



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA

INSTITUTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DETECÇÃO NÃO-DESTRUTIVA DE COMPRIMIDOS ADULTERADOS DO
FÁRMACO GLIBENCLAMIDA EMPREGANDO AS ESPECTROSCOPIA NIR E
FLUORESCENCIA EM FASE SÓLIDA E MÉTODOS QUIMIOMETRICOS

Rafael da Silva Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Kássio Michell Gomes de Lima

Natal – RN

2012

Rafael da Silva Fernandes

DETECÇÃO NÃO-DESTRUTIVA DE COMPRIMIDOS ADULTERADOS DO
FÁRMACO GLIBENCLAMIDA EMPREGANDO AS ESPECTROSCOPIA NIR E
FLUORESCENCIA EM FASE SÓLIDA E MÉTODOS QUIMIOMETRICOS

Monografia apresentada junto ao curso de Química
Bacharelado da Universidade Federal do Rio Grande
do Norte, como requisito obrigatório à obtenção do
título de bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Kássio Michell Gomes de Lima

Natal – RN

2012

Aos que acreditaram e de alguma forma ajudaram na minha caminhada. Especialmente a minha mãe Antônia, e meu pai, Diassis, por todo apoio, confiança e carinho.

A vocês, dedico.

AGRADECIMENTOS

- Sendo esse trabalho a concretização de uma longa caminhada e o resultado de inúmeras superações, nas quais vários obstáculos e imprevistos foram superados. Agradeço a Deus pela oportunidade de ter chegado onde estou pelas pessoas que existem na minha vida e pela força e coragem para viver longe da minha família.
- Aos meus pais Antônia Maria Borges da Silva e Francisco de Assis Fernandes, como também aos meus avós Chaga e Eliza, e aos meus tios Marcos, Erivanio, Elineusa, Elisangela e Roberto por todo amor, atenção, carinho, incentivo e alegria. Todos sempre estiveram ao meu lado
- A minha melhor amiga Aline Vanessa que sempre aceitou minhas prioridades e me fez amar os estudos como amo hoje. Por todos os livros pelo qual estudei e pelo companheirismo que me fizeram crer que era possível.
- Ao meu melhor amigo Sergio Ruschi por todo companheirismo criado durante esse período dentro e fora da universidade.
- A todos os meus amigos do grupo GPQA e do Laboratório de Combustíveis e Lubrificantes-LCL
- Ao professor e orientador Prof. Dr. Kássio Michell Gomes de Lima, por toda sua atenção, apoio, cobrança, conhecimento e, antes de tudo pela confiança que me foi depositada
- A Fernanda Saadna pela colaboração durante o período em que estive realizando análise no Laboratório de Química Analítica - UFRN
- A Universidade Federal do Rio Grande do Norte, ao Departamento de Química e ao NEPPGN

CURRICULUM VITAE

Rafael da Silva Fernandes

E-mail: rafael.quimica.ufrn@gmail.com

Currículo Lattes:<http://lattes.cnpq.br/0271263232319722>

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2009 - 2012 Graduação em Química

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil

Título: BACHARELADO

Orientador: Prof. Dr. Kássio Michell Gomes de Lima

Bolsista: Iniciação Científica (IT-REUNI)

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2009 - 2009 Curso de curta duração de Inovações Tecnológicas Aplicadas as Indústrias Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.

2009 – 2009 Curso de curta duração em Teoria da Modelagem molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.

2009 – 2009 Curso de curta duração de Química Medicinal. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.

2010 - 2010 Extensão universitária em XI Olimpíada de Química do Rio Grande do Norte. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.

2011 - 2011 Extensão universitária em Mostra de Iniciação Científica do Departamento de. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.

2011 -2011 Extensão universitária em 2011 - XII Olimpíada de Química do Rio Grande do N. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.

BOLSA OBTIDA

04/2012 – 12/2010 IT-REUNI

01/2011 – 08/2011 Iniciação Científica (REUNI)

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Fernandes, R. S.; Lima, K.M.G. Detecting counterfeit diabetes tablets by near-infrared spectroscopy; 15th international conferences on Near Infrared Spectroscopy, 2011, Cape Town, África do Sul.

Fernandes, R. S.; Lima, K.M.G; Costa, F.S.L. Non-destructive detection of adulterated tablets of glibenclamide using solid-phase fluorescence spectroscopy and unfolded partial least squares regression with discriminant analysis. Institutde Science Moléculaires de Marseille-Equipe Analyse Développement Durable Environnement Méthodologie, 2011, Marseille,França.

ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS EM REVISTAS

Fernandes, R.S.; LIMA, K.M.G.; Costa, F.S.L.; Valderrama, P.; Março, P.H. Non-destructive detection of adulterated tablets of glibenclamide using NIR and solid-phase fluorescence spectroscopy and chemometric methods Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 66, julho 2012, pag. 85–90.

Paciência e perseverança têm o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem.

(John Quincy Adams)

RESUMO

Este estudo descreve um método não destrutivo para a detecção de comprimidos adulterados de glibenclamida. Este trabalho usa a espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) e espectroscopia de fluorescência em fase sólida juntamente com ferramentas quimiométricas, tais como, modelagem suave independente de analogia de classe (SIMCA), mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA) e mínimos quadrados parciais desdobrado com análise discriminante (UPLS-DA). Neste trabalho foram coletados 366 comprimidos de farmácias da região metropolitana de Natal/RN de três classes, FP (farmácia popular), DA (daonil) e GL (glibexil). Os teores de glibenclamida para cada tipo comprimido foram avaliados por espectrofotometria derivada na região entre 190 a 350 nm do ultravioleta, utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (/Shimadzu). Os resultados obtidos a partir da espectroscopia NIR e fluorescência em fase sólida juntamente com aqueles obtidos a partir da técnica multivariada mostraram até 98,6 % de acerto nos modelos, ratificando que esta classificação de dados é uma maneira eficaz para detectar adulteração de drogas para prevenção de diabéticos. Na tentativa de aperfeiçoar os modelos multivariados e avaliar o erro de cada modelo de calibração, foram feitas seleções de variáveis (comprimento de onda). Os algoritmos utilizados neste trabalho foram o APS (algoritmo de projeções sucessivas), iPLS (do inglês *Interval Partial Least Squares*) e AG (Algoritmo Genético). Todos os algoritmos foram implementados no software Matlab 5.6 (Mathworks, EUA) No futuro, este método pode ser estendido para identificar diferentes tipos de medicamentos falsificados.

Palavras chaves: Glibenclamida, NIR, fluorescência, SIMCA, PLS-DA, UPLS-DA, iPLS, APS, AG

ABSTRACT

This study describes a non-destructive method for detecting tampered with glyburide tablets. This work uses near infrared spectroscopy (NIRS) and fluorescence spectroscopy in the solid phase together with chemometric tools, such as soft independent modeling of class analogy (SIMCA), partial least squares with discriminate analysis (PLS-DA) and minimum deployed with partial squares discriminant analysis (UPLS- DA). In this study we collected 366 tablets pharmacies in the metropolitan region of Natal / RN of three classes, FP (pharmacy popular), DA (Daonil) and GL (glibexil). The contents of glibenclamide for each tablet type were evaluated by spectrophotometry derived in the region between 190-350 nm UV using a UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu). The results obtained from NIR spectroscopy and fluorescence in the solid phase together with those obtained from the multivariate analysis showed up to 98.6% accuracy in the models, confirming that this sort of data is an effective way to detect adulteration of drugs for prevention of diabetics. In an attempt to improve the multivariate models and evaluate the error of each calibration model selections were made of variables (wavelength). The algorithms used in this study were APS (successive projections algorithm), iPLS (Interval Partial Least Squares) and GA (genetic algorithm). All algorithms were implemented in Matlab 5.6 (Mathworks, USA). In the future this method can be extended to identify different types of counterfeit drugs.

