, clicar em “Capture Images”.

Number of samples: 5

Region of interest: 8 x 8

Local:

Date: 22/08/2023

Method:  Auto  Mean

Histogram

R  G  B

Single channels

R  G  B

H  S  V  L  I

Capture images

Figura 7. Tela para Dados da Curva de Calibração.

4.5.2.3 Na aba de captura de imagens, vista na Figura 8, preencher a concentração do ponto da curva em questão em “*tap Conc.*”.

TAP HERE TO REPLACE LAST PHOTO

1/5

sample name

Known concentration: tap conc.

Figura 8. Cabeçalho para preenchimento do nome e concentração do ponto da curva de calibração.

4.5.2.4 Ajustar o poço da placa contendo a solução padrão de forma que o foco (quadrado ao centro da foto) fique no centro, atentando-se para que esteja em uma área bem iluminada e sem sombra. Após, clicar no centro, para que haja o ajuste do foco indicado pela cor verde. Após clicar em Capture, conforme Figura 9.

**CUIDADO: O foco é extremamente importante para que se tenha uma boa curva no aplicativo. SEMPRE AGUARDE O FOCO DA CÂMERA ESTABILIZAR PARA REALIZAR A CAPTURA DA IMAGEM.**

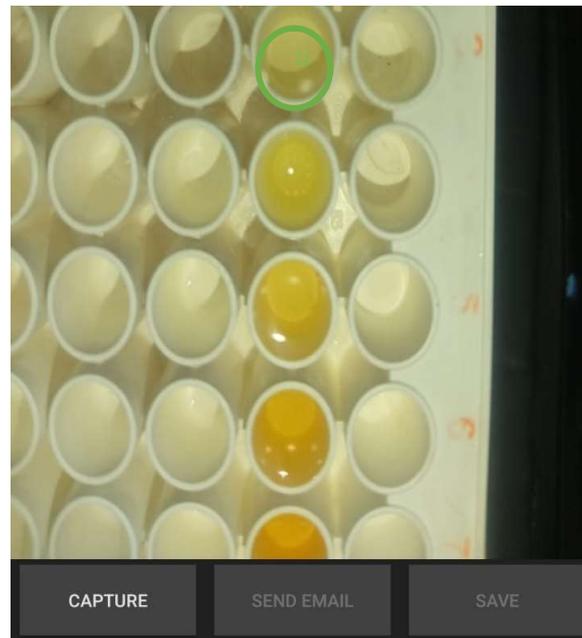


Figura 9. Exemplo de Foco e Captura

4.5.2.5 Automaticamente o programa passa para o próximo ponto, conforme o número de pontos adicionado conforme item 4.5.2.2. Após finalização todos os pontos da curva, clicar em “Save”, conforme Figura 10.

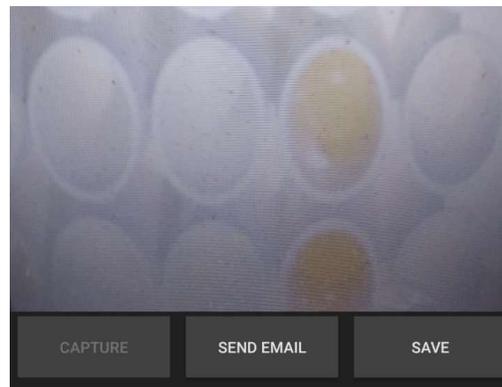


Figura 10. Salvamento após finalização da curva de calibração

4.5.2.6 Uma nova aba abrirá, conforme Figura 11, onde será possível ajustar o fator de correção e visualizar os dados da curva como o coeficiente R. Clicar em “Save” novamente, em que abrirá uma nova aba para denominar a curva a ser salva. Nomear a curva realizada e clicar em OK. Em “Plot”, será possível verificar a reta obtida em um gráfico e sua regressão linear.

