



**Otílio Fernando
Mulandeza**

**Imagiologia de Raman para a avaliação da qualidade
de comprimidos de paracetamol**



**Otílio Fernando
Mulandeza**

**Imagiologia de Raman para a avaliação da qualidade
de comprimidos de paracetamol**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestrado em Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Helena Isabel Seguro Nogueira, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Sara Isabel Augusto Fateixa Caria, Investigadora do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico aos meus pais, Fernando Mulandez e Isabel Bastos, pela educação que recebi, pela dedicação, carinho e amor; à minha esposa Letina, que me incentivou e sempre esteve presente em cada momento da minha vida e aos meus filhos, Larcen, Yuri e Yúmina, frutos de uma nova esperança de futuro melhor e promissor.

o júri

presidente

Doutora Maria Eduarda Bastos Henriques dos Santos
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Maria do Rosário Pimenta Correia
Professora Auxiliar do Departamento de Física da Universidade de Aveiro

Doutora Sara Isabel Augusto Fateixa Caria
Investigadora do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho: Para que a realização deste trabalho fosse possível muitas pessoas ajudaram-me, tanto a nível familiar como profissional, e por isso gostaria de expressar o meu profundo, sincero e grato agradecimento.

Gostaria de começar pelos meus pais, pois sem eles nada teria sido possível, agradeço-lhes pela confiança que demonstram em mim.

À minha esposa, companheira de vida, que me mantém forte e seguro de que sou capaz.

Às minhas orientadoras, Doutora Sara Fateixa e Doutora Helena Nogueira, pela orientação e disponibilidade na elaboração desse trabalho.

À minha amiga Mariza, agradeço por ter me ajudado bastante no melhoramento deste trabalho.

Ao meu colega e amigo Castigo Chame, que sempre estivemos juntos nesta batalha desde o primeiro dia do curso até ao final.

À minha família em geral, que apesar da distância, mantém-me sempre por perto e dá-me força que só a família sabe dar.

Aos meus amigos chegados, que os considero como irmãos, que estão sempre comigo, e eu com eles, e que fazem com que esta reciprocidade me dê força e alegria para continuar.

A todos o meu bem-haja. Muito Obrigado!

palavras-chave

Espectroscopia de Raman, imagiologia de Raman, Paracetamol, 4-Aminofenol, impureza.

resumo

Atualmente, a aplicabilidade da espectroscopia de Raman acoplada à microscopia confocal na indústria farmacêutica vai desde a caracterização das formulações farmacêuticas para a elucidação dos processos cinéticos na entrega da droga à detecção rápida e identificação de medicamentos falsificados.

O Paracetamol é um fármaco de propriedades analgésica e antitérmica, considerado dentre os medicamentos mais consumidos. O 4-aminofenol (4-AF) é o produto hidrolítico do Paracetamol e é relatado como tendo nefrotoxicidade e efeitos teratogênicos.

Este trabalho teve como objetivo a utilização da espectroscopia de Raman acoplada à microscopia confocal para a caracterização do Paracetamol e a identificação de 4-AF em comprimidos de Ben-U-ron. Posteriormente, os comprimidos preparados foram submetidos à estímulos externos tais como temperatura, humidade e exposição solar, a fim de avaliar a presença de impurezas e algumas alterações físicas ou químicas que possam ocorrer durante o estímulo.

Concluiu-se no presente trabalho que a imagiologia de Raman é uma técnica que pode ser útil para a detecção de pequenas quantidades do contaminante 4-AF, em comprimidos de Paracetamol comercializados, apesar de não detetar os teores mínimos estabelecidos pelas Farmacopeias. Avaliou-se em detalhe as variações físicas e químicas dos comprimidos, tais como a sua dureza e a oxidação/degradação dos seus componentes, recorrendo às técnicas de Raman e medidas de compressão, aquando expostos a diversas condições ambientais como, temperatura, humidade e exposição solar.

keywords

Raman spectroscopy, Raman image, Paracetamol, 4-Aminophenol, impurity.

abstrac

Currently, the applicability of the Raman spectroscopy coupled to confocal microscopy in the pharmaceutical industry, ranges from the characterization of pharmaceutical formulations to elucidate kinetic processes in drug delivery to the rapid detection and identification of counterfeit drugs.

Paracetamol is a drug with analgesic and antipyretic properties, considered one of the most consumed drugs. The 4-aminophenol (4-AF) is the hydrolytic product of Paracetamol and, is reported to have nephrotoxicity and teratogenic effects.

The main goal of this work was the use of Raman spectroscopy coupled with confocal microscopy to characterize Paracetamol and the identification of 4-AF in Ben-U-ron tablets. Then the as prepared tablets were subjected to external stimuli such as temperature, humidity and sun exposure to assess the presence of impurities and any physical or chemical changes that may have occurred during the stimuli.

In the present work, we demonstrate that Raman imaging is a great technique that can be useful for the detection of small amounts of the 4-AF contaminant, or as a residue of chemical synthesis in commercially available Paracetamol tablets, although it does not detect the minimum levels established by the Pharmacopoeias. Then, we have evaluated, in more detail, the physical and chemical variations that can occur on the tablets when they are exposed to various environmental conditions such as temperature, humidity and sun exposure.

ÍNDICE

1. Introdução	2
1.1. Espectroscopia de Raman	3
1.1.1. Princípios básicos da espectroscopia de Raman.....	3
1.1.2. Vantagens e limitações da espectroscopia de Raman.....	4
1.1.3. Áreas de aplicação da espectroscopia de Raman	4
1.1.4. Espectroscopia de Raman acoplada à microscopia confocal	5
1.2. Indústria farmacêutica.....	7
1.2.1. Aplicações da espectroscopia de Raman na indústria farmacêutica	7
1.2.3. O Paracetamol.....	8
1.2.4. Aspetos físico-químicos do Paracetamol.....	9
1.2.5. Síntese do Paracetamol.....	10
1.2.6. O 4-Aminofenol.....	11
1.3. Efeito da variação das condições de armazenamentos de fármacos ao nível da alteração das suas propriedades	12
1.4. Objetivos	13
2. Materiais e métodos	15
2.1. Materiais e reagentes	16
2.2. Medicamento utilizado	16
2.3. Preparação dos comprimidos	16
2.4. Instrumentação	18
3. Resultados e discussão	23
3.1. Caracterização do Paracetamol em pó (comercial).....	24
3.2. Caracterização do 4-Aminofenol (4-AF) em pó (comercial).....	28
3.3. Caracterização dos comprimidos de Ben-U-ron	31
3.4. Caracterização dos comprimidos de Ben-U-ron com a adição do 4-AF	35
3.5. Dados estatísticos.....	40
4. Estudo das condições de armazenamento de comprimidos de Ben-U-ron.....	44
4.1. Comprimidos de Ben-U-ron sujeitos a diferentes temperaturas e mesma exposição solar.....	45
4.2. Comprimidos de Ben-U-ron sujeitos à mesma temperatura e diferente exposição solar.....	53
4.3. Comprimidos de Ben-U-ron sujeitos à humidade.....	57
5. Conclusões e perspetivas futuras	63
6. Bibliografia	67

Índice de figuras

Figura 1.1:	Difusão elástica e inelástico.....	3
Figura 1.2:	Esquema ilustrativo das diversas áreas em que a espectroscopia de Raman atua.....	5
Figura 1.3:	a) Imagem ótica de um comprimido de Paracetamol com a área de scan marcada a vermelho; b) Mapeamento de Raman monitorizando a integração da área da banda 1330 cm^{-1} do Paracetamol.....	7
Figura 1.4:	a) imagem ótica de um comprimido de Paracetamol; b) espectro de Raman do Paracetamol retirados de vários sítios do comprimido.....	10
Figura 1.5:	Síntese do Paracetamol a partir do 4-AF.....	10
Figura 1.6:	Síntese do Paracetamol a partir do nitrobenzeno.....	11
Figura 1.7:	Reação de hidrólise do Paracetamol.....	11
Figura 1.8:	Hidrólise de uma amida.....	13
Figura 2.1:	Prensa hidráulica usada para preparação de comprimidos.....	17
Figura 2.2:	Comprimidos de Ben-U-ron preparados por compressão com a adição de 4-AF em diferentes quantidades.....	18
Figura 2.3:	Monitor duplo demonstrando a área de trabalho e o programa utilizado para a aquisição dos espectros e mapeamento de Raman e conseqüente tratamento de dados.....	19
Figura 2.4:	Posição correta do comprimido entre as garras do instrumento.....	21
Figura 3.1:	Espectro FTIR de Paracetamol comercial em pó.....	24
Figura 3.2:	Espectro UV-Vis do Paracetamol comercial.....	25
Figura 3.3:	Difractograma de Raio-X do Paracetamol na Fase Monoclínica.....	25
Figura 3.4:	Espectro RMN de ^1H do Paracetamol e respetiva estrutura molecular.....	26
Figura 3.5:	Espectro Raman do Paracetamol.....	27
Figura 3.6:	Espectro FTIR de 4-AF.....	28
Figura 3.7:	Espectro UV-Vis de 4-AF.....	29
Figura 3.8:	Espectro RMN de ^1H do 4-AF.....	30
Figura 3.9:	Espectro Raman de 4-AF.....	31

Figura 3.10:	Espectro FTIR de Ben-U-ron.....	32
Figura 3.11:	Espectro de Raman do Paracetamol (verde) e do Ben-U-ron (azul).....	32
Figura 3.12:	a) Imagem ótica com a objetiva de maior ampliação (100x); Mapeamento de Raman obtido usando a integração da área das bandas b) a 93 cm^{-1} do espectro de Paracetamol e c) a 2928 cm^{-1} do espectro do amido de milho/ carboximetilamido de sódio; I- Média de 40000 espectros Raman do comprimido de Ben-U-ron.....	34
Figura 3.13:	Espectros de Raman do a) amido de milho e do b) carboximetilamido de sódio, retirado da literatura.....	34
Figura 3.14:	a) Imagem de Raman combinada do comprimido de Ben-U-ron; b) Espectros Raman utilizados para a imagem combinada: I-Espectro de Paracetamol (vermelho); II-Espectro de amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio (azul).....	35
Figura 3.15:	Espectro FTIR de Ben-U-ron com 10%, 1% e 0.5% de 4-AF.....	36
Figura 3.16:	Mapeamento de Raman obtido usando integração da área da banda em 93 cm^{-1} no espectro de Paracetamol com 10%, 1% e 0,5% (a); e da banda em 112 cm^{-1} no espectro de 4-AF com 10%, 1% e 0,5% (b).....	36
Figura 3.17:	a) Imagem combinada de comprimido de Ben-U-ron com 10% de 4-AF; b) Espectros de Raman utilizados para a imagem combinada: 1-Paracetamol (vermelho), 2- 4-AF (verde).....	37
Figura 3.18:	1- Espectro de 4-AF (0,1%) correspondente ao mapeamento de Raman obtido por intensidade integrada da banda em 112 cm^{-1} numa área de $2000\mu\text{m} \times 2000\mu\text{m}$; 2- Espectro de 4-AF (0,05%) correspondente ao mapeamento de Raman obtido por intensidade integrada da banda em 112 cm^{-1} numa área de $2000\mu\text{m} \times 2000\mu\text{m}$	38
Figura 3.19:	Medidas de compressão de diferentes pressões exercidas nas preparações dos comprimidos de Ben-U-ron com 0% de 4-AF.....	39
Figura 3.20:	Medidas de compressão de diferentes quantidades de 4-AF nos comprimidos de Ben-U-ron.....	40
Figura 3.21:	Dados estatísticos do controlo Ben-U-ron.....	41
Figura 3.22:	(a) Mapeamento do comprimido de Ben-U-ron obtido pela ferramenta Analyze do software Projeto5+ (WITec) utilizando ImageJ® para o cálculo das quantidades dos seus constituintes, e a interferência causada pela régua de escala; (b) dados estatísticos de comprimido de Ben-U-ron com diferentes quantidades de 4-AF.....	41
Figura 4.1:	Fotografias dos comprimidos de Ben-U-ron com adição de 4-AF: a) sem estímulo; b) 22°C sem luz; e c) 40°C sem luz.....	46

Figura 4.2:	Mapeamento de Raman nos comprimidos de Ben-U-ron sujeitos à temperatura de 22°C num ambiente sem luz, usando integração da área da banda: I-a) em 93 cm ⁻¹ no espectro de Paracetamol com 0% de 4-AF; I-b) em 2946 cm ⁻¹ no espectro de Amido de milho; II-a) em 93 cm ⁻¹ no espectro de Paracetamol com 0,05% de 4-AF; II-b) em 116 cm ⁻¹ no espectro de 4-AF com 0,05% de 4-AF; III-a) em 89 cm ⁻¹ no espectro de Paracetamol com 0,5% de 4-AF; III-b) em 112 cm ⁻¹ no espectro de 4-AF com 0,5% de 4-AF; III-c) em 116 cm ⁻¹ no espectro de 4-AF com 0,5% de 4-AF.....	47
Figura 4.3:	a) Imagem de Raman combinada do comprimido de Ben-U-ron com 0% de 4-AF, submetido à temperatura de 40°C. b) Espectros de Raman utilizados para a imagem combinada: I-Paracetamol (vermelho), II- Amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio (azul).....	49
Figura 4.4:	Mapeamento de Raman nos comprimidos de Ben-U-ron sujeitos a temperatura de 40°C num ambiente sem luz, usando integração da área da banda em: 93 cm ⁻¹ no espectro de Paracetamol com 10% (a) e 1% (b) de 4-AF; c) 2949 cm ⁻¹ no espectro de Amido de milho com 1% de 4-AF; d) 116 cm ⁻¹ no espectro de 4-AF, com 10% de 4-AF; e) fluorescência a 3103 cm ⁻¹ nos comprimidos com 1% de 4-AF.....	49
Figura 4.5:	Espectros de Raman usados para imagem combinada do comprimido de Ben-U-ron com 1% de 4-AF, submetido a temperatura de 40°C num ambiente sem luz: I- Paracetamol (vermelho), II- Amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio (azul), III- Fluorescência a 3103 cm ⁻¹ (verde).....	49
Figura 4.6:	Medidas de compressão dos comprimidos de Ben-U-ron com diferentes quantidades de 4-AF, sem estímulo e submetidos à temperatura de 22°C e 40°C num ambiente sem luz.....	50
Figura 4.7:	Dados estatísticos dos comprimidos Ben-U-ron com 0% de 4-AF, sem estímulo e sujeitos a temperatura diferente e mesma exposição solar.....	51
Figura 4.8:	Dados estatísticos dos comprimidos Ben-U-ron com a adição de 10% de 4-AF, sem estímulo e sujeitos a temperatura diferente e mesma exposição solar..	52
Figura 4.9:	Reação de electro oxidação do 4-Aminofenol.....	53
Figura 4.10:	Fotografias dos comprimidos de Ben-U-ron com adição de 4-AF: a) sem estímulo; b) 22°C sem luz e c) 22°C com luz.....	54
Figura 4.11:	Mapeamento de Raman nos comprimidos de Ben-U-ron sujeitos à temperatura de 22°C num ambiente com luz e 39% de humidade, usando a integração da área da banda em: I-a) 93 cm ⁻¹ no espectro de Paracetamol com 0% de 4-AF; b) 2931 cm ⁻¹ no espectro de Amido de milho com 0% de 4-AF; II-a) 93 cm ⁻¹ no espectro de Paracetamol com 10% de 4-AF; b) 116 cm ⁻¹ no espectro de 4-AF com 10% de 4-AF; III-a) 93 cm ⁻¹ no espectro de Paracetamol com 0,5% de 4-AF; b) fluorescência no espectro de 4-AF com 0,5% de 4-AF.....	55

Figura 4.12:	Média de espectros de Raman do comprimido de Ben-U-ron sujeitos à temperatura de 22°C num ambiente com luz e 39% de humidade, usando a integração da área da banda em: X- 93 cm ⁻¹ no espectro de Paracetamol com 0,5% de 4-AF; Y- fluorescência no espectro de 4-AF com 0,5% de 4-AF.....	55
Figura 4.13:	Medidas de compressão dos comprimidos de Ben-U-ron com diferentes quantidades de 4-AF, sem estímulo e submetidos à temperatura de 22°C, num ambiente com e sem luz.....	56
Figura 4.14:	Fotografias dos comprimidos de Ben-U-ron com adição de 4-AF: a) Sem estímulo; b) sujeitos à 86,5% de humidade.....	57
Figura 4.15:	Mapeamento de Raman nos comprimidos de Ben-U-ron com 0% de 4-AF (Controlo), sujeitos à 86,5% de humidade, usando a integração da área da banda em: a) 89 cm ⁻¹ no espectro de Paracetamol; b) 2890 cm ⁻¹ no espectro de Ácido esteárico; c) 2940 cm ⁻¹ no espectro de Amido de milho/ carboximetilamido de sódio.....	58
Figura 4.16:	a) Mapeamento de Raman nos comprimidos de Ben-U-ron com 10% de 4-AF, sujeitos à 86,5% de humidade, usando a integração da área da banda em 89 cm ⁻¹ no espectro de Paracetamol e os respetivos espectros médios.....	58
Figura 4.17:	Mapeamento de Raman nos comprimidos de Ben-U-ron sujeitos à 86,6% de humidade e os respetivos espectros médios com 0,05% de 4-AF, usando a integração da área da banda em: a) 89 cm ⁻¹ no espectro de Paracetamol (I); b) fluorescência no espectro de 4-AF (II).....	59
Figura 4.18:	Espectro FTIR de Ben-U-ron, sujeito à 86,5% de humidade, no intervalo de número de onda entre 350-2000 cm ⁻¹ ; (Preto): 10% de 4-AF; (vermelho): Controlo.....	60
Figura 4.19:	Espectro FTIR de Ben-U-ron, sujeito à 86,5% de humidade, no intervalo de número de onda entre 2000-4000 cm ⁻¹ ; (Preto): 10% de 4-AF; (vermelho): Controlo.....	60
Figura 4.20:	Medidas de compressão dos comprimidos de Ben-U-ron com diferentes quantidades de 4-AF, sem estímulo e submetidos à humidade de 39 e 86,5%....	61

Índice de tabelas

Tabela 1.1:	Propriedades fisico-químicas do Paracetamol.....	9
Tabela 2.1:	Valores das massas pesadas para a preparação de cada comprimido.....	17
Tabela 3.1:	Tabela dos valores aproximados de desvio químico de RMN do ¹ H para Paracetamol.....	26
Tabela 3.2:	Modos de vibração associados aos picos mais intensos do espectro de Raman de Paracetamol comercial.....	27
Tabela 3.3:	Tabela dos valores aproximados de desvio químico de RMN do ¹ H para 4-AF.....	30
Tabela 3.4:	Modos de vibração associados aos picos do espectro Raman de 4-AF.....	31

Abreviaturas

4-AF = 4-Aminofenol

ATR = Reflexão Total Atenuada (do inglês Attenuated Total Reflection)

FTIR = Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (do inglês Fourier transform infrared spectroscopy)

FT-Raman = Espectroscopia de Raman por Transformada de Fourier (do inglês Fourier Transform Raman Spectroscopy)

IV = infravermelho

PARA = Paracetamol

RMN = Ressonância Magnética Nuclear

SERS = Espectroscopia de Raman de superfície aprimorada (do inglês Surface Enhanced Raman spectroscopy)

UV-Vis = Ultravioleta-Visível

1. INTRODUÇÃO

1.1. Espectroscopia de Raman

1.1.1. Princípios básicos da espectroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman foi descrita no ano de 1928 pelo físico indiano Chandrashekhara Venkata Raman, que descobriu os fenômenos de difusão (espalhamento) inelástica de luz, conhecido como o efeito de Raman.¹ Quando uma radiação monocromática atinge a amostra, ela se difunde em todas as direções após a sua interação com as moléculas da amostra.² Grande parte desta radiação difusa tem uma frequência que é igual à frequência da radiação incidente e constitui a dispersão de Rayleigh (figura 1.1).² Apenas uma pequena fração da radiação dispersa tem uma frequência diferente da frequência da radiação incidente e constitui o difusão de Raman. Quando a frequência de radiação incidente é maior que a frequência de radiação difusa, as linhas de Stokes aparecem no espectro de Raman. Mas quando a frequência de radiação incidente é menor que a frequência de radiação difusa, as linhas anti-Stokes também aparecem no espectro de Raman. As bandas de Raman envolvem as transições de níveis vibracionais de baixa para alta energia e, portanto, as bandas de Stokes são mais intensas do que as bandas anti Stokes e são medidas na espectroscopia de Raman convencional, enquanto as bandas anti Stokes são medidas quando as amostras em análise são muito fluorescentes, causando grande interferência na região Stokes.³

Uma mudança na polarizabilidade durante a vibração molecular é um requisito essencial para a obtenção de um bom espectro de Raman.

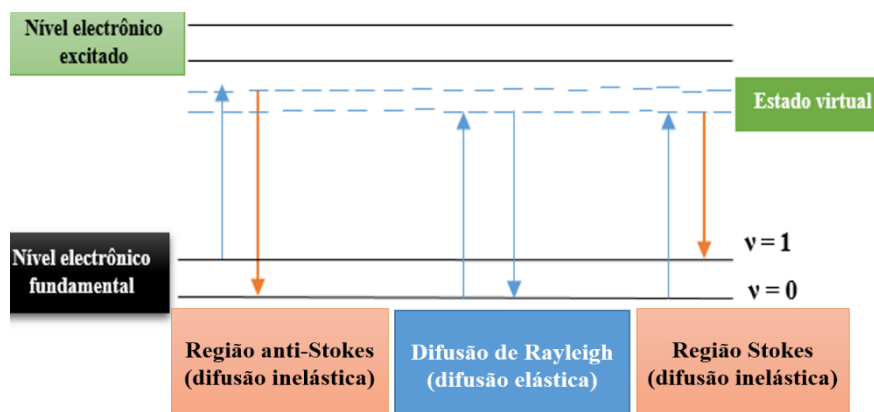


Figura 1.1: Difusão elástica e inelástica, adaptado da referência.⁴

1.1.2. Vantagens e limitações da espectroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman é um método versátil para análise de uma vasta variedade de amostras desde orgânicas (ex. Paracetamol) às inorgânicas (ex. óxido de zinco). A espectroscopia de Raman tem sido utilizada em análises farmacêuticas, apresentando inúmeras vantagens em relação aos métodos convencionais, tais como a cromatografia líquida,⁵ a cromatografia gasosa,⁶ a eletroforese capilar,⁷ e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN),⁸ principalmente pelo facto de ser uma técnica rápida e não destrutiva. Permite identificar princípios ativos farmacêuticos, assim como outras substâncias presentes nas formulações, sem necessidade de tratamento prévio das amostras.⁹ Como a água é um difusor fraco de Raman, é possível analisar soluções aquosas por esta técnica.¹⁰ O interesse por técnicas confiáveis e mais ágeis, com custo reduzido e visando a determinação de baixos teores de fármacos, é um constante desafio.⁹

Esta técnica também possui algumas limitações, tais como o custo do equipamento, que tem sido o principal obstáculo para a sua utilização em análises de rotina. As bandas de Raman são geralmente fracas, podendo por isso, serem ocultadas ou sobrepostas por efeitos de ressonância, tais como a fluorescência, provenientes tanto da amostra como de componentes externos.¹¹ Se a intensidade da linha de excitação for muito alta, as amostras podem decompor-se termicamente.¹⁰ Amostras líquidas e sólidas devem estar livres de impurezas.^{10,12}

1.1.3. Áreas de aplicação da espectroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman é uma técnica muito usada para a análise de materiais em vários estados físicos, como gases, líquidos e soluções, sólidos e pós. Esta técnica tem sido utilizada em diversas áreas tais como Geologia,¹³ Microbiologia,¹⁴ Ciências forenses,¹⁵ Medicina,¹⁶ Química,¹⁷ Arqueologia,¹⁸ Indústrias farmacêuticas,¹⁹ Nanotecnologia,²⁰ Ciência e Engenharia de materiais²¹ (figura 1.2).