Keywords: Glibenclamide, NIR, fluorescence, SIMCA, PLS-DA-DA UPLS, iPLS, APS, AG

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
PREFÁCIO	01
1. INTRODUÇÃO	02
1.1. FALSIFICAÇÃO DE MEDICAMENTOS	02
1.2. GLIBENCLAMIDA	03
1.3. DIABETES MELLITUS	04
1.4. ULTRAVIOLETA	05
1.5. FLUORESCÊNCIA EM FASE SÓLIDA	05
1.6. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO	06
1.7. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS DE CLASSIFICAÇÃO	07
1.8. SELEÇÃO DE VARIÁVEIS	09
2. OBJETIVOS	10

3. EXPERIMENTAL	10
3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES	10
3.2. INSTRUMENTAÇÃO	11
3.3. COMPOSIÇÃO DOS COMPRIMIDOS	12
3.4. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS NIR E FLUORESCÊNCIA	13
3.5. MÉTODO DE REFERÊNCIA	13
3.6. MÉTODOS DE CLASSIFICAÇÃO	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5. CONCLUSÃO	22
6. REFERÊNCIAS	23
7. ANEXO	

LISTA DE ABREVIATURAS

EAASM	<i>European Alliance for Access to Safe Medicines</i> (agência europeia de acesso a medicamentos seguros)
GA	<i>Genetic Algorithm</i> (algoritmo genético)
iPLS	<i>Partial Least Squares intervals</i> (intervalo de mínimos quadrados parciais)
MSC	<i>Multiplicative Scatter Correction</i> (Correção do espalhamento multiplicativo de luz)
NIR	<i>Near Infrared Spectroscopy</i> (espectroscopia de infravermelho próximo)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (análise dos componentes principais)
PLS	<i>Partial Least Squares</i> (mínimos quadrados parciais)
PLS-DA	<i>Partial Least Squares discriminante analysis</i> (mínimos quadrados parciais análise discriminante)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSEC	<i>Root Mean Square Error of Calibration</i> (raiz quadrada do erro médio de calibração)
RMSEP	<i>Root Mean Square Error of prevision</i> (raiz quadrada do erro médio de previsão)
SIMCA	<i>Soft Independent Modeling of Class Analogy</i> (modelagem suave independente de analogia de classe)

SPA	<i>Successive Projections Algorithm</i> (algoritmo de projeções sucessivas)
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i> (organização mundial da saúde)

LISTA DE TABELAS

PÁGINA

Tabela 1	Parâmetro do SIMCA e PLS-DA para amostras da Glibenclamida usando algoritmos de seleção de variáveis.	21
Tabela 2	Parâmetros dos Modelos SIMCA para amostras de Glibenclamida.	22

LISTA DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1	Estrutura molecular da glibenclamida	03
Figura 2	Espectrofotômetro no Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (Bomem) de modelo MB 160	11
Figura 3	Ultravioleta visível (Shimadzu) de modelo UV- HP8453	12
Figura 4	Espectrômetro Perkin Elmer modelo LS-55-B	12
Figura 5	Gráfico da absorbância em função da concentração da glibenclamida pura dissolvida em etanol.	14
Figura 6	Espectro NIR originais de todas as amostras de glibenclamida com excipientes.	16
Figura 7	Espectros derivativos originais de 366 amostras dos comprimidos glibenclamida A, B, C depois de submetidos à pré-tratamentos de suavização, MSC e derivação.	17
Figura 8	Análise por Componentes Principais	18
Figura 9	Análise dos Componentes Principais com reta diagonal decompondo o espaço em duas regiões	20

Figura 10	Contorno obtido por espectroscopia de fluorescência em fase solida	22
Figura 11	Scores do modelo UPLS-DA	23

PREFÁCIO

A falsificação de produtos farmacêuticos possui dimensões internacionais. Há, portanto, necessidade de promover cooperação entre países e cooperação sub-regional e regional na luta contra a falsificação de medicamentos. Neste estudo, foram construídos modelos de classificação para a identificação rápida de produtos farmacêuticos originais e genéricos adquiridos em redes farmacêuticas da região metropolitana de Natal/RN.

A escolha da metodologia empregando a espectroscopia NIR e fluorescência em fase sólida levou em consideração a redução do tempo de análise, a não destruição da amostra e a confiabilidade das medidas por métodos quimiométricos.

Este presente trabalho apresenta os resultados e conclusões das aplicações de métodos espectroscópicos NIR em combinação com as análises multivariadas para determinação de medicamentos falsificados que são muito semelhantes aos produtos genuínos. O estudo é baseado em amostras reais que foram adquiridas em farmácias comerciais.

1. INTRODUÇÃO

1.1 FALSIFICAÇÃO DE MEDICAMENTOS

Devido à extensão da internet medicamentos falsificados representam uma ameaça crescente para a saúde pública em torno do mundo. A EAASM (*do inglês European Alliance for Access to Safe Medicines*) afirma que cerca de 50% dos medicamentos vendidos através de sites não identificados são reconhecidos como falsos [1]. Embora seja difícil obter números precisos, estima-se que as falsificações estão presentes em mais de 10% do mercado mundial de medicamentos [2], além da ameaça à saúde pública, o delito da adulteração de medicamentos promove um impulso para crise financeira, isso porque o valor monetário do comércio internacional de produtos falsificados se aproximou 200 milhões em 2008 [3].

A definição de medicamento falsificado dada pela WHO (*do inglês World Health Organization*) um medicamento falsificado é aquele que é intencionalmente rotulado de forma errada no que diz respeito à identidade e/ou fonte [4]. A falsificação pode ser aplicada aos produtos originais e genéricos. Os medicamentos adulterados podem incluir produtos com ingredientes corretos ou com ingredientes errados, sem princípio ativo, com número insuficiente de ingredientes ativos, com falsa embalagem ou com a concentração do princípio ativo errado [5], mas eles são apresentados como se pudessem gerar os mesmos efeitos farmacodinâmicos.

A circulação crescente e uma variedade de medicamentos contrafeitos forçam os analistas do mundo a projetar diferentes métodos para reconhecimentos de falsificações. Muitos métodos analíticos descritos em farmacopeias têm sido propostos para detecção de drogas falsificadas, tais como, cromatografia líquida e gasosa, ressonância magnética nuclear (RMN) [6], espectroscopia Raman e difração de raios X [6,7]. Na indústria

farmacêutica, para garantir o controle de qualidade dos ingredientes ativos e intermediários dos produtos, é imposto um rígido sistema de regulação. Para cada substância, um determinado conjunto de parâmetros de qualidade é definido, onde são analisadas a dissolução, resistência mecânica, friabilidade e dureza entre outros, o que tem de ser monitorado e documentado amplamente de acordo com as normas de qualidade, antes de o produto ser aprovado [8].

1.2 GLIBENCLAMIDA

Os portadores de diabetes do tipo II, diabetes caracterizada pela resistência a insulina com insuficiente elevação compensatória da secreção desse hormônio, geralmente iniciam uma tentativa de controlar as taxas de glicose por meio de uma dieta alimentar, exercícios ou até a associação destes com uso de um hipoglicemiante oral [9]. A glibenclamida (1-{4-[2-(5-cloro-2-metoxibenzamido)etil]benzenossulfonil}-3-ciclohexiluréia) ou gliburida indicada na Figura 1, é um hipoglicemiante oral de segunda geração, da classe das sulfoniluréia, usado sob a forma de comprimidos para o tratamento do diabetes mellitus. Atua estimulando a liberação de insulina endógena, é ligeiramente solúvel em diclorometano e solúvel em dimetilformamida, etanol, metanol, ácido clorídrico e clorofórmio [10].

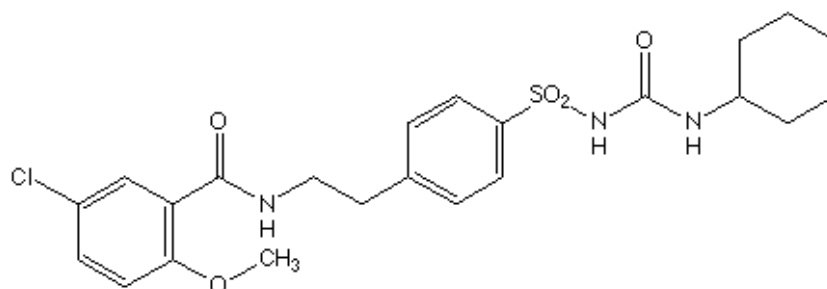


Figura 2: Estrutura molecular da glibenclamida

1.3 DIABETES MELLITUS

Estudos recentes revelaram que a diabetes mellitus tornou-se uma doença comum que afeta seriamente a saúde humana [3]. Diabetes mellitus representa um grupo de doenças de etiologia heterogênea, caracterizada por hiperglicemia crônica e outras anormalidades metabólicas, que são devido à deficiência de efeito da insulina [7].

