

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
UNICAMP**

Instituto de Química



**Espectroscopia no Infravermelho Próximo para
identificação de medicamentos falsificados**

Dissertação de Mestrado

Aluno: Sérgio Henrique Frasson Scafi

Orientador: Prof. Dr. Celio Pasquini

Outubro 2000

Campinas – SP



Dedicatória

***“Dedico esta Dissertação de Mestrado
à minha Avó Doralice Carra Frasson”***

Agradecimentos

*“Em Deus, cuja palavra louvo,
ponho a minha confiança,
minhas palavras, meus pensamentos...”*

- **Ao Professor. Dr. Celio Pasquini pela orientação, paciência e compreensão**
- **Aos Professores Jarbas e Ivo pelo apoio, ajuda e atenção**
- **À Dra. Cláudia Teixeira, diretora do laboratório Noel Nutels – RJ, pela cessão das amostras reais de medicamentos falsificados**
- **Agradecimentos especiais à minha esposa Sabrina pela atenção, ternura, compreensão e carinho em todos os momentos**
- **Agradecimentos especiais à meus Pais Celso e Odette pelo incentivo e carinho**
- **Agradecimentos à minha Família: Celso, José Mário, Márcio, Bernadete, Luciane, Gisela, Ana Caroline, Daniele, Guilherme, João, Sônia e João Rafael**
- **Agradecimentos especiais à meu irmão Celso pela gentileza e presteza de ceder amostras de medicamentos para a execução do projeto**
- **Aos Amigos Ismael, Emerson, Luiz Alexandre, Fernando F., Fernando, Carlos, Gislaiane, Márcia, Soraya, Edna, Cláudia, Patrícia, Andrea, Fernanda, Lygia, Jonas, Gilberto, Gilmar, Ileana, Pilar, Gianni e Henrique**
- **Ao Amigo Renato Guchardi pelo apoio e concessão de uso de seu protótipo de Espectrofotômetro**
- **Ao pessoal da CPG, Bel e André**
- **Aos Funcionários do Instituto de Química e em especial ao funcionário Mário pela confecção das peças**
- **À CAPES pelo apoio financeiro**
- **À FAPESP pelo apoio financeiro do projeto**
- **E a todos aqueles, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a execução desse projeto**

Resumo

Título: Espectroscopia no Infravermelho Próximo para Identificação de Medicamentos Falsificados

Autor: Sérgio Henrique Frasson Scafi

Orientador: Prof. Dr. Celio Pasquini

Este trabalho propõe a investigação do uso da Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) para a identificação de medicamentos falsificados. O trabalho se fundamenta na comparação do espectro na região NIR, de uma amostra, com o espectro típico do medicamento autêntico, possibilitando a sua classificação como verdadeiro ou falso. Sendo a região NIR de difícil interpretação, é necessário a utilização de um tratamento de dados fundamentado em métodos quimiométricos.

A metodologia proposta foi avaliada utilizando-se espectros de amostras de diversos medicamentos, selecionados considerando-se a diversidade de características físico-químicas representativa dos diversos produtos comercializados.

O trabalho propôs primeiramente a investigação do uso da Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) para a identificação de medicamentos adulterados e falsificados. A avaliação da performance da técnica foi feita com amostras reais de medicamentos falsificados. Todos os produtos falsificados foram positivamente identificados. A investigação foi estendida à identificação de medicamentos de diferentes fabricantes contendo o mesmo princípio ativo, de medicamentos dentro de suas embalagens, medicamentos vencidos, em diferentes concentrações e nas diversas formas de apresentação.

Os resultados demonstraram claramente a potencialidade da espectroscopia no Infravermelho Próximo para a determinação da qualidade e avaliação de falsificações de medicamentos.

Palavras-chave: NIR, Identificação de medicamentos, PCA, SIMCA

Abstract

Title: Near Infrared Spectroscopy for Identification of Falsified Drugs.

Author: Sérgio Henrique Frasson Scafi

Supervisor: Prof. Dr. Celio Pasquini

This work is aimed at the investigation of the use of Near Infrared Spectroscopy (NIR) for identification of falsified drugs. The work is based on the comparison of the NIR spectra of a sample with a typical spectra of an authentic drug, allowing its classification as false or authentic. Since the NIR spectral region is difficult to be interpreted, it was necessary to employ multivariate chemometrics for data treatment.

The proposed methodology was evaluated, using a spectra set of various drugs selected in order to include the diversity of physico-chemical characteristics found among commercial products.

Initially, the investigation of the NIR spectroscopic technique for identification of adulterated or false drugs was carried out. The performance of the technique was evaluated by using real samples of falsified drugs. All false products were positively identified. The investigation was extended to the identification of drugs containing the same active principle but made by different manufacturers, drugs inside their packages, with expired validity, with different concentrations of the active principle and under distinct forms of trade.

The results show unequivocally the potential of the NIR spectroscopy as a tool for determination of drug quality and identification of falsified products.

Keywords: NIR, Drug Identification, PCA, SIMCA

Currículo

Sérgio Henrique Frasson Scafi

Formação Superior

Bacharel em Química – Universidade Estadual de Campinas - IQ-UNICAMP

Participações em Congressos

- 20ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Poços de Caldas – MG, 1997. “Construção de um Dispositivo Eletromecânico Antecipador do Ponto Final de Titulação”.
- 5º Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, Campinas - SP, 1997. “Construção de um Dispositivo Eletromecânico Antecipador do Ponto Final de Titulação”.
- 23ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Poços de Caldas – MG, 2000. “Investigação sobre o uso da Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) para Identificação de Medicamentos Falsificados”.
- 23ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Poços de Caldas – MG, 2000. “Utilização da Espectroscopia NIR para Identificação de PET Reciclado”.

Índice de Figuras

Figura

1. Função de Potenciais Harmônicos para um Oscilador Diatômico.....	8
2. Função de Potenciais Harmônicos e Anarmônicos para um Oscilador Diatômico Harmônico.....	10
3. Transições entre Níveis Vibracionais.....	10
4. Perfil da Luz na Refletância Difusa.....	12
5. Esquema da Análise de Componentes Principais (PCA).....	15
6. Esquema da Modelagem SIMCA..	17
7. Esquema da Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS).....	19
8. Espectrofotômetro NIR Brimrose Luminar 2000 e Free Space 2030.....	23
9. Esquema do Espectrofotômetro Luminar 2000 e Free Space 2030.....	24
10. Sonda para Medidas de Transflectância de Amostras Líquidas.....	25
11. Posicionador XYZ com Amostras na Forma de Cápsulas e Comprimido...	25
12. Vistas do Suporte Porta Amostra.....	28
13. Gráfico do Desvio Padrão da Repetibilidade dos Espectros.....	35
14. Espectros de Refletância de Aspirina 500 mg Obtidos nas Duas Faces dos Comprimidos.....	36
15. Espectros de Refletância de Aspirina 500 mg na Forma de 1ª derivada....	37
16. Espectros de Refletância de Aspirina 500 mg Exposta a Alta e Baixa Umidade Relativa do Ar.....	38
17. Espectros de Refletância de Litocit Exposto a Alta e Baixa Umidade Relativa do Ar.....	39
18. Espectros de Refletância dos Medicamentos Aspirina 500, Melhoral 500 mg, Doril 500 mg e AAS 500 mg.....	41
19. Gráfico de Scores da Análise de Componentes Principais dos Medicamentos Aspirina e Melhoral.....	43
20. Gráfico SIMCA de Classificação de Novas Amostras nos Modelos dos Medicamentos Aspirina e Melhoral.....	44
21. Gráfico SIMCA de Classificação de Novas Amostras Adulteradas no	

Modelo do Medicamento Aspirina.....	48
22. Espectros de Refletância do Medicamento Microvlar e seu Placebo.....	50
23. Gráfico de Scores da Análise de Componentes Principais do Medicamento Microvlar e seu Placebo.....	51
24. Gráfico SIMCA de Classificação de Novas Amostras nos Modelos do Medicamento Microvlar e Placebo de Microvlar.....	53
25. Espectros de Refletância de Atenolol e Sulfametoxazol.....	55
26. Gráfico de Scores da PCA das Amostras de Atenolol e Sulfametoxazol....	55
27. Gráfico SIMCA de Classificação de Novas Amostras no Modelo do Fármaco Atenolol.....	56
28. Obtenção dos Espectros do Medicamento Yomax Dentro dos Blisteres.....	57
29. Espectro do Medicamento Yomax Obtido Dentro do Blister e Espectro do Blister.....	58
30. Espectro do medicamento Yomax Obtido Dentro do Blister Utilizando o Blister como "Background".....	59
31. Gráfico SIMCA de Classificação de Novas Amostras no Modelo do Medicamento Yomax.....	60
32. Espectros dos Blisteres dos Medicamentos Yomax e Liberan.....	61
33. Espectros na Forma de 1ª Derivada do Medicamento Litocit.....	64
34. Gráfico de Scores da PCA do Medicamento Litocit.....	64
35. Gráfico SIMCA de Classificação de Novas Amostras Dentro e Fora do Prazo de Validade no Modelo do Medicamento Litocit Válidos.....	66
36. Espectros na Forma de 1ª Derivada dos Medicamentos Ampicilina Similar e Genérica.....	70
37. Gráfico de Scores da PCA dos Medicamentos Ampicilina Similar e Genérica.....	71
38. Gráfico SIMCA de Classificação de Novas Amostras nos Modelos dos Medicamentos Ampicilina Similar e Genérica.....	72
39. Espectros de Refletância dos Medicamentos Binotal e Ampicilina Genérica.....	74
40. Gráfico de Scores da PCA dos Medicamentos Ampicilina Genérica	

e Binotal.....	74
41. Gráfico SIMCA de Classificação de Novas Amostras nos Modelos dos Medicamentos Ampicilina Genérica e Binotal.....	75
42. Espectros na Forma de 1ª Derivada do Medicamento Pressotec.....	78
43. Gráfico de Scores da PCA do Medicamento Pressotec.....	78
44. Gráfico SIMCA de Classificação de Novas Amostras de Pressotec 5, 10 e 20 mg no Modelo Pressotec 20 mg.....	80
45. Gráfico SIMCA de Classificação de Novas Amostras de Pressotec 5, 10 e 20 mg no Modelo do Medicamento Pressotec 5 mg.....	80
46. Gráfico de Scores do Modelo PLS do Medicamento Pressotec 5, 10 e 20 mg.....	82
47. Gráfico de Scores da PCA dos Medicamentos Takil, Sulnil e Plastenan..	86
48. Gráfico SIMCA de Classificação de Novas Amostras no Modelo do Medicamento Takil.....	87
49. Espectros na Forma de 1ª Derivada dos Medicamentos Farlac e Lactutona.....	88
50. Gráfico de Scores da PCA dos Medicamentos Farlac, Lactutona e Retemic.....	89
51. Gráfico SIMCA de Classificação de Novas Amostras no Modelo do Medicamento Farlac.....	90
52. Obtenção do Espectro do Medicamento Flogene na Forma de Cápsula..	91
53. Gráfico SIMCA de Classificação de Novas Amostras no Modelo do Medicamento na Forma de Cápsulas Primeral.....	93
54. Classificação do Medicamento Aspirina 500 mg Utilizando o Programa Real-Time Predictor de Classificação “on-line”.....	97
55. Classificação do Medicamento Pressotec Utilizando o Programa Real-Time Predictor de Classificação “on-line”.....	99
56. Foto da Embalagem do Medicamento Aldomet 250 mg verdadeira e falsas.....	101
57. Espectros de Reflectância do Medicamento Aldomet 250 mg Verdadeiro e falso.....	102

58. Gráfico SIMCA de Classificação de Amostras Verdadeiras e Falsas de Aldomet 250 mg no Modelo Aldomet Verdadeiro.....	103
59. Fotos Mostrando as Embalagens do Medicamentos apreendidas no Comércio cujas Embalagens foram adulteradas. Medicamentos Tylenol, Decadron, Combiron e floxacina.....	104
60. Fotos Mostrando as Embalagens do Medicamentos apreendidas no Comércio cujas Embalagens foram adulteradas. Medicamentos Tanakan F, Mucolin e Omcilon-A “M”.....	105
61. Espectros de Refletância do Medicamento Femme Verdadeiro e Falso...	106
62. Gráfico SIMCA de Classificação de Amostras Verdadeiras e Falsas de Femme no Modelo Femme Verdadeiro.....	108
63. Espectros de Refletância do Medicamento Sulfanilamida em pó Verdadeiro e Falso.....	109
64. Gráfico SIMCA de Classificação de Amostras Verdadeiras e Falsas de Sulfanilamida no Modelo Sulfanilamida Verdadeiro.....	110
65. Espectros de Refletância do Medicamento Melleril 200 mg Verdadeiro e Falso.....	111
66. Gráfico SIMCA de Classificação de Amostras Verdadeiras e Falsas de Melleril no Modelo Melleril Verdadeiro.....	112
67. Espectros de Refletância do Medicamento Citoneurin 5000 Verdadeiro e Falso.....	113
68. Gráfico SIMCA de Classificação de Amostras Verdadeiras e Falsas de Citoneurin 5000 no Modelo Citoneurin 5000 Verdadeiro.....	114
69. Espectros de Transflectância do Medicamento Tylenol Verdadeiro e Falso.....	115
70. Gráfico SIMCA de Classificação de Amostras Verdadeiras e Falsas de Tylenol no Modelo Tylenol Verdadeiro.....	116
71. Diagrama Proposto para a Estratégia de Utilização da Espectroscopia NIR na Identificação de Medicamentos.....	119

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Falsificação de Medicamentos.....	1
1.2 As formas de Falsificação de Medicamentos.....	2
1.3 Medicamentos Falsificados Identificados.....	3
1.4 A Espectroscopia no Infravermelho Próximo.....	4
1.5 Espectroscopia NIR Aplicada ao Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos.....	6
1.6 Princípios da Espectroscopia no Infravermelho Próximo.....	8
1.7 Infravermelho Próximo (NIR) vs Infravermelho Médio (Mid-IR).....	11
1.8 Tratamento de Dados Multivariados.....	14
1.8.1 Análise de Componentes Principais (PCA).....	14
1.8.2 Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA).....	15
1.8.3 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS).....	18
1.8.4 Tratamento de Dados Utilizando o Programa Real-Time Predictor...	19
2. Objetivos.....	21
3. Parte Experimental.....	22
3.1 Espectrofotômetros NIR Brimrose Luminar 2000 e Free Space Luminar 2030.....	23
3.2 Obtenção de Espectros nos Espectrofotômetros NIR Brimrose Luminar 2000 Free Space Luminar 2030.....	24
3.3 Suporte de Amostras.....	28
3.4 Amostras Utilizadas.....	29

3.5 Tratamento de dados dos resultados obtidos no espectrofotômetro NIR Luminar 2000 dual mode Free Space 2030.....	30
4. Resultados e Discussão.....	31
4.1 Resultados Obtidos no Protótipo de Espectrofotômetro.....	31
4.2 Resultados Obtidos nos Espectrofotômetros NIR Brimrose Luminar 2000 Dual Mode e Free Space Luminar 2030.....	32
4.3 Fatores que Influenciam na Medida de Refletância.....	33
4.3.1 Repetibilidade dos Espectros de Refletância.....	34
4.3.2 Influência da Posição e Formato da Amostra.....	35
4.3.3 Influência da Umidade.....	37
4.4 Aplicações da Metodologia NIR em Fármacos.....	39
4.5 Identificação de Medicamentos de Diferentes Fabricantes Contendo o Mesmo Princípio Ativo.....	40
4.5.1 Investigação Sobre os Medicamentos Aspirina 500 mg e Melhoral 500 mg na Forma de Comprimidos.....	40
4.5.2 Análise de Medicamentos Similares na Forma de Pó e Empastilhados.....	44
4.6 Identificação de Medicamentos Adulterados.....	46
4.6.1 Adulteração de Aspirina 500 mg.....	47
4.6.2 Classificação do Medicamento Microvlar e Placebo de Microvlar.....	49
4.6.3 Classificação do Princípio Ativo Atenolol.....	54
4.7 Identificação de Medicamentos Dentro de Embalagens (Blisteres).....	57

4.7.1	Análise do Medicamento Yomax.....	57
4.8	Identificação de Medicamentos Fora do Prazo de Validade.....	62
4.8.1	Análise do Medicamento Litocit.....	63
4.9	Identificação de Medicamentos Genéricos, Similares e de Referência.....	67
4.9.1	Análise dos Medicamentos Contendo como Princípio Ativo Ampicilina 500 mg.....	69
4.9.2	Análise dos Medicamentos Ampicilina 500 mg Genérica e Ampicilina 500 mg Similar (EMS).....	70
4.9.3	Análise dos Medicamentos Ampicilina 500 mg Genérica e de Referência Binotal 500 mg.....	73
4.10	Identificação de Medicamentos Apresentados em Diferentes Concentrações.....	76
4.10.1	Análise do Medicamento Pressotec 5, 10 e 20 mg.....	77
4.10.2	Análise do Medicamento Pressotec 5, 10 e 20 mg Utilizando Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS).....	81
4.11	Identificação de Medicamentos nas Diversas Formas de Apresentação (Pomadas, Líquidos e Cápsulas).....	84
4.11.1	Identificação de Medicamentos na Forma de Pomadas.....	85
4.11.2	Identificação de Medicamentos na Forma de Líquidos.....	87
4.11.3	Identificação de Medicamentos na Forma de Cápsulas.....	90
4.12	Avaliação da Performance do Programa Real-Time Predictor 1.26.....	95
4.12.1	Análise do Medicamento Aspirina 500 mg.....	96
4.12.2	Análise do Medicamento Pressotec 5, 10 e 20 mg.....	97
4.13	Identificação de Medicamentos Falsificados.....	100
4.13.1	Medicamentos com embalagem e rotulagem falsificada e	

Produto verdadeiro.....	101
4.13.2 Medicamentos com Produto Falsificado.....	106
5. Conclusões.....	117
6. Referências Bibliográficas.....	120

1. Introdução:

1.1 Falsificação de Medicamentos

Nestes últimos anos, a sociedade brasileira foi surpreendida pelo aparecimento e derrame de medicamentos falsificados no mercado. O crime, que agride e assusta a população, é um dos sintomas da pouca atenção dada à programas de fiscalização na área de medicamentos. Este tipo de crime se difunde, pelo fato do Brasil ser um mercado consumidor muito grande, altamente lucrativo, e sua população, na maioria, desinformada no tocante à saúde. O Brasil é o quarto mercado consumidor de medicamentos no mundo, atrás apenas de EUA, França e Itália, e representa 4% do faturamento mundial da indústria farmacêutica.

A Organização Mundial da Saúde considerou, em 1988, que eram suficientes para atender a todas as necessidades de saúde cerca de 500 fármacos. No Brasil são permitidos cerca de 1.500, sendo que a lista da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) admitiu, em 1988, a necessidade de 234 fármacos e 18 associações, para atendimento da população brasileira.

Se considerarmos que há no mercado brasileiro entre 24.000 e 33.000 marcas de fábrica, enquanto Alemanha e Inglaterra têm 15.000, a Espanha 14.700, a Itália 13.200, a França 7.400 e a Noruega 1.870, verifica-se que os medicamentos têm sido tratados como se fossem uma mercadoria qualquer a ser trabalhada dentro dos mecanismos da lei de mercado.

A busca indiscriminada do lucro relega a segundo plano os interesses coletivos e é nesse contexto que avança a indústria criminosa da falsificação e produção de medicamentos sem eficácia comprovada.

Para combater a fraude é preciso que haja, não só um cadastramento dos laboratórios produtores de medicamentos no País, verificar seus procedimentos técnicos e sua adequação às especificações legais vigentes. É necessário também, apurar as irregularidades existentes no setor farmacêutico e manter uma

fiscalização rigorosa por parte da Vigilância Sanitária para impedir que a lei seja burlada.

A Vigilância Sanitária, responsável pelo controle de medicamentos do país, procede o registro de um medicamento, somente após exame da documentação científica envolvendo a análise da toxidez e das reações secundárias, além da verificação da qualidade apregoada do medicamento. Após o registro, seria necessária a inspeção da fábrica por técnicos devidamente preparados, para avaliar as instalações, equipamentos, a qualidade técnica da produção, controle de qualidade dos medicamentos produzidos, assim como controle da propaganda para garantir que não seja incompleta, enganosa ou fraudulenta.

Abrangendo o registro dos medicamentos em toda sua complexidade, está a avaliação técnica da produção, as boas práticas de fabricação, garantia de qualidade, treinamento de funcionários, certificações de qualidade, enfim, todos os recursos disponíveis para que se possa oferecer e garantir o verdadeiro medicamento, o controle sistemático de qualidade e eficácia dos medicamentos postos no mercado, sua biodisponibilidade e bioequivalência, o efetivo controle do conteúdo de suas bulas e da propaganda veiculada pelos meios de comunicação.