Como exemplo da aplicação da Espectroscopia de Raman na indústria farmacêutica, pode-se citar o trabalho de Roman Szostak e Sylwester Mazurek sobre a determinação quantitativa de ácido acetilsalicílico e acetaminofeno em comprimidos por espectroscopia de FT-Raman,²² Meikun Fan e colaboradores, fizeram uma revisão bibliográfica sobre a preparação de substratos à base de metais nobres para espectroscopia de Raman de

intensificação de superfície (SERS) e suas aplicações na Química analítica;¹⁷ Na arte e arqueologia, a espectroscopia de Raman tem sido muito utilizada para a caracterização e identificação de vários materiais nas área do patrimônio cultural e arqueológico (ex.: pigmentos, corantes, tintas, papel, polímeros, vidros, cerâmicas, resinas, fibras, produtos corrosivos), do patrimônio natural (ex.: gemas, minerais, fósseis) e alguns aspetos que envolvam ciência forense.²² Nos últimos anos, devido à crescente necessidade de espectros de referência bem definidos e rapidamente disponíveis, tem se vindo a construir base de dados públicas de espectros padrão de Raman de compostos relacionados ao patrimônio cultural e arqueologia.²²

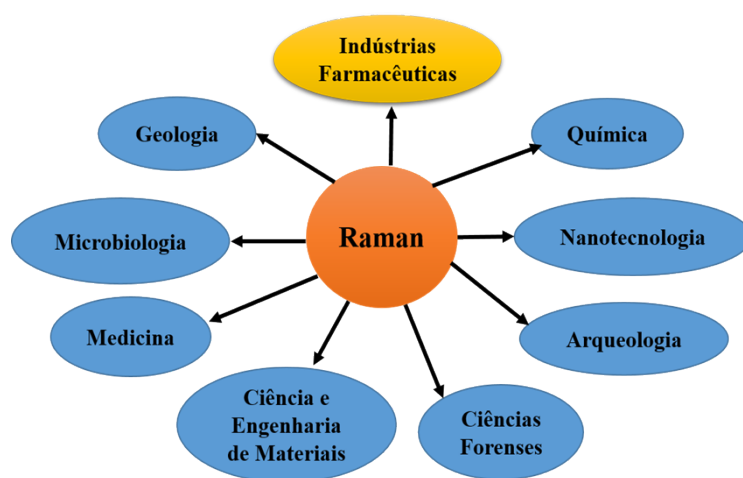


Figura 1.2: Esquema ilustrativo das diversas áreas em que a espectroscopia de Raman atua.

1.1.4. Espectroscopia de Raman acoplada à microscopia confocal

Recentemente assistiu-se a um desenvolvimento da técnica de imagiologia por espectroscopia de Raman, conduzindo a novas possibilidades da caracterização bidimensional de amostras. A aquisição de mapas químicos permite visualizar a distribuição espacial de fases (inorgânicas e orgânicas) numa amostra de acordo com coordenadas definidas.²³ Esta funcionalidade tem-se mostrado muito vantajosa em estudos de diversas naturezas, em diferentes áreas tais como: farmacêutica,²⁴ biomédica²⁵ e materiais cerâmicos industriais.^{23,26}

Por exemplo, Gowen e seus colaboradores têm estudado a monitorização de processos farmacêuticos e controlo de qualidade utilizando imagiologia de Raman.²⁴ Durand e o seu grupo, reportaram a análise microscópica confocal de Raman da interface de materiais

como o zircônio/cerâmica feldspática,²⁷ e Hidetoshi Sato e seus colaboradores, relataram sobre as aplicações biomédicas de uma nova sonda que permite efetuar imagens de Raman num equipamento portátil.²⁵ Essa sonda é a menor e mais leve sonda de imagens de Raman do mundo. A área de irradiação é de cerca de 43 a 90 μm e a resolução espacial é de 1 μm . No estudo realizado, a sonda de imagem de Raman foi utilizada para obter uma imagem de Raman de partículas de diamante e um mapeamento de Raman de carotenóides em *Euglena*.

A espectroscopia de Raman é perfeitamente adaptada à microscopia confocal, pois permite aumentar o contraste, definição de imagens e, por sua vez, construir e obter informações tridimensionais.^{28,29} A microscopia confocal de Raman permite mapear quimicamente, de forma não invasiva, várias amostras na mais alta resolução e adquirir perfis de profundidade.³⁰ Em particular, com o microscópio confocal de Raman, é possível analisar partículas individuais ou camadas com dimensões tão baixas quanto 1 μm .²⁸

Deste modo, milhares de espectros são obtidos e para viabilizar a medida, os tempos de aquisição devem ser bem pequenos. Assim, para se obter um bom mapa de Raman, a amostra em análise deve ter um bom sinal de Raman e o aparato experimental deve ser altamente eficiente.³¹

Para se construir imagens de Raman, o primeiro passo é escolher a área da amostra a ser analisada. Em seguida, escolhe-se uma banda específica do espectro de Raman característica da amostra em estudo e monitoriza-se a integração da sua área, da sua largura ou do seu centro. O mais comum, no entanto, é usar a integração da área de uma respectiva banda, analisando assim em que porção da amostra essa banda é mais intensa ou mais fraca. Essa diferença de intensidade é transformada em imagens considerando uma determinada escala de cor, que também é escolhida pelo usuário do equipamento. A figura 1.3 ilustra a imagem ótica de um comprimido de Ben-U-ron (1g de Paracetamol) com a área de scan (quadrado vermelho) e o respectivo mapeamento de Raman, monitorizando a integração da área da banda em 1330 cm^{-1} do Paracetamol. No mapeamento de Raman ilustrado, a parte amarela é onde a banda do Paracetamol é mais intensa, e a parte vermelha é onde a banda do Paracetamol é menos intensa.

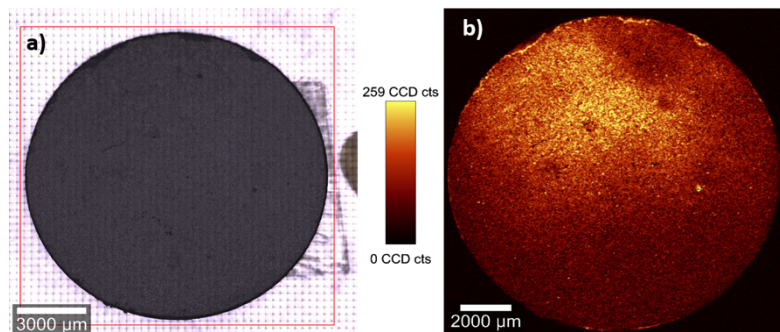


Figura 1.3: a) Imagem ótica de um comprimido de Paracetamol com a área de scan marcada a vermelho; b) Mapeamento de Raman monitorizando a integração da área da banda 1330 cm^{-1} do Paracetamol.

1.2. Indústria farmacêutica

A quantificação dos princípios ativos em fármacos é uma etapa fundamental no processo de controlo de qualidade dos medicamentos, que consiste num conjunto de operações com o objetivo de verificar se o produto está em conformidade com as especificações das farmacopeias. A confirmação de quaisquer irregularidades nos medicamentos pode representar uma série de complicações para a empresa produtora dos mesmos, dentre as quais estão os prejuízos decorrentes da re-fabricação, a perda de credibilidade e até a cessão da licença do funcionamento e do registo do produto.³² Em contrapartida, para os utentes, a falta de qualidade dos medicamentos pode ocasionar uma série de transtornos e até o comprometimento da sua saúde.³³

1.2.1. Aplicações da espectroscopia de Raman na indústria farmacêutica

A aplicabilidade da espectroscopia de Raman na indústria farmacêutica vai desde a caracterização das formulações farmacêuticas, para a elucidação dos processos cinéticos da libertação dos fármacos, à deteção rápida e identificação dos medicamentos falsificados,³² sendo um exemplo, o estudo de Charlotte Eliasson e Pavel Matousek, que descreve a autenticação não-invasiva de produtos farmacêuticos, através da embalagem, usando a espectroscopia de Raman.³⁴

Desde as melhorias instrumentais nas últimas décadas, que a espectroscopia de Raman vem sendo cada vez mais utilizada como uma ferramenta rápida e não destrutiva para a

análise qualitativa dos aspetos químicos e da qualidade física dos fármacos sólidos, semissólidos e líquidos.

A espectroscopia de Raman permite identificar e caracterizar rapidamente grupos funcionais de compostos químicos, conformadores moleculares e autenticar vários fármacos, revelando a presença de contaminantes e desordem estrutural nos materiais, estudando distribuições de tensão e efeitos de temperatura.³⁵ A espectroscopia de Raman, pode ser usada na identificação de matérias-primas, por exemplo, na identificação de partículas de hematite em recipientes de vidro selados para uso farmacêutico³⁶ e apoiar rastreios polimórficos (os polimorfos são compostos com a mesma estrutura química mas propriedades diferentes tais como a solubilidade, afetando assim a absorção de um comprimido pelo utente).^{12,37} Por exemplo, Nanubolu e Burley reportaram a utilização da imagiologia de Raman em função da temperatura para monitorizar a cristalização dos diferentes polimorfos do Paracetamol.³⁷

Entre as vantagens da técnica de Raman, pode-se salientar a sua rapidez, pois ao reduzir o tempo da análise da composição dos ingredientes ativos em comprimidos, permite-se um aumento do número de comprimidos testados e aumenta o nível de confiança nos produtos.³⁸ O método ideal para o controlo da qualidade dos produtos farmacêuticos deve ser um método capaz de testar medicamentos de forma rápida, não destrutiva e sem a necessidade do tratamento prévio das amostras.

1.2.3. O Paracetamol

O Paracetamol, também denominado acetaminofeno, foi sintetizado em 1878 por Morse, e utilizado pela primeira vez na medicina por Von Mering em 1893.³⁹ Mas, foi somente em 1949, que foi oficialmente introduzido como agente terapêutico, uma vez que foi reconhecido como sendo o principal metabolito ativo da fenacetina e da acetanilida, fármacos analgésicos e antipiréticos que o precederam terapêuticamente, desde o século XVIII.⁴⁰

Na indústria farmacêutica, o Paracetamol é classificado como um analgésico não-narcótico e antipirético.⁴¹ O Paracetamol está presente no mercado em diversas apresentações: suspensão, solução, comprimido, cápsula e mastigáveis.⁴² O paracetamol tem despertado muito interesse devido à sua baixa incidência de efeitos colaterais, quando

comparado com o ácido acetil salicílico (AAS), quando administrado em doses terapêuticas.^{43,44} Devido à sua eficácia e baixo custo, encontra-se entre os analgésicos mais utilizados em todo o mundo não sujeitos a receita médica,⁴⁵⁻⁴⁷ estando disponível no mercado na forma de genérico e sob vários nomes comerciais entre os quais o Ben-U-ron, Panadol, Tylenol, Supofen, Pantador, o Panasorbe e o Efferalgan.⁴⁸

De um modo geral, o Paracetamol é um medicamento considerado seguro. Porém, devido ao seu uso extenso e incorreto, pode causar sérios problemas de saúde,⁴⁹ como náuseas, vômitos, dores abdominais, insuficiência renal, insuficiência hepática e em alguns casos pode levar o paciente à morte.⁴⁸

1.2.4. Aspectos físico-químicos do Paracetamol

Quimicamente o Paracetamol, acetaminofeno ou N-acetil- ρ -aminofenol, é uma amida aromática acetilada, sintetizada por Von Mering em 1893,³⁹ podendo-se apresentar sob a forma de 3 polimorfos: forma tipo I que tem uma estrutura cristalina monoclinica (comercial), forma tipo II que tem uma estrutura cristalina ortorrômbica, que pode ser obtida pelo aquecimento da primeira a 180°C e rápido arrefecimento à temperatura ambiente e uma terceira, forma tipo III, muito instável, não sendo conhecida a sua estrutura cristalina pois ainda não foi determinada por Raio-X de cristal, mas estudos já foram realizados para a sua determinação e caracterização por espectroscopia de Raman.^{37,48,50}

Na tabela 1.1, encontram-se resumidas as propriedades físico-químicas do Paracetamol.

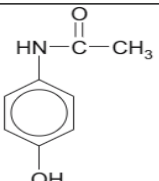
Fórmula Estrutural	Fórmula Molecular	Massa Molar	Descrição	Solubilidade	Conservação
	C ₈ H ₉ NO ₂	151,16 g mol ⁻¹	Pó cristalino, branco, inodoro, de leve sabor amargo	Solúvel em água em ebulição, hidróxido de sódio, álcool metílico e etílico	Em recipientes herméticos e opacos

Tabela 1.1: Propriedades físico-químicas do Paracetamol.⁴⁸

De acordo com os dados da literatura, as vibrações moleculares responsáveis pelas principais bandas de Raman características da molécula do Paracetamol podem ser descritas da seguinte maneira: A banda em 89 cm⁻¹ apresentando o pico com maior intensidade, atribui-se à deformação C-CH₃, a banda em torno de 645 cm⁻¹ foi atribuída à deformação da ligação C-C do anel aromático, a banda em 859 cm⁻¹ surge devido à

elongação (ν) do anel aromático, por volta de 1170 cm^{-1} atribuiu-se à elongação C-H do anel aromático, a deformação angular (δ) do anel aromático corresponde à banda por volta de 1322 cm^{-1} , a banda observada a 1608 cm^{-1} corresponde à elongação C=C e deformação angular O-H. As bandas em 2928 e 3064 cm^{-1} referem-se à elongação simétrica CH_3 e à deformação angular CH_3 , respetivamente.^{51,52}

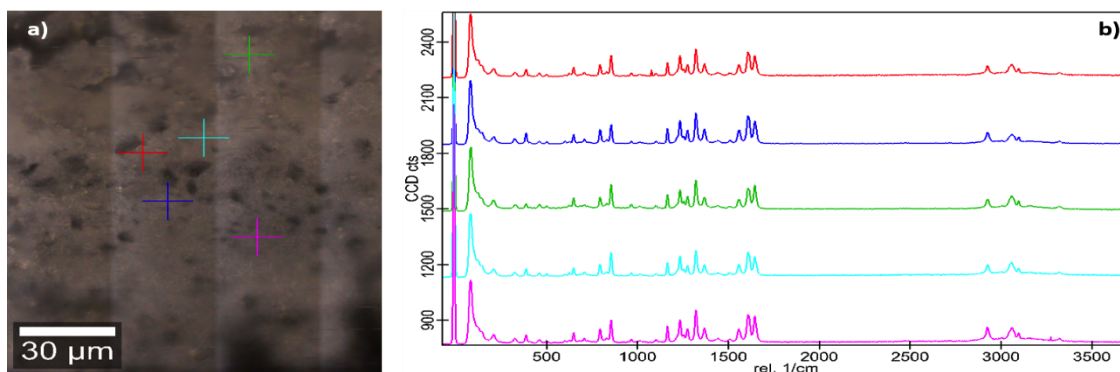


Figura 1.4: a) imagem ótica de um comprimido de Paracetamol; b) espectro de Raman do Paracetamol retirados em vários sítios do comprimido.

1.2.5. Síntese do Paracetamol

O Paracetamol pode ser obtido:

- a) Pela reação do *a*-Aminofenol (4-AF) com o anidrido acético. Nesta reação, o 4-aminofenol reage com o anidrido acético, formando o ácido acético e o Paracetamol.⁵³

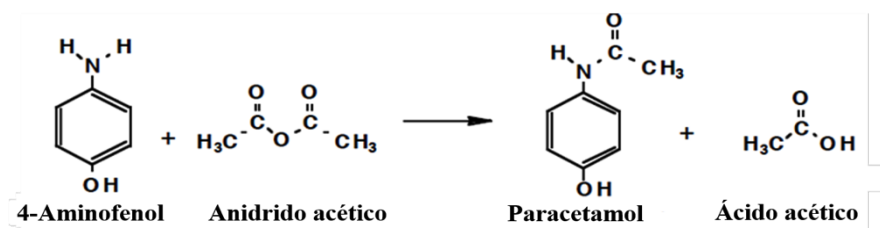


Figura 1.5: Síntese do Paracetamol a partir do 4-AF.⁵³

- b) A partir do nitrobenzeno, reação de redução com zinco metálico na presença de cloreto de amônio. Neste processo, o nitrobenzeno é submetido a uma reação de redução com zinco metálico na presença de cloreto de amônio, um procedimento que leva à formação do sólido instável N-fenil-hidroxilamina, imediatamente

tratado com uma solução de ácido sulfúrico para obtenção do 4-Aminofenol.⁵⁴ No final, a extração do 4-Aminofenol da solução aquosa é conduzida com anidrido acético isolando-se o Paracetamol.⁵⁴

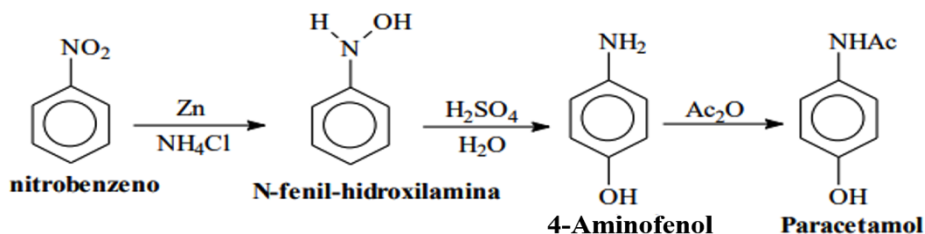


Figura 1.6: Síntese do Paracetamol a partir do nitrobenzeno.⁵⁴

1.2.6. O 4-Aminofenol

O 4-aminofenol (4-AF) ou ρ -aminofenol, além de ser um reagente para a produção de paracetamol, é o principal produto da sua degradação hidrolítica. Pode estar presente em formulações farmacêuticas de Paracetamol como intermediário sintético ou como produto de degradação.⁵⁵

A hidrólise do Paracetamol (figura 1.7) constitui a sua principal rota de degradação e leva à produção do 4-AF e do ácido acético. Esta reação de hidrólise pode ser catalisada utilizando ácidos ou bases.⁵⁶

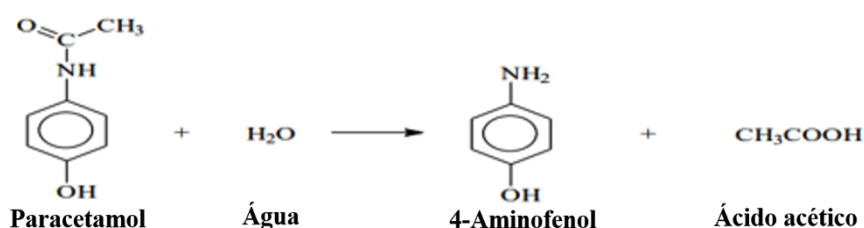


Figura 1.7: Reação de hidrólise do Paracetamol.⁵⁶

O 4-AF é relatado como tendo nefrotoxicidade e efeitos teratogênicos significativos,⁵⁷ sendo assim limitado ao baixo nível de 50 ppm (0,005%) em formulações farmacêuticas pelas Farmacopeias da Europa, dos Estados Unidos e Chinesa,⁵⁸⁻⁶⁰ garantindo desta forma a segurança do fármaco Paracetamol. Os limites para outras impurezas do Paracetamol como por exemplo o nitrobenzeno, a N-fenil hidroxilamina, a fenacetina e a dulcina,⁵⁴ geralmente não são prescritos para produtos, uma vez que estes não são originários da degradação e sua quantidade é limitada na substância por farmacopeias.⁶¹ Sabe-se que, a

espectrofotometria,⁶² cromatografia líquida,⁶³ eletroforese capilar convencional,⁶⁴ análise por injeção de fluxo,⁶⁵ e eletroquímica,⁶⁶ têm sido as técnicas mais utilizadas para a determinação do 4-AF em comprimidos de Paracetamol. Entretanto, a maioria dos procedimentos acima indicados são demorados, caros e necessitam de mão de obra especializada. Portanto, a utilização da espectroscopia de Raman acoplada à microscopia confocal pode ser uma mais valia pois é uma técnica rápida, não destrutiva e sem necessidade de tratamento prévio das amostras, podendo determinar simultaneamente o 4-AF e o Paracetamol em comprimidos, investigar a estabilidade do Paracetamol, análise farmacêutica e controlo de qualidade.

1.3. Efeito da variação das condições de armazenamentos de fármacos ao nível da alteração das suas propriedades

A estabilidade de um produto farmacêutico pode ser definida como a capacidade de uma formulação específica, num dado sistema (ex.: recipiente ou cápsula), permanecer dentro das suas especificações físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas.^{67,68} A qualidade dos produtos farmacêuticos pode ser afetada por diversos fatores, como a estabilidade do(s) ingrediente(s) ativo(s), potencial interação entre ingrediente(s) ativo(s) e excipientes, processo de fabricação, sistema de embalagem, condições ambientais encontradas durante o transporte, armazenamento e uso, e o período de tempo entre a fabricação e o uso.^{67,69}

A exposição a condições ambientais, como temperatura, humidade, luz solar, pH e oxigénio afetam a taxa e a extensão da degradação química da droga. Além da decomposição química (hidrólise, oxidação, isomerização, polimerização, degradação fotoquímica) dos fármacos e/ou excipientes, podem sofrer alterações físicas na forma de comprimidos, tais como alterações na sua dureza, friabilidade, desintegração e/ou a taxa de dissolução podem levar à alteração da aparência física e/ou modificar a biodisponibilidade da droga.⁷⁰

Um dos exemplos da degradação química dos fármacos é a alteração por hidrólise. Sabe-se que diversos fármacos possuem na sua constituição grupos amida ou éster, tornando-os mais propensos a sofrer hidrólise.⁷¹ Esta alteração pode ocorrer em meio aquoso ou por ação da humidade nos comprimidos.⁷² Como exemplos de fármacos que podem sofrer este tipo de alteração, incluem-se os antibióticos, anestésicos, vitaminas e barbitúricos.⁷³

Na hidrólise de uma amida (figura 1.8), normalmente há a formação do ácido carboxílico e de uma amina.

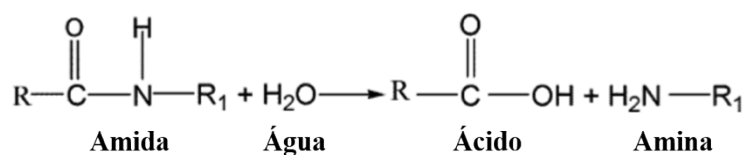


Figura 1.8: Hidrólise de uma amida.

Quanto a degradação física, pode-se citar como exemplo a absorção de humidade. A absorção de humidade durante a fase de armazenamento pode afetar a estabilidade física do medicamento, levando a alterações no seu aspeto e na taxa de dissolução. A capacidade de um comprimido absorver água depende das propriedades físicas, tanto do princípio ativo como dos excipientes. Por exemplo, a absorção de moléculas de água pelos cristais de aspirina é extremamente elevado devido à presença de excipientes hidrofílicos na sua formulação.⁷¹

1.4. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram a utilização da espectroscopia de Raman acoplada à microscopia confocal para a caracterização de fármacos e a identificação de contaminantes em comprimidos comerciais de Paracetamol, como por exemplo, comprimidos de Ben-U-ron (1 g). Em particular, os comprimidos com impurezas foram submetidos a estímulos externos tais como temperatura e humidade variáveis e exposição solar, mimetizando condições de armazenamento de comprimidos, a fim de avaliar a presença de impurezas e algumas alterações físicas ou químicas que possam ter ocorrido.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais e reagentes

- ✓ Paracetamol (Sigma-Aldrich, fórmula química: $C_8H_9NO_2$, massa molecular: 151,163 g/mol, 98% de pureza)
- ✓ Ben-U-ron (Bene Farmacêutica, Lda)
- ✓ 4-aminofenol (Sigma Aldrich, formula química: C_6H_7NO , massa molecular: 109,14 g/mol, 98% de pureza)
- ✓ Cadinho e almofariz
- ✓ Balança analítica
- ✓ Espátula
- ✓ Pinça
- ✓ Prensa
- ✓ Etanol destilado
- ✓ Água destilada

2.2. Medicamento utilizado

Neste estudo foram utilizados comprimidos de Ben-U-ron (Bene Farmacêutica, Lda.), adquiridos na farmácia, apresentando uma cor branca com um formato oval, com massa aproximadamente igual a 1,2 g. O princípio ativo do Ben-U-ron é o Paracetamol. Cada comprimido contém 1 g de Paracetamol, representando cerca de 83% da massa, os restantes 17% são excipientes. Conforme a Bula estes outros componentes são: povidona, amido de milho, talco, ácido esteárico, sílica coloidal hidratada e carboximetilamido de sódio. Para confirmar as características do produto adquirido, foram realizadas análises espectroscópicas como ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho (FTIR), espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis) e Raman.

2.3. Preparação dos comprimidos

Foram preparadas diversas amostras, sendo elas, controlo (0%), 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1% e 10%, onde as percentagens referem-se às diferentes quantidades de 4-AF. Para a obtenção de comprimidos com 200 mg, moeu-se os comprimidos de Ben-U-ron num almofariz de ágata, onde em seguida se fez a sua pesagem numa balança analítica. O 4-AF foi

adicionado posteriormente. A tabela abaixo indica os valores pesados para a preparação de cada comprimido.