A *diabetes mellitus* é uma doença crônica, herdada ou adquirida, causada pela deficiência da ação da insulina ou ineficiência na produção da mesma. A insulina é o hormônio produzido no pâncreas, mais precisamente pelas *Ilhotas de Langherans*, responsável pela redução da glicemia [1]. Os principais sintomas da *diabetes mellitus*, que atinge todas as faixas etárias são, a hiperglicemia e as alterações metabólicas de lipídeos, carboidratos e proteínas [2]. Atualmente são registrados quatro tipos de diabetes (diabetes tipo I, tipo II, diabetes gestacional e outras). A diabetes do tipo I ocorre quando existe deficiência absoluta de insulina, a diabetes do tipo II, que ocorre em quase 90% dos casos de diabetes, é caracterizado pela resistência a insulina com insuficiente elevação compensatória da secreção desse hormônio [3]. A diabetes gestacional é definida como qualquer nível de intolerância a carboidratos, resultando em hiperglicemia de gravidade variável, com início ou diagnóstico durante a gestação [4]. A diabetes acelera e agrava a ocorrência de arteriosclerose, aumenta os riscos de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença arterial oclusiva [11]. Estas complicações são as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com diabetes [12].

Os casos de *diabetes mellitus* têm aumentado dramaticamente nas últimas décadas, a doença tornou-se um sério problema de saúde pública em praticamente todos os países, além dos elevados gastos envolvidos no controle da doença e tratamentos das

complicações agudas e crônicas associadas, tem levado a incapacidade física permanente por cegueira e/ou amputação de membros de indivíduos portadores da doença. Todos esses fatores têm provocado um elevado impacto socioeconômico[16]. Devido às mudanças no estilo de vida da população, um aumento na prevalência da obesidade e do sedentarismo [13,14], estima-se que até 2025 existiram cerca de 300 milhões de pessoas portadores de *diabetes mellitus* em todo planeta [15].

1.4 ULTRAVIOLETA

O método espectrofotométrico no ultravioleta tem sido largamente empregado nas análises de controle de qualidade de preparações farmacêuticas devido à sua rapidez, robustez e simplicidade [16]. A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. A radiação ultravioleta é fundamentada na transição eletrônica dos átomos ou moléculas [17].

1.5 FLUORESCÊNCIA EM FASE SÓLIDA

Em anos recentes, a espectroscopia de fluorescência de excitação e de emissão foi utilizada em conjunto com os métodos quimiométricos para a análise de formulações farmacêuticas em fase sólida por fluorescência molecular e calibração multivariada de segunda ordem [18,19]. A análise por fluorescência molecular é uma opção atraente, devido à sua sensibilidade inerente e facilidade de aquisição espectral. Sotomayor et al. Descrevem a aplicabilidade da espectroscopia de fluorescência para quantificação de princípio ativo [20]. Isto é especialmente verdadeiro para a caracterização da fase sólida, onde a preparação da amostra reduzida é necessária. Em fase sólida, a espectroscopia de fluorescência permite a rápida aquisição de dados com o mínimo

consumo de reagentes e análise de baixo custo. Além disso, não gera resíduo e tem uma boa sensibilidade e seletividade. Infelizmente, até à data, esta estratégia tem sido raramente aplicadas, muito provavelmente devido a uma falta de amostras sólidas de interesse farmacêutico.

1.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

A Espectroscopia NIR (*do inglês Near Infrared Spectroscopy*) tem demonstrado ser uma ferramenta versátil para a análise de produtos da indústria farmacêutica. É uma técnica de análises não destrutiva com pouca ou nenhuma necessidade de preparação da amostra, permite também a determinação simultânea da composição química (por exemplo, o teor do ingrediente farmacêutico ativo) e propriedades físicas, como dureza do comprimido [21]. Na região do infravermelho próximo (750-2500nm), é possível observar principalmente sobretons e combinações de bandas de absorção, normalmente ocorrendo na região do médio associados com as ligações C-H, N-H, O-H e S-H presentes nas moléculas orgânicas. Vredembregt et al. utilizaram (NIR) para verificar a homogeneidade de um lote de Viagra genuíno e para rastrear a presença de citrato de sildenafil [22]. Storme-Paris et al. também utilizaram a espectroscopia NIR para a detecção de medicamentos falsificados e identificação de antibióticos, respectivamente. A caracterização de um fármaco incide sobre o desempenho qualitativo e quantitativo de uma determinada técnica analítica. Para uma técnica como a espectroscopia NIR, essas características são direcionadas a depender de poderosas ferramentas quimiométricas e ferramentas de análise multivariada como, PCA (*do inglês Principal Component Analysis*) PLS (*do inglês Partial Least Squares*) e SIMCA (*do inglês Soft Independent Modeling of Class Analogy*) [23].

1.7 MÉTODOS QUIMIOMETRICOS

A quimiometria começou formalmente na primeira metade da década de 70, mas só se firmou definitivamente quando o computador como componente de instrumentos invadiu o laboratório químico [24]. Quimiometria é a aplicação de métodos estatísticos e matemáticos para a seleção do procedimento experimental ideal e tratamento de dados de análises químicas [7-9]. A quimiometria reúne vários temas, como planejamento de experimentos, métodos de classificação, modelagem e técnicas que permitem compreender os mecanismos químicos. A relação entre medidas instrumentais e valores da propriedade de interesses correspondentes realizados em padrões é feita através de uma série de operações matemáticas definidas como calibração. Sergio Scafi em sua tese de doutorado utilizou modelos quimiométricos para identificação de comprimidos adulterados de aspirina chegando à conclusão de que os modelos eram eficientes.

Os métodos de calibração existentes podem ser divididos quanto à sua complexidade e dimensionalidade dos dados, em calibração de ordem zero, primeira e segunda ordem. Em modelos de calibração de ordem zero é usado um único valor da medida experimental por amostra, ou seja, é uma calibração univariada. A aplicação da calibração univariada requer que a grandeza que é medida diretamente no sistema, por exemplo, a absorvância de um composto, seja livre de interferentes que possam provocar desvios entre sua relação com a propriedade de interesse. Métodos de calibração de primeira ordem fazem uso de um vetor de medidas instrumentais para cada amostra. Esses métodos possibilitam as análises mesmo na presença de interferentes, desde que esses interferentes estejam presentes nas amostras de calibração, como no método de adição do padrão.

Dentre os modelos de calibração multivariada de primeira ordem esta o PLS (mínimos quadrados parciais). As calibrações de segunda ordem são constituídas para

métodos que geram uma matriz de dados por amostra. Esses métodos têm a grande vantagem de permitirem a determinação de espécies de interesse na presença de interferentes [25], mesmo que estes interferentes não tenham sido incluídos nas amostras de calibração.

A PCA é um dos métodos mais comuns empregados na análise de informações, sendo principalmente utilizada pela sua capacidade de compressão dos dados em função da existência de correlação entre diversas variáveis medidas. Quando aplicamos um algoritmo de PCA num conjunto de variáveis, como por exemplo, espectros no infravermelho, o conjunto original destas variáveis é substituído por um novo conjunto de variáveis denominado de componentes principais (PC) [26]. A principal característica deste novo conjunto é a ortogonalidade, porém o mesmo é facilmente reconstruído a partir da combinação linear das variáveis originais (espectros). A PCA é um recurso que constitui a base para o tratamento de dados multivariados, é uma técnica que reduz o número de variáveis (*loadings*) fazendo combinações lineares das variáveis originais [27].