1.2 As Formas de Falsificação de Medicamentos

Depois que a falsificação de medicamentos em grande escala tornou-se um fato de conhecimento público, a indústria farmacêutica parece estar disposta a investir em mecanismos que dificultem a ação dos falsificadores. Uma das formas de se evitar falsificações é o desenvolvimento de embalagens que evitem as fraudes, sabendo que elas não eliminam por completo a possibilidade de falsificação ou adulteração dos medicamentos. Estes mecanismos apenas dificultam o processo de fraude.

A falsificação de medicamentos é caracterizada principalmente:

- Pela utilização de amostras grátis que são reembaladas a fim de serem vendidas.
- Pelo uso de medicamentos roubados.
- Medicamentos que apresentaram problemas em sua produção.
- Medicamentos que foram desviados de estoques do governo e comercializados.
- Pela utilização de placebos (medicamentos que não contém o princípio ativo).

Dentre os casos de medicamentos falsificados constatados e analisados por laboratórios oficiais desde 1998, cerca de 40 % das amostras consideradas de medicamentos falsificados, eram de amostras grátis que foram reembaladas para posterior comercialização, 20 % das amostras foram desviadas dos estoques do governo, 20 % eram amostras adulteradas, oriundas de farmácias de manipulação. Em 5 % dos casos, os medicamentos não continham o princípio ativo, e o restante eram amostras de medicamentos roubados ou que tiveram problemas em sua fabricação, ou ainda que foram compostos com produtos não utilizados pela indústria farmacêutica, como farinha de trigo. Uma pequena parcela era constituída de medicamentos vencidos, que são reembalados com nova data de validade.

1.3 Medicamentos Falsificados Identificados

O ministério da saúde, fornece uma lista contendo os medicamentos falsificados apreendidos e devidamente analisados até o ano de 1999. Esta lista conta, no momento, com 124 diferentes medicamentos falsificados. As principais características de adulteração estão associadas à apresentação do medicamento, embalagem, rotulagem, ausência do cartucho e prazo de validade. A lista completa está disponível na página da Internet do Ministério da Saúde. (endereço: <http://www.saude.gov.br/inform/falsific/relac/htm>)

1.4 Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR)

Diante dos fatos relatados anteriormente, é desnecessário, nos dias atuais, relatar a importância da disponibilidade de métodos e técnicas analíticas capazes de atestar a qualidade e autenticidade de medicamentos, haja visto os inúmeros casos relatados ultimamente e as graves conseqüências decorrentes da prática de falsificação de medicamentos.

Para possibilitar seu uso com o objetivo de comprovar a qualidade e autenticidade de medicamentos, um método analítico deveria apresentar as seguintes características:

- Possibilitar determinações diretas (sem pré tratamento) na amostra.
- Possibilitar a obtenção de resultados rapidamente (em intervalos de tempo da ordem de minutos).
- Ser baseado em instrumental simples e possível de ser transportado a longas distâncias, visando seu uso em operações de fiscalização.
- Possibilitar a verificação da autenticidade de amostras existentes nas mais diversas formas; pastas (pomadas), líquidas (soluções) e sólidas (comprimidos) e nas quais os princípios ativos estejam presentes nos mais diversos teores.
- Possibilitar determinações não destrutivas.

Os métodos espectroscópicos são potencialmente candidatos a preencher os requisitos acima. Nestes métodos, a interação da radiação eletromagnética com a matéria é empregada para estabelecer uma relação quali-quantitativa entre o comportamento da radiação a cada comprimento de onda (em uma determinada faixa) com a composição da amostra. Este comportamento pode refletir (em função do comprimento de onda) diversas formas de interações que, de maneira mais comum, estão associadas a promoção da espécie química de um nível energético quântico a outro de maior energia.

Quando a faixa de comprimento de onda da radiação se situa de 780 a 2500 nm ($12800 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), denominada de região do infravermelho próximo, a

interação provém principalmente de sobretons e combinações de transições fundamentais associadas a níveis energéticos vibracionais de grupos de átomos [1].

As bandas de absorção apresentam, de uma forma geral, intensidades várias vezes inferiores a aquelas do infravermelho (cerca de 10 a 100 vezes) o que, se por um lado, dificulta em parte a obtenção das medidas, por outro permite, por exemplo, o seu uso em amostras que apresentam alto teor de umidade e garante uma alta penetração da radiação em medidas de refletância de amostras sólidas [2]. Também, para compensar a baixa intensidade das absorções, esta região espectral dispõe de fontes de alta intensidade e de eficientes detetores, que contribuem para o aumento da relação sinal/ruído de medidas nela efetuadas.

De uma forma geral, as ocorrências espectrais na região NIR provém de ligações das moléculas em que participam o hidrogênio, o que torna a técnica útil para a determinação de compostos orgânicos contendo ligações C-H, N-H, e O-H.

Embora as bandas de absorção observadas na região do NIR sejam de difícil interpretação, isto é, sua correlação com as vibrações de grupos de átomos ou átomos constituintes da molécula não pode ser elaborada com facilidade [3,15], a utilização dos espectros NIR de absorbância e refletância difusa tem se mostrado muito eficiente. Um grande número de metodologias analíticas desenvolvidas com base em espectros NIR demonstram a habilidade desta técnica de lidar com problemas diversos referentes à análise de alimentos, de produtos farmacêuticos, produtos da indústria de polímeros e petróleo e na agricultura. Nesta última, destacam-se a determinação do teor de proteína total em grãos de cereais sem a necessidade de proceder a qualquer procedimento via úmida [4], a determinação da qualidade de folhas de tabaco [5], ou a identificação da presença de sementes em bandejas geradoras de mudas vegetais [6].

Para ressaltar o potencial da região NIR, quando aplicada à solução de problemas analíticos, nada melhor do que o exemplo dado pelo Canadá que certifica o teor de proteína dos grãos exportados por aquele país através de espectrometria de refletância de amostras dos grãos diretamente ou após simples moagem, em um procedimento que não requer mais do que 5 minutos para ser

efetuado. Milhares de resultados são necessários a cada ano e o método convencional de Kjeldal (via úmida, digestão ácida drástica da amostra por duas horas, empregando mercúrio ou selênio como catalisador, seguida de destilação e titulação da amônia produzida a partir de átomos de nitrogênio contidos na proteína) se por um lado não poderia suprir a demanda, sofre ainda do fato de contrariar o apelo atual por procedimentos analíticos mais limpos, de menor impacto ambiental.

Técnicas não invasivas podem ser desenvolvidas com base na espectroscopia NIR o que qualifica esta metodologia para uso em monitoração em linha. Seu uso na indústria farmacêutica vem crescendo desde 1991 e, atualmente, métodos analíticos nela baseados estão sendo mais utilizados na Europa, onde esta técnica tem se desenvolvido mais rapidamente [7].

É importante observar que, devido à não especificidade das ocorrências espectrais na região NIR, é praticamente impossível se fazer uso quantitativo ou qualitativo desta técnica sem se valer do espectro total ou pelo menos de medidas tomadas em um número de comprimentos de onda distintos que se situa acima de 5. Os dados espectrais são tratados, atualmente, com o uso de técnicas quimiométricas que envolvem principalmente o uso de Regressão de Quadrados Mínimos Parciais (PLS), e Análise de Componentes Principais (PCA) [3].

1.5 Espectroscopia NIR Aplicada ao Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos.

A literatura recente é farta ao descrever propostas de utilização da espectroscopia NIR no controle de qualidade de fármacos. Aplicações no controle de qualidade dos insumos [8, 28] e do processo de homogeneização de misturas de constituintes sólidos de comprimidos [9] têm demonstrado as principais vantagens da técnica NIR em termos de possibilitar determinações em tempo real e sem a necessidade de se proceder um pré- tratamento da amostra. A quantificação de princípios ativos de fármacos produzidos na forma de

comprimidos tem sido feita através de medidas de refletância na região NIR [9,10,11,12].

Instrumentos comerciais construídos com base em interferômetros (transformada de Fourier), convencionais (monocromadores baseados em redes de difração móveis) e empregando filtros óptico-acústicos (AOTF), estão entre os mais empregados para esta finalidade. Quando o instrumento e, conseqüentemente o método analítico, necessita de robustez para ser utilizado *in loco* em operações de fiscalização, por exemplo, o tipo de instrumento mais indicado parece ser aquele no qual o monocromador é constituído de elementos fixos como no caso dos filtros óptico-acústicos.

Estes instrumentos são bastante robustos e mantêm por longo tempo a precisão na medida do comprimento de onda. Esta característica facilita a transposição de informações entre instrumentos, possibilitando a disseminação de resultados de processos de calibração e de bibliotecas de espectros [13].

A identificação de compostos biologicamente ativos tem sido motivo do uso da técnica de refletância NIR. Resultados recentes [14] mostram que bibliotecas de produtos farmacêuticos podem ser construídas e empregadas na sua identificação com um grau de correção que pode atingir 100% dos casos. Diversas estratégias foram discutidas quanto a melhor forma de se compor as bibliotecas que serão empregadas na identificação futura de fármacos.

Em conclusão, a espectroscopia NIR tem demonstrado um grande potencial para ser utilizada na identificação de fármacos. Sua utilização pode ser estendida a fármacos presentes em suas mais distintas formas de apresentação e a conclusão sobre a autenticidade ou não de um determinado medicamento somente estaria restrita, à princípio, a elaboração adequada de uma biblioteca de espectros de medicamentos verdadeiros.

1.6 Princípios da Espectroscopia no Infravermelho Próximo

A radiação no infravermelho absorvida por uma molécula, faz suas ligações individuais vibrarem com maior amplitude e frequência, de maneira similar a um oscilador diatômico.

O conceito básico da espectroscopia vibracional se baseia no comportamento de uma molécula diatômica semelhante a um oscilador harmônico. Para um oscilador harmônico ideal, a energia potencial V seria descrita por uma equação quadrática simples.

$$V = \frac{1}{2} k (r - r_0) = \frac{1}{2} kx^2 \quad (1)$$

onde k é a constante de força da ligação, r é a distância internuclear, r_0 é a distância internuclear de equilíbrio e $x = (r - r_0)$ é a coordenada de deslocamento. A figura 1 mostra a forma como a energia potencial de um oscilador harmônico varia com a amplitude da vibração.

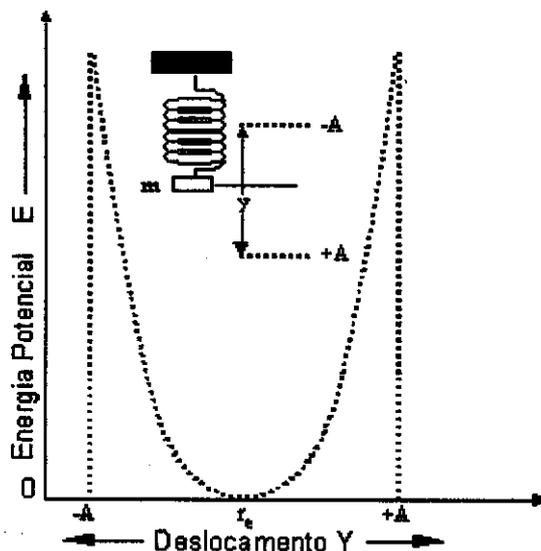


Figura 1. Função de Potenciais Harmônicos para um oscilador diatômico.

A energia potencial assume a forma de uma parábola e tem um comportamento simétrico em torno distância internuclear de equilíbrio, r_e . A frequência de vibração de um oscilador harmônico depende da força da ligação e das massas dos átomos que estão ligados. A energia total da ligação é proporcional à frequência de vibração. O modelo de um simples oscilador harmônico é baseado na Lei de Hooke, onde a frequência vibracional ($\bar{\nu}$) em número de onda é definida como:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\kappa}{\mu}} \quad (2)$$

onde μ é a massa reduzida ($\mu = m_1 m_2 / m_1 + m_2$).

O tratamento da mecânica quântica sobre o modelo simples do oscilador harmônico, mostra que o nível de energia vibracional entre dois átomos de uma molécula é quantizado. Estes níveis de energia são dados por:

$$E_{\text{vib}} = \hbar \nu \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \quad (3)$$

onde \hbar é a constante de Plank, ν é a frequência vibracional clássica e ν é o número quântico vibracional. Os níveis de energia podem ser expressos em unidades de número de onda (cm^{-1}) de acordo com a expressão:

$$G(\nu)(\text{cm}^{-1}) = E_{\text{vib}} / \hbar c = \bar{\nu} \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \quad (4)$$

onde $\bar{\nu}$ é o número de onda da transição vibracional e c é a velocidade da luz no vácuo.

À temperatura ambiente, existem mais moléculas no nível vibracional fundamental $\nu = 0$, e conseqüentemente a transição permitida $\nu=0 \rightarrow \nu=1$, denominada transição fundamental, domina o espectro de absorção do infravermelho. Se os níveis energéticos vibracionais se comportassem como previsto para um oscilador harmônico, estes seriam igualmente espaçados, mas na prática os níveis de energia quantizados não são igualmente espaçados, porque as moléculas desviam da idealidade comportando-se como um oscilador

anarmônico. A figura 2 mostra a forma do potencial anarmônico para um sistema diatômico.

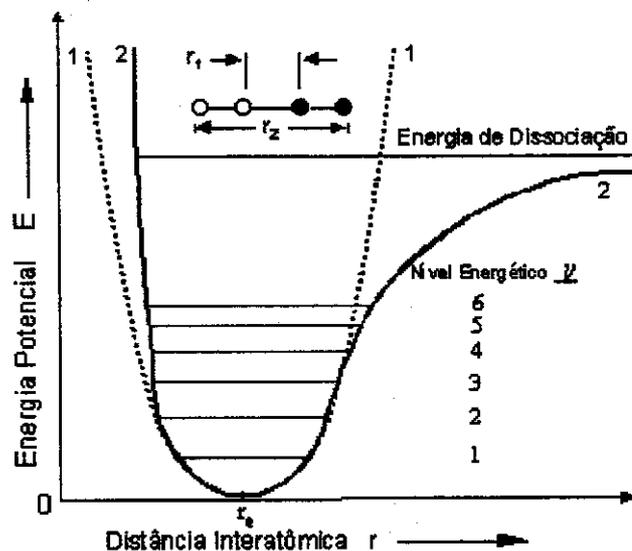


Figura 2. Função de Potenciais Harmônicos (---) e Anarmônicos (—) para um oscilador diatômico.

Evidências experimentais mostram que as moléculas se comportam como osciladores anarmônicos. Primeiro, porque as bandas de transição denominadas “Hot Bands” ou Bandas Quentes, que são as transições originárias de níveis vibracionais excitados ($v \neq 0$) $v=1 \rightarrow v=2$, $v=2 \rightarrow v=3$..., não possuem a mesma frequência da banda fundamental. Isto se deve ao fato de que os níveis de energia vibracionais não são igualmente espaçados. Segundo, as transições denominadas sobretons como $v=0 \rightarrow v=2, 3, 4, \dots$, são permitidas.

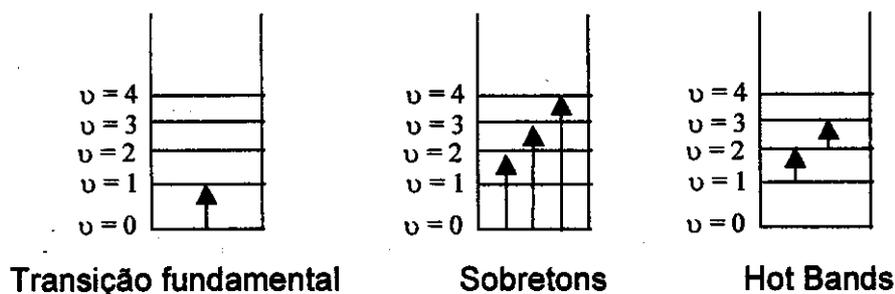


Figura 3. Transições entre níveis vibracionais.

Isto faz com que a expressão 4 seja reescrita com um termo de anarmonicidade:

$$G(v)(\text{cm}^{-1}) = \frac{E_{\text{vib}}}{\hbar c} = \bar{\nu} \left(v + \frac{1}{2} \right) - \chi_e \bar{\nu} \left(v + \frac{1}{2} \right)^2 \quad (5)$$

onde χ_e = Constante de anarmonicidade.

A absorção de radiação infravermelho próximo por um sistema, é devida a variação periódica do seu momento de dipolo elétrico (μ), sendo a frequência da radiação absorvida idêntica à da oscilação do dipolo. Assim, com a oscilação do momento de dipolo com a frequência da radiação incidente, a molécula absorverá a radiação.

O momento de dipolo pode ser expresso pela expressão

$$\mu = \mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dx} \right)_e x \quad (6)$$

onde μ_0 é o vetor do momento de dipolo à distância internuclear de equilíbrio e a derivada é considerada em relação a posição de equilíbrio. A absorção no infravermelho implica $\left(\frac{d\mu}{dx} \right)_e \neq 0$ pelo menos para uma das componentes μ_x , μ_y ou μ_z [1,18, 29, 31].

Há também a chamada anarmonicidade elétrica, que é responsável pelo surgimento no espectro de infravermelho, de bandas de sobretons ("overtones") correspondentes às transições entre níveis energéticos que diferem de duas ou três unidades para o nível quântico vibracional ($\Delta v = +2, +3, \dots$).

$$\mu = \mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dx} \right)_e x + \frac{1}{2!} \left(\frac{d^2\mu}{dx^2} \right)_e x^2 + \frac{1}{3!} \left(\frac{d^3\mu}{dx^3} \right)_e x^3 + \dots \quad (7)$$

Para o surgimento do primeiro sobreton é suficiente se considerar apenas até o termo quadrático. Para o segundo sobreton é necessário considerar o termo cúbico. Para sobretons de ordem superior será necessário a consideração de derivadas de maior ordem, no desenvolvimento da série.

1.7 Infravermelho Próximo (NIR) vs Infravermelho Médio (Mid-IR)

A investigação de compostos farmacêuticos pode ser feita por diversas técnicas de análise, principalmente as baseadas em métodos espectroscópicos como o Infravermelho Próximo (NIR) e o Infravermelho médio (Mid-IR).

A utilização da espectroscopia NIR apresenta vantagens e desvantagens sobre a espectroscopia no infravermelho (Mid-IR). Uma das vantagens apresentadas pelo NIR é a utilização de uma instrumentação robusta, geralmente sem partes móveis, que é composta de fontes simples, como lâmpadas de Tungstênio, mas de alta intensidade, e a possibilidade da utilização de componentes comuns em instrumentos ópticos que operam na região do visível. Para compensar a baixa intensidade das absorções na região espectral NIR, onde as bandas de absorção apresentam intensidades várias vezes inferiores à aquelas do infravermelho, esta região espectral dispõe de instrumentação dotada de fontes de alta intensidade e de eficientes detetores, que contribuem para o aumento da relação sinal/ruído de medidas efetuadas.

A baixa intensidade das absorções na região espectral NIR se, por um lado dificulta em parte a obtenção das medidas, por outro, permite o seu uso em amostras que apresentam alto teor de umidade, como xaropes e colírios e permite que sejam obtidas medidas de refletância em medicamentos sólidos.

O espectro na região do infravermelho próximo emprega radiação de menor comprimento de onda e, com isto, de maior energia. Isto garante uma alta penetração da radiação em medidas de refletância difusa de amostras sólidas, podendo chegar muitas vezes a atingir até 3 mm de profundidade (Figura 4) [31].

Todos estes aspectos garantem maior viabilidade na utilização da técnica de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) em relação à espectroscopia Mid-IR, em uma análise de produtos farmacêuticos.

A tabela 1 resume a comparação da performance da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) com o infravermelho (Mid-IR) [31].

Refletância Difusa

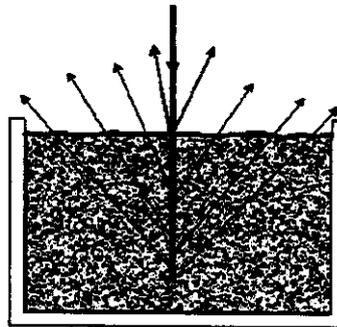


Figura 4. Perfil da luz na refletância difusa.