Amostras	Paracetamol (mg)	4-AF (mg)
Controlo (0%)	200	0
10%	180	20
1%	198	2
0,50%	199	1
0,10%	199,8	0,2
0,05%	199,9	0,1

Tabela 2.1: Valores das massas pesados para a preparação de cada comprimido.

Introduziu-se o molde com a amostra no centro da prensa (esta é constituída pelo pistão, dois discos, a parte de cima do molde e a base), e aplicou-se uma pressão de 8 toneladas durante 2 minutos. Aliviou-se a pressão para retirar o comprimido da prensa e guardou-se os comprimidos em papel de alumínio, no escuro. A figura 2.1, mostra uma prensa hidráulica manual idêntica à utilizada para a preparação dos comprimidos. Fez-se 3 réplicas do comprimido Ben-U-ron.



Figura 2.1: Prensa hidráulica usada para preparação de comprimidos.⁷⁴

Para o estudo da influência da presença do 4-AF (impureza) na preparação do comprimido de Ben-U-ron, prepararam-se vários comprimidos de Ben-U-ron com a adição de 4-AF em diferentes quantidades, sendo estas: 10%, 1%, 0,5%, 0,1% e 0,05%. Fez-se três réplicas por cada quantidade. A figura a seguir ilustra as fotografias dos comprimidos de Ben-U-ron preparados por compressão com 8 toneladas com a adição de 4-AF.



Figura 2.2: Comprimidos de Ben-U-ron preparados por compressão com a adição de 4-AF em diferentes quantidades.

2.4. Instrumentação

Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR): A espectroscopia no infravermelho foi utilizada para caracterizar os compostos individuais de Paracetamol e 4-AF. As amostras foram misturadas com KBr, num almofariz de ágata na proporção de 1:100 (m/m), colocadas num molde e prensadas para a produção de uma pastilha transparente. Os comprimidos preparados anteriormente foram analisados por Refletância Total Atenuada (ATR) do infravermelho. Os espectros de infravermelho foram obtidos num Bruker Optics Tensor 27 spectrometer acoplado a uma célula horizontal de Refletância Total Atenuada, utilizando 256 scans, resolução 4 cm^{-1} , no modo de transmitância. É de referir que o KBr não absorve radiação infravermelha, logo, as únicas linhas espectrais a aparecer serão do composto em análise.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN): A técnica de RMN aplicou-se para a elucidação estrutural dos constituintes das amostras. Os espectros foram registados no espectrómetro de Ressonância Magnética Nuclear, BRUKER AVANCE III - 300 MHz, 7,1 Tesla. As amostras foram preparadas em tubos apropriados, compatíveis com a frequência do equipamento (300 MHz) e com diâmetro de 5 mm. Na preparação da amostra, usou-se cerca de 2 mg Paracetamol como soluto e 2 mL acetona deuterada (D_6) como solvente, tendo ficado completamente dissolvida a mistura. O mesmo procedimento foi efetuado com o 4-AF como soluto. Em seguida, as amostras foram entregues em fase líquida, devidamente identificadas para a análise no espectrómetro.

Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis): Os espectros de UV-Vis do Paracetamol e do 4-AF foram obtidos num espectrômetro de marca GBC, modelo CINTRA 303. Modo-Absorbance, BW (bandwidth)-2nm, Gama-900 a 190 nm, data pitch-0.48nm, scan speed-200 nm/min. A técnica de UV-Vis foi aplicada na determinação de transições eletrônicas entre orbitais dos compostos de Paracetamol e de 4-AF. Pesou-se cerca de 100 mg de Paracetamol para um copo, adicionou-se alguns mL de metanol (cerca de 10 mL) até dissolver, transferiu-se para um balão de 250 mL e diluiu-se com 10 mL de água. Em seguida, a solução foi colocada numa célula de quartzo, que por sua vez foi introduzida no espectrômetro para a obtenção do sinal. O mesmo procedimento foi efetuado com a amostra de 4-AF.

Espectroscopia de Raman: Utilizou-se a espectroscopia de Raman para a caracterização do Paracetamol e do 4-AF como impureza. As amostras analisadas por espectroscopia de Raman não receberam nenhum tipo de pré-tratamento, visto que esta técnica não necessita do tratamento. A imagiologia de Raman foi realizada, utilizando um microscópio confocal Raman-AFM-SNOM combinado WITec alpha 300 RAS⁺, com um laser com um comprimento de onda a 532 nm (Nd: YAG), potência de 1 mW e 5 mW. A figura 3.3 ilustra o monitor duplo usado na obtenção dos espectros e imagens de Raman para a realização deste trabalho.

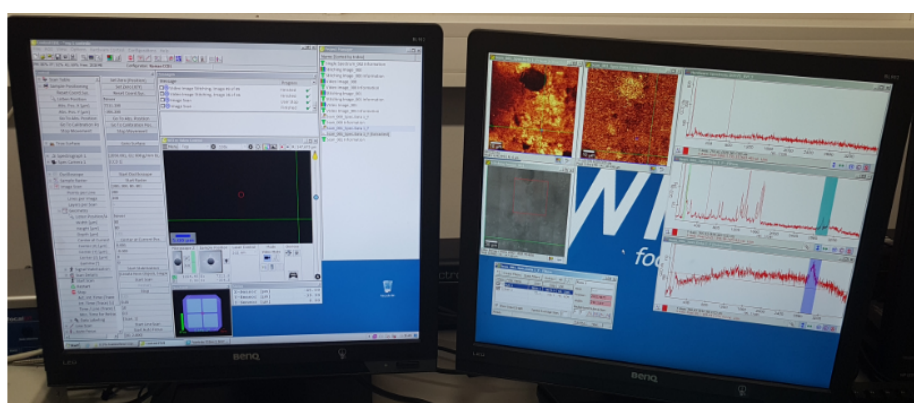


Figura 2.3: Monitor duplo demonstrando a área de trabalho e o programa utilizado para a aquisição dos espectros e mapeamento de Raman e consequente tratamento de dados.

Os mapeamentos de Raman foram adquiridos tirando 200 x 200 espectros de Raman em áreas pequenas com o tamanho de 80 μm x 80 μm e 400 x 400 espectros de Raman em áreas maiores de 2mm x 2mm. O tempo de integração para cada espectro de Raman na área pequena foi de 0.1 s (aproximadamente 60 min) com a objetiva de 100x e 0.05 s para áreas maiores (aproximadamente 90 min) com a objetiva de 10x. O software WITec, WITec Project 5.0 (WITec, Ulm, Alemanha), foi usado para criar as imagens de Raman onde se integrou as áreas das bandas 93 cm^{-1} para o Paracetamol, 112 cm^{-1} para o 4-AF, 2921 cm^{-1} para o amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio.

Os espectros de Raman do Paracetamol, 4-AF e do amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio obtidos para cada comprimido foram utilizados para criar imagens combinadas, usando a ferramenta Analyze do software Projeto5+ (WITec). As imagens de Raman mostrando uma escala de cores foram criadas usando a integração das áreas das bandas de Raman, nas quais o valor da área absoluta sob uma banda corresponde a uma intensidade de cor na escala mostrada na imagem nos respectivos pixels.

Durante a elaboração deste trabalho, dois softwares foram utilizados frequentemente, sendo eles, o OriginPro 8 que foi usado para a construção dos gráficos e o ImageJ que foi usado para o processamento dos dados estatísticos dos comprimidos, demonstrando deste modo a distribuição da quantidade do princípio ativo, dos excipientes e das impurezas nos comprimidos de Paracetamol. As imagens combinadas e os mapas dos respectivos compostos foram utilizados na tentativa de calcular estatisticamente a quantidade dos excipientes e do princípio ativo em cada comprimido, utilizando o software ImageJ. Os cálculos para processamento dos dados estatísticos foram efetuados com os mapas de Raman dos comprimidos de Ben-U-ron, utilizando o ImageJ® criando deste modo as imagens de Raman a preto e branco, e de seguida retirou-se a percentagem de uma das cores correspondente a um dos componentes do comprimido.

Medidas de compressão: Foram efetuados testes de dureza dos vários comprimidos de Ben-U-ron em conjuntos de 3 réplicas. Estas medidas de compressão consistem em submeter os comprimidos a uma força necessária para quebrá-los sob compressão diametral (figura 2.4). O teste de dureza foi realizado utilizando o equipamento de marca Shimadzu, modelo: atualização AG-25TA; que efetua os testes de Tração, Compressão e

Dobra; Células: 250 KN, 20 KN e 1 KN; Ano de compra: anterior a 1998. A força é medida em Newton (N).

A monitorização da dureza do comprimido é importante, visto que comprimidos pouco duros podem se desintegrar, fraturar ou quebrar durante o armazenamento, transporte e manuseamento anterior ao consumo. Na preparação dos comprimidos, a fluidez e compressibilidade dependem especialmente das propriedades dos excipientes presentes na mistura.⁷⁴ A seleção do excipiente adequado, ou a combinação de excipientes, é a base de todo o estudo da pré-formulação. Por causa da influência do tamanho do comprimido na força necessária ao seu esmagamento, é comum calcular-se a resistência de tensão dos comprimidos utilizando a equação abaixo.⁷⁴

$$T_s = \frac{2 F}{\pi d v}$$

Onde F é a força de rutura, d é o diâmetro da pastilha e v é a sua espessura.

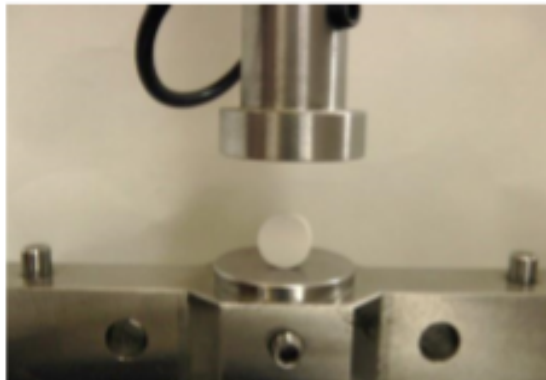


Figura 2.4: Posição correta do comprimido entre as garras do instrumento.⁷⁴

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização do Paracetamol em pó (comercial)

A figura 3.1 apresenta o espectro de infravermelho, obtido para o Paracetamol comercial em pó. Foram atribuídos para o alongamento de (O-H) e (CH₃) as bandas correspondentes aos números de onda 3323 e 3037-3130 cm⁻¹, respetivamente. Por volta de 1651 cm⁻¹ constata-se uma banda intensa, correspondente a dupla ligação referente ao grupo carbonilo (C=O). Entre 1617 e 1323 cm⁻¹, observam-se bandas correspondentes às deformações no anel aromático. A banda a 1230 cm⁻¹ corresponde ao alongamento C-N (aril). Os picos observados a 1171 e 969 cm⁻¹ foram atribuídos ao alongamento C-O e alongamento C-N (amida), respetivamente. Os picos vibracionais a 838 e 514 cm⁻¹ foram atribuídos ao anel aromático para-substituído e à deformação fora do plano do anel fenil, respetivamente.⁷⁵⁻⁷⁷

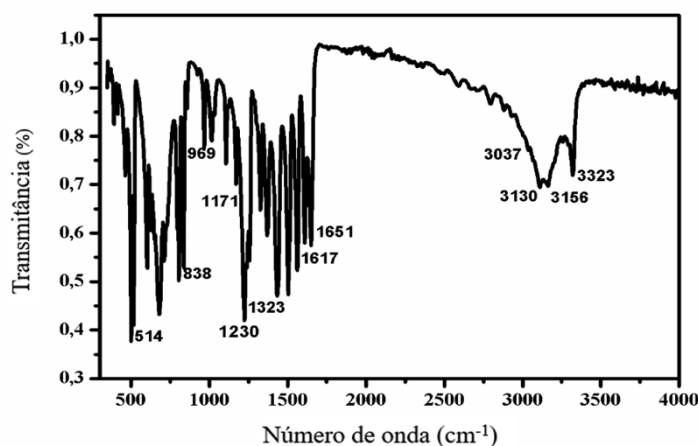


Figura 3.1: Espectro FTIR de Paracetamol comercial em pó.

A figura 3.2 apresenta o espectro de absorção do Paracetamol puro comercial, na região do ultravioleta-visível. O espectro de absorção do composto de Paracetamol em metanol, na região do UV, evidenciou uma banda de absorção com um comprimento de onda máximo a 244 nm. Esta banda de absorção é característica da transição eletrônica n-π* do grupo C=O do Paracetamol.⁷⁸

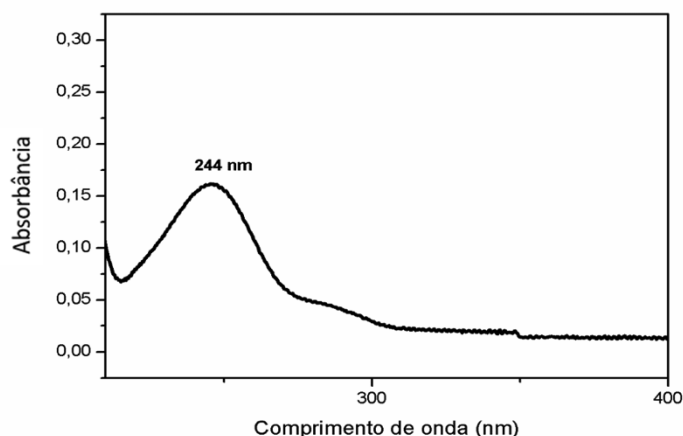


Figura 3.2: Espectro UV-Vis do Paracetamol comercial.

A figura 3.3 ilustra o difractograma de Raio-X do Paracetamol comercial e o padrão de raio-x da fase monoclinica. O Paracetamol exibe 3 polimorfos sendo o mais estável, à temperatura ambiente, o Paracetamol com fase monoclinica. Tendo isto em consideração, os difractogramas apresentados na figura 3.3 são semelhantes em posição e número de picos, mas existem algumas diferenças importantes nas intensidades relativas em alguns destes picos, tais como os picos a 14°, 18°, e 26°. Estas variações de intensidades dos picos a baixo ângulo podem indicar diferenças na cristalinidade, tamanho da partícula e orientação preferencial.⁷⁹

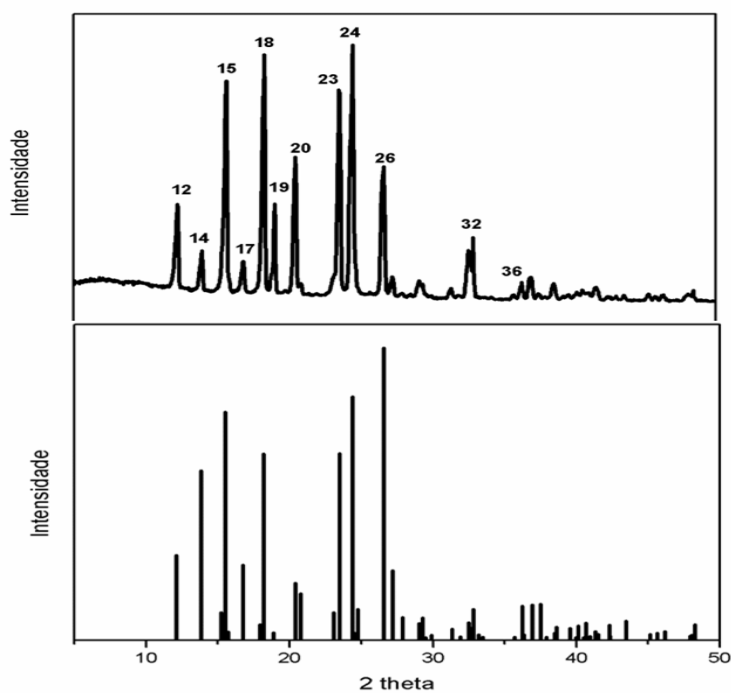


Figura 3.3: Difractograma de Raio-X do Paracetamol na Fase Monoclinica.

O espectro de RMN ^1H do Paracetamol (figura 3.4) apresenta cinco sinais. O hidrogénio (A) apresentou o valor mais alto de desvio químico por estar ligado ao azoto, e este por sua vez ligado ao grupo $\text{C}=\text{O}$ formando o grupo amida, tendo sido verificado um singlete. O hidrogénio (B) está diretamente ligado ao oxigénio, ou seja, o OH está diretamente ligado ao anel aromático, o que resultou num singlete. Observou-se para o hidrogénio (C) um duplete e para o hidrogénio (D) também um duplete. Para o hidrogénio (E), o carbono por estar ligado a três átomos de hidrogénio, atribuiu-se ao pico com maior intensidade e o valor mais baixo de desvio químico, formando assim um singlete.⁸⁰ A atribuição dos valores dos hidrogénios do Paracetamol estão ilustradas na tabela 3.1.

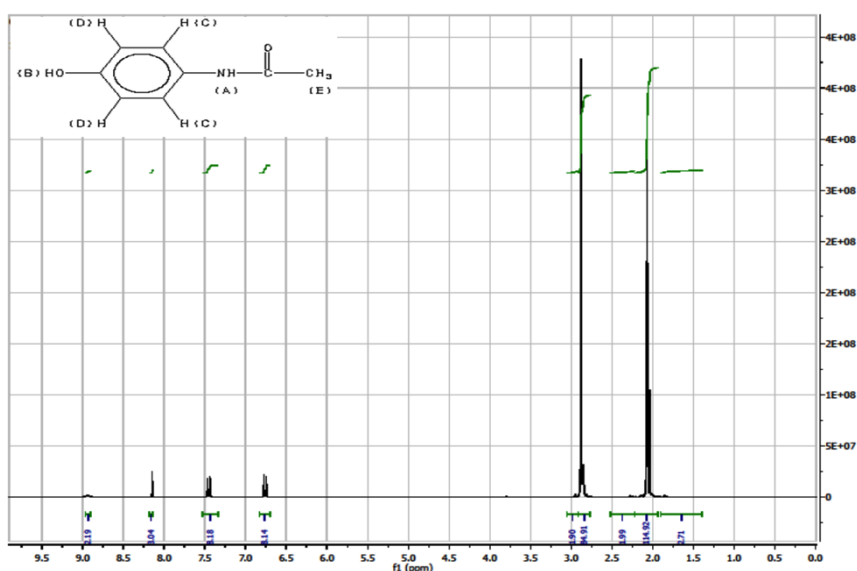


Figura 3.4: Espectro RMN de ^1H do Paracetamol e respetiva estrutura molecular.

Tipo de protão	Desvio químico aproximado (ppm)
A	8.9
B	8.2
C	7.4
D	6.7
E	2.1

Tabela 3.1: Tabela dos valores aproximados de desvio químico de RMN do ^1H para Paracetamol.

A figura 3.5 ilustra o espectro de Raman do Paracetamol comercial e a tabela 3.2 representa os modos de vibração associados aos respetivos picos. O espectro é semelhante ao relatado na literatura.^{51,52} Os picos com maior intensidade verificam-se em 89 cm^{-1}

atribuído à deformação (γ) C-CH₃, em 859 cm⁻¹ atribuído à elongação (ν) do anel aromático, a elongação da ligação C-N (carbono do anel aromático) corresponde à banda 1234 cm⁻¹, para a banda de 1322 cm⁻¹ verificou-se a deformação angular (δ) do anel aromático, por volta de 1608 cm⁻¹ concedeu-se à elongação C=C e deformação angular O-H. Verificou-se duas bandas distantes e com maior número de onda, por volta de 2928 e 3064 cm⁻¹ foram atribuídos à elongação simétrica CH₃ e à deformação angular do grupo metil (CH₃), respetivamente.

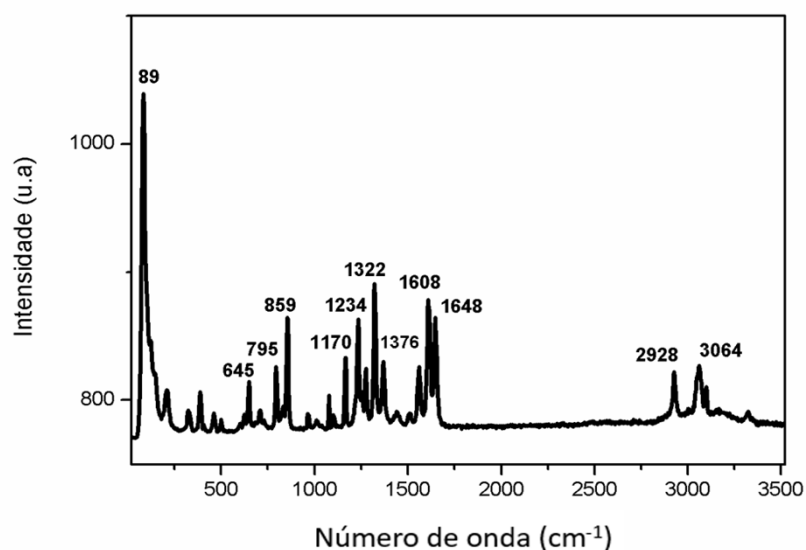


Figura 3.5: Espectro Raman do Paracetamol.

Nº de Onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibração
89	Deformação (γ) C-CH ₃
645	Deformação (γ) C-C (arilo)
795	Deformação (γ) (arilo)
859	Elongação (ν) (arilo)
1170	Elongação (ν) C-H (arilo)
1234	Elongação (ν) C-N (arilo)
1322	Deformação angular (δ) (arilo)
1376	Deformação (γ) (arilo)
1560	Elongação (ν) C-N
1608	Elongação (ν) C=C e deformação angular (δ) O-H
1648	Elongação (ν) C = O
2928	Elongação simétrica (ν) CH ₃
3064	Deformação angular (δ) (CH ₃)

Tabela 3.2: Modos de vibração associados aos picos mais intensos do espectro Raman de Paracetamol comercial.^{51,52}

3.2. Caracterização do 4-Aminofenol (4-AF) em pó (comercial)

A impureza 4-AF em pó (comercial) adquirida à Sigma-Aldrich foi caracterizada utilizando diversas técnicas.

A figura 3.6 apresenta o espectro de infravermelho, obtido para o 4-AF. A banda a 1238 cm^{-1} foi atribuída à elongação linear do C-N, a elongação C=C do anel aromático atribuiu-se ao pico observado a 1507 cm^{-1} . Para a elongação linear (ν) dos C-H do anel aromático, foram atribuídas as bandas entre 2593 e 3029 cm^{-1} , identificou-se dois picos a 3340 e 3282 cm^{-1} atribuídos à elongação linear (ν) N-H. O pico característico do O-H, que previa que deveria aparecer como um pico fraco em 3633 cm^{-1} não é obviamente visto devido ao pico forte sobreposto em N-H.⁸¹

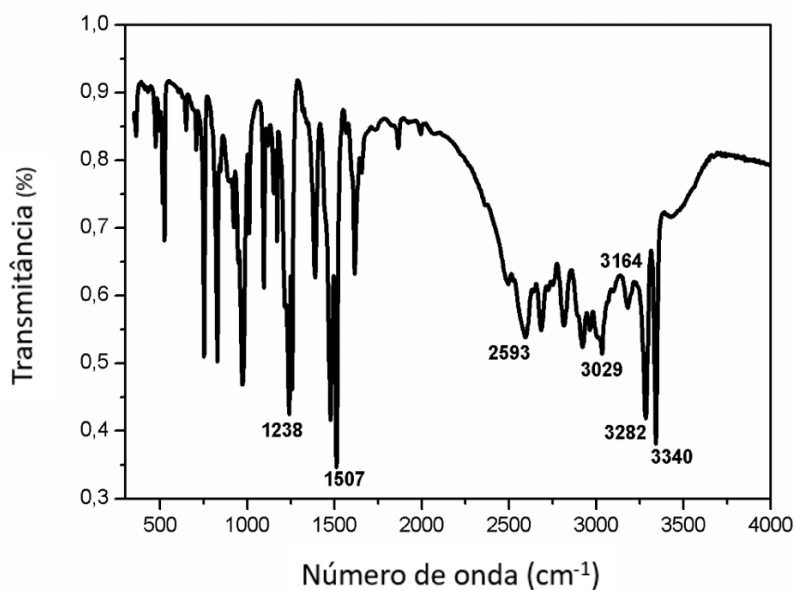


Figura 3.6: Espectro FTIR de 4-AF.