O PLS é o método normalmente utilizado em análises de calibração multivariada. Neste método, os sinais multivariados, como os valores de absorbância medidos em diferentes comprimentos de onda do espectro na região do infravermelho próximo (variáveis x) e concentrações das amostras (variáveis y), por exemplo, são utilizados para estabelecer um modelo de regressão linear. Para construção do modelo de calibração, os dados são dispostos na forma de matrizes: matriz X e matriz Y que contêm os dados de variáveis independentes x e dependentes y , respectivamente. Estas matrizes são decompostas em uma soma de produtos de dois vetores. Normalmente o PLS assume uma relação linear entre os parâmetros analisados. Pequenos desvios da linearidade são aceitáveis, ou seja, o modelo é capaz de dar uma boa previsão desde que

mais variáveis latentes sejam incorporadas ao modelo. Contudo, quando substancial não linearidade está presente nos dados analisados, erros consideráveis são obtidos [28]. Isso pode ser explicado pela representação dos espectros no espaço, fatores que descrevem melhor a propriedade estudada [29].

O PLS-DA (do inglês *Partial Least Squares discriminant analysis*) é uma regressão PLS clássica, onde a variável resposta é categórica, ou seja, indica a classe ou categoria das amostras. Durante o processo de calibração, o método PLS-DA é treinado para calcular os "valores de associação", um para cada classe, a amostra é então atribuído a uma classe quando o valor for acima de um limite de previsão específico. Maiara Santos em sua dissertação de mestrado utilizou o modelo de classificação PLS-DA para análise na verificação na autenticidade de drogas.

Por outro lado, o método SIMCA é construído a partir de modelos baseados em componentes principais, no qual cada classe corresponde a um conjunto de treinamento. Um número ótimo de componentes principais é determinado independentemente para cada classe e o modelo final é obtido através da definição da fronteira entre cada ACP modelado. Como consequência, uma hipercaixa com tantas dimensões quantas forem o número de componentes principais mais adequados para cada classe é obtida. Uma vez definidas as hipercaixas é importante verificar se existem classes com sobreposição. O poder de discriminação dos modelos SIMCA se baseia na não existência de sobreposição entre duas classes diferentes, bem como na maior distância interclasses possível [30]. Janusa Sabin e colaboradores utilizaram o modelo de classificação SIMCA para identificação de fármacos antidepressivos.

1.8. SELEÇÃO DE VARIÁVEIS

Algoritmo Genético (AG) foi proposto por Holland (1975) e utiliza operadores matemáticos para simular o mecanismo de seleção natural inspirada na teoria da evolução de Charles Darwin. Esse algoritmo seleciona conjunto(s) de variáveis de forma mais aleatória e menos susceptível a soluções locais. O AG utiliza operadores genéticos, tais como, o cruzamento (*crossover*) e a mutação que manipulam indivíduos de uma população, por intermédio de gerações, para melhorar (aperfeiçoar) a adaptação (*fitness*) gradativamente [31].

O APS é uma técnica originalmente concebida para selecionar variáveis minimamente colineares em calibração multivariada baseada em MLR. Os modelos MLR-APS apresentaram desempenho (medido em termos de habilidade de predição) melhor que os modelos PLS em muitas aplicações [32].

O procedimento de iPLS compreende dois passos [33]. Primeiro, o espectro é dividido em intervalos de largura igual e modelos PLS locais são construídos para cada intervalo. Segundo, a posição do centro e a largura do intervalo que produziram o melhor modelo PLS (em termos de RMSEPCV, por exemplo) são ajustados para aperfeiçoar os resultados.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo investigar a possibilidade de utilizar a técnica de espectroscopia de infravermelho próximo, ultravioleta e fluorescência em fase sólida em conjunto com ferramentas de calibração multivariada para classificar amostras de glibenclamida quanto à sua composição ou teor de princípio ativo, adquiridas em farmácias comerciais na região metropolitana de Natal/RN.

3. EXPERIMENTAL

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Para determinação do teor de princípio ativo no comprimido foram utilizados os seguintes reagentes:

Glibenclamida como padrão de referência adquirido na Sigma-Aldrich com pureza superior a 99% (HPLC). Etanol (99%, Merck) usado para preparar soluções de glibenclamida utilizados para a construção da curva analítica.

3.2 INSTRUMENTAÇÃO

Neste trabalho foi utilizado Espectrofotômetro no Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (Bomem) de modelo MB 160 D acoplado a um acessório de reflectância difusa, localizado no NEPPGN (Núcleo de Estudos e Pesquisas em Petróleo e Gás Natural), Departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Para auxiliar na obtenção dos espectros tem-se a utilização de um aparato confeccionado em formato cilíndrico com cavidade apropriada ao comprimido.



Figura 2: Espectrofotômetro no Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (Bomem) de modelo MB 160 (UFRN, Natal, Brasil).

O espectrofotômetro ultravioleta visível (Shimadzu) de modelo UV- HP8453 existente no laboratório II de química (UFRN) foi utilizado para a realização da quantificação do teor de princípio ativo de glibenclamida.



Figura 3: Ultravioleta visível (Shimadzu) de modelo UV- HP8453(UFRN, Natal, Brasil).

Os dados de excitação/emissão de fluorescência foram adquiridos em um espectrômetro Perkin Elmer modelo LS-55 localizado no instituto de química na cidade de Campinas (UNICAMP-SP)



Figura 4: Espectrômetro Perkin Elmer modelo LS-55(UNICAMP/SP, Campinas, Brasil).

3.3. COMPOSIÇÃO DE COMPRIMIDOS

O hipoglicemiante oral glibenclamida possui além dos 5 mg do princípio ativo glibenclamida excipientes que complementam sua composição. Alguns dos excipientes são: lactose mono-hidratada, aerosil, amido pré-gelificado, talco, estearato de magnésio e sílica coloidal anidra.

3.4 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS

Os espectros NIR de 366 comprimidos foram coletados em um espectrofotômetro Bomem MB 160, sendo realizadas 3 réplicas para cada comprimido utilizando apenas a média dos espectros de cada amostra, com resolução de 8 cm^{-1} , 50 varreduras para cada espectro e a região utilizada foram de 700 nm a 2.500 nm. Foram utilizadas 251 amostras da marca A, 57 amostras da marca B e 58 amostras da marca C.

Os dados de excitação / emissão de fluorescência foram adquiridos na faixa de comprimentos de onda de 300-400 nm para a excitação e a emissão de 405-600 nm para, com passos de 5 e 2 nm para a excitação e de emissão, respectivamente. As fendas de excitação e de emissão foram fixados em 5 nm, a velocidade de digitalização foi ajustado para o modo mais rápido, o tubo fotomultiplicador foi definido para o nível médio e uma célula com uma sonda de fibra óptica de reflectância foi usado diretamente nos comprimidos.

3.5 MÉTODO DE REFERÊNCIA

Para quantificação do princípio ativo foram coletados espectros na região de 190 a 350 nm, utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (/Shimadzu). Nesta análise foram utilizadas apenas uma porção representativa das marcas A, B e C, totalizando 45 amostras.

A curva analítica para determinação do teor da glibenclamida foi obtida empregando a espectrofotometria UV para determinação da faixa linear de concentração. As soluções-padrão foram preparadas através da diluição de uma solução padrão de 250 mgL^{-1} em álcool etílico, sendo obtidas as concentrações de 2, 10, 40, 60, 80, 100, 120, 140 mgL^{-1} . As medidas foram feitas no comprimento de onda de 300 nm, correspondente ao máximo de absorção da glibenclamida. Na Figura abaixo se observa o gráfico da absorbância em função da concentração da glibenclamida pura.