Tabela 1. Comparação da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e infravermelho (Mid-IR)

Técnica	Mid-IR	NIR
Aparência do Espectro	Detalhado, freqüentemente bem estruturado	Largo, absorções difusas, não estruturado
Natureza do Fenômeno	Forte	Fraco
Conteúdo da Informação	<ul style="list-style-type: none"> • Espectros refletem propriedades e composição • Propriedades características do material • Bom para interpretação de funcionalidades químicas • Normalmente segue a Lei de Beer – quantitativa 	<ul style="list-style-type: none"> • Espectros refletem propriedades e composição • Propriedades características do material • Moderado para interpretação de funcionalidades químicas • Normalmente segue a Lei de Beer – quantitativa
Matriz de amostras 1- Sólida 2- Líquida 3- Gasosa	1- Amostragem pode ser difícil 2- Amostragem fácil 3- Amostragem fácil	1- Amostragem fácil 2- Amostragem fácil 3- Amostragem fácil, mas limitada aplicação
Parte óptica 1- Instrumento 2- Amostragem 3 - Especial	1- Transmissores de IR especiais - KBr, ZnSe. Baseado na utilização de espelhos 2- Transmissores IR ou espelhos, diamantes 3- Lentes Catadiópticas	1- Tipicamente quartzo com baixo índice de OH Parte óptica usada em instrumentação 2- Janela de quartzo ou safira 3- Fibras ópticas comumente usadas
Aplicações analíticas	<ul style="list-style-type: none"> • Caracterização de materiais • Identificação de compostos • Controle de Qualidade e processos de análise • Microamostragem • Técnicas acopladas CG-IR, TGA-IR • Análise de misturas de gases 	<ul style="list-style-type: none"> • Análises composicionais • Medidas de propriedades • Controle de qualidade e investigação • Processos de análise

1.8 Tratamento de Dados Multivariados

Para o tratamento de dados dos espectros coletados das amostras, foram utilizados dois programas computacionais. O programa quimiométrico Unscrambler 7.5 e o programa de classificação "On-Line", Real-Time Predictor 1.26, fornecido junto com o espectrofotômetro Luminar Brimrose.

O programa *Unscrambler*® 7.5 da Camo S.A., permite o uso de ferramentas quimiométricas tais como: Análise de Componentes Principais (PCA), Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) e técnicas de classificação como SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy).

1.8.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais (Figura 5) é um método matemático de tratamento de dados baseado em álgebra linear. O método é utilizado para transformação de dados complexos, com a finalidade de extrair informações relevantes do conjunto de dados e torná-las de fácil interpretação. Um novo conjunto de variáveis é constituído (Fatores, Componentes Principais, Autovetores, Variáveis Latentes) a partir da combinação linear das originais, criando assim novos eixos no espaço multidimensional que são ortogonais entre si e construídos em ordem decrescente da quantidade de variância que descrevem. O PCA tenta agrupar variáveis que estão altamente correlacionadas numa nova variável chamada componente principal (PC), criando um conjunto que contém apenas as informações importantes e descartando informações redundantes, diminuindo o número de dimensões exigidas. Assim, cada amostra acaba sendo representada por um ponto no espaço de dimensão M do qual é possível a extração de informações das amostras e de agrupamento de amostras que apresentem características semelhantes. É através da Análise de Componentes Principais que se determina a dimensionalidade do conjunto de dados [19].

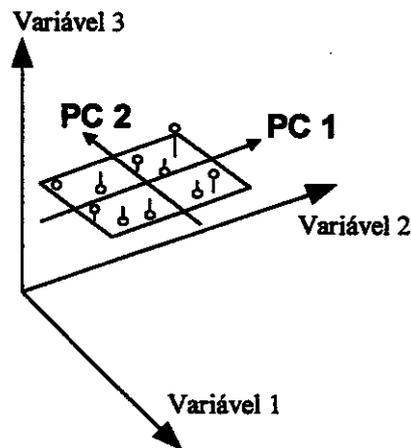


Figura 5. Primeira componente principal (PC 1) e Segunda componente principal (PC 2) em um espaço multidimensional.

1.8.2 Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA)

SIMCA é um método quimiométrico probabilístico, modelativo e paramétrico, que modela a localização das classes de amostras através do uso de componentes principais. O SIMCA é fundamentado na Análise de componentes principais (PCA). Para cada determinado agrupamento ou classe de amostras, é criado um modelo PCA que delimita uma região espacial multidimensional. Uma nova amostra pode ser classificada como pertencendo a uma das classes, quando possuir características semelhantes que a permitam ser inserida neste espaço multidimensional de um dos agrupamentos. Os métodos matemáticos utilizados no SIMCA estão baseados no cálculo da distância da amostra ao modelo, que é a variância residual para cada amostra da classe q (S_i) e da variância residual total (S_o) (equação 8 e 9). Então é aplicado um teste F (equação 10) para verificação da posição da amostra no modelo. Este valor é comparado com um valor crítico tabelado de F para um determinado nível de probabilidade e graus de liberdade, determinando a classificação ou não da amostra no modelo.

$$S_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^M (res_j^q)^2}{(M - A)}} \quad (8)$$

$$S_o = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_q} \sum_{j=1}^M (res_j^q)^2}{(N_q - A_q - 1)(M - A_q)}} \quad (9)$$

$$F = \frac{(S_i^q)^2}{(S_o^q)^2} \frac{N_q}{(N_q - A_q - 1)} \quad (10)$$

Nas equações 8, 9 e 10, N_q é o número de espectros ou amostras utilizadas na classe de treinamento (q), A_q é o número de componentes principais utilizados no modelo da classe q , M é o número de variáveis, i e j representam os índices de amostras e variáveis respectivamente. Amostras com um nível de probabilidade na faixa de 0,1 - 1,0 são classificadas como pertencendo ao modelo, enquanto que amostras com valores abaixo de 0,05 são classificadas como não pertencendo ao modelo e amostras com valores intermediários à 0,05 – 0,1 são consideradas como Outliers.

É considerado também na classificação por SIMCA o valor de Leverage da amostra (H_i), que é a medida de quão distante a projeção de uma amostra no modelo está em relação ao centro da classe modelada.

$$H_i = \frac{1}{I} + \sum_{a=1}^A \frac{t_{ia}^2}{t_a^T t_a} \quad (11)$$

Onde I é o nº de amostras, A é o nº de componentes principais, a é o índice da componente principal, i é número da amostra, t_{ia} é o valor do score da amostra no componente principal a , e t_a é o vetor dos scores das amostras empregadas no modelo. O T da equação significa que o vetor de scores deve ser transposto.

O cálculo destas duas distâncias (F e H_i) é que determina a classificação de uma nova amostra [17,18, 19]. Um modelo SIMCA é mostrado na figura 6.

O SIMCA operado pelo Unscrambler fornece como resultado de uma classificação, uma tabela de onde são mostrados com asteriscos, as amostras que são classificadas e à que classes estas amostra pertencem. Ele também fornece como resultado duas possibilidades de gráficos, o de S_i/S_o vs Leverage (H_i) e o gráfico de Coomans (S_i x S_i).

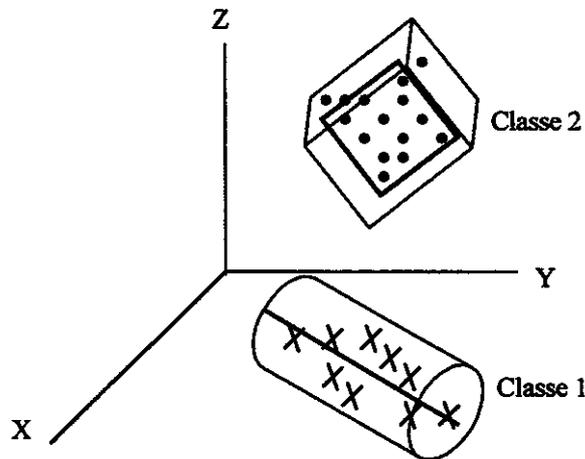


Figura 6. Modelo SIMCA de Classificação. As classes são modeladas de acordo com o número de componentes principais requerido.

No gráfico de S_i/S_o x Leverage (H_i), S_i/S_o é a distância relativa da nova amostra ao modelo (Desvio padrão residual) e H_i é a projeção da distância da amostra ao centro do modelo. No gráfico de S_i/S_o vs Leverage (H_i), a amostra é considerada como pertencendo a classe modelada se ambas as distâncias medidas S_i/S_o e H_i forem menores que um valor crítico de distância da classe modelada. O resultado é fornecido para cada classe separadamente.

No gráfico de Coomans, (S_i vs $S_i \rightarrow S_i$ (Raiz quadrada da variância residual da amostra) = a distância da projeção da nova amostra ao modelo) os modelos 1 e 2 representam os modelos construídos com medicamentos de referência. Neste gráfico de Coomans é representada a classificação de novas amostras em dois modelos. Nesta classificação existem 4 resultados possíveis:

- A classificação da nova amostra como pertencendo a classe 1 ou a classe 2. Isto ocorre quando as amostras obtêm valores de distâncias inferiores a uma distância crítica estipulada para uma ou outra classe (delimitada pelas linhas vertical para a classe 1 e horizontal para 2). Como resultado, a amostra pertence a respectiva classe.

- A classificação da nova amostra como pertencendo tanto a classe 1 como a classe 2. Isto ocorre quando as amostras obtêm valores de distâncias inferiores a

uma distância crítica estipulada para ambas as classes simultaneamente, caindo em uma região comum as duas classes. Como resultado disto, a amostra pode ser classificada como pertencendo a ambas as classes.

- A classificação da nova amostra como não pertencendo a nenhuma das classes. Isto ocorre quando a nova amostra obtém valores de distância superiores aos valores estipulados para ambas classes. Como resultado a amostra não pertence a nenhuma das classes. Este tipo de classificação possui uma probabilidade de 95 %, ou seja, uma confiabilidade de 95 % de um resultado correto.

Este valor da distância crítica da classe, delimitada pela linha no gráfico, é calculado a partir do teste F do SIMCA e possui um valor que depende do número de amostras e componentes principais da classe modelada.

1.8.3 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) (Partial Least Square)

A regressão por mínimos quadrados parciais, faz parte de um conjunto de métodos denominados de calibração multivariada. O PLS é um método de previsão de uma informação quantitativa Y, a partir de valores de medida (como absorbância) X, via alguma função de transferência [19]:

$$Y = f(X) \quad (12)$$

A calibração multivariada relaciona a matriz de dados das variáveis medidas (X_1, X_2, \dots, X_n) com uma matriz de dados de concentração ou propriedade Y.

De maneira semelhante ao PCA, o PLS decompõe a matriz de dados X em componentes principais, relacionando-os com a matriz de dados Y, simultaneamente trocando informações entre matrizes até a composição do melhor modelo para a classe analisada. Ambos os modelos das matrizes X e Y procuram simultaneamente as variáveis latentes em X que predizem as variáveis em Y da melhor maneira.

Este método apresenta as vantagens de utilizar um maior número de variáveis, diminuindo o erro, poder ser usado em determinações simultâneas e em análises sem resolução ou na presença de interferentes. A figura 7 mostra o ajuste do componente principal da matriz de dados X, de acordo com o vetor de concentração ou propriedade Y.

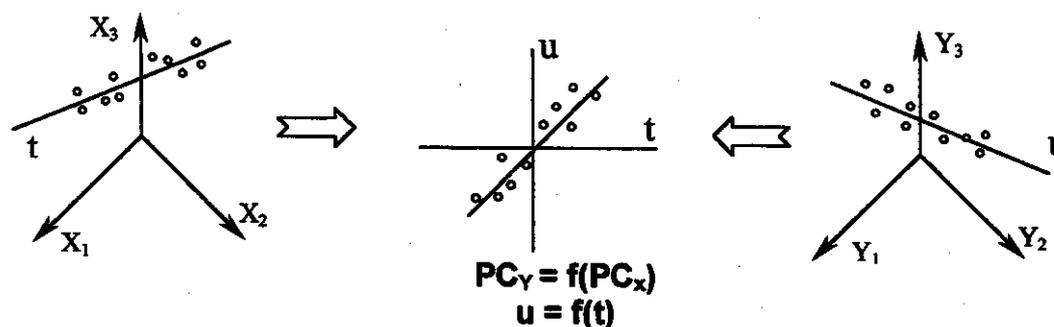


Figura 7. Ajuste do componente principal da matriz de dados X, correlacionado com o vetor de concentração ou propriedade Y na modelagem por PLS.

A quantificação de novas amostras por PLS é baseada em uma equação que relaciona os valores das variáveis de dados (X) com valores de concentração ou uma propriedade (Y). Na calibração, coeficientes ponderam a influência de cada uma das variáveis na relação com um valor de concentração. Esta equação, que atribui um coeficiente ou peso ao valor da variável com a concentração, é utilizada na previsão de novas amostras. Os coeficientes, definidos na equação de calibração para cada variável, são utilizados pela nova amostra que a partir desta equação, retorna o valor de concentração ou da propriedade da nova amostra.

1.8.4 Tratamento de Dados Utilizando o Programa Luminar Real – Time Predictor 1.26

O programa Luminar Real-Time Predictor 1.26 acompanha o programa de controle Snap 2.03 do espectrofotômetro Brimrose. Sua operação é muito simples.

A partir do conjunto de dados de amostras de medicamentos verdadeiros é construído um padrão interno de referência que é armazenado em um arquivo. Acoplado ao programa de controle do instrumento Snap 2.03, o programa obtém um novo espectro de uma amostra desconhecida, que baseado no cálculo de uma *Distância Crítica*, pode ser classificado ou não como pertencendo a mesma classe do conjunto de espectros padrões do medicamento. Desta forma, a classificação é feita "on-line", quase a tempo real. O programa aceita a inclusão de mais de um grupo padrão na análise. Espectros de amostras desconhecidas que ficam abaixo do valor de distância crítica estipulado para cada grupo de medicamento, são classificados como pertencendo a mesma classe do padrão de referência. Amostras que ultrapassam esta distância crítica são classificados como Outliers, ou não pertencendo à classe (aparecimento da palavra Outlier, que indica que a amostra não pertence a nenhum grupo).

O mesmo conjunto de dados dos padrões utilizados no tratamento de dados pelo programa Unscrambler pode ser utilizado por este programa.

O cálculo desta distância crítica é fundamentado no cálculo da distância semi-Euclidiana, e segue os seguinte passos:

1. Primeiro é calculado a média dos valores de refletância obtidos em cada comprimento de onda dos espectros de referência e do desconhecido.

AvgRef = média dos valores dos espectros de referência (calibração).

Avgdesc = média dos valores dos espectros desconhecidos (predição).

2. Então é calculado a diferença (**Dif**) entre estes valores médios.

$$\text{Dif} = \text{Avgdesc} - \text{AvgRef} \quad (13)$$

3. Para cada valor de comprimento de onda [i], é calculado a diferença entre um ponto do espectro desconhecido (**Desc**) e do espectro de referência médio (**Ref**) e então subtraído a diferença (**Dif**) dos valores médios. Finalmente, é calculado o valor absoluto do resultado. A soma de todos os valores absolutos fornece a distância crítica (**DC**).

$$\text{DC} = \sum (\text{Abs} (\text{Desc} [i] - \text{Ref} [i] - \text{Dif})) \quad (14)$$

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho é o de avaliar a Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) quanto a seu potencial para identificação de medicamentos falsificados ou adulterados, estabelecendo uma metodologia para sua utilização e avaliando a sua performance. Secundariamente, a técnica NIR foi avaliada quanto a possibilidade de seu uso para distinguir entre medicamentos genéricos, similares e de referência, medicamentos de diferentes fabricantes contendo o mesmo princípio ativo, medicamentos dentro da embalagem (blisteres), medicamentos com prazo de validade vencido, medicamentos nas diversas formas de apresentações (líquidos, pomadas cápsulas) e medicamentos com diferentes teores de princípio ativo.

3. Parte Experimental

A parte experimental deste trabalho, está fundamentada na utilização de um Espectrofotômetro de Infravermelho Próximo de operação simples.

A primeira etapa do projeto, envolveu a utilização de um protótipo de um Espectrofotômetro de Infravermelho Próximo construído pelo aluno de doutorado Renato Guchardi, como projeto de sua tese de doutorado [32]. Este protótipo foi utilizado para se estabelecer um primeiro contato com a técnica de espectroscopia NIR e com a sua instrumentação. Este espectrofotômetro atua na faixa de comprimento de onda de 850 a 1600 nm (cm^{-1}), utilizando como monocromador um filtro óptico-acústico de TeO_2 (AOTF). O protótipo foi utilizado até a chegada em julho de 1999 de um Espectrofotômetro NIR comercial da marca Brimrose modelo Luminar 2000 dual mode com Free Space 2030 (Figura 8). Este espectrofotômetro é composto por duas unidades, que atuam nas faixas de comprimento de onda de 850 a 1800 nm e 1100 a 2400 nm. Este instrumento é mais rápido e adequado aos propósitos do projeto de investigação da espectroscopia NIR para identificação de medicamentos falsificados. O espectrofotômetro comercial utilizado é um dos mais completos do mercado, permitindo que todos os tipos de medidas (refletância, transfectância, transmitância/absorbância) possam ser efetuados. Sua velocidade de aquisição de dados é essencial para a elaboração de bibliotecas extensas e que possam incorporar a maior variação possível entre espectros de medicamentos verdadeiros. Um microcomputador faz o controle e aquisição de dados do instrumento.

3.1 Espectrofotômetros NIR Brimrose Luminar 2000 e Luminar Free Space 2030 (Dual Mode)

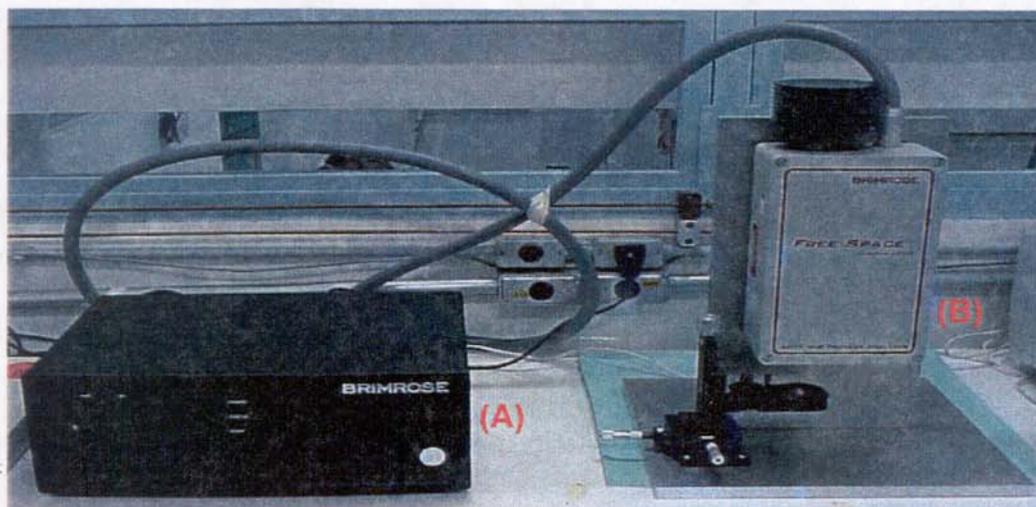


Figura 8. Espectrofotômetro NIR Brimrose Luminar 2000 (A) e Free Space Luminar 2030 (B).

O Espectrofotômetro NIR Brimrose Luminar 2000 Dual Mode é composto, na realidade, por dois espectrofotômetros. O espectrofotômetro denominado Luminar 2000, é composto por uma fonte (lâmpada com filamento de tungstênio), um monocromador baseado em um filtro óptico-acústico sintonizável de TeO_2 (AOTF) com faixa espectral de 850 nm à 1800 nm, um detetor de Arseneto-Gálio-Índio, fibras ópticas para obtenção dos espectros nos modos absorvância e transmitância e uma sonda para obtenção dos espectros no modo e transreflectância (Figura 9). Um computador dedicado é parte integrante do espectrofotômetro.

O outro espectrofotômetro denominado Free Space Luminar 2030 é acoplado ao Luminar 2000 e possui os mesmos componentes, exceção feita à faixa de atuação do AOTF de 1100 nm à 2400 nm e que não utiliza fibras ópticas para a obtenção dos espectros no modo refletância. Esta unidade compartilha com a unidade Luminar 2000, o sistema de controle.

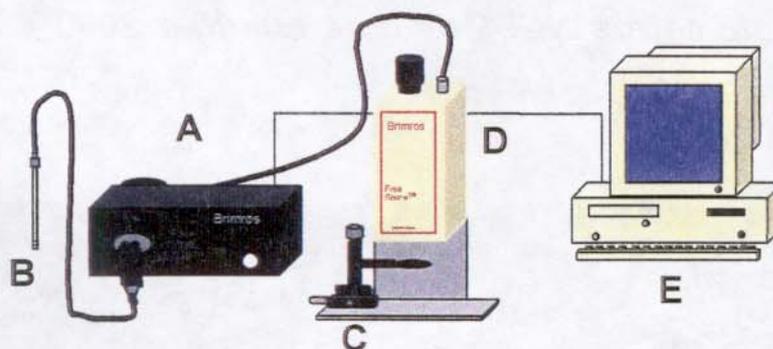


Figura 9. A - Espectrofotômetro NIR Brimrose Luminar 2000 (850-1800 nm), B - Sonda de fibra óptica para líquidos, C - Posicionador (X Y Z) porta amostra, D - Espectrofotômetro NIR Brimrose Free Space Luminar 2030 (1100-2400 nm) e E - Microcomputador AMD K6 II 400 Mhz.