O espectro de UV-Visível (figura 3.7) de 4-AF, evidenciou uma banda de absorção com um comprimento de onda máximo a 227 nm . O grupo NH_2 ligado ao anel benzeno indica a existência de um par de elétrons não emparelhado que pode entrar em conjugação com o anel benzeno.⁸² A banda de absorção situada em 227 nm resulta de transições π para π^* do anel aromático.⁸²

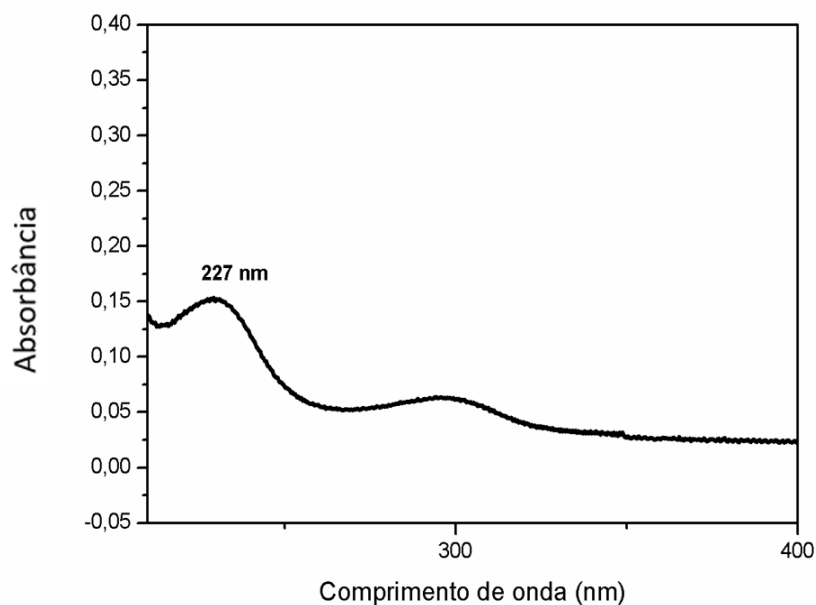


Figura 3.7: Espectro UV-Vis de 4-AF.

A figura 3.8 representa o espectro de RMN ^1H do 4-AF e a sua respetiva estrutura. Para o hidrogênio (A), o grupo (-OH) está diretamente ligado ao anel aromático, tendo apresentado o maior valor de desvio químico, originando um singlete. Observou-se para o hidrogênio (B) um duplete e este, por se encontrar mais próximo do grupo (-OH), foi atribuído o valor mais próximo ao protão (A). Tendo sobrado apenas o protão (C) dentro do anel aromático, que também gerou um duplete, atribuiu-se o valor mais próximo e menor do que o do protão (B). Verificou-se para o hidrogênio (D) a formação de uma amina primária (-NH₂), gerando um singlete com maior intensidade em relação aos outros protões.^{80,83} Em relação ao hidrogênio (D), na literatura este valor é mais elevado, na ordem dos 4 ppm, mas neste caso obteve-se um valor baixo, talvez seja porque o 4-AF tenha sofrido alguma alteração como a oxidação. A tabela 3.3, ilustra as atribuições dos sinais aos hidrogênios de 4-AF.

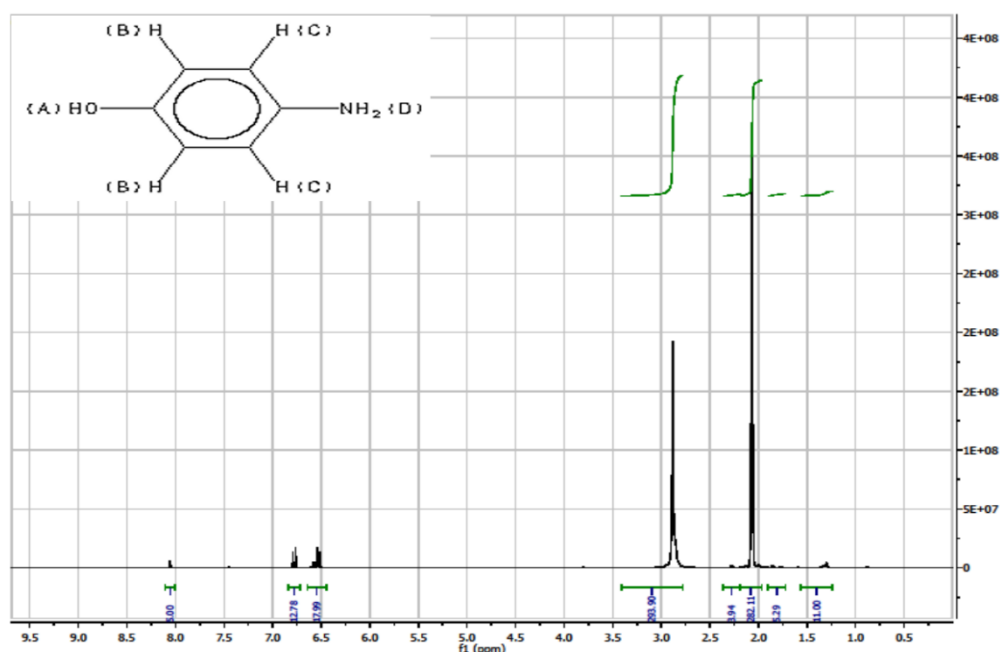


Figura 3.8: Espectro RMN de ^1H do 4-AF.

Tipo de protão	Desvio químico aproximado (ppm)
A	8.08
B	6.75
C	6.58
D	2.1

Tabela 3.3: Tabela dos valores aproximados de desvio químico de RMN do ^1H para 4-AF.

A figura 3.9 ilustra o espectro Raman do 4-AF, seguida da atribuição dos seus modos vibracionais (tabela 3.4). A deformação do anel aromático e a alongação do anel aromático foram atribuídos às bandas 645 e 843 cm^{-1} , respetivamente. A alongação da ligação C-H do anel aromático e C-N foram concedidas às bandas 1162 e 1258 cm^{-1} , respetivamente. A alongação C=C e a deformação N-H deu origem à banda por volta de 1616 cm^{-1} . A região em torno de 3000 e 2680 cm^{-1} é constituída por vários picos fracos sobrepostos e foi atribuído à deformação angular O-H. A alongação C-H foi atribuída a banda de 3064 cm^{-1} . Não foi possível identificar o modo de vibração para a banda 112 cm^{-1} .⁸⁴

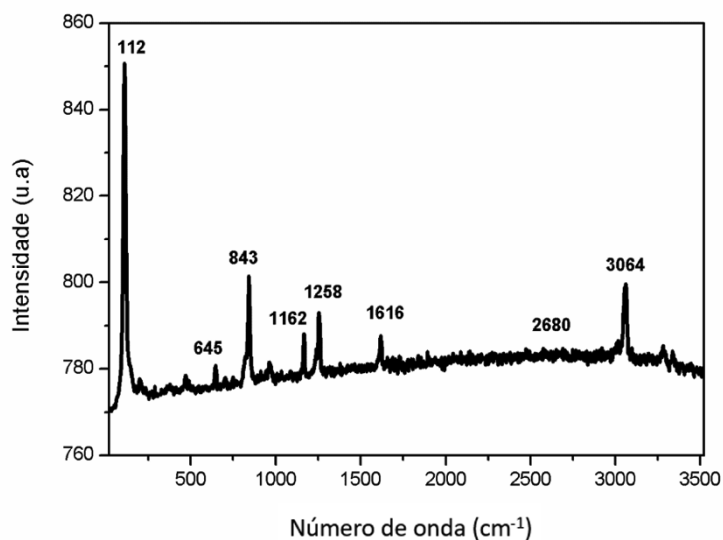


Figura 3.9: Espectro Raman de 4-AF.

Nº de Onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibração
645	Deformação (γ) (arilo)
843	Elongação (ν) (arilo)
1162	Elongação (ν) C-H
1258	Elongação (ν) C-N
1616	Elongação (ν) C=C ou deformação (γ) N-H
3000 e 2680	Deformação angular (δ) O-H
3064	Elongação (ν) C-H (alquilo)

Tabela 3.4: Modos de vibração associados aos picos do espectro Raman de 4-AF.⁸⁴

3.3. Caracterização dos comprimidos de Ben-U-ron

Como foi referido anteriormente, o princípio ativo do Ben-U-ron é o Paracetamol, e os seus excipientes são: polivinilpirrolidona (povidona ou PVP), amido de milho, talco, ácido esteárico, sílica coloidal hidratada e carboximetilamido de sódio. O espectro no infravermelho de Ben-U-ron (figura 3.10), apresenta grande semelhança ao do Paracetamol, pois este constitui 83% em massa do medicamento. Observa-se também novos picos originados pelos modos vibracionais correspondentes aos excipientes. Dentre os excipientes do Ben-U-ron, foi possível confirmar a presença de PVP e do amido de milho. A presença do amido de milho foi confirmada com a presença da banda 3323 cm⁻¹ atribuída à elongação do grupo -O-H e da banda a 3156 cm⁻¹, atribuída à elongação C-H.⁸⁵

O pico correspondente à posição de 1651 cm^{-1} foi atribuído à elongação do grupo C=O e à elongação N-C do PVP.^{86,87} Por esta técnica, não foi possível identificar os componentes da banda em 1718 cm^{-1} .

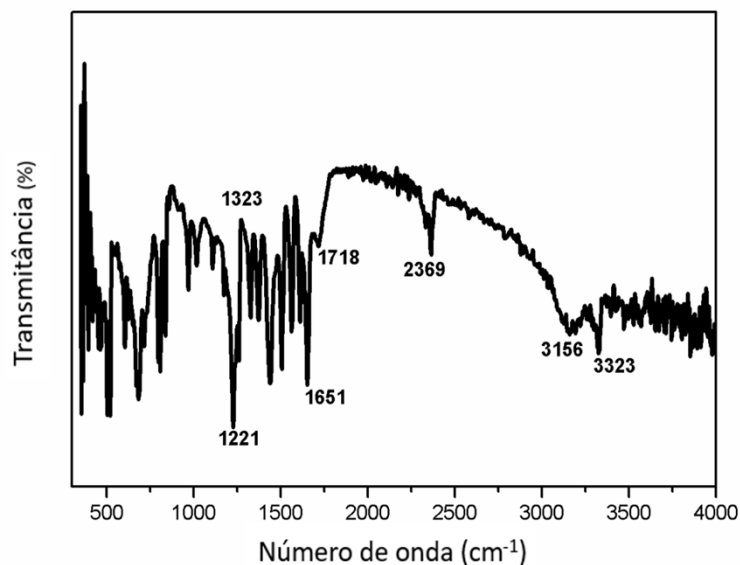


Figura 3.10: Espectro FTIR de Ben-U-ron.

Sabe-se que cada comprimido de Ben-U-ron contém 1g de Paracetamol, constituindo cerca de 83% da massa do comprimido (princípio ativo), os restantes 17% são excipientes. Fez-se o espectro de Raman dos comprimidos de Ben-U-ron e verificou-se que o mesmo se assemelha bastante ao do Paracetamol (figura 3.11).

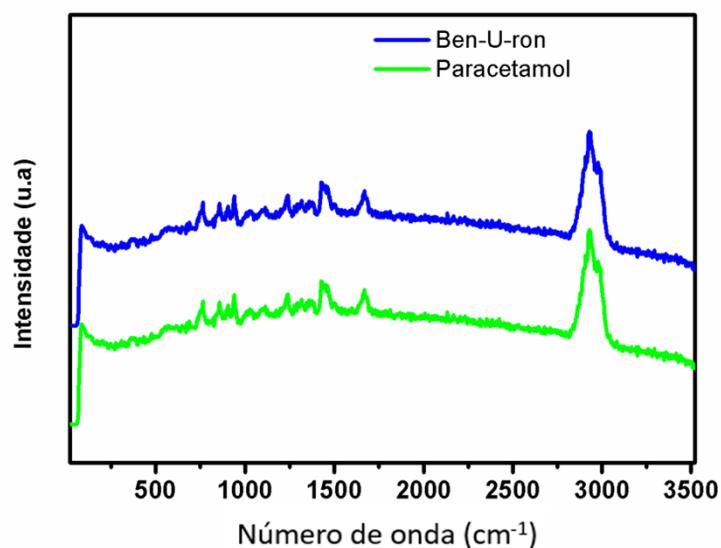


Figura 3.11: Espectro de Raman do Paracetamol (verde) e do Ben-U-ron (azul).

Como não foi possível identificar nenhum dos excipientes do Ben-U-ron no espectro de Raman, recorreu-se à imagiologia de Raman, para se obter a distribuição do Paracetamol e dos seus excipientes na superfície do comprimido.

A Figura 3.12 mostra uma fotografia ótica juntamente com os mapas de Raman em 2D obtidos para o comprimido de Ben-U-ron e o espectro médio dos espectros obtidos pela aquisição do mapeamento de Raman. Os mapas de Raman demonstram a distribuição do Paracetamol (Figura 3.12-b) e dos excipientes amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio (Figura 3.12-c). Estes mapeamentos de alta resolução foram adquiridos pela passagem do laser sobre a superfície do comprimido numa área de $80 \times 80 \mu\text{m}$ (200 pontos por 200 linhas), acumulando um espectro de Raman em cada pixel (num total de 40000 espectros de Raman).

Na figura 3.12-b) conseguiu-se identificar o Paracetamol pela integração da área da banda a 93 cm^{-1} atribuída à deformação C-CH_3^{51} e, na figura 3.12-c) identificou-se o amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio pela integração da área da banda a 2928 cm^{-1} . Sabe-se, pela literatura, que o amido de milho tem uma banda vibracional aos 2909 cm^{-1} e o carboximetilamido de sódio tem uma banda vibracional aos 2924 cm^{-1} (Figura 3.13), sendo que atribuiu-se a banda 2928 cm^{-1} a uma conjugação destas 2 bandas, pois é uma banda bastante larga.⁸⁸⁻⁹⁰

Em maior detalhe, as porções amarelas na Figura 3.12-b) indicam que a banda de Raman do Paracetamol aparece mais intensa, tendo-se assim uma distribuição do Paracetamol na área analisada do comprimido. A porção escura indica uma banda menos intensa do Paracetamol, havendo maior probabilidade de aí se encontrarem os excipientes. A região a 2928 cm^{-1} (Figura 3.12-c) pode estar relacionada ao alongamento simétrico e assimétrico do C-H no amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio,⁸⁸⁻⁹⁰ onde a cor amarela mostra a presença do amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio.

O espectro apresentado na figura 3.12-I representa o espectro médio dos espectros obtidos quando da aquisição do mapeamento de Raman, verificando-se unicamente a presença de Paracetamol.

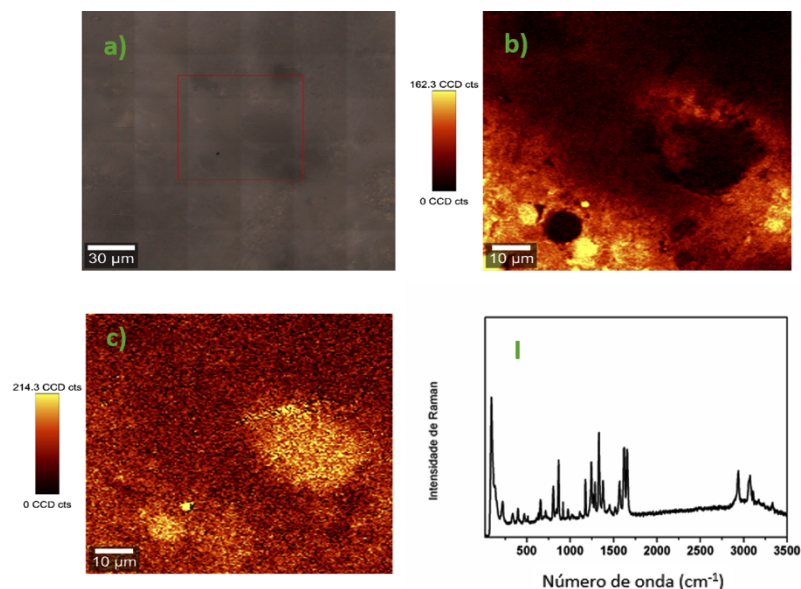


Figura 3.12: a) Imagem ótica com a objetiva de maior ampliação (100x); Mapeamento de Raman obtido usando a integração da área das bandas b) a 93 cm^{-1} do espectro de Paracetamol e c) a 2928 cm^{-1} do espectro do amido de milho/ carboximetilamido de sódio; I- Média de 40000 espectros Raman do comprimido de Ben-U-ron.

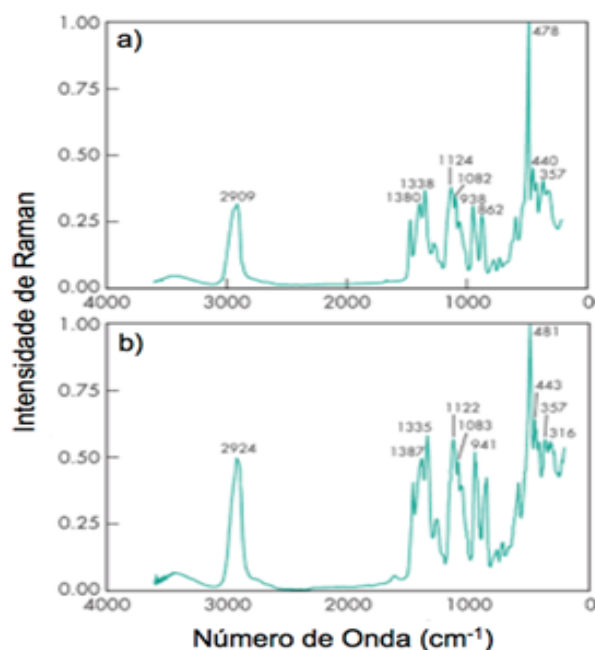


Figura 3.13: Espectros de Raman do a) amido de milho e do b) carboximetilamido de sódio, retirado da literatura.⁹¹

A Figura 3.14 apresenta uma imagem combinada onde evidencia os dois espectros diferentes obtidos no mapeamento do comprimido de Ben-U-ron. O espectro de Raman que corresponde ao Paracetamol está a vermelho e o de amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio está a azul. Na imagem, os pontos azuis significam a presença

do amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio na área monitorizada do comprimido. O vermelho ocupa maior área do comprimido em análise, o que sugere a presença do Paracetamol, em maior quantidade, como princípio ativo do comprimido de Ben-U-ron.

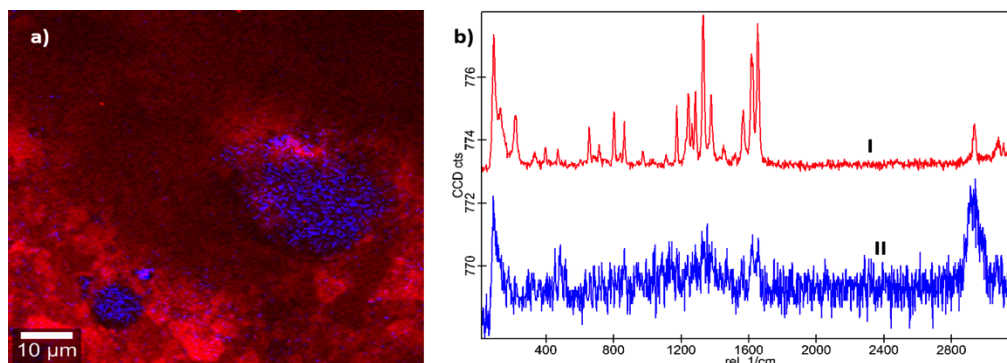


Figura 3.14: a) Imagem de Raman combinada do comprimido de Ben-U-ron; b) Espectros Raman utilizados para a imagem combinada: I-Espectro de Paracetamol (vermelho); II-Espectro de amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio (azul).

3.4. Caracterização dos comprimidos de Ben-U-ron com a adição do 4-AF

Os espectros de infravermelho de Ben-U-ron com a adição da impureza 4-AF com diferentes percentagens (0,5%; 1%; e 10%), apresentam praticamente as bandas de absorção nos mesmos números de onda (figura 3.15), mas a partir do espectro com a adição dos 10% de 4-AF já se consegue observar a existência de uma nova banda em 1090 cm^{-1} , demonstrando a presença de impureza. O 4-AF é o produto da degradação hidrolítica do Paracetamol e pode causar efeitos nefrotóxicos e teratogênicos significativos, sendo detetado em Paracetamol como uma impureza ou intermediário sintético.⁹² Segundo as farmacopeias, a presença de 4-AF é permitida na amostra até o limite máximo de 0,005%,^{59,60} e estando acima desse limite, indica alto grau de impureza, sendo considerada imprópria para a produção de medicamentos. Sendo assim, pode-se dizer que a espectroscopia na região do infravermelho não é uma boa técnica para monitorizar a impureza 4-AF.

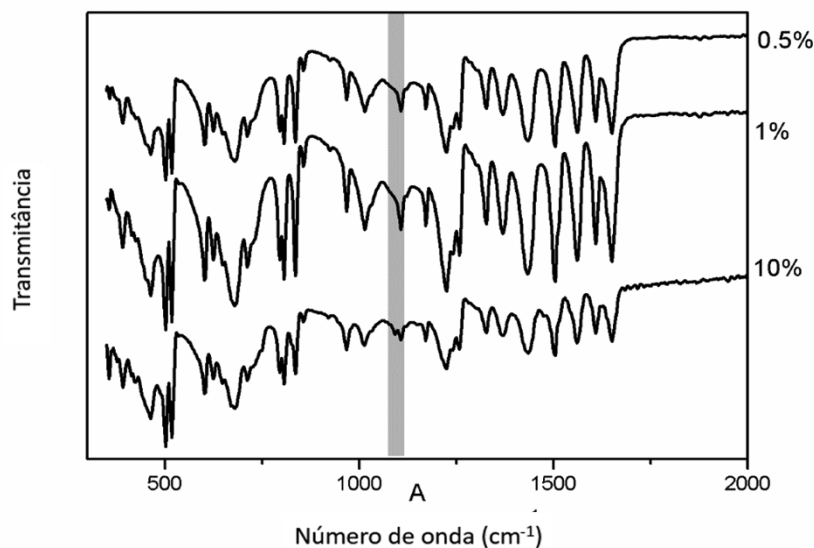


Figura 4.15: Espectro FTIR de Ben-U-ron com 10%, 1% e 0.5% de 4-AF.

Fez-se mapeamento dos comprimidos de Paracetamol com a adição de 10%, 1% e 0,5% de 4-AF (figura 3.16). O Paracetamol foi monitorizado à 93 cm^{-1} e o 4-AF à 112 cm^{-1} , numa área de $80\mu\text{m} \times 80\mu\text{m}$. Para avaliar os comprimidos com 0,1% e 0,05%, verificou-se que no mapeamento de $80\mu\text{m} \times 80\mu\text{m}$ não foi identificado sinal da impureza 4-AF, talvez por se tratar de uma área pequena.

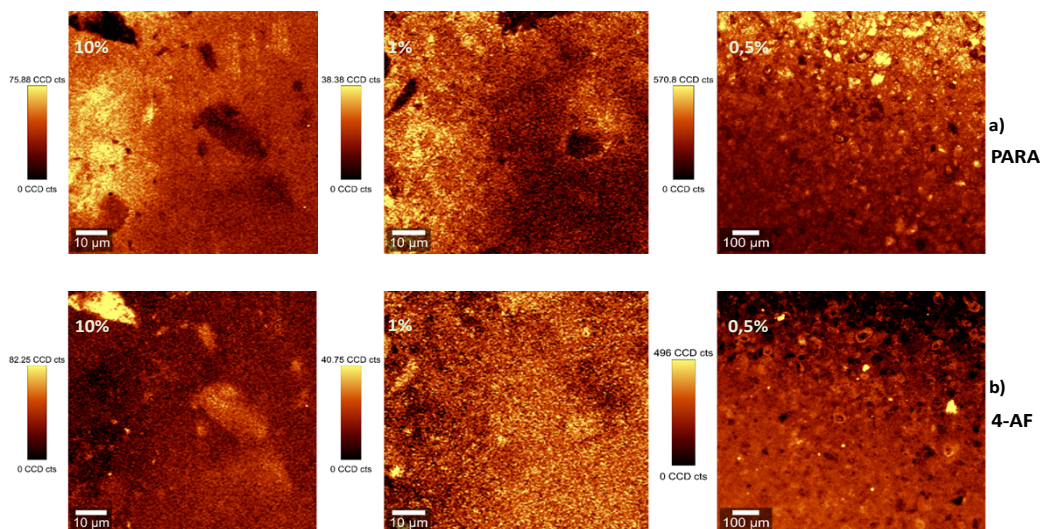


Figura 3.16: Mapeamento de Raman obtido usando integração da área da banda em 93 cm^{-1} no espectro de Paracetamol com 10%, 1% e 0,5% (a); e da banda em 112 cm^{-1} no espectro de 4-AF com 10%, 1% e 0,5% (b).