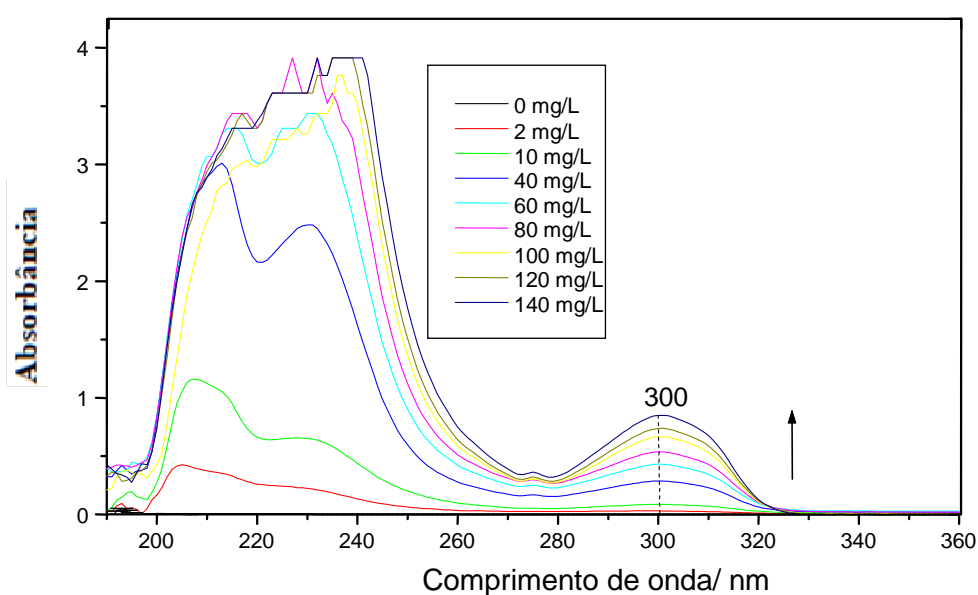


Figura 5: Gráfico da absorbância em função da concentração da glibenclamida pura dissolvida em etanol em diferentes concentrações.

3.6 - CLASSIFICAÇÃO MULTIVARIADA

A importação dos dados, pré-tratamentos e construção dos modelos quimiométricos foram realizadas utilizando o software Unscrambler 9,8 da Camo. Os pré-tratamentos foram à suavização Savitzky-Golay, correção do espalhamento multiplicativo (MSC) e o cálculo das derivadas. Previamente foi selecionada uma região para modelagem com maior número de informações de interesse, ou seja, o conjunto

que melhor correlacionava os espectros com as propriedades físico-químicas do fármaco analisado. A faixa espectral utilizada na construção dos modelos foi de 1328 a 2497 nm.

O PLS-DA foi construído para a classificação e discriminação das amostras A,B e C. A resposta do vetor Y é qualitativa, onde cada uma das categorias de resposta são codificadas através de uma variável representativa.

O método SIMCA foi construído a partir de modelos baseados em componentes principais, no qual cada classe A, B e C corresponde a um conjunto de treinamento. Um número ótimo de componentes principais é determinado independentemente para cada classe e o modelo final é obtido através da definição da fronteira entre cada PCA modelado. Como consequência, uma hipercaixa com tantas dimensões quantas forem o número de componentes principais mais adequados para cada classe é obtida. O poder de discriminação dos modelos SIMCA se baseia na não existência de sobreposição entre duas classes diferentes, bem como na maior distância interclasses possível [27].

Na tentativa de aperfeiçoar os modelos multivariados e avaliar o erro de cada modelo de calibração foram feitas seleções de variáveis (comprimento de onda). O uso dos algoritmos de seleção tem por objetivo realizar todo procedimento de calibração multivariada descrito acima com um número menor de variáveis. Os algoritmos utilizados neste trabalho foram o APS (algoritmo de projeções sucessivas)[f], *iPLS* (do inglês Interval Partial Least Squares)[g] e AG (Algoritmo Genético)[h]. Todos os algoritmos foram implementados no software Matlab 5.6 (Mathworks, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando as moléculas são submetidas à radiação correspondente à região do NIR, ocorrem transições vibracionais atingindo então, níveis energéticos superiores, o

que gera a ocorrência de bandas de combinação e sobretons, que são resultado das vibrações fundamentais das ligações do tipo C-H, N-H, S-H, C-O e O-H.

Na Figura 6 são mostrados todos os espectros originais, e como se pode observar, a interpretação visual dos espectros NIR não é algo simples devido às sobreposições espectrais.

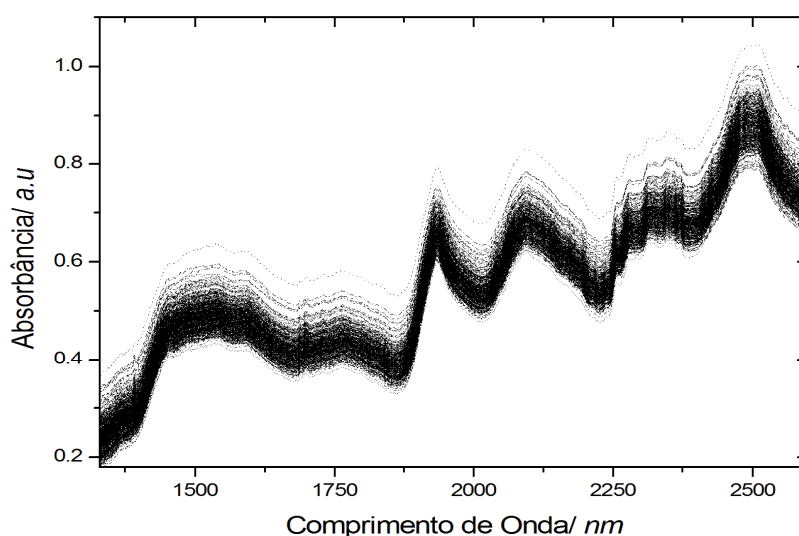


Figura 6: Espectro NIR originais das 366 amostras dos comprimidos glibenclamida A, B, C com excipientes.

Com a finalidade de diminuir o erro instrumental e o espalhamento de luz que prejudica a interpretação das propriedades que se relacionam com o sinal analítico, se faz necessário aplicar uma série de pré-tratamentos. O primeiro pré-tratamento utilizado foi à suavização Savitzky-Golay, a fim de eliminar ao máximo a presença de ruídos instrumentais aleatórios. O algoritmo Savitzky-Golay é baseado na realização de pelo menos um ajuste dos quadrados de regressão linear de um polinômio de grau k , em pelo menos $k + 1$ pontos de dados ao redor de cada ponto do espectro para suavizar os dados. Buscando otimizar o resultado, variaram-se as janelas de 10 a 30 pontos, e verificou-se que a partir de certo limite o aumento dos pontos dessas janelas provoca perda de

informação. À matriz de dados, foi empregada ainda a técnica de tratamento de correção de espalhamento de luz (MSC), com a finalidade de corrigir o efeito do espalhamento de luz presente nos espectros obtidos por técnicas de absorção, causados, principalmente, pelas irregularidades presentes na superfície das amostras. Por fim, foi feito o cálculo das derivadas, para que fosse feita a correção da linha base dos espectros. Assim como a suavização, as janelas variaram de 10 a 30 pontos. E semelhante ao resultado anterior, pôde-se observar que aumentando muito os pontos das janelas, é possível diminuir os ruídos, porém a partir de certo ponto, informações necessárias ao modelo começam a serem perdidas. A Figura 7 mostra os espectros após terem sido aplicados todos os pré-tratamentos:

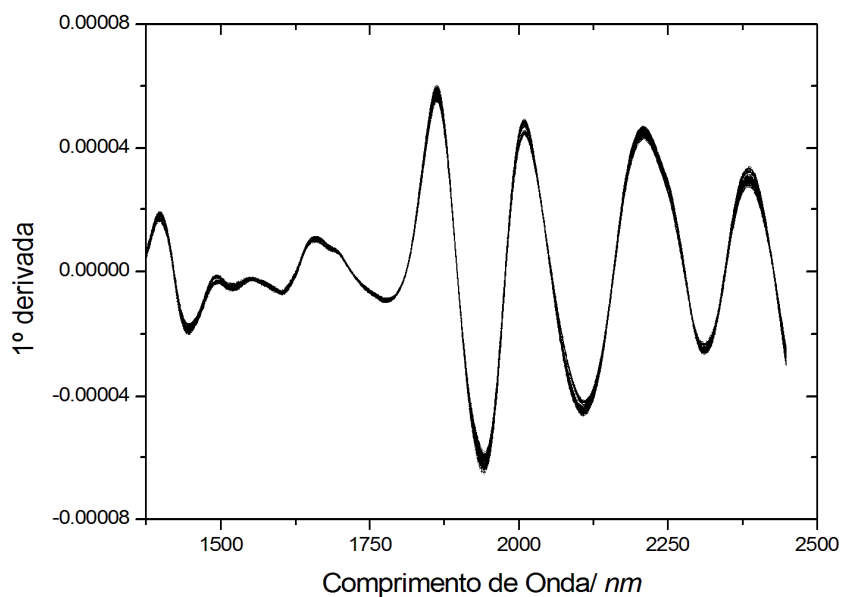


Figura 7: Espectros derivativos originais de 366 amostras dos comprimidos glibenclamida A, B, C depois de submetidos à pré-tratamentos de suavização, MSC e derivação.