3.2 Obtenção de Espectros nos Espectrofotômetros NIR Brimrose Luminar 2000 e Free Space Luminar 2030

Os espectros de transfectância dos medicamentos na forma líquida, foram obtidos no espectrofotômetro Luminar 2000, na faixa de 850-1800 nm, com uma sonda para amostras líquidas (Figura 10). Esta sonda é mergulhada na amostra do medicamento líquido, e o feixe de luz proveniente da fibra óptica incide e atravessa a amostra, reflete em um espelho em sua base e retorna a fibra, fornecendo as informações da amostra.

Os espectros de refletância dos medicamentos na forma sólida ou cápsulas, foram obtidos pelo espectrofotômetro Luminar Free Space 2030, na faixa de 1100-2400 nm, com as amostras colocadas em um suporte contendo uma íris (Figura 11a, 11b) que, ao fechar centraliza o comprimido no feixe de luz incidente, à distância de maior resposta de intensidade luminosa possível, previamente estabelecida.

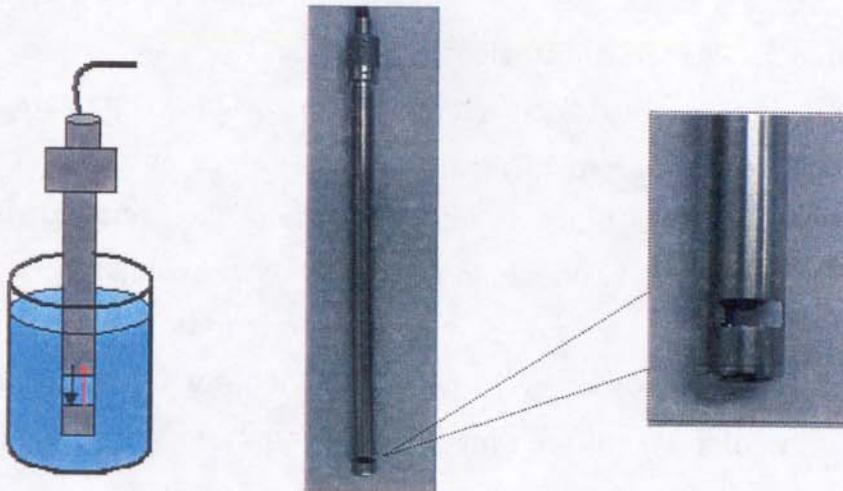


Figura 10. Sonda para medidas de transfectância de amostras líquidas.:

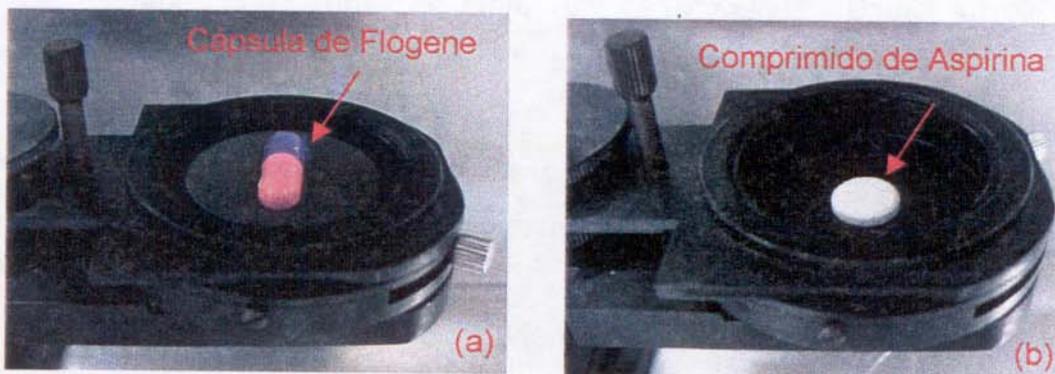


Figura 11. Posicionador XYZ com amostras na forma de cápsula (a) e comprimido (b).

Os espectros foram obtidos, analisando-se vários comprimidos do mesmo medicamento posicionados no suporte, alternando-se a face e retirando-os e recolocando-os, para a obtenção da maior variação possível dos dados devido a composição e variabilidade espectral devido a pequena flutuação no posicionamento.

Na obtenção dos espectros foram efetuadas 300 varreduras da faixa espectral. O espectro final é uma média destas 300 varreduras. Nestas condições, o tempo de obtenção de um espectro final é de cerca de 30 segundos.

Experimentos preliminares mostraram a necessidade de se incluir na biblioteca de espectros referentes aos medicamentos verdadeiros, fatores que afetam os dados espectrais na região NIR. Os principais fatores são:

1) Face do comprimido – A incidência da luz em superfícies irregulares faz com a reflexão da luz não seja reproduzível. Isto faz com que os espectros de refletância NIR não sejam reproduzidos da mesma maneira, adicionando ruídos aos espectros ou causando uma variação na linha de base e intensidade de absorção. Para medicamentos na forma de comprimidos, o formato e as inscrições em sua superfície influem nos espectros de refletância sobre a qual a radiação NIR incide. Um mesmo comprimido, com inscrições diferentes nas faces, pode apresentar perfis espectrais diferentes, quando coletados espectros nas duas faces. Para incluir este efeito na coleção de espectros referentes a um dado medicamento, foram obtidos espectros de ambas as faces dos comprimidos.

2) Teor de água (Umidade) – O teor de água nos comprimidos, principalmente na sua superfície depende da umidade atmosférica à qual o comprimido está exposto. Fatores como a umidade ambiente podem influenciar nos espectros de refletância, principalmente em amostras em pó. Neste tipo de amostra, a absorção de água, pode ser observada através de um aumento na banda de absorção nas regiões de 1425 e 1900 nm.

Para averiguar estes efeitos, foram feitos estudos utilizando comprimidos de Aspirina 500 mg, variando-se a umidade relativa do ar de 30 % à 80% e coletando espectros em cada valor de umidade e estudos mantendo-se temperatura e umidade da sala constantes.

Foi necessário, também, que todas as medidas fossem tomadas nas mesmas condições ou que a variação destes fatores fosse levada em consideração e fossem incluídas na construção do modelo do medicamento.

3) Posicionamento - Já é de conhecimento geral que a posição e a forma da amostra, além do tamanho das partículas que a constitui, influem no espectro de refletância [16,20]. Para se avaliar este efeito, foram efetuados, inicialmente, estudos da posição da amostra em relação ao feixe de luz incidente, visando a obtenção da melhor relação sinal/ruído dos espectros.

Na posição de maior intensidade luminosa refletida, foram coletados 50 espectros de 20 comprimidos de Aspirina 500 mg em uma única face. Fez-se então, uma análise de componentes principais para este conjunto de espectros, que serviu como modelo padrão do medicamento. Este modelo necessitou de 3 componentes principais para a explicação de 97 % da variância dos dados.

O estudo da posição da amostra foi feito com um comprimido de Aspirina 500 mg, variando-se sua localização a passos de 0,5 mm no eixo X e Y (Plano de incidência da luz) e 1 mm no eixo Z (altura da amostra em relação à janela de saída de luz do espectrofotômetro), a partir da posição em que se registrou a maior intensidade luminosa refletida. Coletando-se espectros desta amostra em cada uma das posições, pode ser feita uma classificação no modelo de Aspirina 500 mg construído, e verificado em quais combinações de posições a amostra continua sendo classificada como pertencendo à classe padrão. Desta forma determina-se a tolerância de deslocamento em cada eixo. Para a maior absorção possível, o fabricante recomenda que a amostra deveria ser posicionada à 65 mm da janela do espectrofotômetro (eixo Z).

4) Limite de Detecção - Para se avaliar a eficiência e o limite de detecção do instrumento, foram utilizadas amostras de um placebo do medicamento Microvlar e amostras verdadeiras de Microvlar que possui em sua composição uma quantidade pequena dos princípios ativos Levonorgestrel (0,15 mg) e Etinilestradiol (0,03 mg). Esta amostra de placebo foi gentilmente fornecida pelo laboratório da Receita Federal na alfândega da cidade de Santos, prévia e devidamente analisada.

5) Geometria dos comprimidos - Amostras em pó também representam uma dificuldade para análises no modo refletância devido à granulometria e superfície desigual de cada amostra. Na tentativa de minimizar estes efeitos, foi construído no laboratório um empastilhador para a transformação destas amostras em pó em amostras na forma de comprimidos.

Alguns medicamentos, como o Microvlar, para serem analisados precisavam ser macerados, transformados na forma de pó, e novamente empastilhados. A amostra de seu placebo estava na forma de pó, então comprimidos de Microvlar

foram triturados e empastilhados em um empastilhador construído no laboratório para a obtenção dos espectros .

Para se investigar se a distinção entre amostras de Aspirina e Melhoral, que apresentam composição semelhante, era devido ao formato do comprimido ou fatores geométricos relacionados a amostra e não sua composição química, amostras destes medicamentos também foram trituradas e analisadas. Um dos recursos usado para minimizar fatores como granulometria da amostra na forma de pó, foi fazer a transformação destas amostras em pastilhas, com o empastilhador construído no laboratório. Isso garantia uma maior reprodutibilidade das medidas.

No tratamento de dados, os valores de refletância e transfectância dos espectros obtidos são centrados na média.

3.3 Suporte de Amostras

A figura 12, mostra o suporte de amostras utilizado na obtenção dos espectros de refletância.

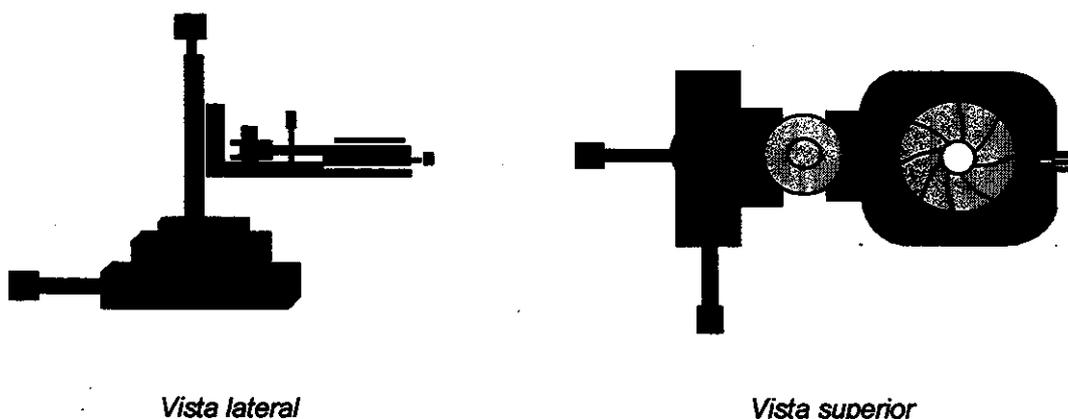


Figura 12. Vistas do suporte porta amostra posicionador X Y Z (com íris centralizadora).

Este suporte posicionador possui movimentação nos três sentidos, X, Y e Z, isto faz com que a posição da amostra possa ser ajustada conforme a necessidade. Ele possui também uma íris, que ao ser fechada, posiciona a amostra em seu centro e conseqüentemente sob o feixe de luz incidente.

3.4 Amostras Utilizadas

Foram utilizadas no estudo, amostras de diversos lotes de diferentes medicamentos, na forma de comprimidos, para obtermos a maior variação possível de composição e de fatores geométricos associados aos medicamentos verdadeiros.

Entre as amostras utilizadas, estão vários lotes de Aspirina 500 mg, lotes de Melhoral 500 mg. Ambos foram empregados na construção da biblioteca de espectros e na avaliação do método de classificação. A performance dos métodos de classificação foi verificada com o uso de placebos e outros medicamentos e/ou simulando-se composição grosseiramente distinta daquela dos medicamentos verdadeiros.

Para que não houvesse uma dispersão do estudo a muitos medicamentos, as análises foram restringidas a poucos medicamentos com características selecionadas, a fim de que fossem investigadas as diversas possibilidades de utilização da espectroscopia NIR em medicamentos como: análises dentro de blisteres, comparação de genéricos e similares, identificação de medicamentos adulterados e identificação de medicamentos vencidos.

Os principais medicamentos utilizados foram: Aspirina 500 e 650 mg, Melhoral, Doril e AAS todos 500 mg, Yomax, Ampicilina Genérica e Similar, Binotal, Litocit, Pressotec, Microvlar, Takil, Primal, Farlac além de outros medicamentos para classificação, placebos e medicamentos montados e adulterados no laboratório.

Para isto, foram utilizados os medicamentos mostrados na Tabela 2 na forma sólida (modo refletância) e na forma líquida (modo absorvância):

Tabela 2. Medicamentos utilizados.

Comprimidos		Cápsulas	Líquidos	Pomadas
Aspirina 500 mg (Bayer)	Tanakan F (Knoll)	Primeral (Synthelabo)	Farlac (Farmasa)	Takil (Marjan)
Melhoral 500 mg (S. Ross)	Aldomet (Prodome)	Permixon (Asta)	Lactutona (Luitpold)	Sulnil (Frumtost)
AAS 500 mg (S. W.)	Femme (Aché)	Flogene (Aché)	Retemic (Apsen)	Plastenan (S. Winthrop)
Doril 500 mg (DM)	Floxacin (Merk S.D)		Tylenol (Cilag)	Omcilon-A "M" (Squibb)
Litocit (Apsen)	Melleril (Sandoz)		Mucolin (Knoll)	
Yomax (Apsen)			Combiron (Aché)	
Ampicilina 500 mg (EMS)			Decadron (Prodome)	
Ampicilina Genérica (EMS)				
Binotal 500 mg (Bayer)				
Microvlar (Schering Brasil)				
Citoneurin 5000 (Merk)				
Pressotec 5, 10, 20 mg (Teuto)				

Medicamentos utilizados na avaliação dos modelos

- Pasalix (Marjan) - Dorflex (Merrell Lepetit) - Quinoflox (Biolab) - Calman (Ativus)
- Liberan (Apsen) - Levordiol (Nova Química) - Aspirina 650 mg (Bayer) - Liberan (Apsen)

Além destes medicamentos, foram utilizados placebos e excipientes como Lactose e Amido, além de medicamentos produzidos ou adulterados no laboratório.

3.5 Tratamento de Dados Obtidos com o Espectrofotômetro NIR Luminar 2000 Dual Mode com Free Space 2030

O tratamento dos dados foi feito por métodos estatísticos multivariados utilizando o programa computacional quimiométrico *Unscrambler*® 7.5 da Camo S.A.. O tratamento utilizou os métodos quimiométricos de Análise de Componentes Principais (PCA) e modelos SIMCA para classificação. Para previsões quantitativas foi utilizada Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS).

Para o tratamento dos dados foi utilizado também um Programa computacional da Brimrose que acompanha o instrumento chamado Real-Time Predictor 1.26, que faz uma classificação "on-line".

4. Resultados e Discussão

A investigação sobre o uso da espectroscopia NIR para identificação de medicamentos falsificados requer a construção de uma biblioteca de dados com espectros de medicamentos verdadeiros, contendo a maior variação possível de amostras e de lotes do medicamento, com nome de fabricante e quantidade de princípio ativo definidos para cada tipo de medicamento. O usuário acessa um programa que faz uma comparação dos dados espectrais de uma amostra, que ele julga ser de um determinado medicamento, com os espectros contidos no banco de dados referentes aos espectros de medicamentos verdadeiros. O programa que faz esta comparação, através de métodos quimiométricos, informa ao usuário se sua amostra possui as características que permitam sua classificação como pertencendo ao grupo referente do medicamento.

O projeto de investigação do uso da espectroscopia no infravermelho próximo para identificação de medicamentos falsificados foi dividido em 2 etapas. A primeira etapa baseou-se na obtenção de amostras de medicamentos com médicos, hospitais e farmácias, que gentilmente cederam algumas amostras. A maioria se apresentava no prazo de validade e outras com validade expirada.

Uma das metas do projeto, além da avaliação de possíveis falsificações, era investigar se era possível a determinação, através da espectroscopia NIR, de variações na composição de medicamentos após ter se expirado sua validade.

De posse das amostras, deu-se início à segunda etapa do projeto, que consistiu da aprendizagem, quanto ao uso da instrumentação a ser utilizada, das técnicas de espectroscopia NIR e dos métodos quimiométricos utilizados no tratamento dos dados espectrais.

4.1 Resultados Obtidos no Protótipo de Espectrofotômetro NIR

O trabalho realizado com protótipo de espectrofotômetro consistiu, na verdade, apenas de uma aprendizagem e um contato com a Espectroscopia no Infravermelho Próximo e com as técnicas de medida em espectroscopia NIR. Os

primeiros estudos foram feitos a partir da obtenção de espectros de refletância de medicamentos diversos, como Aspirina e Melhoral.

O Protótipo de Espectrofotômetro utilizado apresenta todas as características necessárias à sua utilização, quando comparado a espectrofotômetros comerciais. Mas, devido à falta de componentes mais avançados como detectores mais rápidos e potentes, por exemplo, sua utilização torna-se prejudicada por deficiências, tais como: a lentidão na coleta de espectros e utilização de fibras ópticas não adequadas (alta atenuação) para coleta de dados no modo refletância, que causam baixa reprodutibilidade espectral e ruídos excessivos.

A partir dos resultados preliminares obtidos no protótipo de espectrofotômetro, pode-se concluir ser viável a utilização do método de análise de medicamentos por NIR proposto, necessitando pequenos ajustes matemáticos que corrijam fatores como variação na linha de base ou ruídos nos espectros.

Com a instalação do espectrofotômetro comercial Brimrose Luminar 2000, mais rápido e adequado aos propósitos do projeto, deu-se continuação ao projeto, com a obtenção de melhores resultados.

4.2 Resultados Obtidos no Espectrofotômetro NIR Brimrose Luminar 2000 Dual Mode Free Space Luminar 2030

Com a instalação deste espectrofotômetro comercial, este passou a ser utilizado na obtenção dos espectros de refletância a absorbância dos medicamentos.

O controle do Espectrofotômetro Brimrose Luminar 2000 Dual Mode Free Space Luminar 2030 e a aquisição de dados, fica a cargo do programa computacional Snap 2.03 da Brimrose.

Como foi dito anteriormente, as análises não foram estendidas a muitos medicamentos, mas sim, a alguns medicamentos selecionados de forma a representar grande parte das características dos produtos comercializados. É necessário que antes da obtenção dos espectros no modo refletância, sejam feitas

investigações sobre a influência do posicionamento das amostras, sobre a faixa espectral utilizada e outros fatores que influenciam a coleta dos espectros.

Os medicamentos utilizados no projeto foram escolhidos de acordo com suas características específicas. Estes medicamentos foram empregados para se investigar a melhor forma de obtenção dos dados espectrais para compor a biblioteca de medicamentos de referência. Desta forma, investigou-se também a possibilidade de obtenção do espectro de refletância de medicamentos dentro de suas embalagens (blister). Avaliou-se também a possibilidade de identificação de medicamentos vencidos, de medicamentos genéricos e similares, de medicamentos com diferentes concentrações de princípio ativo, de medicamentos de diferentes fabricantes contendo o mesmo princípio ativo, de medicamentos nas mais diversas formas de apresentação e de medicamentos adulterados ou falsificados.

4.3 Fatores que Influenciam as Medidas de Refletância

Fatores ambientais como temperatura e umidade e outros como posição, forma da amostra e sua granulometria, afetam seu espectro de refletância e necessitam ter seu efeito avaliado [16]. Para se estudar estes fatores, as análises se restringiram a poucos medicamentos sólidos. A análise do efeito da posição e distância da amostra na coleta de espectros, influência da face do comprimido e tempo de exposição da amostra no ambiente fora da embalagem, além de outros fatores, foram restritas aos medicamentos Aspirina e Melhoral, ambos contendo 500 mg do princípio ativo ácido acetilsalicílico. Em vista da composição semelhante apresentada por estes medicamentos, eles foram de grande utilidade para a avaliação do método de classificação (identificação), que tem a tarefa de discriminar, a partir das pequenas diferenças espectrais observadas, medicamentos de formulação semelhante.

4.3.1 Repetibilidade dos Espectros de Refletância

Um estudo da repetibilidade dos espectros de refletância foi efetuado para se inferir a confiabilidade estatística das medidas espectrofotométricas. A análise dos resultados deste estudo, através dos desvios padrões dos espectros, permite estabelecer o limite de precisão associado à instrumentação utilizada.