A Figura 3.17 mostra uma imagem combinada do comprimido de Ben-U-ron com 10% de 4-AF e os seus respetivos espectros de Raman. Na área em análise do comprimido, a cor verde significa a distribuição de 4-AF e o vermelho indica a distribuição do Paracetamol no comprimido. A parte escura é onde a banda do Paracetamol é menos intensa, havendo maior probabilidade de se encontrar os excipientes, tais como amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio.

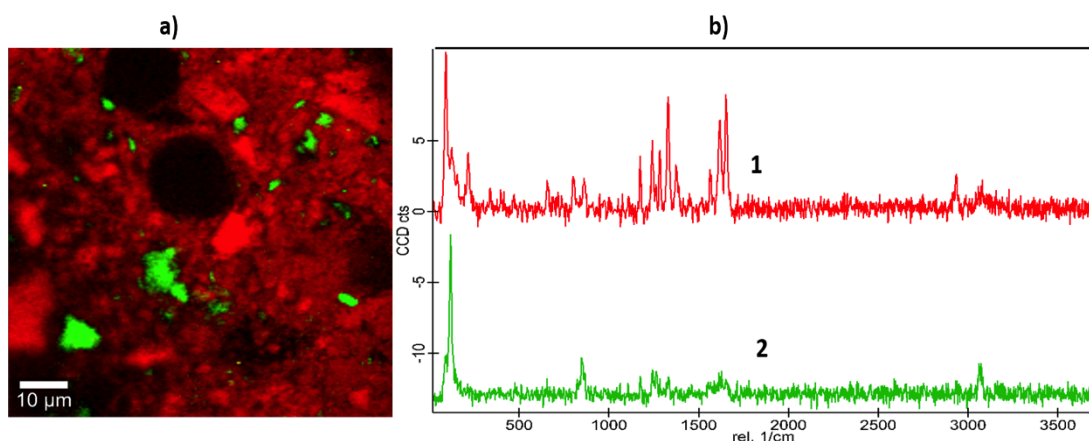


Figura 3.17: a) Imagem combinada de comprimido de Ben-U-ron com 10% de 4-AF; b) Espectros de Raman utilizados para a imagem combinada: 1-Paracetamol (vermelho), 2- 4-AF (verde).

Para avaliar os comprimidos com 0,1% e 0,05% aumentou-se a área para 2000μm x 2000μm com o mesmo número de espectros (40000). Neste mapeamento de área maior, notou-se o sinal de 4-AF. Sendo assim, pode-se dizer que esta técnica pode ser útil para a deteção da impureza 4-AF nos fármacos em quantidades reduzidas, apesar de não detetar quantidades abaixo do limite máximo admissível pelas Farmacopeias que é de 0,005%.⁵⁸⁻⁶⁰ A Figura 3.18 ilustra os espectros de 4-AF (0,1% e 0,05%) e os respetivos mapeamentos de Raman obtidos por intensidade integrada da banda em 112 cm⁻¹ numa área de 2000μm x 2000μm.

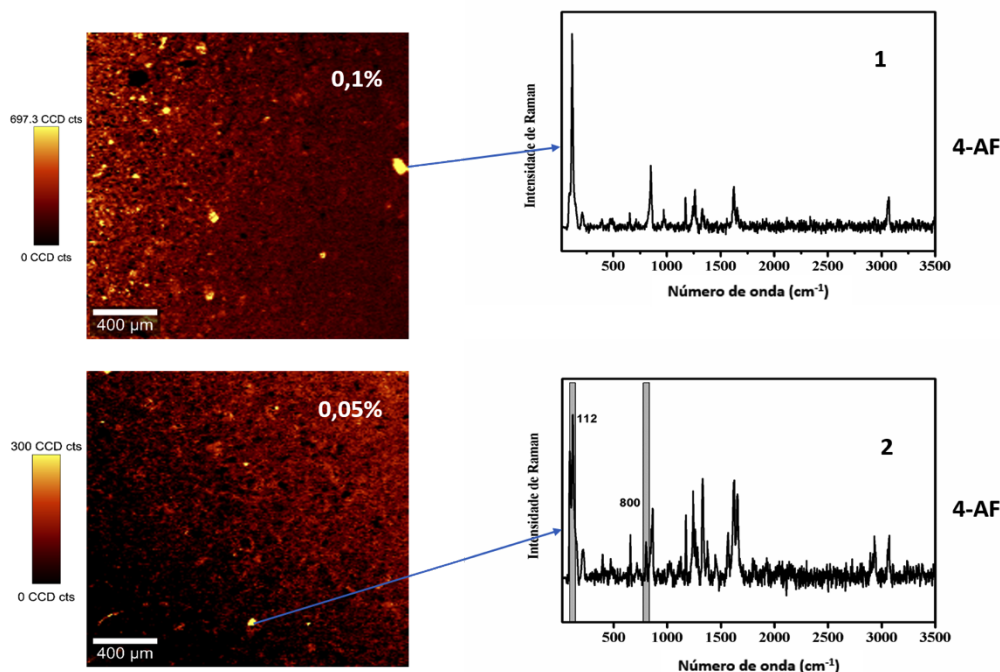


Figura 3.18: 1- Espectro de 4-AF (0,1%) correspondente ao mapeamento de Raman obtido por intensidade integrada da banda em 112 cm^{-1} numa área de $2000\mu\text{m} \times 2000\mu\text{m}$; 2- Espectro de 4-AF (0,05%) correspondente ao mapeamento de Raman obtido por intensidade integrada da banda em 112 cm^{-1} numa área de $2000\mu\text{m} \times 2000\mu\text{m}$.

Depois da caracterização química demonstrada acima, realizou-se uma caracterização física dos comprimidos. Primeiramente analisou-se os comprimidos com 100% de Ben-U-ron (3 réplicas) preparados utilizando 8 Toneladas de pressão, obtendo-se um valor para uma força máxima de $49 \pm 10\text{ N}$ para quebrar os comprimidos e uma resistência de tensão de $17 \pm 9\text{ N/mm}^2$. Encontra-se descrito na literatura que uma força máxima menos de 50 N não é considerada satisfatória para quebrar comprimidos de Paracetamol.⁹³ O valor obtido para os comprimidos preparados fica no limite do satisfatório, não sendo o método de preparação utilizado o mais indicado para este tipo de medicamento. Realizou-se o mesmo teste para comprimidos de Ben-U-ron comerciais previamente retirados da caixa e obteve-se uma força de $142 \pm 6\text{ N}$ para quebrar o comprimido e uma resistência de tensão de $2 \pm 0\text{ N/mm}^2$. O valor de força máxima encontra-se nos valores reportados na literatura para comprimidos comercializados de Paracetamol.^{93,94}

Para validar o método de compressão utilizado para preparar os comprimidos estudados nesta dissertação, diferentes pressões foram utilizadas para a prensagem dos comprimidos de Ben-U-ron (2T, 4T, 6T e 8T). Os valores para a força máxima necessária para quebrar o comprimido e a resistência de tensão para os diversos comprimidos estão apresentados na

Figura 3.19. Pelos gráficos, verificou-se que os comprimidos prensados com uma força de 4 T apresentam o maior valor de força máxima para quebrar os comprimidos, sendo este valor acima dos 50N. Este resultado indica-nos que os comprimidos mais estáveis em termos físicos, de adoção e desintegração seriam os comprimidos preparados com 4T, contudo os estudos seguintes foram realizados em comprimidos prensados a 8T.

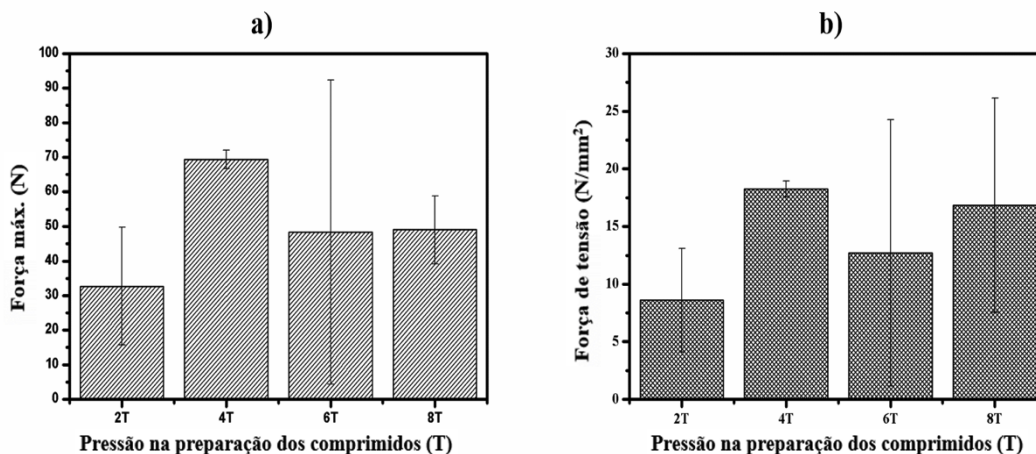


Figura 3.19: Medidas de compressão de diferentes pressões exercidas nas preparações dos comprimidos de Ben-U-ron com 0% de 4-AF.

A figura 3.20 ilustra os valores da força máxima necessária para quebrar o comprimido e a resistência de tensão dos comprimidos de Ben-U-ron com diferentes quantidades de 4-AF, sendo 0,05%, 0,5%, 1% e 10%.

Pode-se notar que os comprimidos com quantidades de 4-AF acima de 0,5% apresentam os valores da força máxima necessária para quebrar o comprimido superior a 50N, ou seja, segundo a literatura, os resultados obtidos podem ser considerados satisfatórios.⁹³ Vale dizer que, apesar desses comprimidos serem considerados satisfatórios, possuem uma certa quantidade de impurezas, o que não é bom para a saúde humana, e que as mesmas impurezas contribuem no aumento da dureza da formulação mesmo numa percentagem mínima.

Em mais detalhe, para os comprimidos com 0,5% de 4-AF, o valor da força máxima necessária para quebrar o comprimido foi de 55 ± 10 N/mm² e uma resistência de tensão de 15 ± 3 N/mm², com 1% de 4-AF obteve-se o valor de 66 ± 7 N/mm² para força máxima e a sua resistência de tensão de 17 ± 2 N/mm², com 10% de 4-AF, o valor da força máxima necessária para quebrar o comprimido foi de 65 ± 11 N/mm² com uma resistência de tensão de 17 ± 3 N/mm², assim, apesar do valor da força máxima necessária para quebrar o

comprimido ser superior a 50N, pode-se dizer que esta técnica não é muito viável para avaliar qualitativamente os comprimidos de Paracetamol com impureza pois os valores encontram-se muito próximos. Na preparação dos comprimidos, a fluidez e compressibilidade dependem especialmente das propriedades dos excipientes na mistura.⁷⁴

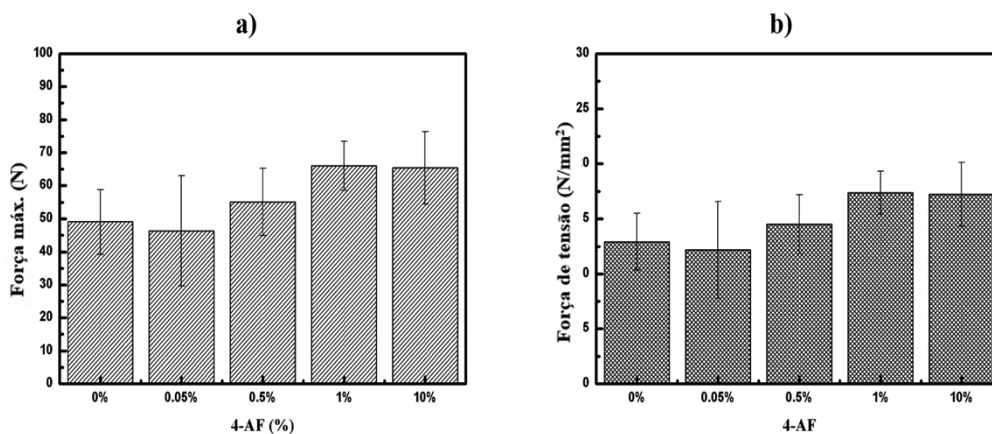


Figura 3.20: Medidas de compressão de diferentes quantidades de 4-AF nos comprimidos de Ben-U-ron.

3.5. Dados estatísticos

Foram processados estatisticamente os dados dos comprimidos de Ben-U-ron sem a adição de 4-AF e com a adição de 4-AF, usando os softwares ImageJ® e OriginPro 8.

Referiu-se anteriormente que cada comprimido de Ben-U-ron apresenta cerca de 83% de Paracetamol e os restantes 17% são excipientes. Para os comprimidos de Ben-U-ron com 0% de 4-AF ilustrado na figura 3.21, a partir dos cálculos estatísticos feitos, verificou-se que 64,07% e 8,25% correspondem à quantidade do Paracetamol e do amido de milho respetivamente. Estes valores ainda continuam a demonstrar que a quantidade do princípio ativo (Paracetamol) é muito superior em relação às quantidades dos excipientes. Vale dizer que estes comprimidos de Ben-U-ron foram adquiridos na Farmácia e, posteriormente reproduzidos no laboratório. Em vista disso, pode-se afirmar que os dados estatísticos encontrados vão de acordo com os reportados em Bula.

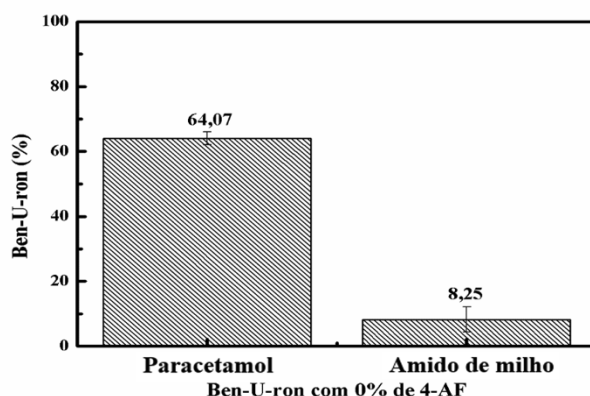
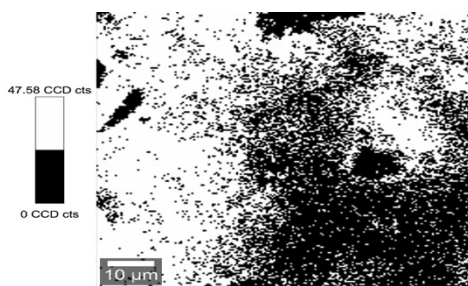
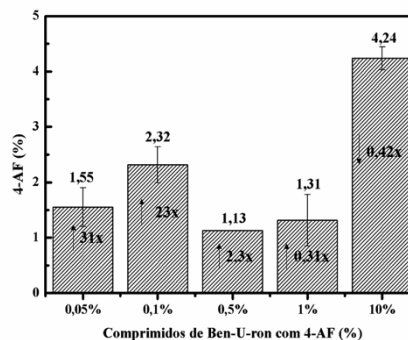


Figura 3.21: Dados estatísticos do controlo Ben-U-ron.

A figura 3.22 (a) ilustra mapeamento do comprimido de Ben-U-ron obtido pela ferramenta Analyze do software Projeto5+ (WITec) utilizando ImageJ® para o cálculo das quantidades dos seus constituintes, e a interferência causada pela régua de escala e (b) ilustra dados estatísticos de comprimido de Ben-U-ron com a adição de 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1% e 10% de 4-AF. Através do gráfico, nota-se que apenas os comprimidos contendo 10% de 4-AF apresentam um valor abaixo da quantidade de 4-AF adicionado quando da preparação do comprimido. Deste modo, após a re-fabricação do comprimido com 10% de 4-AF, a quantidade de 4-AF presente foi de 4,24%.



a



b

Figura 3.22: (a) Mapeamento do comprimido de Ben-U-ron obtido pela ferramenta Analyze do software Projeto5+ (WITec) utilizando ImageJ® para o cálculo das quantidades dos seus constituintes, e a interferência causada pela régua de escala; (b) dados estatísticos de comprimido de Ben-U-ron com diferentes quantidades de 4-AF.

O software ImageJ® apresenta algumas limitações, como a interferência da régua de escala utilizada (Figura 3.22a) na quantificação do contaminante 4-AF através da proporção preto (4-AF): branco (Paracetamol). Na Figura 3.22b nota se uma redução no efeito da régua na

quantificação de 4-AF calculada, entre valores de 0,05 e 1%, nos quais o resultado obtido variou entre 31 vezes e 0,31 vezes maior a quantidade adicionada, respectivamente, atingindo inclusive valores negativos que fornecem uma percentagem de 4-AF inferior a realmente adicionada.

4. ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO DE COMPRIMIDOS DE BEN-U- RON

O armazenamento adequado e a preservação dos medicamentos são fatores fundamentais para a eficácia dos princípios ativos. Para a determinação da estabilidade de um medicamento, são avaliados fatores interferentes de caráter extrínseco, como temperatura, humidade ou luz, ou intrínsecos, como as propriedades físico-químicas do fármaco e excipientes, o processo de obtenção e a forma farmacêutica.^{95,96}

Para o estudo das condições de armazenamento dos fármacos, os comprimidos de Ben-U-ron com diferentes quantidades de 4-AF, foram submetidos (durante 4 semanas) à variação de três fatores ambientais tais como, temperatura, luz e humidade. De referir que foram efetuadas três réplicas para cada concentração. Por conseguinte, neste capítulo fez-se a caracterização das propriedades físicas e químicas do comprimido de Ben-U-ron sujeito à diversas condições ambientais no seu armazenamento.

4.1. Comprimidos de Ben-U-ron sujeitos a diferentes temperaturas e mesma exposição solar

Os comprimidos de Ben-U-ron com adição de 4-AF foram submetidos num ambiente sem luz, à temperatura de 22°C e 40°C durante 4 semanas, conforme ilustra a figura 4.1. Importa referir que, as quantidades de 4-AF adicionadas aos comprimidos de Ben-U-ron foram correspondentes a 0,05%, 0,5%, 1% e 10%, embora os comprimidos de 0.05% não estejam ilustrados na figura 4.1. Às mesmas condições foi submetido o controlo de Ben-U-ron, ou seja, 0% de 4-AF. Pode-se observar pela imagem a), que se fez 3 réplicas para os comprimidos de Ben-U-ron sem estímulo, tendo o controlo (0% 4-AF) cor branca e os restantes, com adição de 4-AF, verificou-se uma ligeira alteração da cor branca para cor castanha. Estas características também podem ser verificadas nos comprimidos sujeitos à temperatura de 22°C sem luz (imagem b), mesmo após 4 semanas. Nota-se que, para os comprimidos com 0% de 4-AF (controlo), sujeitos à temperatura de 22°C, permaneceram com a mesma coloração branca como os de controlo sem estímulo. Provavelmente os comprimidos de Ben-U-ron submetidos à temperatura de 22°C não sofreram alterações significativas nas suas características físicas porque encontram-se dentro da faixa da temperatura ambiente e protegidos em condições favoráveis. Sabe-se que o princípio ativo do Ben-U-ron é o Paracetamol e, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o

Paracetamol deve ser conservado à temperatura ambiente (15°C a 30°C), protegido da luz e mantido em lugar seco.⁹⁷

Para os comprimidos sujeitos à temperatura de 40°C (imagem c), nota-se uma diferença significativa em termos da coloração que varia de branco para castanho escuro, isto é, na medida em que se aumenta a quantidade de 4-AF, os comprimidos tornam-se mais castanhos e escuros em relação aos comprimidos sujeitos à temperatura de 22°C, nas mesmas condições de luminosidade e tempo. É de salientar que para o comprimido sem impureza (controle) sujeito aos 40°C sem luz, há uma ligeira alteração da coloração para castanho em relação ao controle sujeito à temperatura de 22°C sem luz (branco). Sendo assim, essas características demonstram que a temperatura é um dos fatores ambientais muito importante dentre os envolvidos na degradação de produtos farmacêuticos, uma vez que, na maioria dos casos, a velocidade de degradação química aumenta com o aumento da temperatura e não existe um acondicionamento capaz de protegê-los dos efeitos do calor.⁹⁸ A influência da temperatura pode ser reduzida pela correta seleção da forma de armazenamento: em temperatura ambiente, sob refrigeração ou congelamento.

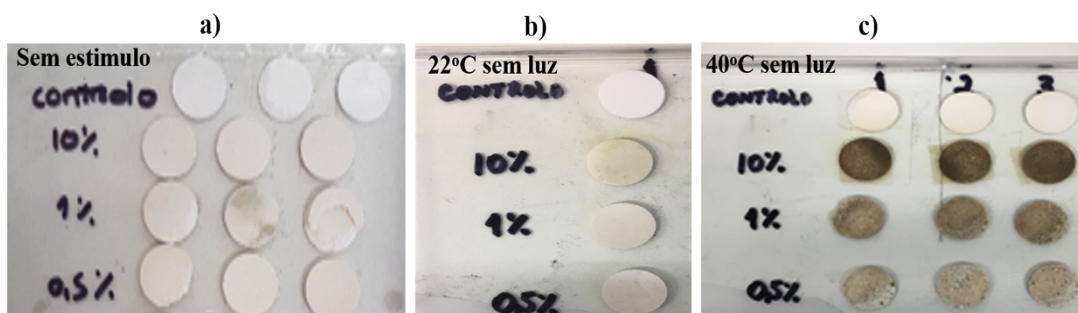


Figura 4.1: Fotografias dos comprimidos de Ben-U-ron com adição de 4-AF: a) sem estímulo; b) 22°C sem luz; e c) 40°C sem luz.

Fez-se o estudo de imagiologia de Raman nos comprimidos de Ben-U-ron sujeitos à temperatura de 22°C num ambiente sem luz como pode-se ver na figura 4.2 numa área menor de 80µm x 80µm. Conseguiu-se identificar o Paracetamol, usando a integração da banda em 93 cm⁻¹ no espectro de Paracetamol com 0% de 4-AF (imagem I-a). Ainda na mesma área foi identificado o Amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio pelo mapeamento de Raman, usando a integração da área da banda a 2946 cm⁻¹, como pode-se observar na imagem I-b.

Numa área grande, conseguiu-se identificar o Paracetamol pelo mapeamento de Raman, com base nos comprimidos de Ben-U-ron com 0,05% de 4-AF, monitorizando à 93cm⁻¹

(imagem II-a). Pode-se observar na imagem II-b, o 4-AF, pelo mapeamento de Raman de 4-AF, usando a integração da banda em 116 cm^{-1} com 0,05% de 4-AF na mesma área.

Na imagem III-a, pelo mapeamento de Raman obtido, identificou-se o Paracetamol, usando integração da área da banda a 89 cm^{-1} no espectro de Paracetamol com 0,5% de 4-AF, numa área pequena. Não foi possível identificar o 4-AF no mapeamento de Raman obtido, usando a integração da área da banda a 112 cm^{-1} , no espectro de 4-AF com 0,5% de 4-AF numa área pequena (imagem III-b). Só foi possível notar o sinal de 4-AF, numa área grande do mapeamento de Raman obtido, usando a integração da área da banda a 116 cm^{-1} no espectro de 4-AF com 0,5% de 4-AF, como pode-se observar na imagem III-c.

Portanto, quer para os comprimidos com 0,05% como para os com 0,5% de 4-AF, nestas condições, só foi possível identificar o 4-AF, utilizando a área grande.