Após todos os pré-tratamentos, a matriz de dados, foi submetida à PCA, a fim de classificar ou separar amostras, que apresentem características semelhantes. Esse procedimento permitiu a identificação de três grupos distintos de amostras, conforme podemos observar no gráfico dos escores (Figura 8). Várias PCA foram desenvolvidas,

variando as janelas da suavização e das derivadas. Os melhores modelos obtidos na fase de pré-tratamentos sobre os dados foram os que usaram o MSC e janelas de 30 pontos para suavização e primeira derivada Savitzky-Golay. Para o melhor resultado, obteve-se PC1 (primeira componente principal) definida na direção de máxima variância dos dados de todo o conjunto de amostras de 57% e PC2, descrita na direção que descreve a variação máxima no subespaço ortogonal a PC1 de 16%. Para a escolha do melhor modelo, foi levada em consideração a maior porcentagem nas componentes principais PC1, PC2 e PC3 (não expressa no gráfico). Um dos fatores que difere o SIMCA do PLS-DA é o critério usado para construir modelos. No SIMCA são construídos submodelos com a finalidade de capturar variações dentro de cada classe, no PLS-DA são identificados no espaço dados que discriminam cada classes diretamente. PLS2-DA é uma versão do método PLS em que diversas variáveis Y são qualitativas.

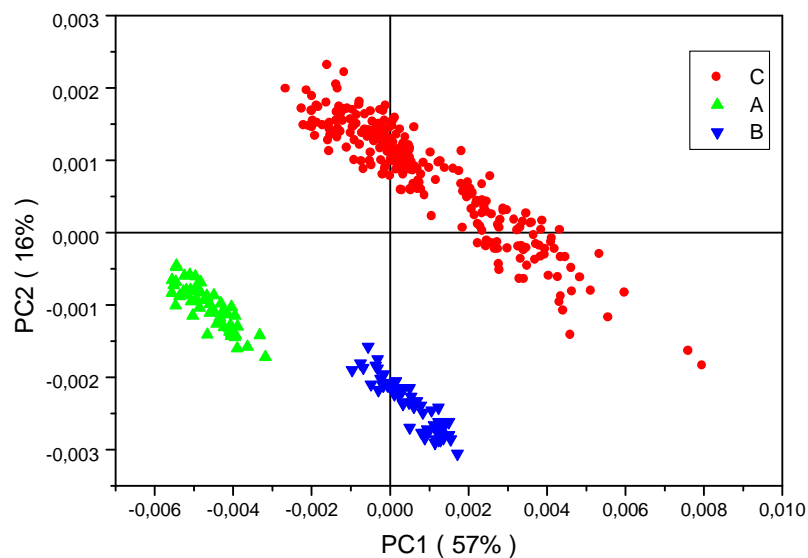


Figura 8: Análise por Componentes Principais

Observa-se na Figura acima, a existência das três classes distintas de amostras, chamados de clusters (do inglês, agrupamento), observa-se através da 1ª componente

principal, que abrange 57% da variância dos dados, podemos verificar que existe uma diferença entre os três clusters, e que as marcas C e B apresentam variações que as diferem dos medicamentos da marca A, considerado neste trabalho, como referência. Essas duas marcas, ao longo de PC1 são muito parecidas, entretanto, na segunda componente principal (PC2), que explica 16% da variância dos dados, é possível notar diferenças entre as mesmas. Isto comprova a sensibilidade da PCA em detectar pequenas alterações entre as amostras. Partindo do princípio que as três marcas contêm a mesma composição, era previsto que no gráfico dos *scores* houvesse apenas um agrupamento. Como podemos observar o modelo PCA é capaz de prever diferenças significativas entre as três marcas, refletindo a composição química. Com intuito de ratificar as classificações feitas pelos modelos multivariados as amostras foram quantificadas através da técnica do UV-vis, onde se obteve a partir de uma regressão linear, a equação da reta com correlação ($r = 0,99899$), tendo objetivo de investigar a distribuição dos agrupamentos em torno das PCs. Após a quantificação observou-se que as amostras A e B apresentaram quantidade de princípio ativo próximo ao informado nas suas respectivas embalagens (5 mg), tendo o valor medido variado entre 4,62 a 4,92 mg. Como o intervalo no teor de princípio ativo é igual para as amostras A e B, embora possuam o mesmo princípio ativo correspondem, às diferentes posições nos *scores* foram atribuídas à quantidade ou tipo de excipientes ou a sequência de manipulação. Para amostra C, após a quantificação foi obtido um valor variando entre 2,22 e 2,54 mg, um valor distante aproximadamente 50 % do informado pela embalagem (5 mg). Resgatando um dos conceitos citados na introdução desse presente trabalho, pode-se observar que a amostra C possui características de um medicamento adulterados. A distância no teor do princípio ativo em relação as amostra A e B é facilmente detectada pelo modelo, sendo expressa no gráfico dos *scores* que separa bem a amostra C das

demais . A Figura 9 representa o gráfico da PCA com uma linha diagonal separando o espaço em duas regiões, uma contendo teores próximos a 5 mg e outra região contendo valores distante de 5 mg.

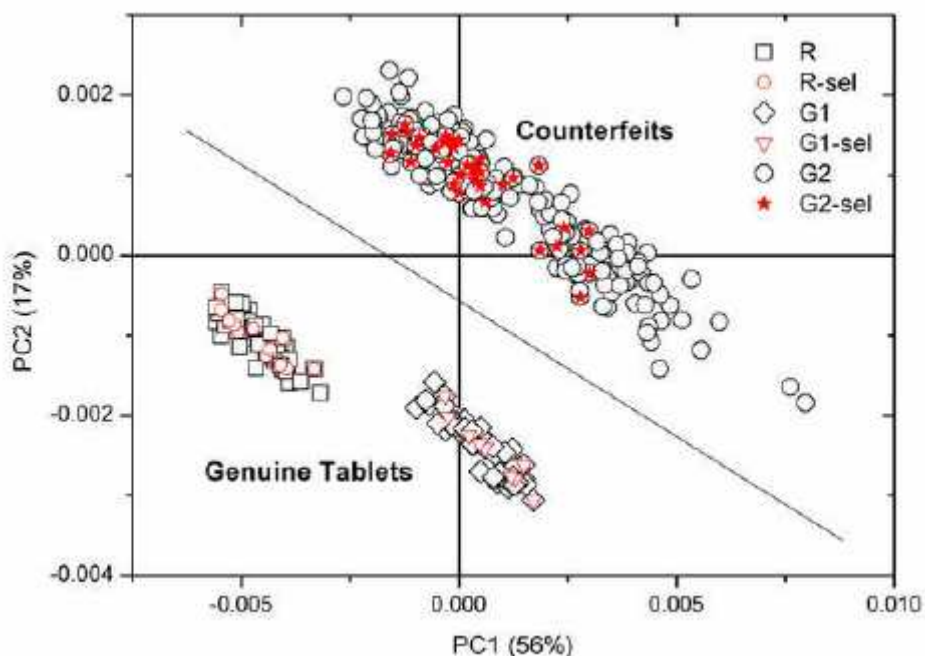


Figura 9 - Análise dos Componentes Principais com reta diagonal decompondo o espaço em duas regiões (G2 Amostra Farmácia popular; R Amostra Daonil; G1 Amostra Clamiben).