Para o estudo da repetibilidade dos espectros de refletância de amostras de comprimidos, foram obtidos 20 espectros (média de 300 varreduras) de um mesmo comprimido de Aspirina 500 mg em uma única face. Na obtenção de cada um dos espectros, o comprimido foi retirado e recolocado no suporte amostrador. Desta forma, incluiu-se no estudo o efeito de possíveis deslocamentos da amostra.

Na figura 13 é mostrado o gráfico dos desvios padrões relativos das medidas em cada variável dos 20 espectros do mesmo comprimido. Pode ser evidenciada a boa repetibilidade dos espectros de refletância, com valores de desvio padrão médio da ordem de 10^{-3} na faixa de 1100 à 1200 e 2000 à 2400, e valores de desvios padrões da ordem de 10^{-4} na faixa de 1200 à 2000, garantindo assim a precisão das medidas obtidas com o espectrofotômetro. Com a utilização de ferramentas de normalização dos espectros como primeira derivada, os valores dos desvios padrões das medidas ($dR/d\lambda$) são da ordem de 10^{-4} na faixa de 1100 à 1200 e 2000 à 2400, e 10^{-5} na faixa de 1200 à 2000.

Em outro estudo da repetibilidade dos espectros de refletância de amostras de comprimidos, foram obtidos 20 espectros de um mesmo comprimido de Aspirina 500 mg em uma única face, sem a alteração na sua posição. O desvio padrão dos valores em cada variável dos 20 espectros do mesmo comprimido apresentou uma boa repetibilidade dos espectros de refletância, com valores de desvios padrões da ordem de 10^{-4} para toda a faixa espectral.

O aumento do ruído observado na região espectral NIR, abaixo de 1200 nm e acima de 2000 nm, deve-se a um conjunto de fatores associados. Entre os fatores, está a baixa eficiência do AOTF nos extremos da faixa espectral. Outro fator é a

menor eficiência de emissão da lâmpada a valores de comprimento de onda acima de 1500 nm.

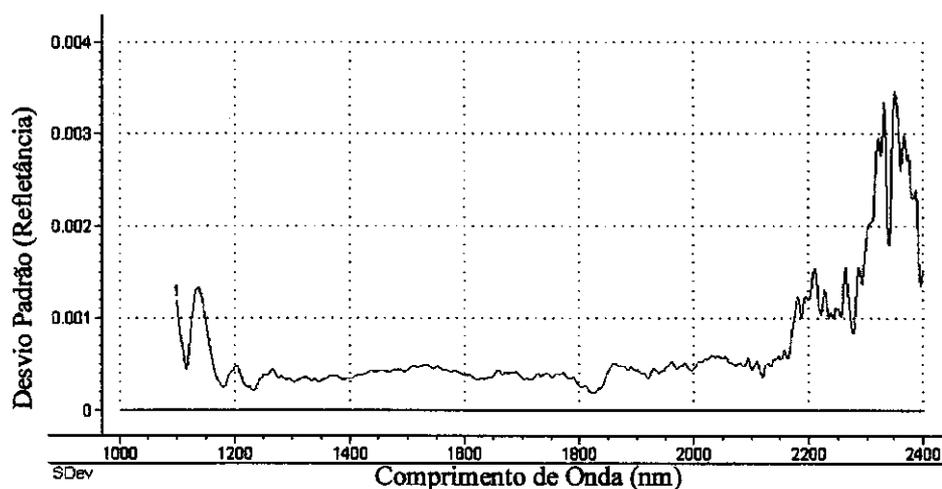


Figura 13. Gráfico do desvio padrão da amostragem de 20 espectros do mesmo comprimido.

4.3.2 Influência da Posição e Formato da Amostra

Como foi dito na parte experimental, o estudo da posição da amostra foi feito com uma amostra de Aspirina 500 mg, variando-se a localização do posicionador em cada um dos eixos X, Y e Z, a partir da posição de maior intensidade luminosa (posição inicial) em que foi fixado o posicionador.

Deste estudo pode-se concluir que, baseando-se na posição de maior intensidade luminosa em que foi fixado o posicionador, as possíveis variações ou deslocamento no posicionador que permitam que a amostra continue sendo classificada como pertencente à classe padrão de Aspirina, são de ± 3 mm no eixo X, ± 3 mm no eixo Y e ± 6 mm no eixo Z. Para a maior absorção possível, o posicionador foi fixado à 65 mm da janela do espectrofotômetro (eixo Z). Estes valores demonstram uma boa tolerância em relação ao posicionamento da amostra permitindo, em vista do suporte empregado e da sua precisão, concluir que este fator não exerce influência significativa sobre o procedimento de classificação.

Outro fator que afeta os espectros de refletância de comprimidos, é que suas faces influenciam, causando variações no espectro. Normalmente, os comprimidos apresentam uma face provida de um sulco utilizado para estabelecer o seu corte para meia dose, ou inscrições com o nome do fabricante ou do produto. Desta forma é observada uma menor reprodutibilidade espectral ao se alterar a face, espalhando diferentemente o feixe de luz. Para a construção do grupo de espectros padrão este fator deve ser levado em conta, coletando-se espectros nas duas faces do comprimido. Este efeito pode ser visualizado nos espectros de Aspirina 500 mg obtidos nas duas faces do comprimidos mostrado na figura 14.

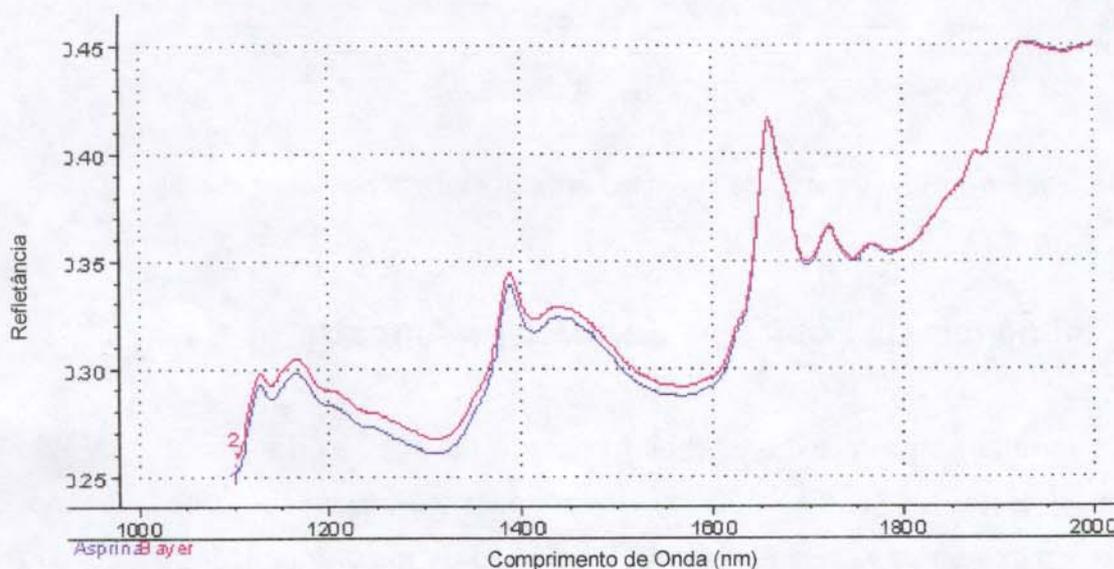


Figura 14. Espectros de refletância de Aspirina 500 mg obtidos nas duas faces dos comprimidos com inscrições *Bayer* (Rosa) e *Aspirina* (Azul).

Para minimizar estes problemas de alteração espectral, foi necessário a aplicação de métodos matemáticos como primeira derivada que são eficazes, conforme pode ser observado na figura 15, para se corrigir flutuações aditivas de linha de base, otimizando assim a extração de informações analiticamente úteis [14].

Amostras em pó também representam uma dificuldade para análises no modo refletância devido a granulometria e superfície desigual de cada amostra. Na

tentativa de minimizar estes efeitos, foi construído no laboratório um empastilhador para a transformação destas amostras em pó em amostras na forma de comprimidos.

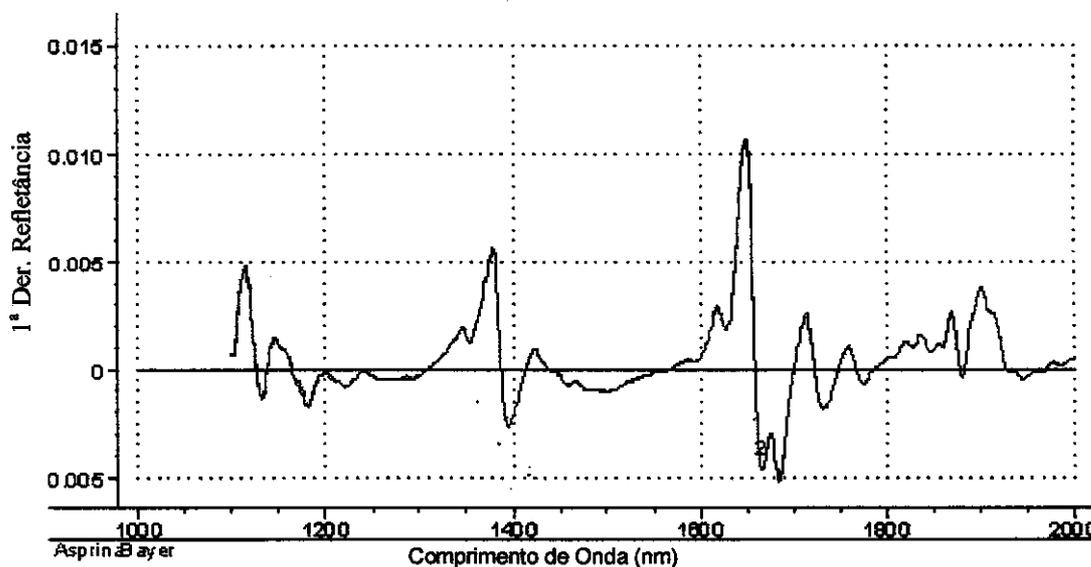


Figura 15. Espectros de comprimidos de Aspirina 500 mg apresentados na figura 14, tomados nas duas faces, na forma da 1ª derivada.

4.3.3 Influência da Umidade

Fatores como a umidade ambiente também podem influenciar nos espectros de refletância, através da absorção de água pelos medicamentos. Nos espectros de amostras em pó ou comprimidos a absorção significativa de água pode ser observada através de um aumento na banda de absorção nas regiões de 1425 e 1900 nm, referentes às bandas do 1º sobretom e combinação da ligação O-H, respectivamente.

Para evitar a influência da umidade ambiente nos espectros das medidas de refletância das amostras de medicamentos sólidos, esta foi mantida constante. Este procedimento foi adotado, após estudos sobre o efeito da umidade do ar sobre os espectros realizados, apresentarem melhores resultados na modelagem por PCA quando realizados sob umidade ambiente constante.

Na figura 16 é mostrado o espectro de refletância de uma amostra de Aspirina 500 mg triturada em almofariz (em pó), exposto ao ambiente com alta umidade relativa do ar (Umidade relativa do ar de 80%) e exposto ao ambiente com baixa umidade relativa do ar (Umidade relativa do ar de 40%). Nesta figura pode ser observado a grande variação da absorção nas bandas relativas a absorção da água. Este efeito é mais acentuado em medicamentos muito higroscópicos como o Litocit. Na figura 17 é mostrado o espectro de refletância de uma amostra de Litocit triturada em almofariz (em pó), exposto ao ambiente com alta umidade relativa do ar (Umidade relativa do ar de 80%) e exposto ao ambiente com baixa umidade relativa do ar (Umidade relativa do ar de 40%).

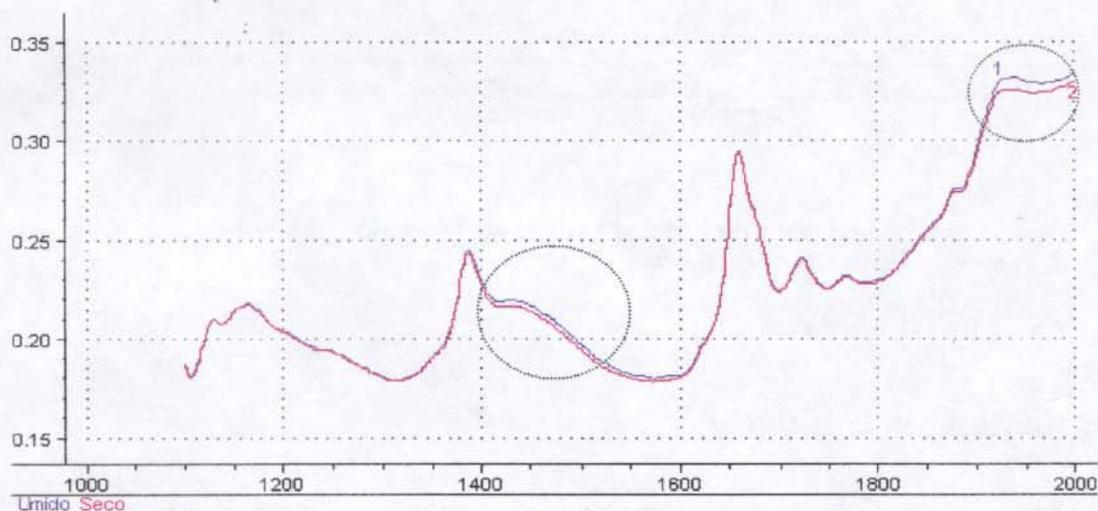


Figura 16. Variação nos espectros de refletância do medicamento Aspirina 500 mg exposto ao ambiente com alta umidade relativa do ar (Azul) e exposto ao ambiente com baixa umidade relativa do ar (Rosa).

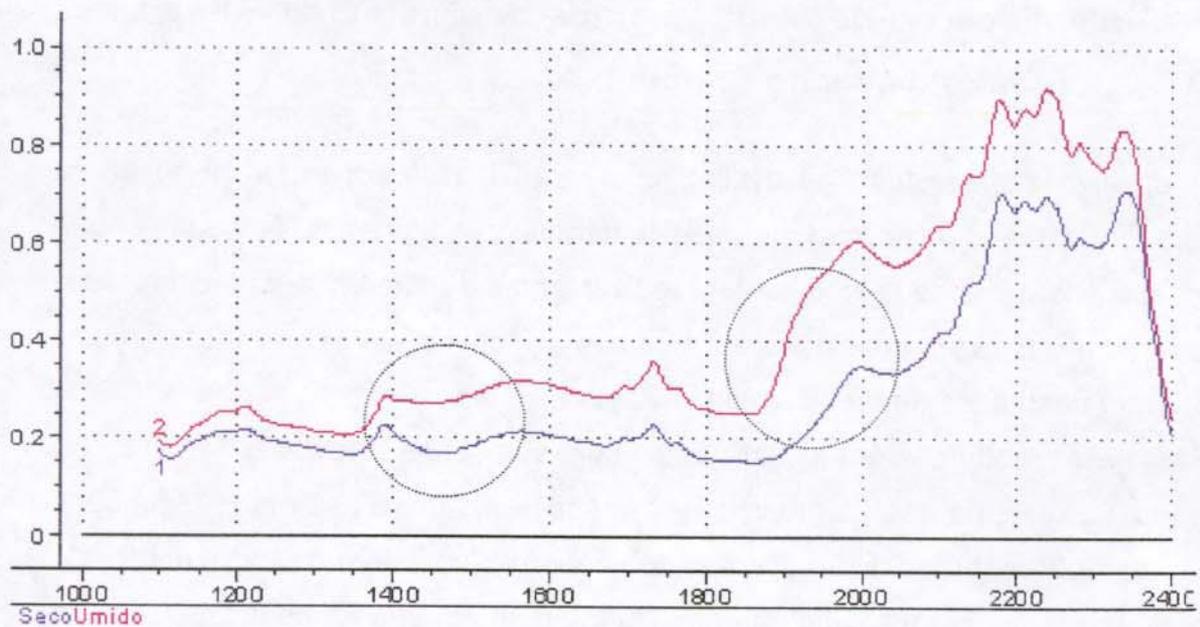


Figura 17. Variação nos espectros de refletância do medicamento Litocit exposto ao ambiente com alta umidade relativa do ar (Rosa) e exposto ao ambiente com baixa umidade relativa do ar (Azul).

4.4 Aplicações da Metodologia NIR em Fármacos

Para se avaliar a utilização da técnica NIR na identificação de medicamentos, esta foi testada em diversas situações, e para isso, utilizou-se diferentes medicamentos que apresentam características distintas e representativas da maioria dos fármacos comercializados, de forma a se avaliar medicamentos:

- * De diferentes fabricantes, contendo mesmo princípio ativo. (Aspirina e Melhoral)
- * Adulterados ou falsificados (Aspirina)
- * Dentro de Blisteres. (Medicamento Yomax)
- * Vencidos e não vencidos. (Medicamento Litocit)
- * Genéricos e similares. (Ampicilina, Ampicilina genérica e Binotal)
- * Em diferentes tipos de formulações (Cápsulas, líquidos, xaropes, etc.).
- * Em diferentes concentrações. (Medicamento Pressotec)

4.5 Identificação de Medicamentos de Diferentes Fabricantes Contendo o Mesmo Princípio Ativo

O objetivo deste estudo foi avaliar, com o auxílio da espectroscopia NIR, a possibilidade de identificação de medicamentos de diferentes fabricantes que apresentam composição semelhante. Medicamentos de diferentes fabricantes que apresentam em sua composição os mesmos princípios ativos em teores iguais podem ser chamados de medicamentos similares.

Para este estudo, foram utilizados por sua composição e formato do comprimido semelhantes, os medicamentos Aspirina, Melhoral, Doril e AAS, todos contendo 500 mg do princípio ativo ácido acetilsalicílico, além de excipientes. Os medicamentos Melhoral e Doril apresentam também em sua formulação 30 mg de Cafeína. Todos são empregados como analgésicos e antitérmicos.

Este estudo é relevante na investigação do uso da espectroscopia NIR na identificação de medicamentos falsificados, porque permite avaliar a técnica quanto a capacidade de distinguir entre, medicamentos de acordo com sua composição com relação aos excipientes e pequenas variações que caracterizam os diferentes fabricantes. Isto permite uma distinção mais clara dos diversos medicamentos de marcas diferentes, associando a composição do medicamento ao seu fabricante. Desta forma, pode-se concluir, por exemplo, se um outro medicamento, mesmo que com composição semelhante, foi embalado e vendido como sendo de outra marca [12, 21, 27].

4.5.1 Investigação Sobre os Medicamentos Aspirina e Melhoral 500 mg na Forma de Comprimidos

A figura 18 mostra os espectros de refletância dos medicamentos Aspirina, Melhoral, AAS e Doril obtidos na forma dos comprimidos originais. Pequenas diferenças espectrais entre os medicamentos podem ser visualizadas. Estas

pequenas diferenças espectrais despertam o interesse pelo estudo da possibilidade de identificação de cada um dos medicamentos.

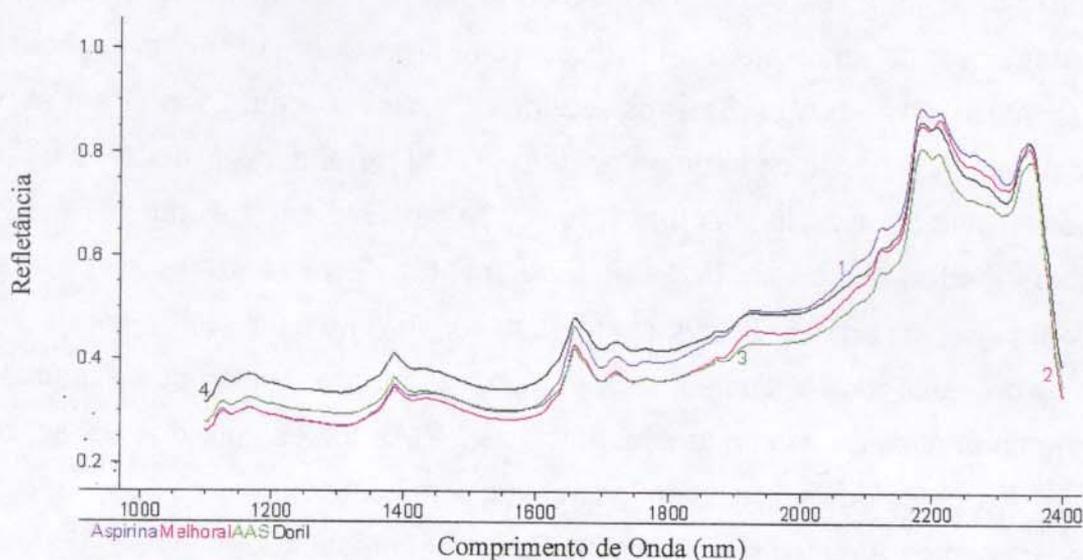


Figura 18. Espectros de refletância dos medicamento Aspirina 500 mg (Azul-1), Melhoral 500 mg (Rosa-2), Doril 500 mg (Preto-3) e AAS 500 mg (Verde-4).