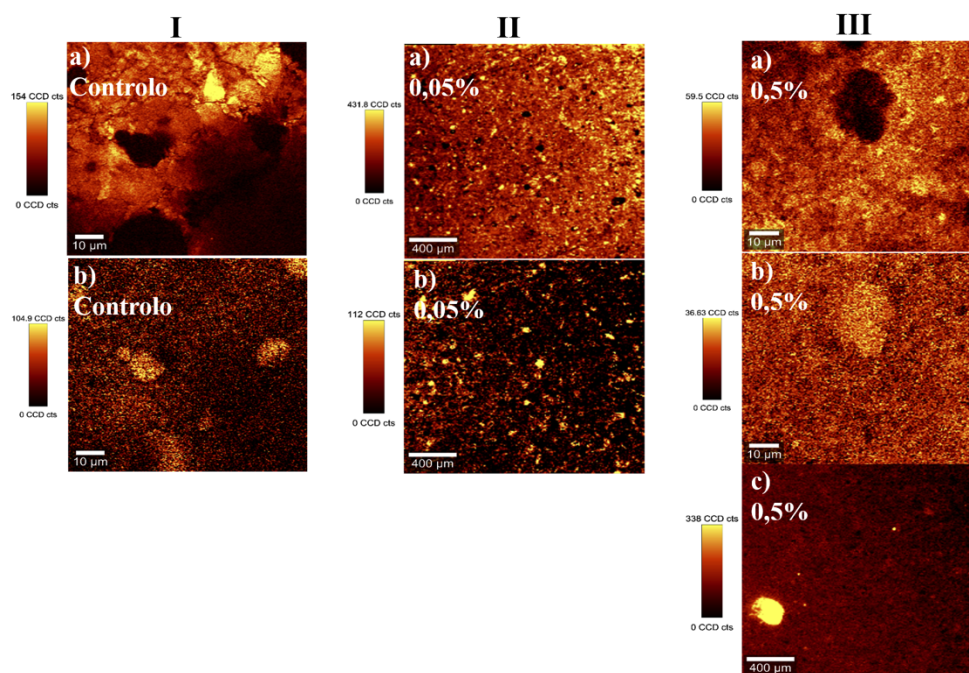


Figura 4.2: Mapeamento de Raman nos comprimidos de Ben-U-ron sujeitos à temperatura de 22°C num ambiente sem luz, usando integração da área da banda: **I-a)** em 93 cm^{-1} no espectro de Paracetamol com 0% de 4-AF; **I-b)** em 2946 cm^{-1} no espectro de Amido de milho; **II-a)** em 93 cm^{-1} no espectro de Paracetamol com 0,05% de 4-AF; **II-b)** em 116 cm^{-1} no espectro de 4-AF com 0,05% de 4-AF; **III-a)** em 89 cm^{-1} no espectro de Paracetamol com 0,5% de 4-AF; **III-b)** em 112 cm^{-1} no espectro de 4-AF com 0,5% de 4-AF; **III-c)** em 116 cm^{-1} no espectro de 4-AF com 0,5% de 4-AF.

A Figura 4.3 mostra uma imagem de Raman combinada do comprimido de Ben-U-ron com 0% de 4-AF, submetido à temperatura de 40°C , num ambiente sem luz e os respetivos espectros de Raman. Pela imagem, nota-se que o vermelho ocupa maior área do

comprimido em análise, o que indica a presença do Paracetamol em maior quantidade. Os pontos azuis significam a presença do amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio na área monitorizada do comprimido, mostrando a sua presença em menor quantidade.

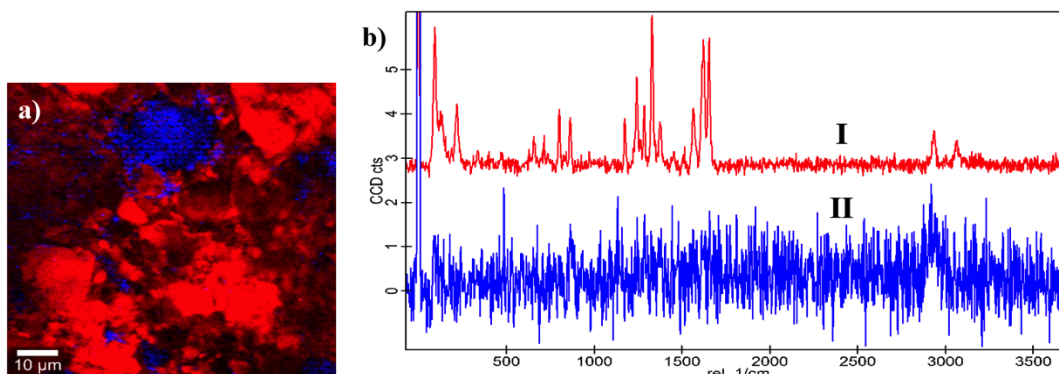


Figura 4.3: a) Imagem de Raman combinada do comprimido de Ben-U-ron com 0% de 4-AF, submetido à temperatura de 40°C. b) Espectros de Raman utilizados para a imagem combinada: I-Paracetamol (vermelho), II- Amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio (azul).

A figura 4.4 mostra os mapeamentos de Raman nos comprimidos de Ben-U-ron sujeitos à temperatura de 40°C num ambiente sem luz e a figura 4.5 ilustra espectros de Raman usados para imagem combinada do comprimido de Ben-U-ron com 1% de 4-AF, submetido no mesmo ambiente. O Paracetamol foi identificado, pelo mapeamento de Raman, usando a integração da banda em 93 cm⁻¹ no espectro de Paracetamol com 10% e 1% de 4-AF, como pode-se observar nas imagens a) e b), respetivamente. Foi possível identificar o Amido de milho, pelo mapeamento de Raman obtido, usando a integração da banda em 2949 cm⁻¹ no espectro de Amido de milho com 1% de 4-AF (imagem c).

Nota-se pela imagem d, que conseguiu-se identificar o 4-AF em comprimidos com 10%, pelo mapeamento de Raman obtido, usando a integração da banda em 116 cm⁻¹ no espectro de 4-AF. Não foi possível identificar o 4-AF nos comprimidos com 1%, tendo-se verificado uma banda muito intensa de fluorescência (Figura 4.4e) e (Figura 4.5, espectro III). Estes resultados sugerem a possível decomposição ou oxidação do 4-AF.

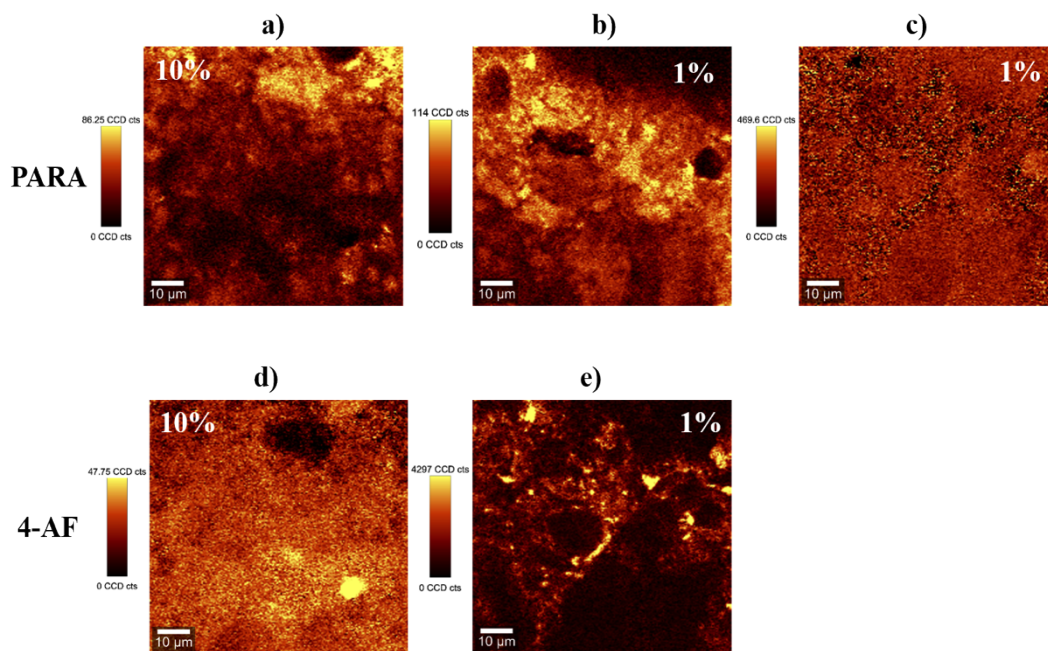


Figura 4.4: Mapeamento de Raman nos comprimidos de Ben-U-ron sujeitos a temperatura de 40°C num ambiente sem luz, usando integração da área da banda em: 93 cm^{-1} no espectro de Paracetamol com 10% (a) e 1% (b) de 4-AF; c) 2949 cm^{-1} no espectro de Amido de milho com 1% de 4-AF; d) 116 cm^{-1} no espectro de 4-AF, com 10% de 4-AF; e) fluorescência a 3103 cm^{-1} nos comprimidos com 1% de 4-AF.

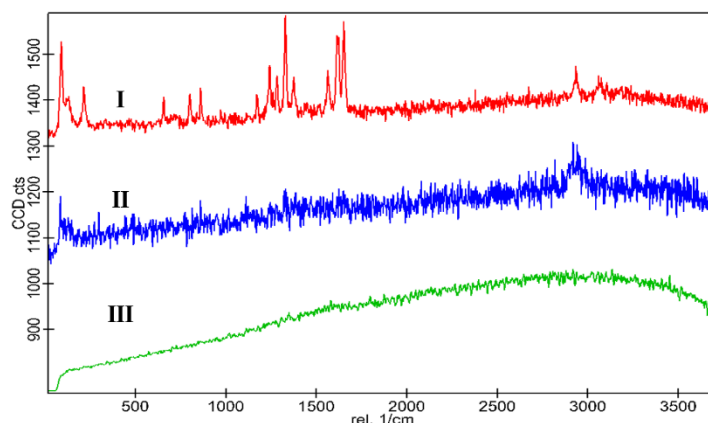


Figura 4.5: Espectros de Raman usados para imagem combinada do comprimido de Ben-U-ron com 1% de 4-AF, submetido a temperatura de 40°C num ambiente sem luz: **I**- Paracetamol (vermelho), **II**- Amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio (azul), **III**- Fluorescência a 3103 cm^{-1} (verde).

A figura 4.6 mostra os resultados das medidas de compressão dos comprimidos de Ben-U-ron, com diferentes quantidades de 4-AF, submetidos a temperaturas de 22°C e 40°C em ambiente sem luz, num período de 4 semanas. Os valores obtidos para os comprimidos sem estímulo também serão apresentados para comparação. Realizaram-se 3 réplicas para os comprimidos com 0%, 1% e 10% de 4-AF. O gráfico 4.6-a), apresenta os valores da força máxima necessária para quebrar o comprimido, e o gráfico 4.6-b), apresenta os valores da força de tensão ou resistência de tensão para a sua rutura.

Verifica-se pelos gráficos que as amostras a 22°C sem luz, têm dureza inferior aos controlos, apesar destas amostras não sofrem grande estímulo, talvez tenham sofridos a oxidação ou decomposição ou ainda absorção de água, mesmo que seja mínima.

Quanto as amostras submetidas a 40°C sem luz, observa-se uma redução significativa da dureza em relação aos controlos, isso indica-nos que a temperatura poderá ter sido um dos fatores influenciador na degradação dos comprimidos, ou seja, com o aumento da temperatura, a dureza dos comprimidos vão diminuindo. No estudo de Brahmaiah Kommanaboyina & C. T. Rhodes, sobre as “Tendências nos testes de estabilidade, com ênfase na estabilidade durante a distribuição e armazenamento de medicamento”, os autores afirmam que a velocidade de degradação química do fármaco aumenta com o aumento da temperatura e não existe um acondicionamento capaz de protegê-los dos efeitos do calor.⁹⁸ Em virtude disso, pode-se afirmar que temperatura é um dos fatores ambientais que teria contribuído para a fragilidade ou degradação dos comprimidos em análise.

Para as amostras com impurezas, nota-se uma diminuição da dureza com o aumento da temperatura de exposição como nas amostras controlo e a diminuição da quantidade de 4-AF no comprimido.

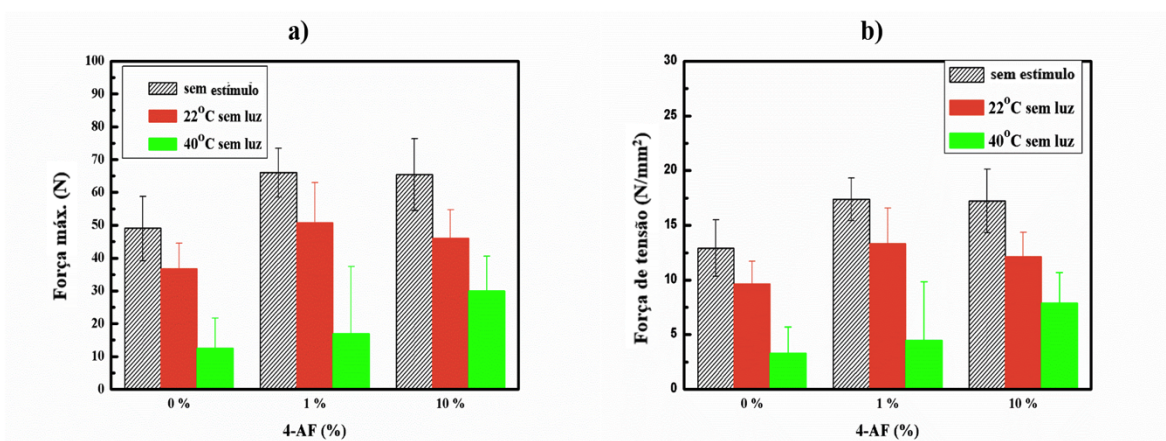


Figura 4.6: Medidas de compressão dos comprimidos de Ben-U-ron com diferentes quantidades de 4-AF, sem estímulo e submetidos à temperatura de 22°C e 40°C num ambiente sem luz.

A figura 4.7 mostra dados estatísticos dos comprimidos de Ben-U-ron sem a adição de 4-AF, sem estímulo (controlo) e submetidos a diferentes temperaturas num ambiente sem

luz. O resultado do dado estatístico efetuado para os comprimidos de Ben-U-ron sem adição de 4-AF e sem estímulo, foi de 64,07% e 8,25% correspondente às quantidades do Paracetamol e do amido de milho, respetivamente.

Para os comprimidos de Ben-U-ron sem a adição de 4-AF, submetidos à temperatura de 22°C, o valor da quantidade de Paracetamol encontrado foi de 21,60% e de amido de milho foi de 5,90%.

Em relação aos comprimidos de Ben-U-ron com 0% de 4-AF, submetidos à temperatura de 40°C num ambiente sem luz, o valor da quantidade de Paracetamol encontrado foi de 23,09% e 5,66% para o amido de milho.

Pelos valores dos dados estatísticos obtidos, pode-se dizer que os comprimidos sujeitos ao ar (O₂) mesmo com temperaturas diferentes podem sofrer alterações no empacotamento dos ingredientes formando-se mais espaços livres (ocós/sem grãos) entre os grãos dos vários componentes. Assim, a exposição dos comprimidos a diferentes temperaturas, pode ter contribuído para este fenómeno, ou seja, para grande parte dos processos de degradação química é necessário a presença de energia para ultrapassar a barreira de ativação. A combinação de moléculas irá originar uma distribuição de energia, a qual depende da temperatura. Desta forma, para a mesma área de análise verifica-se praticamente mesmas quantidades de componentes como de paracetamol e amido de milho, ou então, este método não é o mais indicado para quantificar componentes num comprimido.

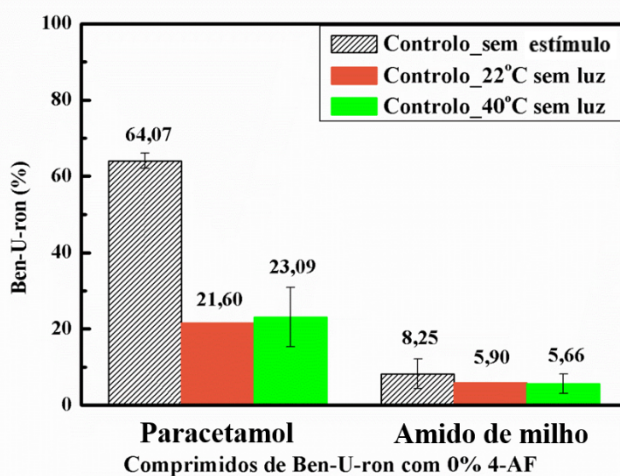


Figura 4.7: Dados estatísticos dos comprimidos Ben-U-ron com 0% de 4-AF, sem estímulo e sujeitos a temperatura diferente e mesma exposição solar.

Os comprimidos de Ben-U-ron com 10% de 4-AF, sujeitos a diferentes temperaturas e mesma exposição solar, foram escolhidos para o tratamento estatístico dos dados, ilustrados na figura 4.8. Pode-se observar no gráfico que, nos comprimidos sem estímulo, o valor da quantidade de 4-AF encontrado foi de 4,24%.

Para os comprimidos submetidos à temperatura de 22°C em ambiente sem luz, conseguiu-se identificar 1,35% de 4-AF. Para os comprimidos submetidos à temperatura de 40°C em ambiente sem luz, apresentaram somente 0,79% de 4-AF.

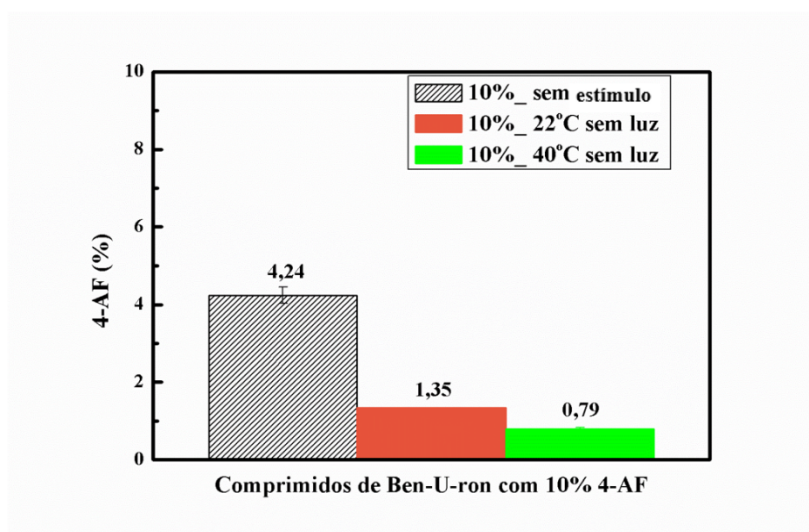


Figura 4.8: Dados estatísticos dos comprimidos Ben-U-ron com a adição de 10% de 4-AF, sem estímulo e sujeitos a temperatura diferente e mesma exposição solar.

Estes resultados sugerem que o composto 4-AF pode sofrer alterações químicas com a exposição a diferentes temperaturas mesmo sem a presença de luz. A diminuição da quantidade de 4-AF pode indicar alterações químicas da sua estrutura ou composição (possível oxidação devido à presença de O₂), daí se observar uma banda de fluorescência muito intensa no mapeamento de Raman dos comprimidos sujeitos à temperatura de 40°C. Outra evidência destas alterações pode ser observada a olho nu, pois os comprimidos com a impureza mudam de cor de branco para castanho, sendo mais evidente a mudança de cor nos comprimidos sujeitos à temperatura de 40°C.

Sabe-se pela literatura que os compostos aminofenóis, por possuírem um grupo amina e um grupo fenol, são muito instáveis ao ar e à luz solar, e especialmente sensíveis ao oxigênio e à humidade, decompondo-se com a exposição à atmosfera.^{99,100} Os aminofenóis substituídos na posição orto e para são mais suscetíveis à oxidação em relação aos

compostos como a anilina ou meta-aminofenol, gerando derivados de amino-fenoxazina após oxidação, como por exemplo a 4-quinona-imina¹⁰⁴, a 4-quinona-imida e a 1,4-benzoquinona.⁹⁹

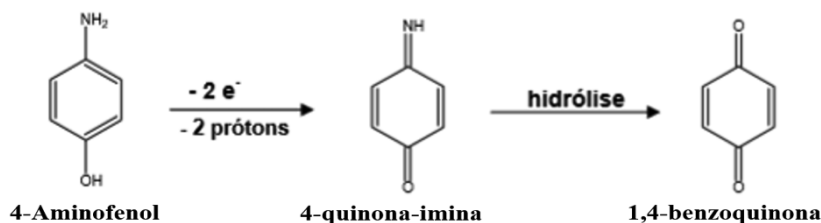


Figura 4.9: Reação de electro oxidação do 4-Aminofenol.¹⁰¹

Tentou-se identificar a presença da 1,4-benzoquinona nos comprimidos expostos às diferentes temperaturas por IV, mas nenhuma alteração nos espectros de IV foi observada nos comprimidos expostos às temperaturas de 22°C e 40°C. Em contrapartida, os espectros de Raman dos comprimidos expostos a temperatura de 40°C demonstraram uma diminuição do sinal do 4-AF e o aparecimento de uma banda larga de fluorescência na região dos 3300 cm⁻¹. O aparecimento desta banda pode ser uma evidência a presença da 4-quinona-imida, mas para se ter a certeza o espectro de Raman do composto isolado deverá ser feito para comparação.

4.2. Comprimidos de Ben-U-ron sujeitos à mesma temperatura e diferente exposição solar

A figura 4.10 ilustra as fotografias dos comprimidos de Ben-U-ron com adição de 4-AF submetidos num ambiente sem luz (imagem b) e com luz (imagem c), sujeitos à mesma temperatura de 22°C e humidade de 39% durante 4 semanas. A humidade foi medida com um higrômetro. Na imagem a) pode-se observar as 3 réplicas dos comprimidos de Ben-U-ron sem estímulo com 0,5%, 1%, 10% e 0% de 4-AF.

No subcapítulo anterior (4.1) já foram caracterizados os comprimidos de Ben-U-ron com adição de 4-AF sujeitos à temperatura de 22°C sem luz, e notou-se que mesmo após 4 semanas não houve mudanças significativas em relação aos comprimidos de controlo sem estímulo.

Para os comprimidos sujeitos à temperatura de 22°C com luz, pode-se observar uma mudança significativa da coloração variando de branco para castanho claro, ou seja, na medida em que se aumenta a quantidade de 4-AF, os comprimidos tornam-se mais castanhos. Portanto, a luz pode fornecer a energia de ativação necessária para que ocorra uma reação de degradação. Essa reação pode ser de oxidação, promovendo a instabilidade farmacêutica.¹⁰² A proteção pode ser alcançada através da utilização de antioxidantes, de revestimentos e de embalagens fotoprotetoras.^{96,102}

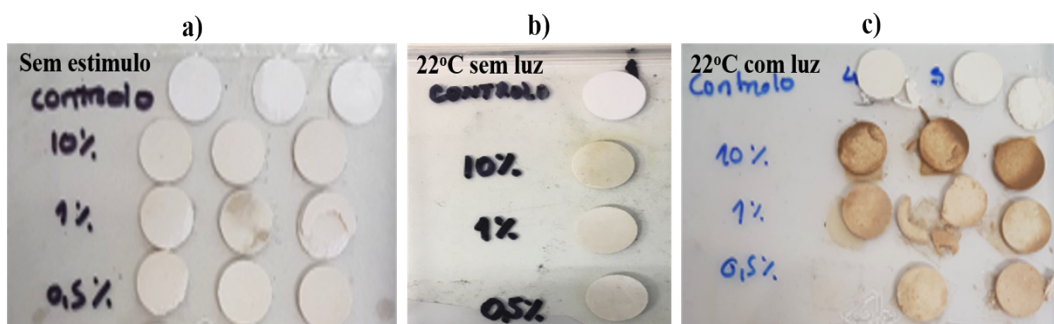


Figura 4.10: Fotografias dos comprimidos de Ben-U-ron com adição de 4-AF: a) sem estímulo; b) 22°C sem luz e c) 22°C com luz.

Fez-se mapeamento de Raman nos comprimidos de Ben-U-ron sujeitos à temperatura de 22°C num ambiente com luz e 39% de humidade, segundo ilustra a figura 4.11. Pelo mapeamento de Raman, foi identificado o Paracetamol, utilizando a integração da banda em 93 cm^{-1} no espectro de Paracetamol com 0% de 4-AF (imagem I-a), e o Amido de milho em 2931 cm^{-1} no espectro de Amido de milho, segundo ilustra a imagem I-b).

Para os comprimidos com 10% de 4-AF, o Paracetamol foi identificado através do mapeamento de Raman, usando a integração da área da banda em 93 cm^{-1} no espectro de Paracetamol (imagem II-a) e o 4-AF em 116 cm^{-1} no espectro de 4-AF (imagem II-b).

Conseguiu-se identificar o Paracetamol, pelo mapeamento de Raman, usando a integração da banda em 93 cm^{-1} no espectro de Paracetamol com 0,5% de 4-AF, entretanto, não foi possível identificar o 4-AF pelo mapeamento de Raman, tendo-se verificado uma banda larga de fluorescência na zona no espectro de 4-AF com 0,5% de 4-AF, como pode-se observar nas imagens III-a, III-b e os respetivos gráficos (figura 4.12).