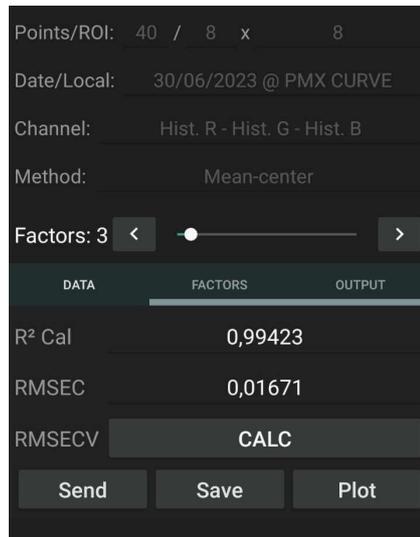


Figura 11. Tela da Curva de Calibração lida no aplicativo

#### 4.5.3 Análise das Amostras

4.5.3.1 Para a leitura de amostras, voltar ao menu PLS, visto na figura Figura 6, e selecionar opção “Sampling”.

4.5.3.2 Irá abrir uma nova aba, visto na figura 12. Preencher todos os dados e clicar em “Capture Images”. **IMPORTANTE:** Para fazer repetições de amostras, preencher em “Number of sample” o número de repetições. Para cada amostra será repetido esse processo.

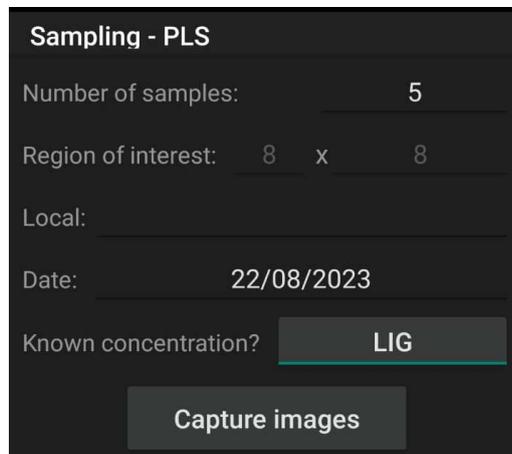


Figura 12. Amostragem PLS

4.5.3.3 Proceder com a captura das imagens das amostras, conforme itens 4.5.2.3 e 4.5.2.4. Após leitura de todas as amostras, clicar em “Save”.

4.5.3.4 Abrirá uma janela com as opções de curva para analisar as amostras, selecionar a curva desejada.

4.5.3.5 Abrirá uma nova janela, conforme Figura 13. Ajustar fator para 3 e clicar em “Calc”. Para verificar a concentração de cada uma das amostras, ir para aba “Output Samp”.

**Multivariate - PLS Analysis**

Points/ROI: 40 / 8 x 8

Date/Local: 30/06/2023 @ PMX CURVE

Channel: Hist. R - Hist. G - Hist. B

Method: Mean-center

Factors: 3 < —●— >

DATA	FACTORS	OUTPUT CALIB	OUTPUT SAMP
Name	Conc. Value	Prediction	
#	0,10	0,12	
#	0,10	0,13	
#	0,10	0,13	

Figura 13. Aba de resultados das amostra

**APÊNDICE B.** Tabela dos 12 Princípios da Química Analítica Verde Empregados como Critérios na Avaliação Ambiental do Método via *Software* Livre Agree

<b>Critério</b>	<b>Método não- miniaturizado</b>	<b>Método miniaturizado</b>	<b>Método miniaturizado com PhotoMetrix PRO</b>
1. Técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar o tratamento da amostra.	Análise off-line		
2. O tamanho mínimo da amostra e o número mínimo de amostras são objetivos.	50 mL	6 mL	0,60 mL
3. Devem ser realizadas medições in situ.	Equipamento <i>Offline</i>		Equipamento <i>On-line</i>
4. A integração de processos e operações analíticas economiza energia e reduz o uso de reagentes.	3 ou menos etapas de preparo		
5. Métodos automatizados e miniaturizados deve ser selecionado.	Não miniaturizado, realizado manualmente	Miniaturizado, realizado manualmente	
6. A derivatização deve ser evitada.	Não há necessidade		
7. A geração de um grande volume de resíduos analíticos deve ser evitada e o gerenciamento adequado de resíduos analíticos deve ser fornecido.	550 mL	66 mL	6,60 mL
8. Os métodos multianálito ou multiparâmetro são preferidos aos métodos que usam um analito de cada vez.	1 parâmetro, 20 amostras por hora	1 parâmetro, 40 amostras por hora	
9. O uso de energia deve ser minimizado (técnica que mais consome energia).	Espectrofotometria UV-Vis		Não aplicável
10. Reagentes obtidos de fontes renováveis devem ser preferidos.	Nenhum reagente de fonte renovável		
11. Os reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos.	22 mL	4 mL	0,40 mL
12. A segurança do operador deve ser aumentada.	Riscos: a vida aquática; corrosivo		

Fonte. Adaptada pela autora<sup>32</sup>.