Em nenhum dos medicamentos há referência sobre a composição dos excipientes. Os comprimidos dos medicamentos Aspirina, Melhoral possuem, em média, massas de 613 mg e 615 mg, respectivamente. Já os comprimidos de Doril e AAS apresentam massas, em média, de 573 mg e 571 mg, respectivamente. Para os medicamentos Aspirina e Melhoral estes valores representam uma porcentagem, em massa, de 81,5 % e 81,3 %, respectivamente, de princípio ativo no comprimido. Os teores de cafeína nos comprimidos de Melhoral e Doril são, em média, 4,88% e 5,2%, respectivamente.

Foram obtidos vários grupos de espectros de amostras de Aspirina 500 mg e Melhoral 500 mg para construção dos padrões destes medicamentos. Para se minimizar os efeitos do formato dos comprimidos dos medicamentos, os espectros foram matematicamente processados para a forma de suas primeiras derivadas.

Foram construídos modelos PCA dos medicamentos Aspirina e Melhoral, sendo que os outros dois medicamentos foram utilizados apenas para classificação.

Os espectros foram obtidos variando-se diversos parâmetros experimentais como faixa de comprimento de onda medido e posição da amostra, mantendo-se constantes umidade ambiente e número de varreduras, visando a otimização das medidas, até o ajuste dos parâmetros experimentais mais adequados. Para estes medicamentos, a faixa de comprimentos de onda utilizada foi de 1100-2000 nm. A faixa de trabalho do aparelho vai de 1100 à 2400 nm, no modo refletância. Porém, para estes medicamentos, medidas a comprimentos de onda acima de 2000 só acrescentam ruídos aos espectros, como pode ser visto na figura 13 do item 4.3.1.

Depois de estudados e ajustados os parâmetros para obtenção dos espectros, foi feita uma análise de componentes principais (PCA) do conjunto dos espectros, e através do gráfico dos *scores*, verificou-se a discriminação entre as duas classes dos medicamentos Aspirina e Melhoral 500 mg, como mostrado na figura 19. Para a construção do modelo PCA do medicamento foi utilizada como técnica de validação, a validação cruzada ("Cross Validation").

Verificada por PCA a discriminação entre as classes dos medicamentos Aspirina e Melhoral 500 mg, foi construído um modelo para cada medicamento, utilizando 200 espectros de 100 amostras de Aspirina de 20 lotes diferentes e 200 espectros de 60 amostras de Melhoral de 11 lotes, com espectros coletados das duas faces do comprimido, a fim de se incluir na modelagem fatores relacionados à face ou posicionamento da amostra, de efeitos do tamanho de partículas e variação aceitável de concentração do princípio ativo. A temperatura ambiente flutuou entre 19° e 21° C e a umidade relativa do ar flutuou entre 39 % e 45 %.

Posteriormente, foram construídos modelos PCA para ambos os conjuntos de amostras, que serviram como padrão do medicamento para a classificação de novas amostras por SIMCA. O modelo de Aspirina 500 mg utiliza 3 componentes principais (PC) para explicar a variância de seus dados e o modelo Melhoral 500 mg utiliza 4 PC. Em todas as análises e classificações efetuadas para novas amostras, o resultado obtido foi sempre correto. Aspirina e Melhoral são classificados como pertencendo à suas respectivas classes, não sendo

classificados em classes de outros medicamentos, totalizando 100 % de acerto. Devido ao grande número de marcas de medicamentos existentes, seria impossível afirmar, que uma amostra de um medicamento não iria nunca classificar como pertencendo a classe de outro medicamento. Mas pode-se afirmar com certeza que, em caso da classificação como pertencendo a uma classe de referência, a amostra pertence a classe do medicamento.

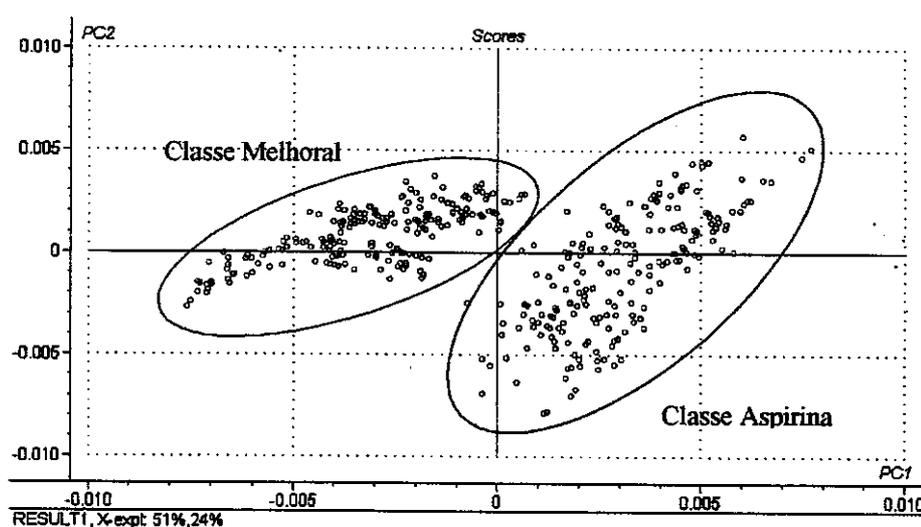


Figura 19. Gráfico de "scores" da análise de componentes principais dos medicamentos Aspirina e Melhoral.

A não classificação de uma amostra verdadeira em seu padrão é resultado de problemas na obtenção do espectro desta nova amostra ou problemas na modelagem da classe padrão. No entanto, em vista da similaridade entre medicamentos avaliados neste estudo, é possível dizer que muito provavelmente, a identificação em outra classe de medicamentos totalmente diferente não seria obtida, pois compostos (principalmente referentes ao princípio ativo) distintos afetariam muito mais os espectros do que as alterações observadas neste estudo com os analgésicos. Isto significa dizer que espectros de medicamentos diferentes seriam bastante distintos.

Uma classificação de novas amostras dos medicamentos de diferentes fabricantes (Aspirina, Melhoral, Doril e AAS) é mostrada no gráfico de Coomans da figura 20.

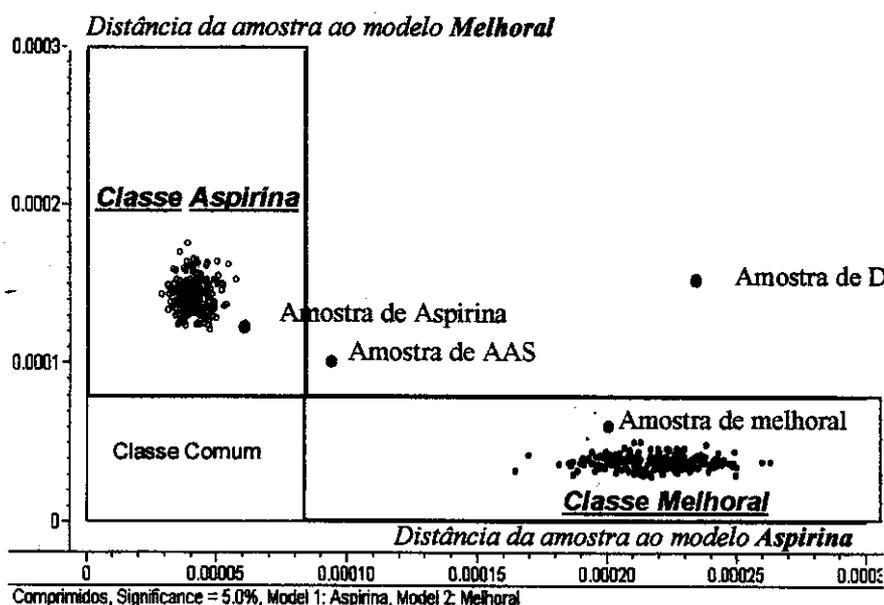


Figura 20. Gráfico de classificação de novas amostras nos modelos dos medicamentos Aspirina e Melhoral.

4.5.2 Análise de Medicamentos Similares na Forma de Pó e Empastilhados

Para se avaliar se a distinção de classes entre os medicamentos Aspirina e Melhoral, observada após uma Análise de Componentes Principais (PCA), era devida a geometria da amostra (formato do comprimido) e não a sua composição química, algumas amostras foram trituradas, colocadas em um suporte apropriado e tiveram seus espectros coletados. Desta forma, possíveis variações devidas ao formato dos comprimidos, não corrigidas pela utilização da derivada dos espectros foram canceladas. O resultado desta investigação foi a manutenção, como nos

medicamentos originais, da distinção das classes dos medicamentos Aspirina e Melhoral, mostrando que ela se deve a composição química das amostras.

Para que fossem minimizados os efeitos do tamanho de partícula, superfície irregular da amostragem dos comprimidos triturados e mantido um padrão geométrico, as amostras foram também empastilhadas e analisadas, fornecendo o mesmo resultado das amostras de comprimidos originais e das amostras em pó, ou seja, a distinção entre as classes dos medicamentos analisados Aspirina e Melhoral.

Desta forma, utilizando-se Análise de Componentes Principais, foi possível verificar que as diferenças espectrais em ambos os casos, eram realmente devidas à composição química dos medicamentos e não ao formato do comprimido.

Os resultados obtidos mostram ser possível, utilizando um conjunto de amostras de referência que incluem a variação de parâmetros de amostragem, como face do comprimido, posição da amostra, e de composição, fazer-se uma discriminação entre amostras dos medicamentos Aspirina 500 mg de amostras de Melhoral 500 mg ou de outros medicamentos similares.

Um conjunto de referência por necessitar da inclusão de parâmetros, como variação da composição, deve possuir no mínimo 10 diferentes amostras de um mesmo medicamento. Para a construção dos modelos PCA, que englobem todos os parâmetros, devem ser obtidos no mínimo 20 espectros destas 10 amostras. Estes são os números mínimos necessários para que todos os parâmetros experimentais sejam considerados, fornecendo com isso um modelo confiável do medicamento, que resulte em 100% de identificação positiva.

Pode ser verificado assim, que o método é eficiente para a classificação de amostras de marcas comerciais diferentes, contendo praticamente a mesma formulação. Conseqüentemente, pode-se concluir ser possível a discriminação entre medicamentos de diferentes fabricantes contendo o mesmo princípio ativo e nas quais pequenas variações de composição estão presentes.

Quando a composição dos medicamentos não apresenta princípios ativos adicionais, as diferenças espectrais, que fazem com que seja possível a distinção

de medicamentos similares de diferentes fabricantes, devem-se não à geometria do comprimido ou inscrições nas faces dos mesmos, mas a composição de excipientes diferenciada dos medicamentos. Contudo, não é possível a observação destas diferenças espectrais sem o auxílio de métodos quimiométricos de análise como o PCA e SIMCA.

4.6 Identificação de Medicamentos Adulterados

Durante o estudo anterior, foi comprovada a possibilidade de identificação de medicamentos contendo o mesmo princípio ativo conforme o fabricante e que a metodologia desenvolvida era capaz de distinguir medicamentos semelhantes.

Uma vez que é possível a distinção entre medicamentos muito semelhantes por espectroscopia NIR, a possibilidade de identificação de diferenças em medicamentos, causadas por adulterações grosseiras ou reembalagem de outro tipo de medicamento ou excipiente, é muito maior.

Estudou-se, portanto, a potencialidade da espectroscopia NIR de distinguir entre medicamentos verdadeiros, adulterados, de falsificação simulada ou que tiveram seu teor de princípio ativo reduzido pelo acréscimo de excipientes. Avaliou-se também neste estudo, a possibilidade de identificação de amostras de Placebos de medicamentos, como o Microvlar.

Placebos são medicamentos que não apresentam efeitos terapêuticos reais. São compostos por todos os excipientes (veículo) de um determinado medicamento, com exceção do princípio ativo. São utilizados principalmente em casos onde as doenças tem fundo psicológico e em programas de avaliação da eficácia e de efeitos colaterais de medicamentos novos.

4.6.1 Adulteração de Aspirina 500 mg

O modelo de Aspirina 500 mg empastilhada no laboratório, construído anteriormente, foi usado na classificação por SIMCA de novas amostras de Aspirina 500 mg não incluídas no conjunto de amostras utilizadas para a construção do modelo PCA. Além disto, foram classificadas amostras de excipientes puros, como lactose e amido, amostras de Aspirina 500 mg adulteradas com amido e lactose, amostras simulando Aspirina montadas no laboratório (contendo 500 mg de ácido acetilsalicílico e amido) e amostras de Aspirina 650 mg, todas empastilhadas.

O modelo de Aspirina 500 mg utiliza 4 componentes principais (PC) para explicar 90 % da variância de seus dados. A faixa espectral utilizada também foi de 1.100 à 2.000 nm.

Amostras de Aspirina 500 mg foram trituradas e adulteradas pelo acréscimo de quantidades definidas de compostos comumente usados como excipientes em medicamentos como lactose e amido. Considerando que os comprimidos de Aspirina 500 mg possuem em média uma massa de 613 mg, sendo 500 mg de ácido acetilsalicílico (valor nominal) e aproximadamente 100 mg de excipientes; o teor de ácido acetilsalicílico (AAS) no comprimido é de cerca de 81,5%.

Para a adulteração deste medicamento, foram adicionados aos comprimidos triturados, valores de massa definidos de amido ou lactose para uma diluição à teores de 80, 75, 70, 50 % de AAS no comprimido. A simulação no laboratório de um comprimido de Aspirina foi feita com a mistura de 500 mg de ácido acetilsalicílico e amido, ambos P.A.. Todas as amostras foram empastilhadas empregando-se a mesma massa das misturas.

Quando os parâmetros que afetam a obtenção do espectro de refletância são mantidos constantes, o resultado obtido é sempre a classificação correta das amostras de Aspirina verdadeiras em sua respectiva classe, e a classificação como não pertencendo à classe Aspirina 500 mg, das amostras dos medicamentos adulterados com lactose ou amido, mesmo quando a adulteração é feita pela adição de pequenas quantidades de excipientes.

O resultado mostra também, a classificação como não pertencendo da Aspirina de outra concentração (Aspirina 650 mg), Aspirina simulada e dos excipientes puros. Uma classificação de novas amostras de Aspirina e Aspirina adulterada com lactose é mostrada no gráfico de S_1/S_0 x Leverage (H_i) da figura 21.

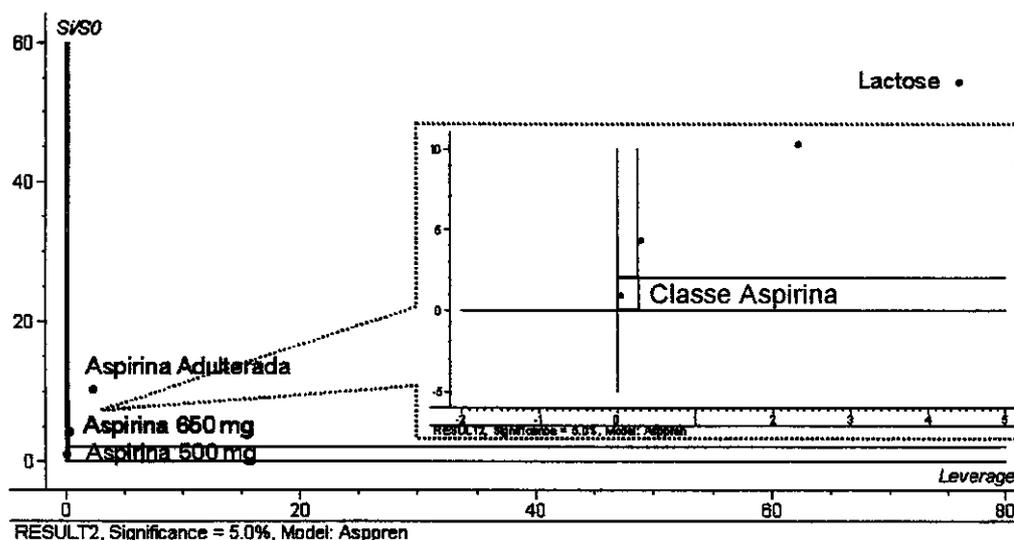


Figura 21. Gráfico de classificação de amostras adulteradas no modelo do medicamento Aspirina.

O gráfico da figura 21 mostra que Aspirina 500 mg verdadeira é classificada corretamente em sua classe padrão, enquanto que amostra de Aspirina adulterada com uma pequena quantidade de lactose e a Aspirina na concentração de 650 mg de ácido acetilsalicílico não são classificadas como pertencendo a classe padrão de Aspirina 500 mg. Amostras do excipiente lactose, por apresentar composição totalmente diferente da Aspirina, localizam-se em uma região distante da classe padrão de Aspirina 500 mg.

Os resultados obtidos mostram ser possível, utilizando um conjunto grande de amostras padrão com uma grande variação de parâmetros de amostragem, como face do comprimido, posição da amostra, além de algoritmos matemáticos que normalizem os dados (como aplicação de primeira derivada), fazer-se uma discriminação entre amostras dos medicamentos verdadeiros de amostras de Aspirina adulterada, de medicamentos totalmente diferentes, placebos ou contendo teores ou composição diferente, como no caso da Aspirina 650 mg.

Isto evidencia o potencial da espectroscopia NIR na verificação da autenticidade de medicamentos.

Um dos aspectos observados é a possibilidade de identificação de medicamentos simulados e distinção do medicamento de marca, mesmo que esta simulação contenha o mesmo teor de princípio ativo do medicamento verdadeiro.

Para uma não distinção deste tipo de falsificação entre medicamento de marca e simulado, seria necessário que a simulação fosse uma cópia fiel do medicamento de marca. Isto porque, na análise por NIR, o espectro do medicamento é devido não só ao princípio ativo, mas a composição total do medicamento (princípio ativo e excipientes) e aspectos físicos como dureza do comprimido, inscrições na face, etc..

Com isto, pode-se concluir, ser possível a utilização da espectroscopia NIR na identificação de adulterações de medicamentos. Esta identificação é possível até mesmo em medicamentos com adulterações sutis, como redução do teor de princípio ativo pela adição de excipientes.

4.6.2 Classificação de Microvlar e Placebo de Microvlar

O medicamento Microvlar, utilizado como anticonceptivo feminino, foi um dos primeiros medicamentos falsificados descobertos no Brasil. Ele foi um dos marcos da descoberta da falsificação de medicamentos, principalmente pela repercussão que ocasionou. A indústria fabricante alega ter embalado farinha de trigo em um teste para uma máquina embaladora e permitido, inadvertidamente, a distribuição desta farinha embalada como medicamento. Pela repercussão causada e pela pequena quantidade de princípio ativo que apresenta em sua composição, 0,15 mg de Levonorgestrel (0,22 % em massa do comprimido) e 0,03 mg de Etinilestradiol (0,04 % em massa do comprimido), em comprimidos de 85 mg (70 mg retirando-se a casca que recobre o comprimido), este medicamento constitui um desafio ao estudo de identificação de medicamentos falsificados pela

espectroscopia NIR. Neste caso, o aspecto relacionado com a sensibilidade da técnica pode ser avaliado.

Amostras de placebo de Microvlar, previamente analisadas, foram gentilmente fornecidas pelo laboratório da Receita Federal na alfândega da cidade de Santos.

Para a construção do padrão do medicamento, foram utilizados 10 lotes de Microvlar e outros 3 lotes para a validação do modelo.

Os comprimidos de Microvlar foram raspados e a cobertura que os recobria retirada. Dez comprimidos de cada lote do medicamento foram triturados e novamente empastilhados, fornecendo comprimidos de aproximadamente 700 mg. Comprimidos de Placebo também foram montados com a mesma massa.

Foram obtidos 50 espectros dos 10 diferentes lotes de amostras de Microvlar e 50 espectros de 10 amostras de placebo, com espectros tomados nas duas faces da pastilha. A faixa espectral utilizada foi de 1.200 à 2.200 nm. Estes espectros serviram como padrão para o medicamento e seu placebo.

Visualmente é possível a observação de pequenas diferenças espectrais entre o Microvlar e seu placebo, como mostrado na figura 22.