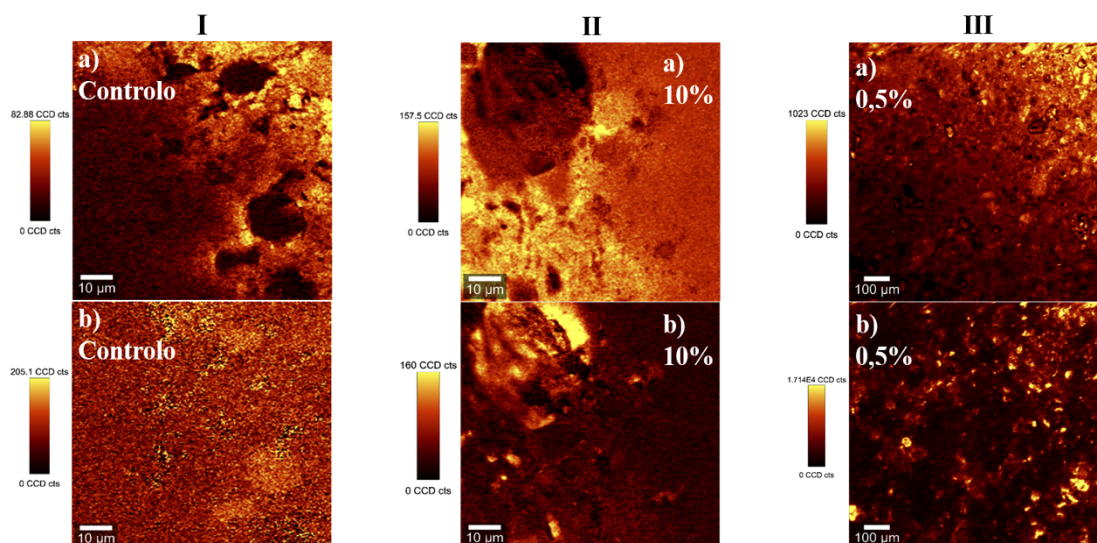


Figura 4.11: Mapeamento de Raman nos comprimidos de Ben-U-ron sujeitos à temperatura de 22°C num ambiente com luz e 39% de humidade, usando a integração da área da banda em: **I-a)** 93 cm^{-1} no espectro de Paracetamol com 0% de 4-AF; **b)** 2931 cm^{-1} no espectro de Amido de milho com 0% de 4-AF; **II-a)** 93 cm^{-1} no espectro de Paracetamol com 10% de 4-AF; **b)** 116 cm^{-1} no espectro de 4-AF com 10% de 4-AF; **III-a)** 93 cm^{-1} no espectro de Paracetamol com 0,5% de 4-AF; **b)** fluorescência no espectro de 4-AF com 0,5% de 4-AF.

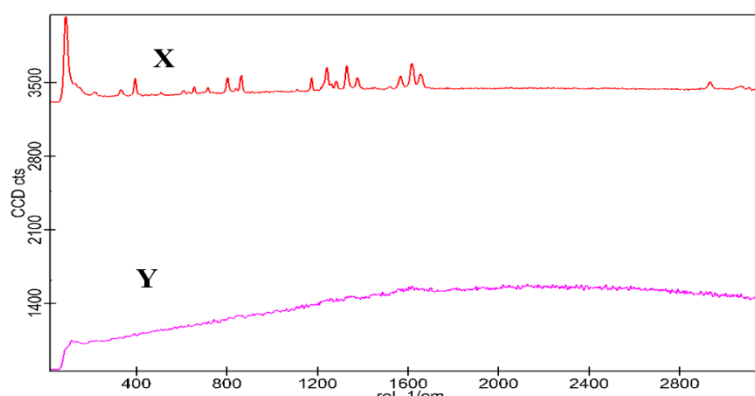


Figura 4.12: Média de espectros de Raman do comprimido de Ben-U-ron sujeitos à temperatura de 22°C num ambiente com luz e 39% de humidade, usando a integração da área da banda em: **X-** 93 cm^{-1} no espectro de Paracetamol com 0,5% de 4-AF; **Y-** fluorescência no espectro de 4-AF com 0,5% de 4-AF.

A figura 4.13 ilustra os resultados das medidas de compressão dos comprimidos de Ben-U-ron, com diferentes quantidades de 4-AF, submetidos a temperatura de 22°C num ambiente com e sem luz, durante 4 semanas, bem como os comprimidos sem estímulo. Foram realizadas 3 réplicas para os comprimidos com 0%, 0,5%, 1% e 10% de 4-AF. Os valores da força máxima necessária para quebrar o comprimido encontram-se no gráfico 4.13-a), e no gráfico 4.13-b), encontram-se os valores da resistência de tensão.

Já foram analisadas no subcapítulo anterior as medidas de compressão para os comprimidos sujeitos à temperatura de 22°C num ambiente sem luz.

Relativamente aos comprimidos submetidos à temperatura de 22°C num ambiente com luz, os valores da força máxima necessária para quebrar comprimidos foram de 49 ± 7 N, 42 ± 12 N, 40 ± 19 N e 47 ± 10 N para os comprimidos com 0%, 0,5%, 1% e 10% de 4-AF, respetivamente. Os valores da resistência de tensão encontrados, foram de 13 ± 2 N/mm², 11 ± 3 N/mm², 11 ± 5 N/mm² e 12 ± 3 N/mm², para os comprimidos com 0%, 0,5%, 1% e 10% de 4-AF, respetivamente.

Os comprimidos submetidos a 22°C com e sem luz, apresentaram uma resistência menor em relação aos controlos. Nas amostras sem estímulo sujeitas a uma temperatura de 22°C com e sem luz, o empacotamento dos comprimidos praticamente sofre ligeiras alterações. Nos comprimidos com impureza, a exposição a temperatura ambiente com e sem luz altera ligeiramente as propriedades de empacotamento dos comprimidos. Estes resultados sugerem que os comprimidos de Ben-U-ron alteram o seu empacotamento quando expostos ao oxigénio do ar podendo absorver moléculas de água, já que a humidade é de 39%.

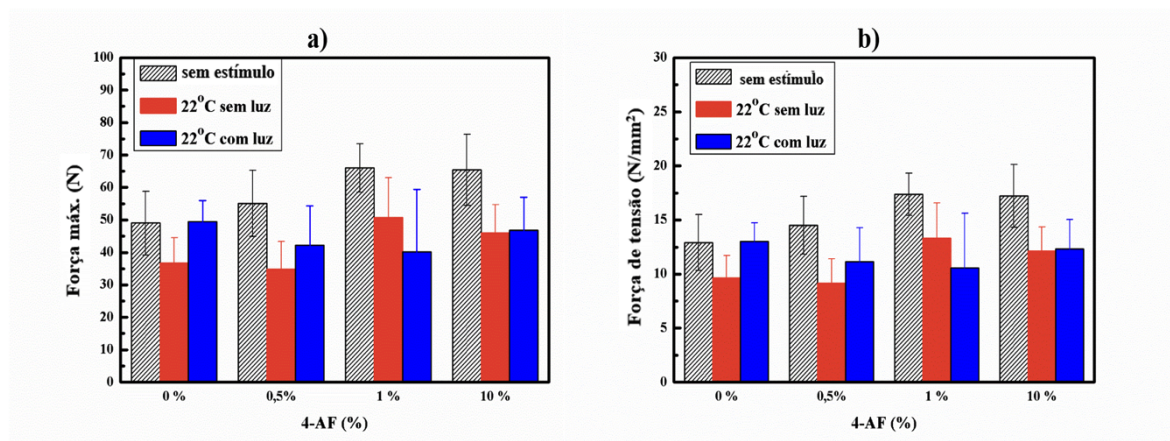


Figura 4.13: Medidas de compressão dos comprimidos de Ben-U-ron com diferentes quantidades de 4-AF, sem estímulo e submetidos à temperatura de 22°C, num ambiente com e sem luz.

4.3. Comprimidos de Ben-U-ron sujeitos à humidade

Na figura 4.14 consta as fotografias dos comprimidos de Ben-U-ron com e sem impureza (0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 10% e 0% de 4-AF) submetidos a uma humidade de 86,5% durante 4 semanas. Verificou-se uma alteração significativa das características físicas (cor) nos comprimidos após 4 semanas, passando de branco para castanho nos comprimidos de Ben-U-ron com 0,05%; 0,1% e 0,5% de 4-AF; e para os comprimidos com 1% e 10%, houve alteração para cor preta. Por conseguinte, os comprimidos com 10% de 4-AF ficaram mais escuros em relação aos de 1%, mas o controlo não sofreu grandes alterações na sua coloração.

A humidade pode provocar degradação em medicamentos no estado sólido, e sabe-se que o Paracetamol possui na sua constituição grupo amida, característica que os torna mais propensos a sofrer hidrólise.⁷¹ A maneira mais eficiente de se evitar a hidrólise é optar pela proteção da humidade com uso de dessecantes, embalagem impermeável, remoção de traços de metais e adição de agentes quelantes, escolha de pH de maior estabilidade como pH neutro.⁷³

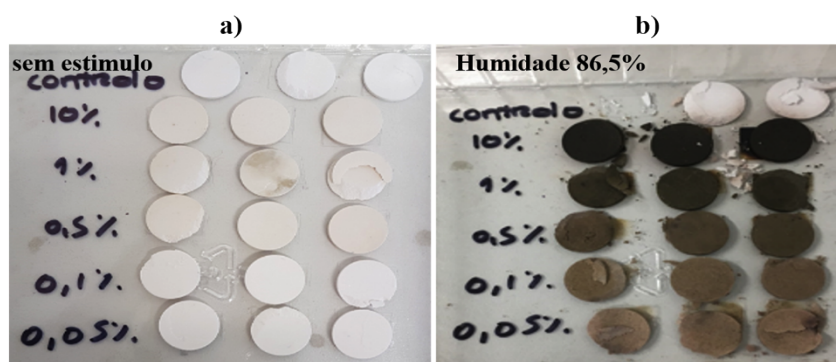


Figura 4.14: Fotografias dos comprimidos de Ben-U-ron com adição de 4-AF: a) Sem estímulo; b) sujeitos à 86,5% de humidade.

A figura abaixo mostra o mapeamento de Raman nos comprimidos de Ben-U-ron com 0% de 4-AF (controlo), sujeitos à 86,5% de humidade. Como queríamos avaliar a degradação do Paracetamol nos comprimidos, o mapeamento de Raman foi efetuado numa área grande de 500x500 μm adquirindo-se no total de 40000 espectros. Foi possível identificar o Paracetamol sem qualquer alteração pelo mapeamento de Raman, usando a integração da

banda em 89 cm^{-1} no espectro de Paracetamol, como pode-se observar na imagem a). Foram também identificados, o ácido esteárico e o amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio, usando a integração da banda em 2890 cm^{-1} (imagem b) e em 2940 cm^{-1} (imagem c) respectivamente.

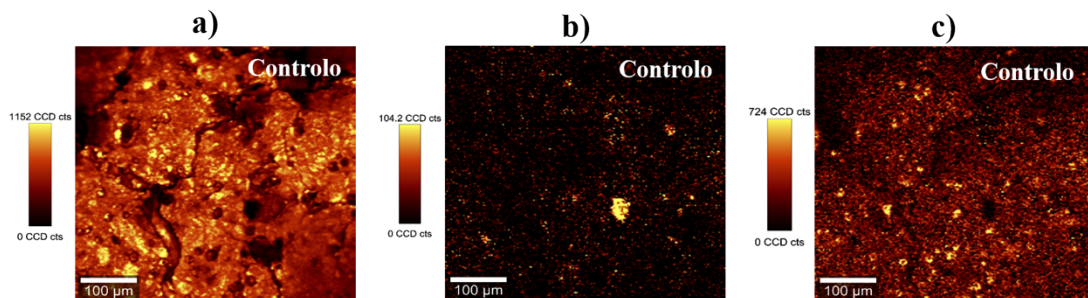


Figura 4.15: Mapeamento de Raman nos comprimidos de Ben-U-ron com 0% de 4-AF (Controlo), sujeitos à 86,5% de humidade, usando a integração da área da banda em: **a)** 89 cm^{-1} no espectro de Paracetamol; **b)** 2890 cm^{-1} no espectro de Ácido esteárico; **c)** 2940 cm^{-1} no espectro de Amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio.

A figura 4.16 apresenta o mapeamento de Raman do Paracetamol com 10% de 4-AF, sujeitos à 86,5% de humidade e os respetivos espectros médios. Conseguiu-se identificar o Paracetamol, mas com uma certa dificuldade, usando a integração da área da banda em 89 cm^{-1} no espectro de Paracetamol como pode-se observar na imagem a) e o respetivo espectro médio (gráfico I). Não foi possível identificar o 4-AF nestas condições, tendo-se verificado uma banda de fluorescência e uma alteração das bandas na região entre 1000 e 1600 cm^{-1} (imagem b), como pode-se também ver o seu respetivo espectro médio (II).

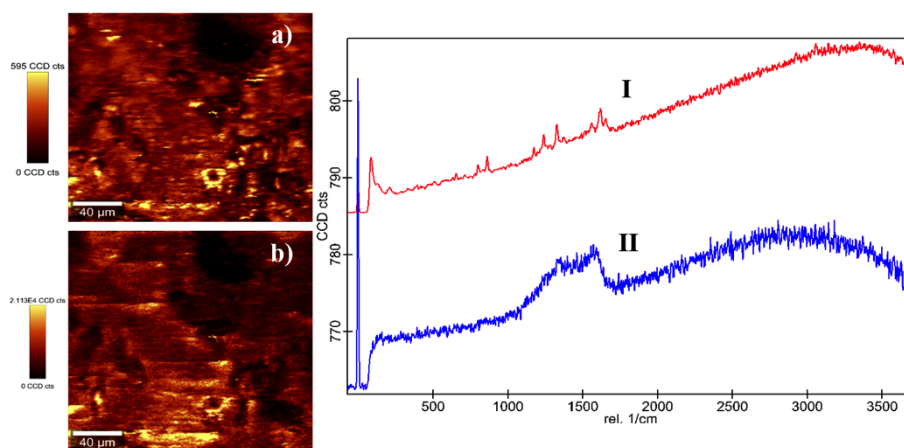


Figura 4.16: a) Mapeamento de Raman nos comprimidos de Ben-U-ron com 10% de 4-AF, sujeitos à 86,5% de humidade, usando a integração da área da banda em 89 cm^{-1} no espectro de Paracetamol e os respetivos espectros médios.

Foram efetuados os mapeamentos de Raman para os comprimidos de Ben-U-ron sujeitos à 86,5% de humidade com menor teor de 4-AF, como se pode verificar na figura 4.17 em que consta também os respetivos espectros médios. A imagem a-I, mostra o mapeamento de Raman com a identificação do Paracetamol, usando a integração da área da banda em 89 cm^{-1} no espectro de Paracetamol com 0,05% de 4-AF. Não foi possível identificar o 4-AF a partir do mapeamento de Raman nestas condições (imagem b-II), tendo-se verificado novamente uma banda larga de fluorescência por volta 2400 e 3550 cm^{-1} no espectro de 4-AF com 0,05% de 4-AF conforme ilustra a imagem.

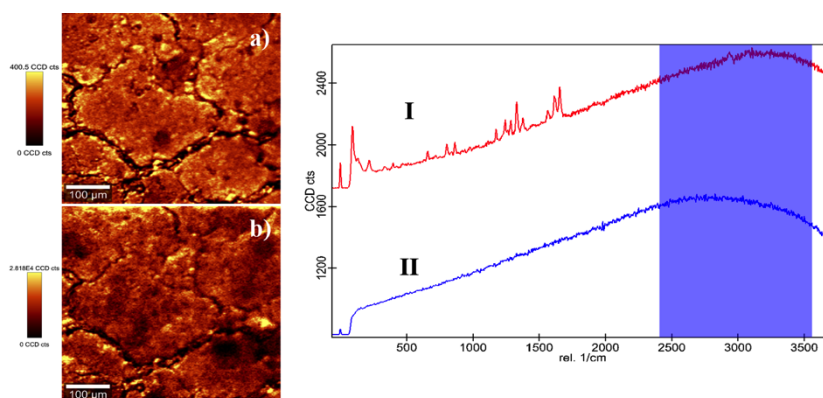


Figura 4.17: Mapeamento de Raman nos comprimidos de Ben-U-ron sujeitos à 86,5% de humidade e os respetivos espectros médios com 0,05% de 4-AF, usando a integração da área da banda em: a) 89 cm^{-1} no espectro de Paracetamol (I); b) fluorescência no espectro de 4-AF (II).

Como não foi possível identificar o 4-AF, recorreu-se ao infravermelho, para confirmar a sua presença ou a existência de outros compostos nos comprimidos, como pode-se ver nas figuras 4.18 e 4.19. Continuou a se observar a presença de 4-AF na banda em 1090 cm^{-1} para o comprimido com 10% de 4-AF submetido à 86,5% de humidade que é praticamente igual ao de 10% de 4-AF sem estímulo.⁹⁹ Não foi possível novamente identificar o composto existente no comprimido por esta técnica.

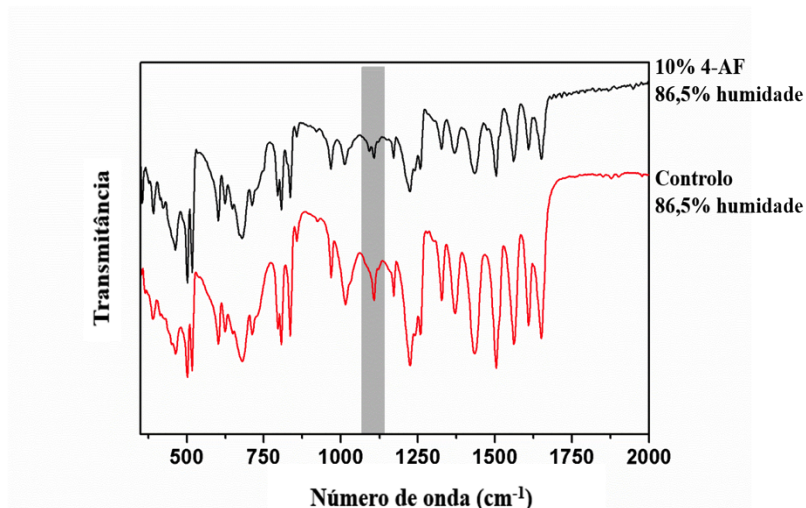


Figura 4.18: Espectro FTIR de Ben-U-ron, sujeito à 86,5% de humidade, no intervalo de número de onda entre 350-2000 cm^{-1} ; (**Preto**): 10% de 4-AF; (**vermelho**): Controlo.

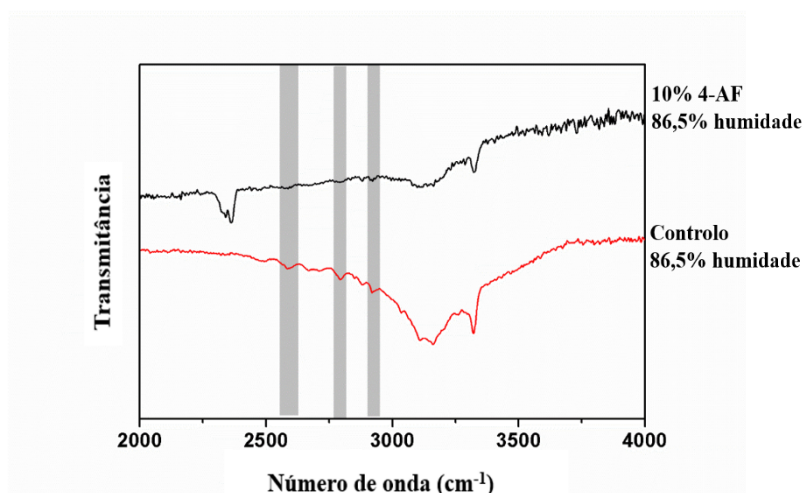


Figura 4.19: Espectro FTIR de Ben-U-ron, sujeito à 86,5% de humidade, no intervalo de número de onda entre 2000-4000 cm^{-1} ; (**Preto**): 10% de 4-AF; (**vermelho**): Controlo.

Efetuarão-se as medidas de compressão nos comprimidos com 0%, 0,5%, 1% e 10% de 4-AF, sem estímulo e submetidos à 39 e 86,5% de humidade num período de 4 semanas (figura 4.20). O gráfico 4.20-a), apresenta os valores da força máxima necessária para quebrar o comprimido, e o gráfico 4.20-b), apresenta os valores da resistência de tensão.

No gráfico 4.20-a), para os comprimidos submetidos à 39% de humidade, sendo 0%, 0,5, 1% e 10% de 4-AF, os valores da força máxima necessária para quebrá-los foram de $49 \pm 7\text{N}$, $42 \pm 12\text{N}$, $40 \pm 19\text{N}$ e $47 \pm 10\text{N}$ respetivamente. Em relação aos comprimidos sujeitos

à 86,5% de humidade, os valores da força máxima necessária para quebrar os comprimidos foram de $0,78 \pm 0,00\text{N}$, $15 \pm 5\text{N}$, $11 \pm 10\text{N}$, e $11 \pm 5\text{N}$ respetivamente.

Relativamente ao gráfico 5.20-b), nos comprimidos submetidos à 39% de humidade com 0%, 0,5%, 1% e 10% de 4-AF, os valores da resistência de tensão foram de $13 \pm 2\text{N/mm}^2$, $11 \pm 3\text{N/mm}^2$, $11 \pm 5\text{N/mm}^2$ e $12 \pm 3\text{N/mm}^2$, respetivamente. Para os comprimidos com 0%, 0,5%, 1% e 10% de 4-AF, submetidos à 86,5% de humidade, os valores da resistência de tensão encontrados foram de $0,20 \pm 0,00\text{N/mm}^2$, $3,9 \pm 1,0\text{N/mm}^2$, $3 \pm 3\text{N/mm}^2$ e $2,9 \pm 1,0\text{N/mm}^2$ respetivamente.

Verifica-se que os comprimidos submetidos a 39% de humidade possuem maior resistência mecânica em relação aos de 86,5% de humidade. Com estes resultados consegue-se demonstrar que a presença de água nos comprimidos altera a dureza/empacotamento do comprimido comprometendo a sua composição e possível adsorção depois de administrado num utente. Portanto os comprimidos devem ser sempre guardados em locais seco e a uma temperatura ambiente entre 20-25 °C, fechados nas suas embalagens de origem.

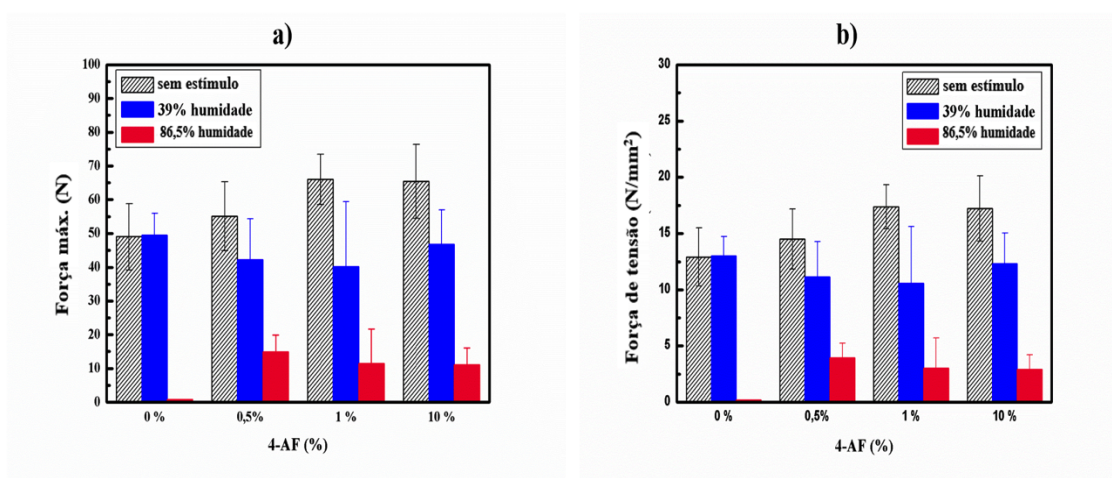


Figura 4.20: Medidas de compressão dos comprimidos de Ben-U-ron com diferentes quantidades de 4-AF, sem estímulo e submetidos à humidade de 39 e 86,5%.

5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Neste trabalho, diversas técnicas como ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho (FTIR), ultravioleta-visível (UV-Vis), Raman, Raio-X e a espectroscopia de Raman acoplada à microscopia Confocal, foram utilizadas para a caracterização do composto Paracetamol e 4-AF. Foram preparados comprimidos de Ben-U-ron com diferentes teores de 4-AF (0%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1% e 10%) e diferentes toneladas de pressão (2T, 4T, 6T e 8T). Os comprimidos de Ben-U-ron, com e sem impureza, foram submetidos a estímulos como, temperatura, humidade e luz solar, com o objetivo de simular as condições ambientais de armazenamento, que não só afetam a sua degradação, mas também alteram a dureza e aparência física.

A imagiologia de Raman é uma técnica que pode ser útil para a identificação de pequenos teores do contaminante 4-AF, resultante da degradação química do Paracetamol comercializado, porém não é sensível o suficiente para detetar os 0,005% estabelecidos pelas Farmacopeias. Apesar disso, com esta técnica conseguiu-se identificar a distribuição do Paracetamol e de alguns excipientes tais como o amido de milho e/ou carboximetilamido de sódio e o ácido esteárico num comprimido de Ben-U-ron, ainda que o software ImageJ® apresente algumas limitações aos cálculos.