Outra observação que pode ser feita, é quanto à homogeneidade de cada uma das três classes de amostras. Como se pode ver, as amostras de A e B estão bastante agrupados no gráfico dos scores, o que demonstra que durante o processo de fabricação, houve um cuidado em seguir rigidamente as etapas sequenciais da produção. Por outro lado, as amostras da C não apresentam tal comportamento, visto que estão distribuídas de forma dispersa, o que sugere, uma falta de homogeneidade no processo de produção. Na tabela 1, estão expressos os valores do coeficiente de correlação(R), raiz quadrada do erro médio de calibração (RMSEC) e raiz quadrada do erro médio de previsão (RMSEP) para os modelos de calibração PLS-DA com e sem algoritmos de seleção de variáveis. O RMSEC e RMSEP dos modelos construídos com o espectro NIR inteiro

(995 variáveis) foram calculados usando o software Unscrambler 9,8 da Camo. O RMSEC e RMSEP dos modelos construídos com as variáveis selecionadas pelos foram calculados utilizando o software Matlab 5.6 (Mathworks, EUA). Os resultados mostram que o artifício da seleção variável quando aplicados provocaram uma oscilação nos valores de erro. Como se pode observar não há uma mudança significativamente nos valores de R, Com exceção do uso do algoritmo MLR-iPLS, cujo R foi de 0.914, os demais algoritmos apresentaram modelos com coeficiente de correlação entre 0.991 e 0.982. Os valores de RMSEP e RMSEC embora que tenham sido menor quando nenhuma seleção de variáveis foi aplicada, também não apresentaram uma diferença significativa, o que aumenta a confiabilidade dos modelos sem e com os algoritmos de seleção. Assim como a correlação o RMSEP e RMSEC quando calculando com as variáveis selecionadas pelo MLR-iPLS apresentou um valor um pouco distante dos

Tabela 1: Parâmetros do SIMCA e PLS-DA Para Amostras da Glibenclamida Usando Algoritmos de Seleção de Variáveis.

Algoritmo	Número de Variáveis	PLS-DA		R ²	SIMCA	
		RMSEC	RMSEP		Erro Tipo I(%)	Erro Tipo II(%)
MLR-APS	9	0,0834	0,0844	0,984	3,27	0
MLR-iPLS	200	0,1874	0,1958	0,914	0,55	9,56
MLR-AG	219	0,0873	0,0894	0,982	1,91	0
Nenhum Algoritmo	955	0,0593	0,0608	0,991	1,40	0

demais. Os modelos SIMCA construídos usando os algoritmos de seleção APS e AG apresentaram valores de erros (tipo I e tipo II) dentro do intervalo de confiança, assim como o modelo que não utilizou a seleção de variáveis. A distância limite para cada classe de amostras foi estabelecido com base nos parâmetros estatísticos Q e T² com 95% de confiança.

O modelo SIMCA com 366 amostras foi utilizado para classificar as amostras em 3 classes, e os resultados podem ser observados na Tabela 2, em que é possível observar que apenas 1,4 % das amostras não foram classificadas corretamente..

Tabela 2: Parâmetros dos Modelos SIMCA Para Amostras de Glibenclamida

	A	B	C	Todas
N° Amostras por Classe	57	58	251	366
N° Amostras Classificadas Corretamente	57	58	251	361
N° Amostras Classificadas Erroneamente	0	0	0	5
% Acerto na Classificação	100	100	100	98,6

A classificação correta de 98,6 % das amostras demonstra que o modelo é robusto a variações na composição dos comprimidos. O modelo desenvolvido não apresentou problemas como: número alto de amostras alocadas em classes erradas e amostras classificadas em mais de uma classe, o que comprova sua capacidade preditiva.

Para reforçar os modelos de classificação utilizados nesse trabalho, foi acrescentando mais um modelo de classificação UPLS-DA. O mapa Excitação / emissão obtido por espectroscopia de fase sólida molecular para as amostras de três classes de glibenclamida. Os resultados são idênticos, não permitindo uma identificação visual das amostras em uma classe determinada.

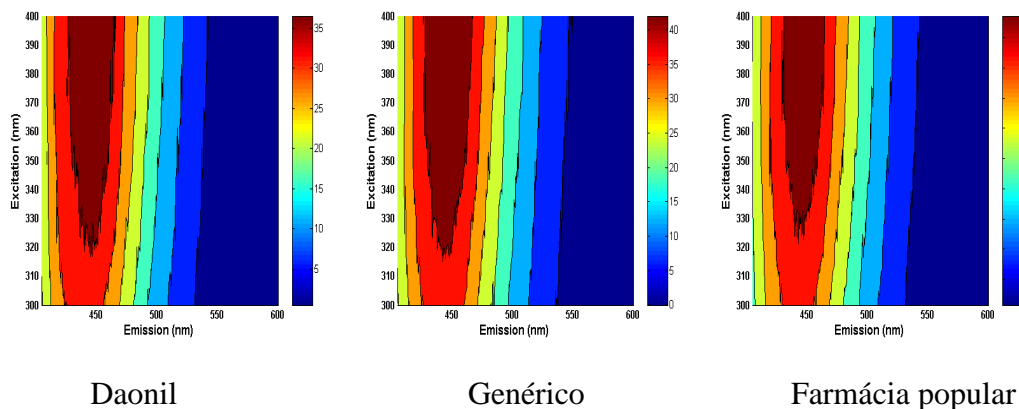


Figura 10 – Contorno obtido por espectroscopia de fluorescência em fase sólida.

Foram construídos modelos de segunda ordem para fins de classificação, o modelo UPLS-DA. foi desenvolvida a partir de fase sólida moleculares de dados de fluorescência de todos os 194 comprimidos separados em dois grupos: calibração e de validação, com 129 e 65 amostras, respectivamente. Cada amostra (matriz) foi desdobrada no seu vetor correspondente.

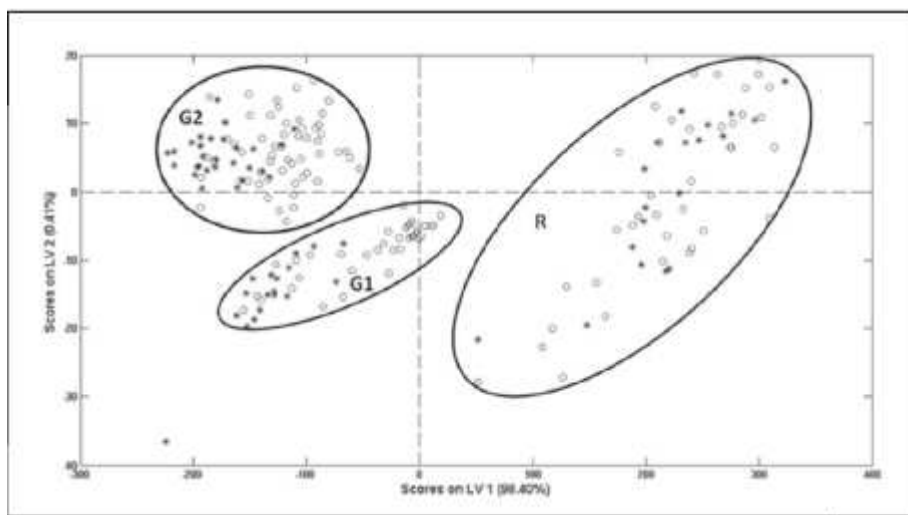


Figura 11 – Scores do modelo UPLS-DA.

A separação entre as três classes de os comprimidos investigados pode ser observado nos agrupamentos. Observa-se que há uma distinção clara dos comprimidos adulterada (classe G2 - Daonil) com os originais (classe R- Farmácia popular).

CONCLUSÃO

A espectroscopia de infravermelho próximo por reflectância difusa, utilizada juntamente aos métodos quimiométricos, mostrou-se uma técnica analítica eficiente para estudos classificatórios. Bem como auxiliar no combate à fraudes de medicamentos. Ainda pode-se afirmar que esta metodologia pode ser utilizada para outros medicamentos, uma vez que neste trabalho ficou demonstrado que mesmo compostos com ação farmacológica e estrutura química muito semelhante podem ser facilmente diferenciados e identificados. Conclusões mais exatas só poderão ser alcançadas com estudos quantitativos, que forneçam ao modelo os valores de referência,

com os quais os dados espectrais possam ser associados. Vale ressaltar a importância dos pré-tratamentos e escolha do método de regressão, a fim de retirar o máximo de informação útil ao modelo. O que o confere maior credibilidade aos resultados.