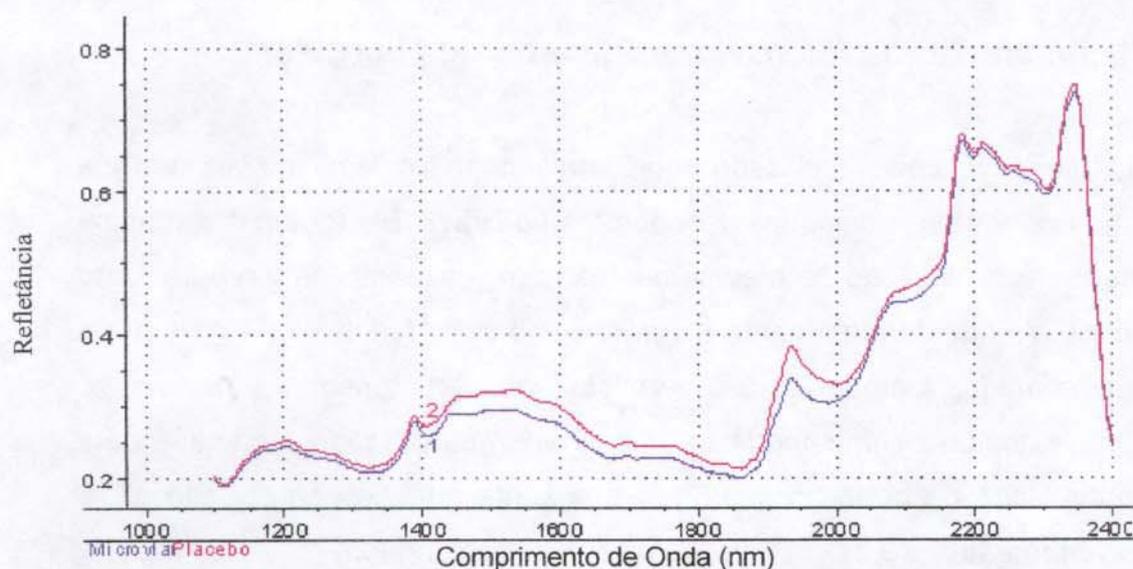


Figura 22. Espectros do medicamento Microvlar (Azul-1) e seu Placebo (Rosa-2).

Para a verificação e confirmação destas diferenças, foi feita uma análise de componentes principais, observando-se o aparecimento de duas classes distintas de amostras, a classe Microvlar e a classe Placebo (figura 23).

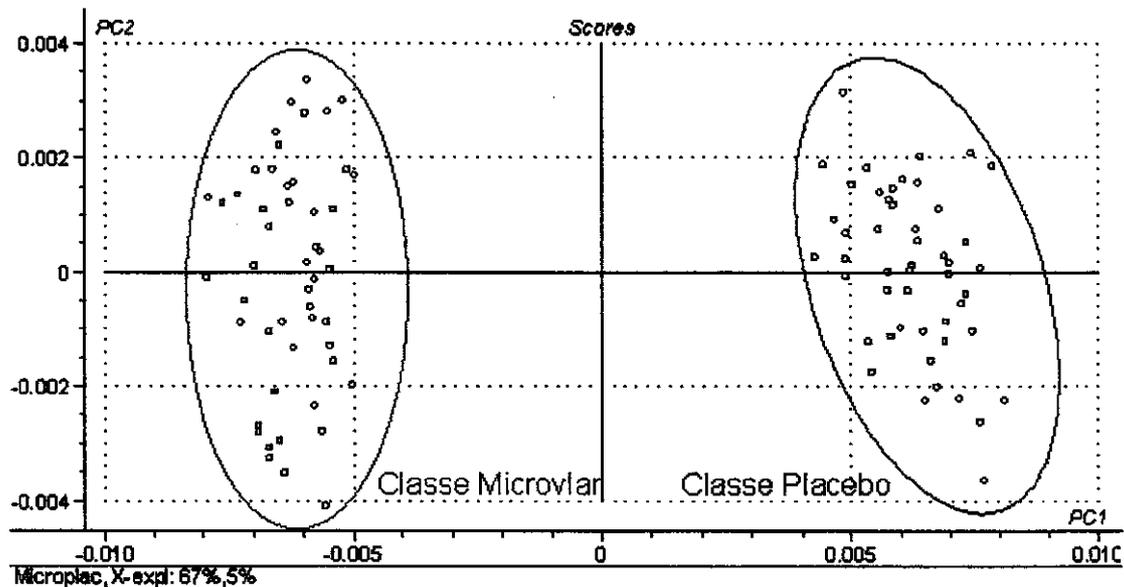


Figura 23. Gráfico de Scores da Análise de Componentes Principais do medicamento Microvlar e Placebo de Microvlar.

Verificada a distinção de classes, foram construídos, então, modelos PCA para os conjuntos de amostras de Microvlar e placebo, que serviram como padrão.

Estes modelos foram posteriormente usados na classificação de novas amostras de Microvlar e amostras de placebo de Microvlar, que não foram incluídas no conjunto de amostras utilizadas para a construção dos modelos PCA.

O modelo PCA para o medicamento Microvlar utilizou 10 componentes principais em sua construção, o modelo PCA para o placebo utilizou 9 componentes principais em sua construção. Porém, ambos modelos fornecem um resultado seguro na classificação de novas amostras valendo-se de apenas 3 componentes principais.

O número excessivo de componentes deve-se, talvez, ao empastilhamento destas amostras e reflete, provavelmente, apenas ruídos. A variância explicada ao se reduzir de 10 componentes principais para 3 varia de 78% a 50 %.

Para a validação do conjunto de dados e dos modelos construídos, foi feita a classificação de 10 espectros de amostras de Microvlar e 10 amostras de placebo, que não fizeram parte do conjunto padrão. Como resultado, foi possível a verificação da classificação correta de todas as amostras em suas respectivas classes padrão (tabela 3 e figura 24).

Tabela 3. Classificação de novas amostras de Microvlar e Placebo de Microvlar nos modelos padrões Microvlar e Placebo de Microvlar. O asterisco (*) significa que o espectro foi classificado como pertencendo ao modelo.

Amostra	Modelo Microvlar	Modelo Placebo
Placebo 1		*
Placebo 2		*
Placebo 3		*
Placebo 4		*
Placebo 5		*
Placebo 6		*
Placebo 7		*
Placebo 8		*
Placebo 9		*
Placebo 10		*
Microvlar 1	*	
Microvlar 2	*	
Microvlar 3	*	
Microvlar 4	*	
Microvlar 5	*	
Microvlar 6	*	
Microvlar 7	*	
Microvlar 8	*	
Microvlar 9	*	
Microvlar 10	*	

Amostras do medicamento Levordiol que contém os mesmos princípios ativos que o Microvlar e a cobertura do Microvlar transformada em pastilha, também foram utilizadas na classificação, mas em nenhum momento foram classificadas como pertencentes às classes padrão do Microvlar ou do seu placebo.

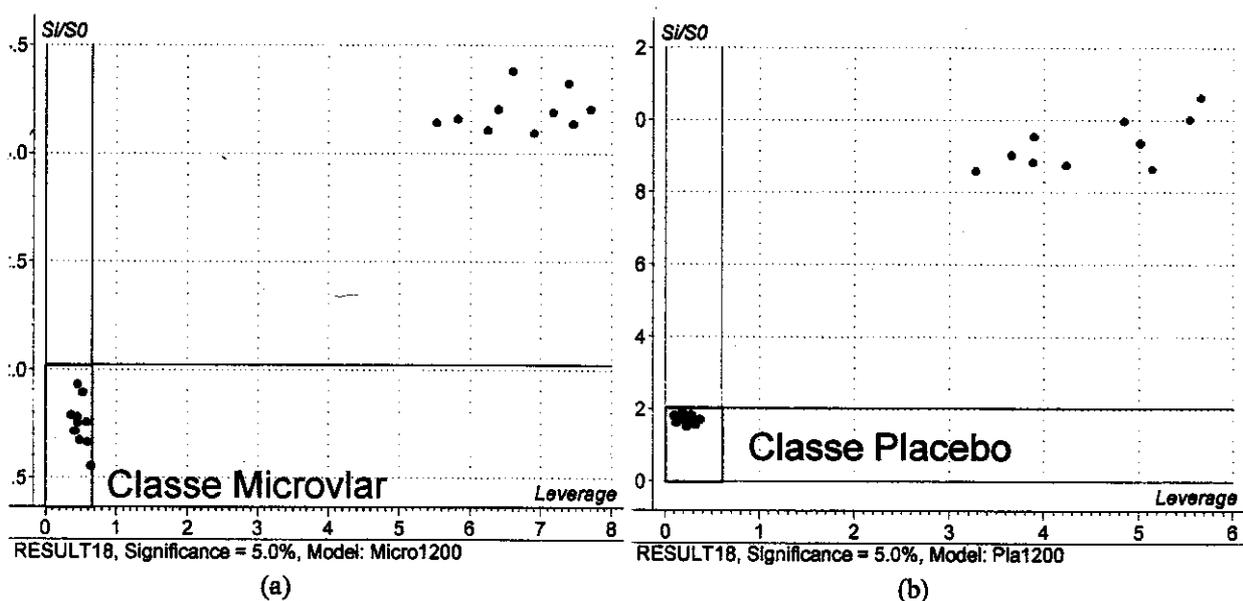


Figura 24. Gráfico de Coomans de classificação SIMCA de novas amostras de Microvlar (azul) e Placebo (preto) nos modelos padrão de Microvlar (a) e Placebo (b). (N^o de componentes =3).

A classificação correta das amostras nas respectivas classes padrão evidencia o potencial de identificação e discriminação de medicamentos verdadeiros de placebos, mesmo quando os princípios ativos estão presentes em teores reduzidos.

Para o medicamento Microvlar, o resultado obtido foi a classificação correta de todas as amostras de Microvlar como pertencendo à sua respectiva classe padrão e a classificação de todas as amostras de Placebo como pertencendo à sua classe padrão. Não ocorreu em nenhum momento, como resultado, a classificação de placebo como pertencendo a classe Microvlar.

Pode-se concluir com isto, que o resultado da classificação de novas amostras obtido foi muito bom. Mesmo com a pequena quantidade de princípio ativo contido no produto, foi possível discriminação entre placebo e medicamento verdadeiro.

Uma das medidas que pode ser avaliada futuramente, a fim de se evitar falsas classificações de placebos em padrões de medicamentos, devido a pequena diferença espectral causada pela pequena quantidade de princípio ativo contido no medicamento, é a extração do princípio ativo do comprimido por solventes adequados e posterior análise do material concentrado.

4.6.3 Classificação do Princípio Ativo Atenolol

O composto denominado Atenolol é utilizado como princípio ativo de diversos medicamentos comerciais, como por exemplo, o medicamento Atenoric 100 mg da indústria Neo Química. Os medicamentos que levam em sua formulação este princípio ativo, são utilizados no controle da pressão arterial.

Um importador de produtos farmacêuticos, comprou de uma indústria indiana, 10 lotes do composto Atenolol, cada um contendo 50 kg do produto. Em uma análise de ponto de fusão, foi constatado que um dos lotes não apresentava o ponto de fusão referente ao composto Atenolol. A pedido deste importador, a Central Analítica da Unicamp efetuou então, uma análise do lote suspeito, a fim de se averiguar se o composto era ou não Atenolol. Utilizando-se diversas técnicas de análise tais como CG-MS, Infravermelho e RMN de próton e ^{13}C , foi constatado que o composto do lote suspeito, realmente não se tratava de Atenolol, mas sim, de Sulfametoxazol.

Este fato poderia ocasionar graves conseqüências, caso não fosse constatado pelo importador que um dos recipientes não continha o composto Atenolol. Como conseqüência disso, medicamentos formulados a base de Atenolol, poderiam ser produzidos com a outra substância. Esta alteração na composição do produto poderia ser considerada como uma adulteração de medicamentos.

Ocorrências como esta podem ser facilmente detectadas, utilizando-se a metodologia desenvolvida na identificação de medicamentos por infravermelho próximo como ferramenta analítica.

O objetivo deste estudo foi de verificar, em um caso real, a possibilidade de distinção de amostras padrão de Atenolol de amostras de Sulfametoxazol, inadvertidamente embaladas como Atenolol.

A partir das amostras padrão de Atenolol e da amostra suspeita, gentilmente cedidas pela Central Analítica, foram obtidos 20 espectros de refletância do lote padrão de Atenolol e 20 espectros do lote suspeito, coletados em um suporte plástico.

Visualmente, é possível a verificação de diferenças espectrais acentuadas entre os dois lotes do medicamento, o padrão e o suspeito (figura 25). Utilizando-se a primeira derivada dos espectros, foi feita uma análise de componentes principais, verificando-se duas classes distintas de amostras. Estas classes referem-se à classe Atenolol e à classe do lote suspeito. Esta distinção de classes pode ser visualizada no gráfico de Scores da figura 26.

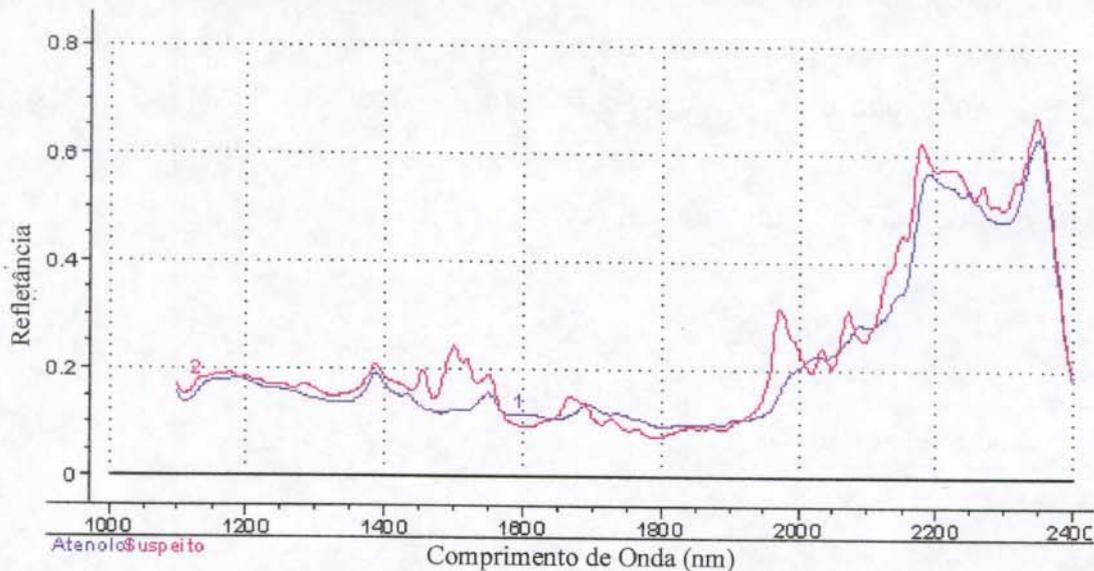


Figura 25. Espectros das amostras de Atenolol (Azul) e de Sulfametoxazol (lote suspeito) (Rosa).

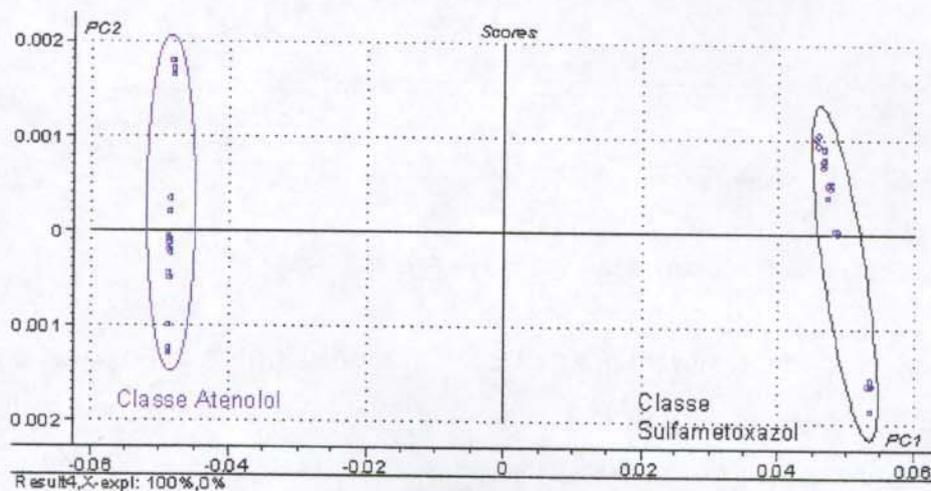


Figura 26. Gráfico de scores da PCA das amostras de Atenolol e de Sulfametoxazol.

Verificada a distinção de classes, foi construído então, um modelo PCA para o conjunto de amostras de Atenolol, que serviram como padrão.

Este modelo foi posteriormente usado na classificação de novas amostras de Atenolol, que não foram incluídas no conjunto de amostras utilizadas para a construção dos modelos PCA e amostras do lote suspeito contendo sulfametoxazol. O modelo PCA para o princípio ativo Atenolol utilizou 2 componentes principais em sua construção.

Como resultado de novas classificações no modelo construído para o Atenolol, foi possível a verificação da classificação correta de amostras de Atenolol, e a classificação como não pertencendo das amostras do lote adulterado, como mostrado no gráfico $S_i/S_o \times H_i$ da figura 27.

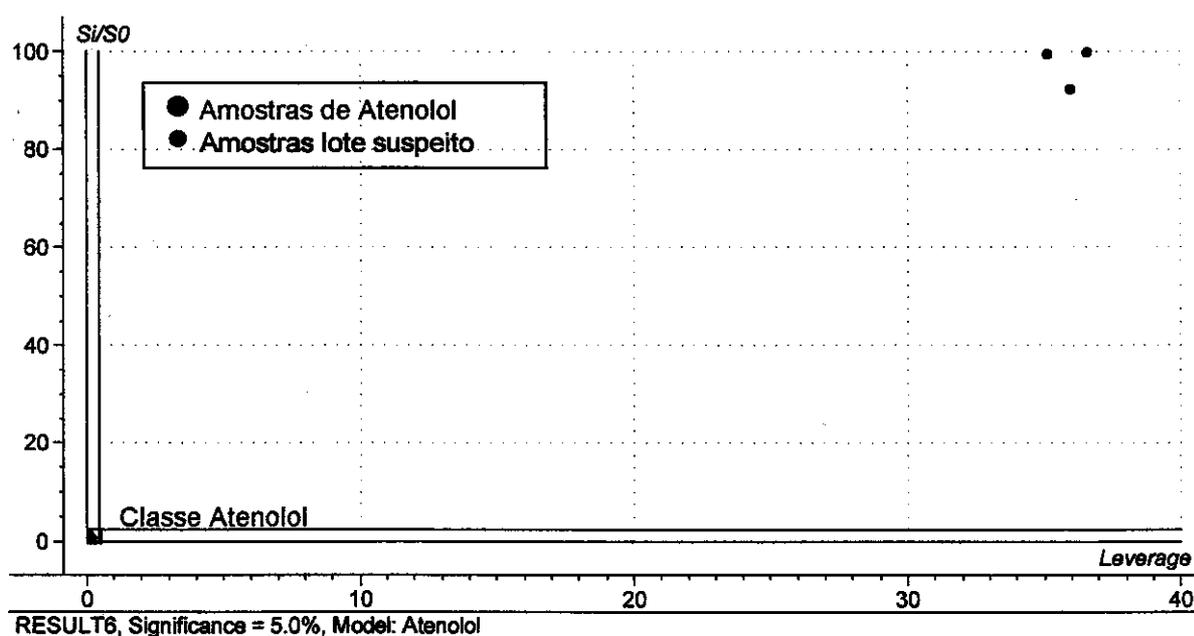


Figura 27. Classificação de novas amostras no modelo Atenolol.

Não é possível se determinar, apenas por infravermelho próximo, qual produto compunha o lote suspeito, mas pela metodologia desenvolvida é possível se determinar se o composto se tratava ou não de Atenolol. Pela classificação destas amostras do lote adulterado no modelo Atenolol padrão, foi verificado não se tratar do composto Atenolol.

4.7 Identificação de Medicamentos Dentro de Embalagens (Blisteres)

O objetivo deste estudo é avaliar, com o auxílio da espectroscopia NIR, a possibilidade de identificação e classificação de medicamentos dentro da própria embalagem (Blister) [23, 24, 25, 26].

Este tipo de procedimento apresenta a vantagem de manter intactas as embalagens em que estão contidos os comprimidos, visando assim sua utilização em inspeções e fiscalizações de medicamentos sem comprometimento do produto. Outra vantagem é a não influência da umidade ambiente sobre o espectro, uma vez que o comprimido mantém a umidade estável dentro da embalagem.