Em mais detalhe, verificou-se que:

- ✓ A temperatura afeta a estabilidade dum fármaco, por exemplo, o aumento da temperatura (aumento da quantidade de energia fornecida à reação) reduz a estabilidade química da sua composição, diminuindo a dureza do comprimido, e também podendo afetar a cor do comprimido ao favorecer reações de oxidação e/ou decomposição;
- ✓ A luz, pelo mesmo motivo, pode fornecer a energia de ativação necessária para que ocorra uma reação de degradação;
- ✓ O controle insuficiente da humidade no local de armazenamento pode acelerar reações de hidrólise e degradação do medicamento no estado sólido. Verificou-se também que a absorção de água altera o empacotamento dos vários componentes do comprimido, alterando as suas propriedades físicas.

Assim, concluiu-se que o aumento da humidade e da temperatura, na presença de oxigénio, favorecem a oxidação do 4-AF, mas não interferem na estabilidade do Paracetamol. De forma similar, reduzem a dureza dos comprimidos, independentemente de conter

impurezas ou não. Portanto, recomenda-se que se armazene os medicamentos com Paracetamol em locais secos e a uma temperatura ambiente nos invólucros de origem.

Os resultados deste trabalho permitem perspetivar futuras investigações nesta área, sobre os seguintes aspetos:

- ✓ Paracetamol não seria o fármaco mais indicado para avaliar a influência de temperatura e da humidade na sua estabilidade química, uma vez que não há relatos sobre a ação de pequenas alterações destes estímulos ambientais sobre o efeito fisiológico. A carbamazepina seria mais adequada, pelo menos para o estudo do efeito da humidade, visto que a forma hidratada altera a sua dissolução no organismo humano dificultando a sua adsorção;
- ✓ Realizar outros tipos de testes mecânicos como por exemplo: friabilidade, desintegração e dissolução, dado que, estes testes fornecem evidências de como a qualidade de um medicamento varia sob a influência de fatores ambientais;
- ✓ Preparar os comprimidos utilizando uma pressão de 4T, dado que, estes comprimidos, apresentaram o valor de força máxima para quebrá-los acima dos 50N, o que indica que são os comprimidos mais estáveis em termos físicos, de adoção e desintegração em relação aos comprimidos prensados a 8T;
- ✓ Calcular detalhadamente a interferência da régua de escala na determinação das quantidades dos componentes ao utilizar o ImageJ®.

6. BIBLIOGRAFIA

- (1) Das Ruchita, S.; Agrawal, Y. K. Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vib. Spectrosc.* **2011**, *57* (2), 163–176.
- (2) Raman, C. V.; Krishnan, K. S. A new class of spectra due to secondary radiation. *Indian J. Phys.* **1928**, *419*, 399–419.
- (3) Skoog, D. A.; Holler F. J.; Crouch S. Principles of instrumental analysis. *Thomson Brooks/Cole*. **2006**, *6th ed.*
- (4) De Faria, D. L. A.; Santos, L. G. C. Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: Repetindo o experimento de Raman. *Quim. Nova* **1997**, *20* (3), 319–323.
- (5) Florêncio, D. M.; Nagata, N.; Farago, P. V.; Zamora, P. G. P. Determinação simultânea de Paracetamol e cafeína por espectrometria UV-Vis associada a ferramentas matemáticas. *Rev. Bras. Farmácia* **2008**, *89* (2008), 39–43.
- (6) Cordeiro, G. A. Desenvolvimento de metodologias espectroscópicas multivariadas para quantificação de fármacos em formas farmacêuticas. **2006**, 29–31.
- (7) De Carvalho, L. M.; Spengler, C.; De Lima, A. P. S.; Raabe, A.; Martini, M.; Do Nascimento, P. C.; Bohrer, D. Determinação simultânea de cations empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato em equipamento construído em laboratório. *Quim. Nova* **2009**, *32* (8), 2203–2208.
- (8) Scheiner, G. et al. Determination of impurities in methoxsalen drug substance: isolation and identification of isopimpinellin as a major impurity by atmospheric pressure chemical ionization LC/MS and NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *33*, 627–637.
- (9) Rostron, P.; Gaber, S.; Gaber, D.; Raman spectroscopy, a review raman spectroscopy. *International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR)*. **2016**, *869*, 50–64.
- (10) Kalantri, P.; Somani, R.; Makhija, D. T. Raman spectroscopy : a potential technique in analysis of pharmaceuticals. *Der Chem. Sin.* **2010**, *1* (1), 1–12.
- (11) Leite, J. Aplicação das técnicas de espectroscopia FTIR e de micro-espectroscopia confocal de Raman à preservação do património, Tese de mestrado integrado, engenharia metalúrgica e de materiais, Faculdade de engenharia, Universidade do Porto, **2008**.
- (12) Vankeirsbilck, T.; Vercauteren, A.; Baeyens, W.; Van der Weken, G.; Verpoort, F.;

- Vergote, G.; Remon, J. P. Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2002**, *21* (12), 869–877.
- (13) Liu, D. H.; Xiao, X. M.; Tian, H.; Min, Y. S.; Zhou, Q.; Cheng, P.; Shen, J. G. Sample maturation calculated using Raman spectroscopic parameters for solid organics: methodology and geological applications. *Chinese Sci. Bull.* **2013**, *58* (11), 1285–1298.
- (14) Rösch, P.; Harz, M.; Schmitt, M.; Peschke, K. D.; Ronneberger, O.; Burkhardt, H.; Motzkus, H. W.; Lankers, M.; Hofer, S.; Thiele, H.; et al. Chemotaxonomic identification of single bacteria by micro-Raman spectroscopy: Application to clean-room-relevant biological contaminations. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (3), 1626–1637.
- (15) Izake, E. L. Forensic and homeland security applications of modern portable Raman spectroscopy. *Forensic Sci. Int.* **2010**, *202* (1–3), 1–8.
- (16) Choo-Smith, L. P.; Edwards, H. G. M.; Endtz, H. P.; Kros, J. M.; Heule, F.; Barr, H.; Robinson, J. S.; Bruining, H. A.; Puppels, G. J. Medical applications of Raman spectroscopy: from proof of principle to clinical implementation. *Biopolym. - Biospectroscopy Sect.* **2002**, *67* (1), 1–9.
- (17) Fan, M.; Andrade, G. F. S.; Brolo, A. G. A review on the fabrication of substrates for surface enhanced raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *693* (1–2), 7–25.
- (18) Bersani, D.; Madariaga, J. M. Applications of Raman. *J. Raman Spectrosc.* **2012**, *43* (11), 1523–1528.
- (19) Taday, P. F.; Van Der Weide, D.; Wood, K.; Chamberlain, M.; Roskos, H.; Phillips, C.; Newnham, D.; Towrie, M.; Appelquist, I. Applications of terahertz spectroscopy to pharmaceutical sciences. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2004**, *362* (1815), 351–364.
- (20) Cai, W. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2008**, *Volume 1*, 17–32.
- (21) Carvalho, J. de O. Estudo de espalhamento Raman em cristais de nitrato de mongolíssima submetidos a altas pressões, pós-graduação em ciências dos materiais, centro de ciências sociais, saúde e tecnologia de imperatriz, Universidade Federal de Maranhão, 2015.

- (22) Szostak, R.; Mazurek, S. Quantitative Determination of Acetylsalicylic Acid and Acetaminophen in Tablets by FT-Raman Spectroscopy. *Analyst* **2002**, *127* (1), 144–148.
- (23) Niessen, A. M. A. Mapas por microscopia de Raman caso de estudo: cerâmicas arqueológicas portuguesas da idade do ferro provenientes do Castro de Azougada, dissertação de mestrado em conservação e restauro área de especialização de cerâmica e vidro, Universidade Nova de Lisboa, **2010**.
- (24) Gowen, A. A.; O'Donnell, C. P.; Cullen, P. J.; Bell, S. E. J. Recent applications of chemical imaging to pharmaceutical process monitoring and quality control. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *69* (1), 10–22.
- (25) Sato, H.; Tanaka, T.; Ikeda, T.; Wada, S.; Tashiro, H.; Ozaki, Y. Biomedical applications of a new portable Raman imaging probe. *J. Mol. Struct.* **2001**, *598* (1), 93–96.
- (26) Sylvain, B.; Olivier, B.; Benzerara, K. Raman mapping using advanced line-scanning systems: geological applications. *Applied Spectroscopy. Paris.* **2008**, *62*, 1180-1188.
- (27) Durand, J. C.; Jacquot, B.; Salehi, H.; Fages, M.; Margerit, J.; Cuisinier, F. J. G. Confocal Raman microscopic analysis of the zirconia/feldspathic ceramic interface. *Dent. Mater.* **2012**, *28* (6), 661–671.
- (28) Allakhverdiev, K. R.; Lovera, D.; Altstädt, V.; Schreier, P.; Kador, L. Confocal Raman Microscopy: non-destructive materials analysis with micrometer resolution. *Rev. Adv. Mater. Sci.* **2009**, *20* (1), 77–84.
- (29) Kiselev, R.; Schie, I. W.; Aškriabić, S.; Krafft, C.; Popp, J. Design and first applications of a flexible Raman micro-spectroscopic system for biological imaging. *Biomed. Spectrosc. Imaging* **2016**, *5* (2), 115–127.
- (30) Dieing, T.; Fischer, H.; Cederholm, E.; Gegerfelt, D. Von. Imaging of ultrathin graphite with confocal Raman imaging. **2015**.
- (31) Paschoal, A. R. A microscopia Raman de alta resolução e suas aplicações na ciência dos materiais, tese de doutoramento apresentada ao curso de pós-graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, 2011.
- (32) Xin Zhang; Qing-Hai Tan; Jiang-Bin Wu; et al. Review on the Raman spectroscopy of different types of layered materials. *RSC Adv.* **2015**.

- (33) Staden, J. F.; Tsanwani, M. Determination of Paracetamol in pharmaceutical formulations using a sequential injection system. *Elsevier*. **2002**, 25 (3), 1095-1101.
- (34) Eliasson, C.; Matousek, P. Noninvasive authentication of pharmaceutical products through packaging using spatially offset raman spectroscopy. *Anal. Chem.* **2007**, 79 (4), 1696–1701.
- (35) Shashkov, S.; Dorozhkin, P. AFM-Raman characterization of pharmaceutical tablets compound distribution studies in pharmaceutical tablets by integrated AFM-Raman instrument. **2015**.
- (36) Caudrona, E.; Tfayli, A.; Monnier, C.; et al. Identification of hematite particles in sealed glass containers for pharmaceutical uses by Raman microspectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, 866–868.
- (37) Nanubolu, J. B.; Burley, J. C. Investigating the recrystallization behavior of amorphous Paracetamol by variable temperature Raman studies and surface Raman mapping. *Mol. Pharm.* **2012**, 9 (6), 1544–1558.
- (38) Bonawi-Tan, W.; Williams, J. A. S. Quality control with Raman spectroscopy in pharmaceutical tablet manufacturing. *J. Manuf. Syst.* **2004**, 23 (4), 299–308.
- (39) Donald A. Comely, M.D.; Joseph A. Ritter, M. D. J. N-acetyl-P-aminophenol (tylenol elixir) as a pediatric antipyretic-analgesic. *JAMA* **1956**, 1219–1221.
- (40) Ferreira, T. R.; Barberato Filho, S.; Borgatto, A. F.; Lopes, L. C. Analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios não esteroides em prescrições pediátricas. *Cien. Saude Colet.* **2013**, 18 (12), 3695–3704.
- (41) Kogawa, A. C.; Hérica, A.; Salgado, R. N. Doxycycline Hyclate: A review of properties, applications and analytical methods. *Int. J. Life Sci. Pharma Res.* **2012**, 2 (4), P11–P25.
- (42) Sciences, P. United States Patent (19). **1994**, No. 19.
- (43) Sena, M. M.; Poppi, R. J. N-Way PLS Applied to simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, Paracetamol and caffeine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, 34 (1), 27–34.
- (44) Chao, K.; Dhakal, S.; Qin, J.; Peng, Y.; Schmidt, W. F.; Kim, M. S.; Chan, D. E. A spatially offset Raman spectroscopy method for non-destructive detection of gelatin-encapsulated powders. *Sensors (Switzerland)*. **2017**, 17 (3).
- (45) Graham, G. G.; Davies, M. J.; Day, R. O.; Mohamudally, A.; e Scott, K. F. The

- modern pharmacology of Paracetamol: Therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology*. **2013**, 21(3), 201-232.
- (46) De-Giorgio, F.; Lodise, M.; Chiarotti, M.; d'Aloja, E.; Carbone, A.; e Valerio, L. Possible fatal acetaminophen intoxication with atypical clinical presentation. *J Forensic Sc* **2013**, 58(5), 1397-1400.
- (47) Klotz, U. Paracetamol (Acetaminophen) - A popular and widely used nonopioid analgesic. *Arzneimittelforschung* **2012**, 62(8), 355-359.
- (48) Bertolini, A.; Ferrari, A.; Ottani, A.; Guerzoni, S.; Tacchi, R.; et al. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Rev.* **2006**, 12 (3-4), 250-275.
- (49) Santos, C.; Moraes, O. Hepatotoxicidade por Paracetamol, Faculdade de Pindamonhangaba, São Paulo, **2014**.
- (50) Rose, A. A.; Kaialy, W. Improved tableting behavior of Paracetamol in the presence of polyvinylpyrrolidone additive: effect of mixing conditions. *Particuology* **2018**, 1-10.
- (51) Amado, A. M.; Azevedo, C.; Ribeiro-Claro, P. J. A. Conformational and vibrational reassessment of solid Paracetamol. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, 183, 431-438.
- (52) Movasaghi, Z.; Rehman, S.; Rehman, I. U. Raman spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2007**, 42 (5), 493-541.
- (53) Organic experiments, *One-Day Practical Course for Year 12 Students Organic Experiments*; **2016**.
- (54) Baptistella, L. H. B.; Giacomini, R. A.; Imamura, P. M. Síntese dos analgésicos Paracetamol e fenacetina e do adoçante dulcina: um projeto para Química orgânica experimental. *Quim. Nova* **2003**, 26 (2), 284-286.
- (55) Mujahid, A.; Ali, Y.; Afzal, A.; Hussain, T.; Tufail Shah, A.; Shehzad, K.; Umar Farooq, M. Rapid assay of the comparative degradation of acetaminophen in binary and ternary combinations. *Arab. J. Chem.* **2014**, 7 (4), 522-524.
- (56) Vieira, H. J. Desenvolvimento de procedimentos de análise por injeção em fluxo para a determinação de furosemida, Paracetamol e acetilcisteína em formulações farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Química, 2006.
- (57) Mehretie, S.; Admassie, S.; Hunde, T.; Tessema, M.; Solomon, T. Simultaneous

- Determination of N-acetyl-p-aminophenol and p-aminophenol with Poly (3,4-ethylenedioxythiophene) modified glassy carbon electrode. *Talanta* **2011**, 85 (3), 1376–1382.
- (58) Xu, Q.; Bauer, R.; Hendry, B. M.; Fan, T. P.; Zhao, Z.; Duez, P.; Simmonds, M. S. J.; Witt, C. M.; Lu, A.; Robinson, N.; et al. The quest for modernisation of traditional chinese medicine. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, 13 (1), 1.
- (59) The European Pharmacopoeial Convention. *Sixth Ed. Eur. Pharmacopoeia* **2007**, 0049.
- (60) Hatcher, R. A. The United States Pharmacopeia. *J. Am. Med. Assoc.* **1908**, L (1), 30–34.
- (61) Németh, T.; Jankovics, P.; Németh-Palotás, J.; Koszegi-Szalai, H. Determination of Paracetamol and Its main impurity 4-aminophenol in analgesic preparations by micellar electrokinetic chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 47 (4–5), 746–749.
- (62) Suntornsuk, L.; Pipitharome, O. Simultaneous determination of paracetamol and chlorpheniramine maleate by micellar electrokinetic chromatography. *Pharm. Biomed. Anal. J. Pharm.* **2003**, 441–449.
- (63) Abdelwahab, N. S.; Abdelaleem, E. A. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of guaifenesin and pseudoephedrine hydrochloride in the presence of syrup excipients. *Arab. J. Chem.* **2017**, 10, S2896–S2901.
- (64) Chen, G.; Zhu, Y.; Wang, Y.; Xu, X.; Lu, T. Determination of bioactive constituents in traditional Chinese medicines by CE with electrochemical detection. *Biomed. Anal. J. Pharm.* **2006**, 843–850.
- (65) Oliveira, G. G.; Janegitz, B. C.; Batistão, M. B.; Salami, F. H.; Fatibello-Filho, O.; Leite, O. D. Determinação de Paracetamol pela inibição da reação quimiluminescente do luminolhipoclorito de sódio em um sistema de análise em fluxo empregando o conceito de multicomutação. *Quim. Nova* **2009**, 32 (7), 1755–1759.
- (66) Forshed, J.; Andersson, F. O. NMR and bayesian regularized neural network regression for impurity determination of 4-aminophenol. *Biomed. Anal. J. Pharm.* **2002**, 495–505.
- (67) Wilkins & Williams. *Troy DB. Remington: The Science and Practice of Pharmacy*,

- 21st ed.; Philadelphia: Lippincott, 2006.
- (68) (USP-28/NF-23), U. P. F. Stability considerations in dispensing practice. *Rockv. United States Pharmacopeial Conv.* **2005**.
- (69) Raymond, C. R.; Paul J. S.; M. E. Q. Handbook of pharmaceutical excipients. *Handb. Pharm. excipients, Sixth Ed.* **2009**.
- (70) Gbenga, B. L.; Taiwo, Y. Studies of the effect of storage conditions on some pharmaceutical parameters of powders and tablets. *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.* **2015**, *14* (2), 147–151.
- (71) Yoshioka, S.; Stella, V. *Stability of Drugs and Dosage Forms*; Kluwer Academic Publishers: New York, **2002**.
- (72) Prista, N.; Alves, A. C.; Morgado, R. M. B.; Lobo, J. *Tecnologia Farmacêutica*, 6. III vol.; Lisboa, **2009**.
- (73) Lachman, L.; Lieberman, H. A. E Kanig, J. L. *Teoria e Prática Na Indústria Farmacêutica*, 1 vol. I.; Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, **2001**.
- (74) Swarbrick, J. S. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*; **2006**.
- (75) França, M. D. Degradação de Paracetamol empregando tecnologia oxidativa avançada baseada em fotocatalise heterogênea usando irradiação artificial e solar. Universidade Federal de Uberlândia, 2011.
- (76) Trivedi M. K.; Patil S.; Shettigar H.; Bairwa K.; Jana S. Effect of biofield treatment on spectral properties of Paracetamol and piroxicam. *Chem. Sci. J.* **2015**, *6* (3).
- (77) Soares, L. A. Análises preliminares de substâncias viscosas em espectrômetro de infravermelho utilizando suporte alternativo. *Rev. Eletrônica Farmácia* **2014**, *3* (2), 63–67.
- (78) Faccin da Silva, H.; Vebber, M. C.; Fetter, G.; Giovanela, M.; da Silva Crespo, J. Preparação e caracterização de filmes finos automontados de PAH/PAA/TiO₂ fotossensibilizados com clorofilina cúprica para a fotodegradação de Paracetamol. *Sci. cum Ind.* **2018**, *6* (2), 31–38.
- (79) De Aroca, M. T. C. Resolución de la estructura cristalina del Paracetamol en base a la difracción de rayos X en polvo (crystal structure determination of Paracetamol by powder X-ray diffraction). Trabajo de fin de grado para acceder al grado en Física. Facultad de Ciencias, Universidad de Cantabria, 2017.
- (80) Santos, M. da S.; Colnago, L. A. Validation of quantitative ¹H NMR method for the

- analysis of pharmaceutical formulations. *Quim. Nova* **2013**, *36* (2), 324–330.
- (81) Hao, B. S. Synthesis and characterisation of schiff base liquid crystals possessing dialkylamino terminal unit. Universiti Tunku Abdul Rahman, 2011.
- (82) Cinarli, A.; Gürbüz, D.; Tavman, A.; Seher Birteksöz, A. Synthesis, spectral characterizations and antimicrobial activity of some schiff bases of 4-chloro-2-aminophenol. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **2011**, *25* (3), 407–417.
- (83) Reddy, J. S.; Chakravarth, I. E.; Prabhavathi, K. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research Preparations. **2011**, *3* (4), 773–776.
- (84) Griffith, W. P.; Koh, T. Y. Vibrational spectra of 1,2-benzenedithiol, 2-aminothiophenol and 2-aminophenol and their SER spectra. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1995**, *51* (2), 253–267.
- (85) Peng, H.; Xiong, H.; Wang, S.; Li, J.; Chen, L.; Zhao, Q. Soluble starch-based biodegradable and microporous microspheres as potential adsorbent for stabilization and controlled release of coix seed oil. *Eur. Food Res. Technol.* **2011**, *232* (4), 693–702.
- (86) Dumitraşcu, M.; Meltzer, V.; Sima, E.; Virgolici, M. G.; Albu, M. G.; Ficai, A.; Moise, V.; Minea, R.; Vancea, C.; Scărişoreanu, A.; et. al. Characterization of electron beam irradiated collagen polyvinyl pyrrolidone (PVP) and collagen-dextran (DEX) blends. *Dig. J. Nanomater. Biostructures* **2011**, *6* (4), 1793–1803.
- (87) Utami, P. I.; Rahayu, W. S.; Nugraha, I.; Rochana A. N. Fatty acid analysis of lipid extracted from rats by Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. Purwokerto.* **2018**, 0–4.
- (88) Yuen, S. N.; Choi, S. M.; Phillips, D. L.; Ma, C. Y. Raman and FTIR spectroscopic study of carboxymethylated non-starch polysaccharides. *Food Chem.* **2009**, *114* (3), 1091–1098.
- (89) Kaczmarska, K.; Grabowska, B.; Spychaj, T.; Zdanowicz, M.; Sitarz, M.; Bobrowski, A.; Cukrowicz, S. Effect of microwave treatment on structure of binders based on sodium carboxymethyl starch: FT-IR, FT-Raman and XRD investigations. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *199*, 387–393.
- (90) Oliveira, M. R. A.; et al. Determination of amylose content in starch using Raman spectroscopy and multivariate calibration analysis. *Orig. Pap.* **2010**, 2695–2700.
- (91) De Almeida, M. R.; de Sá Oliveira, K.; Stephani, R.; Cappa de Oliveira, L. F.

- Application of FT-Raman spectroscopy and chemometric analysis for determination of adulteration in milk powder. *Anal. Lett.* **2012**, *45* (17), 2589–2602.
- (92) Babaei, A.; Afrasiabi, M.; Mirzakhani, S.; Reza Taheri, A. A sensitive determination of acetaminophen in pharmaceutical preparations and biological samples using multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22* (2), 344–351.
- (93) Liya, T.; Esubalew, A.; Ayenew A. Quality evaluation of paracetamol tablets obtained from the common shops (kiosks) in Addis Ababa, Ethiopia. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2014**, *5* (8), 3502–3510.
- (94) Haywood, A.; Mangan, M.; Glass, B. Stability implications of repackaging Paracetamol tablets into dose administration Aids. *J. Pharm. Pract. Res.* **2006**, *36* (1), 25–28.
- (95) Melveger, A. J.; Huynh-Ba, K. *Critical Regulatory Requirements for a Stability Program*; Handbook of stability testing in pharmaceutical development: New York, Springer, 2009.
- (96) Silva, K. E. R.; Alves, L. D. S.; Soares, M. F. R.; Passos, R. C. S.; Faria, A. R.; Rolim Neto, P. J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. *Rev. Ciências Farm. Básica e Apl.* **2009**, *30* (2), 129–135.
- (97) WHO. *WHO Good Manufacturing Practices: Main Principles for Pharmaceutical Products*; 2004.
- (98) Kommanaboyina, B.; e Rhodes, C. T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1999**, *25*, 857–868.
- (99) Lerner, L. Identity of a purple dye formed by peroxidic oxidation of p-aminophenol at low P^H. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115* (35), 9901–9910.
- (100) https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5852965.htm.
- (101) Vieira, S. N. Contribuição para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para detecção de hepatopatias, Dissertação de mestrado, Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, **2007**.
- (102) Gil, E.S. *Controle físico-químico de qualidade de medicamentos*. 3.ed. São Paulo: Editora Pharmabooks, **2010**, p.297-348.