Por fim, devem-se destacar as qualidades do método alternativo, pois sem necessitar de nenhum tratamento prévio das amostras, e aplicação de nenhuma outra técnica, foi possível identificar a diferença entre os grupos analisados. Não havendo gasto de reagentes, nem operadores especializados para realizar análises, o que incute em baixo custo e sem necessidade de destruir as amostras. Com base nos dados apresentados, é possível afirmar que a espectroscopia aliada à quimiometria são técnicas confiáveis para estudos qualitativos, que visem classificação e identificação de formulações farmacêuticas.

7. REFERÊNCIAS

- [1] "Agreement on Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights, including Trade in Counterfeit Goods," Geneva: , 1995.
- [2] D. Virella, "Falsificação de medicamentos . Uma realidade à qual é preciso dar atenção," *Ácta Periatr*, vol. 39, no. 1, pp. 46-50, 2008.
- [3] Cristiane Guidolin and Marina Venzon Antunes, "Medicamentos Falsificados," Universidade Feevale, 2011.
- [4] "Counterfeit Medicines," 2006. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs275/en/print.html>. [Accessed: 21-Apr-2011].
- [5] P.-Y. Sacré et al., "Comparison and combination of spectroscopic techniques for the detection of counterfeit medicines.," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 53, no. 3, pp. 445-53, Nov. 2010.
- [6] S. Balayssac, S. Trefi, V. Gilard, M. Malet-Martino, R. Martino, and M.-A. Delsuc, "2D and 3D DOSY 1H NMR, a useful tool for analysis of complex mixtures: application to herbal drugs or dietary supplements for erectile dysfunction.," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 50, no. 4, pp. 602-12, Nov. 2009.
- [7] N. . Jestel, *Raman Spectroscopy*. John Wiley & Sons, pp. 195-243.

- [8] J. Märk, M. Andre, M. Karner, and C. W. Huck, "Prospects for multivariate classification of a pharmaceutical intermediate with near-infrared spectroscopy as a process analytical technology (PAT) production control supplement.," *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, vol. 76, no. 2, pp. 320-7, Oct. 2010.
- [9] E. W. C. C.A. Anderson, J.K.D., "Pharmaceutical applications of near-infrared spectroscopy," 2007.
- [10] D. S. M. Ribeiro, J. A. V. Prior, C. J. M. Taveira, J. M. A. F. S. Mendes, and J. L. M. Santos, "Automatic miniaturized fluorometric flow system for chemical and toxicological control of glibenclamide.," *Talanta*, vol. 84, no. 5, pp. 1329-35, Jun. 2011.
- [11] P. Roura Olmeda, M. Mata Cases, and J. F. Cano Pérez, "Nuevas perspectivas en el tratamiento de la diabetes mellitus," *Atención Primaria*, vol. 35, no. 5, pp. 229-232, Mar. 2005.
- [12] M. N. Elbagir, M. A. Eltom, H. Rosling, and C. Berne, "Glycaemic control of insulin-dependent diabetes mellitus in Sudan: influence of insulin shortage," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 30, no. 1, pp. 43-52, Oct. 1995.
- [13] C. G. C. Nery, M. A. da S. Pires, G. A. Pianetti, and C. D. Vianna-Soares, "Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida," *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 44, no. 1, pp. 61-73, Mar. 2008.
- [14] L.F. PALLARDO SÁNCHEZ, "Sulfonilureas en el tratamiento del paciente con diabetes mellitus tipo 2," *Endocrinología y Nutrición*, vol. 55, pp. 17-25, 2008.
- [15] M. M. Ansar and M. Ansari, "Nitric oxide involvement in pancreatic beta cell apoptosis by glibenclamide.," *Nitric oxide: biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, vol. 14, no. 1, pp. 39-44, Feb. 2006.
- [16] M. I. R. . HACKMANN, E.R.M.; BENETON, S.A.; SANTORO, "Espectrofotometria derivada na análise de fármacos em medicamentos," *Rev. Port. Farm.*, vol. 51, pp. 7-12, 1990.
- [17] H. H. Perkampus, *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*. Berlin: , 1992.
- [18] J. C. L. Alves and R. J. Poppi, "Simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine using solid-phase molecular fluorescence and parallel factor analysis.," *Analytica chimica acta*, vol. 642, no. 1-2, pp. 212-6, May 2009.
- [19] A. B. Moreira, I. L. T. Dias, G. O. Neto, E. A. G. Zagatto, and L. T. Kubota, "Solid-phase fluorescence spectroscopy for the determination of acetylsalicylic acid in powdered pharmaceutical samples," *Analytica Chimica Acta*, vol. 523, no. 1, pp. 49-52, Oct. 2004.
- [20] M. D. P. T. Sotomayor, I. L. T. Dias, M. R. V. Lanza, A. B. Moreira, and L. T. Kubota, "Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas," *Química Nova*, vol. 31, no. 7, pp. 1755-1774, 2008.

- [21] M. Blanco, M. Bautista, and M. Alcalá, "Preparing calibration sets for use in pharmaceutical analysis by NIR spectroscopy.," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 97, no. 3, pp. 1236-45, Mar. 2008.
- [22] I. Storme-Paris et al., "Challenging near infrared spectroscopy discriminating ability for counterfeit pharmaceuticals detection.," *Analytica chimica acta*, vol. 658, no. 2, pp. 163-74, Jan. 2010.
- [23] M. Gatti, G. Contarini, and E. Neviani, "Effectiveness of chemometric techniques in discrimination of lactobacillus helveticus biotypes from natural dairy starter cultures on the basis of phenotypic characteristics," *Applied and environmental microbiology*, vol. 65, no. 4, pp. 1450-4, Apr. 1999.
- [24] B. de Barros Neto, I. S. Scarminio, and R. E. Bruns, "25 anos de quimiometria no Brasil," *Química Nova*, vol. 29, no. 6, pp. 1401-1406, Dec. 2006.
- [25] N. E. El-Reyani, Ö. Bozdogan, I. Baczkó, I. Leprán, and J. G. Papp, "Comparison of the efficacy of glibenclamide and glimepiride in reperfusion-induced arrhythmias in rats," *European Journal of Pharmacology*, vol. 365, no. 2-3, pp. 187-192, Jan. 1999.
- [26] S. . Brown, "Chemical Systems Under Indirect Observation: Latent Properties and Chemometrics," vol. 49, p. 14A-31A, 1995.
- [27] Y. Roggo, P. Chalus, L. Maurer, C. Lema-Martinez, A. Edmond, and N. Jent, "A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies.," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 44, no. 3, pp. 683-700, Jul. 2007.
- [28] S. Wold, J. Trygg, A. Berglund, and H. Antti, "Some recent developments in PLS modeling," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 58, no. 2, pp. 131-150, Oct. 2001.
- [29] et al O'Neil, "The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals.," *European Journal of Pharmacology*, vol. 587, pp. 330-335, 2008.
- [30] F. R. P. Rocha and L. S. G. Teixeira, "Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS," *Química Nova*, vol. 27, no. 5, pp. 807-812, Oct. 2004.
- [31] L. Norgaard, A. Saudland, J. Wagner, J. P. Nielsen, L. Munck, and S. B. Engelsen, "Interval Partial Least-Squares Regression (iPLS): A Comparative Chemometric Study with an Example from Near-Infrared Spectroscopy," *Applied Spectroscopy*, vol. 54, no. 3, pp. 413-419, Mar. 2000.
- [32] M. C. U. Araújo, T. C. B. Saldanha, R. K. H. Galvão, T. Yoneyama, H. C. Chame, and V. Visani, "The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 57, no. 2, pp. 65-73, Jul. 2001.
- [33] R. C. Barthus, L. H. Mazo, and R. J. Poppi, "Aplicação de métodos de calibração multivariada para a determinação simultânea de riboflavina (VB2), tiamina (VB1), piridoxina (VB6) e nicotinamida (VPP)," *Química Nova*, vol. 30, no. 7, pp. 1638-1643, 2007.