4.7.1 Análise do Medicamento Yomax

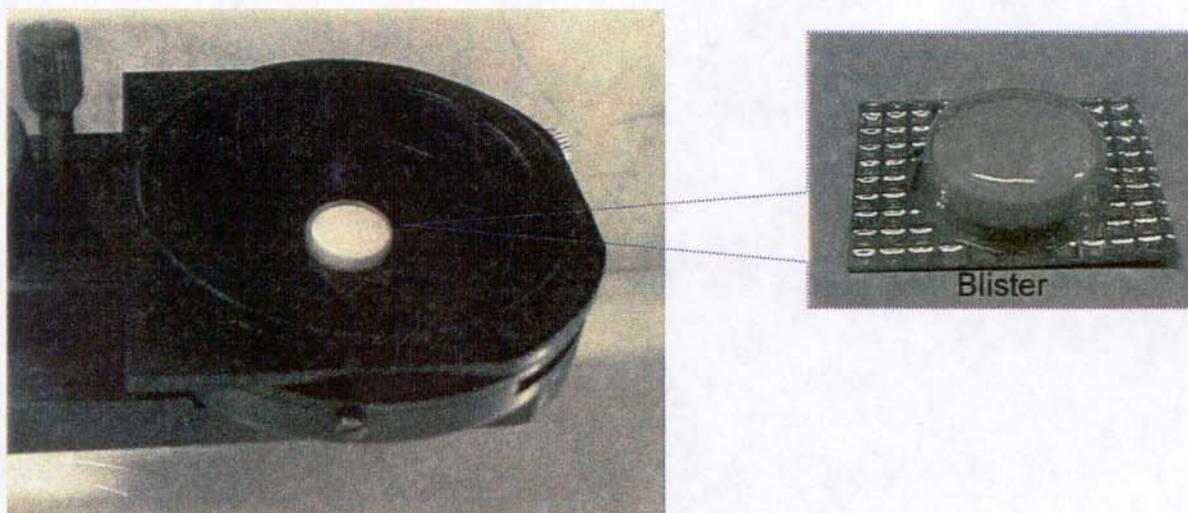


Figura 28. Obtenção dos espectros do medicamento Yomax dentro dos Blisteres.

Neste estudo foi utilizado como medicamento de referência o medicamento Yomax. Este medicamento foi utilizado por possuir outros medicamentos com aparência, formato e blister semelhante.

O fármaco Yomax possui por princípio ativo 5,4 mg de lumbina que atua como vasodilatador do corpo cavernoso do pênis, por seu efeito alfa-antagonista. É utilizado na disfunção sexual masculina de origem psicogênica, vascular e diabética.

Para a construção dos modelo de classe deste medicamento, foram obtidos, sempre mantendo constantes os parâmetros de obtenção, 50 espectros de 14 amostras do medicamento Yomax, todas presentes dentro de seus "blisteres". A fim de se excluir a absorção de luz pela embalagem (Blister) no espectro, esta foi utilizada como referência e seu valor descontado dos espectros do medicamento.

Estes espectros foram obtidos variando-se diversos parâmetros experimentais como faixa de comprimento de onda utilizado e posição da amostra, mantendo-se constante o número de varreduras (300), visando a otimização das medidas até o ajuste dos parâmetros experimentais mais adequados.

Para este medicamento, a faixa espectral de comprimento de onda utilizada foi de 1.100 - 2.220 nm. Para este medicamento, valores acima de 2.220 nm só acrescentam ruídos aos espectros de refletância e foram excluídos.

Na figura 29 (a) e (b) podem ser vistos os espectros do medicamento Yomax obtidos dentro do blister e o espectro do blister. Na figura 30 pode ser visto o espectro do medicamento Yomax obtido dentro do blister utilizando o blister como referência ("background").

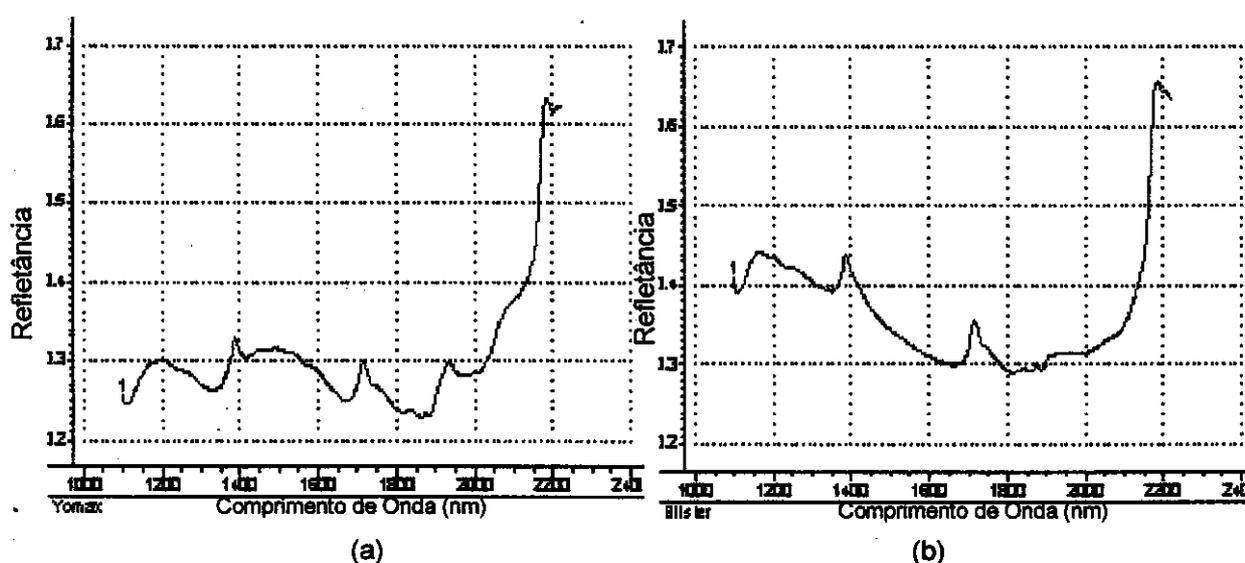


Figura 29. Espectros do medicamento Yomax obtido dentro do blister (a) e somente do blister (b).

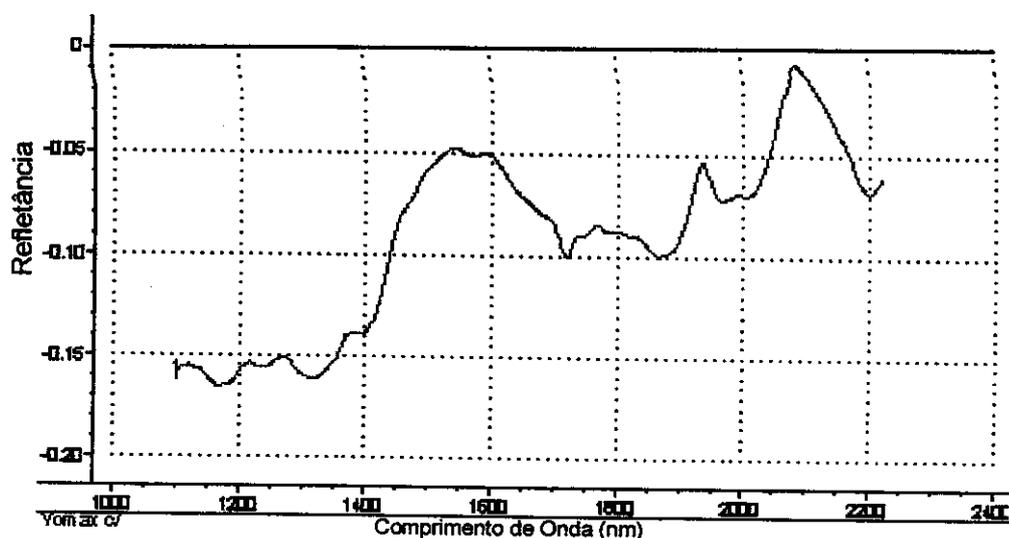


Figura 30. Espectro do medicamento Yomax obtido dentro do Blister utilizando o Blister como referência.

O tratamento dos dados foi feito através de métodos quimiométricos como PCA e classificação via SIMCA. A partir dos espectros do medicamento Yomax padrão obtidos, foi construído um modelo PCA. Este modelo PCA do medicamento utiliza 50 espectros das 14 amostras e é composto por 2 componentes principais e utiliza como técnica de validação, a validação cruzada ("Cross Validation"). Este modelo serviu como padrão do medicamento. Este modelo foi posteriormente usado na classificação de novas amostras de Yomax e amostras de outros medicamentos dentro dos blisters, como o Liberan, Ciflox, e o Calman.

A classificação das amostras do medicamento Yomax como pertencendo ao sua classe padrão, e a classificação como não pertencendo das amostras de outros medicamentos, foi observada em todos os experimentos. As amostras do medicamento Yomax utilizadas na validação da classificação não fizeram parte da construção do modelo.

A seguir segue uma classificação de novas amostras no modelo Yomax padrão (figura 31).

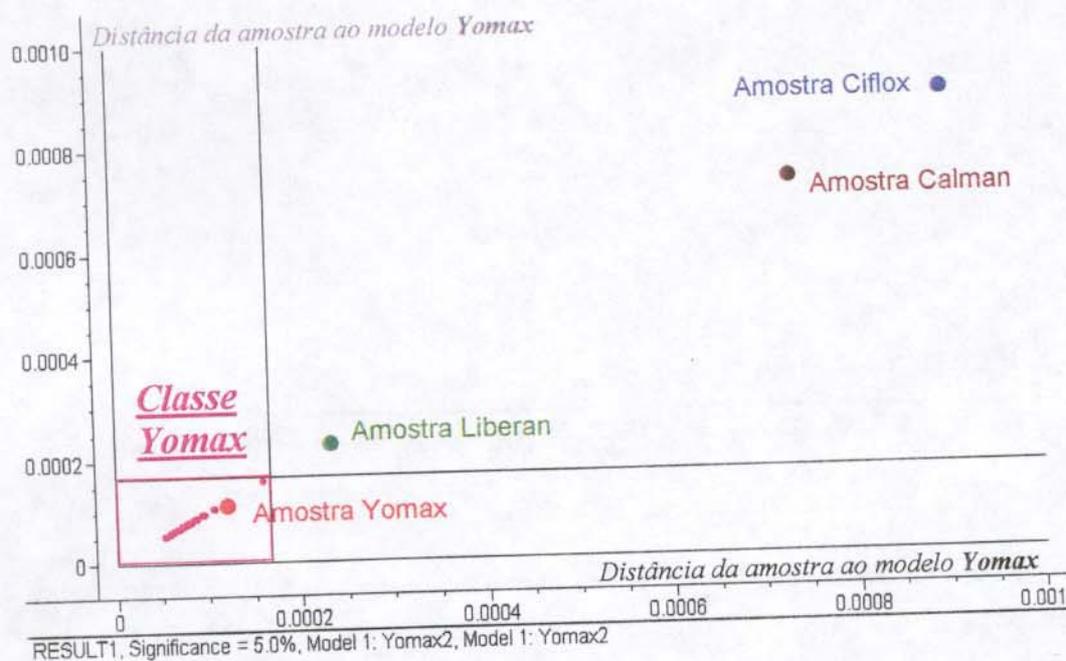


Figura 31. Gráfico de Coomans de Classificação SIMCA para a classe do medicamento Yomax.

Para embalagem de medicamentos, a indústria farmacêutica, geralmente utiliza blisters produzidos a base de PVC [24,25]. Esta embalagem também absorve a radiação na região NIR. Tal fato poderia ocasionar a não classificação de uma amostra de um dado medicamento, na classe padrão de outro medicamento, devido a diferenças espectrais da embalagem e não do medicamento em si. Poderia também ocasionar a classificação na classe padrão do medicamento B, de um medicamento A embalado com o blister do medicamento B.

A figura 32 mostra que os espectros dos blisters do medicamento Yomax e do medicamento Liberan são feitos do mesmo material, e que as diferenças entre medicamentos que fazem com que apenas o medicamento Yomax seja classificado em sua classe padrão, devem-se à composição diferenciada de cada medicamento e não a sua embalagem.

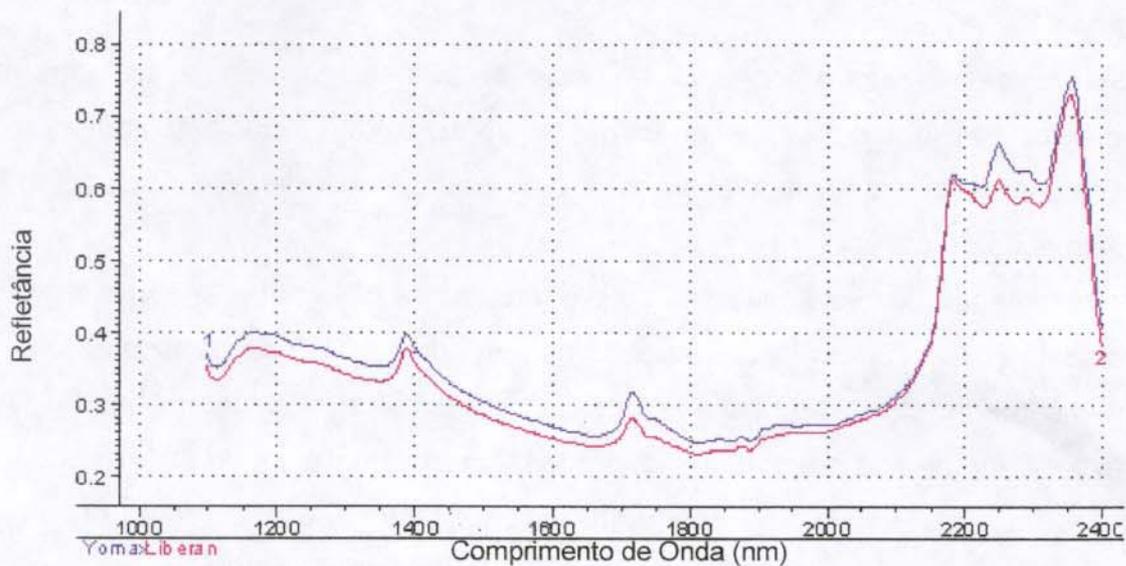


Figura 32. Espectros dos blisters do medicamento Yomax (1) e do medicamento Liberan (2).

Com estes resultados, foi verificado ser possível a obtenção de espectros e classificação e discriminação de amostras, mesmo estando o comprimido dentro de sua embalagem.

A análise do medicamento sem remoção da embalagem, garante a vantagem da não influência da umidade ambiente sobre o espectro, uma vez que o comprimido mantém a umidade estável dentro da embalagem. A embalagem é mantida intacta, podendo a qualidade do medicamento ser verificada em fiscalizações, sem que a embalagem do produto seja rompida, mantendo a integridade do produto e evitando gastos.

4.8 Identificação de Medicamentos Fora do Prazo de Validade

O objetivo deste estudo foi avaliar a possibilidade da diferenciação entre medicamentos vencidos e medicamentos dentro do prazo de validade, ou melhor, de medicamentos que sofreram alterações em suas características químicas e físicas pela ação do tempo.

Os medicamentos, como a maioria dos produtos comerciais possuem uma vida útil, ou seja, um prazo determinado por estudos, em que os fabricantes asseguram que o medicamento apresentará a qualidade e os efeitos terapêuticos desejados. Este prazo é denominado prazo de validade. Mas, nem sempre um produto dentro do prazo de validade encontra-se adequado para o consumo, ou um produto com prazo de validade vencido encontra-se impróprio para o consumo. Isto acontece também com os medicamentos que, por vezes, acabado o prazo de validade, ainda encontram-se próprios para o consumo, e por vezes, ainda com prazo de validade vigente, devido a fatores como a forma de sua armazenagem, encontram-se degradados e impróprios para o consumo. Estes medicamentos que pela ação do tempo sofrem degradações e muitas vezes perdem sua eficácia pela decomposição de seu princípio ativo e excipientes, podem tornar-se produtos nocivos à saúde.

O estudo visa o desenvolvimento de um método de análise por NIR, que permita a identificação de medicamentos que sofreram alterações químicas que o diferem do medicamento padrão em bom estado.

Este estudo é de grande valia na investigação do uso da espectroscopia NIR na identificação de medicamentos falsificados, principalmente porque uma das formas de falsificação de medicamentos é a utilização de medicamentos vencidos reembalados e comercializados com nova data de validade. Este estudo é de grande importância, também, no controle de qualidade de estoques de medicamentos pela possibilidade de identificação de medicamentos com características alteradas pelo tempo e que podem, assim, deixar de causar o efeito terapêutico desejado ou causar mal à saúde de seu usuário.

4.8.1 Análise do Medicamento Litocit

Neste estudo, por suas características apropriadas e por possuir lotes vencidos e não vencidos do medicamento, utilizou-se como referência o medicamento Litocit. Este medicamento apresenta em sua formulação 1080 mg (10 mEq) do princípio ativo Citrato de Potássio por comprimido e é utilizado no tratamento de acidose tubular renal com formação de cálculos por sais de cálcio, hipocitratúria com redução da excreção de oxalato de cálcio e litíase por sais de ácido úrico.

Para a construção dos padrões deste medicamento, foram obtidos e testados, sempre mantendo constantes os parâmetros de obtenção de espectros estudados, vários espectros de amostras de Litocit. Estes espectros também foram obtidos variando-se diversos parâmetros experimentais como faixa de comprimento de onda medido e posição da amostra, mantendo-se constantes umidade ambiente e número de varreduras, visando a otimização das medidas até o ajuste dos parâmetros mais adequados. Para este medicamento, a faixa espectral de comprimento de onda utilizada foi de 1100-2280 nm. Valores de refletância acima de 2280 nm só acrescentam ruídos aos espectros e foram portanto, excluídos.

Como o medicamento não apresentava um formato de comprimido ideal para a análise, todos os comprimidos foram macerados e novamente empastilhados.

Dois lotes deste medicamento estavam com seus prazos de validade vencidos, um a partir de março de 1999 (03/1999) e outro a partir de setembro de 1999 (09/1999). Dois estavam com seus prazos de validade vigentes, um com prazo até agosto de 2000 (08/2000) e outro com prazo até novembro de 2000 (11/2000).

Pela observação dos espectros obtidos, como os da figura 33, não podem ser visualizadas diferenças espectrais acentuadas entre as amostras Litocit de lotes válidos e vencidos. Foi feita, então, uma análise de componentes principais (PCA) com todas as amostras e lotes e verificada a distinção de classes de medicamentos vencidos e válidos, como é mostrado no gráfico de scores do PCA dos lotes com validade até 03/1999 e com validade até 11/2000 da figura 34.

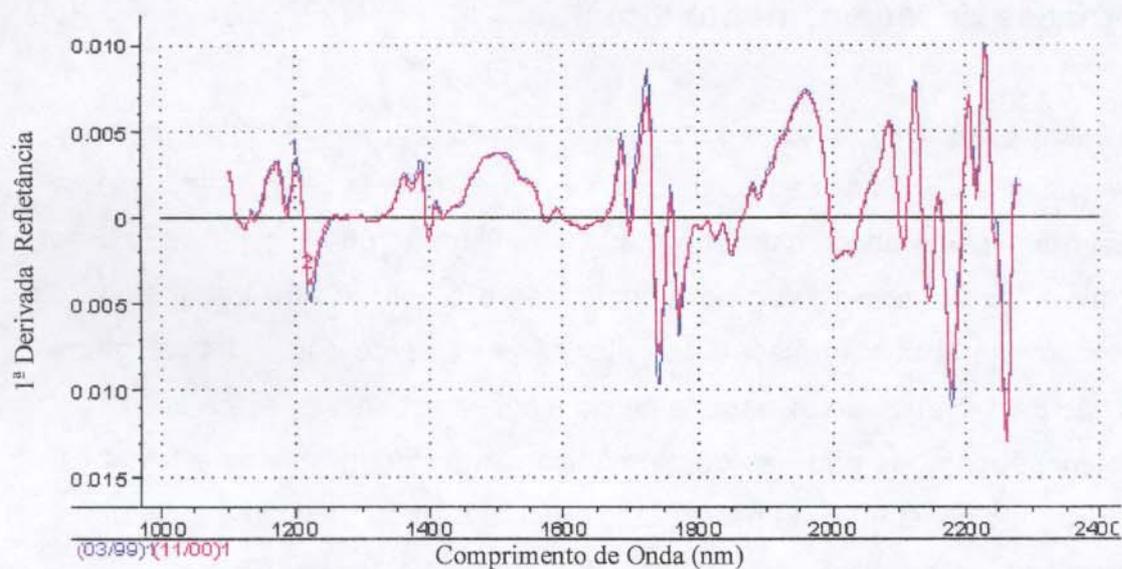


Figura 33. Espectros na forma da 1ª derivada das amostras de Litocit dos lotes 03/1999 (Azul) e 11/2000 (Rosa).

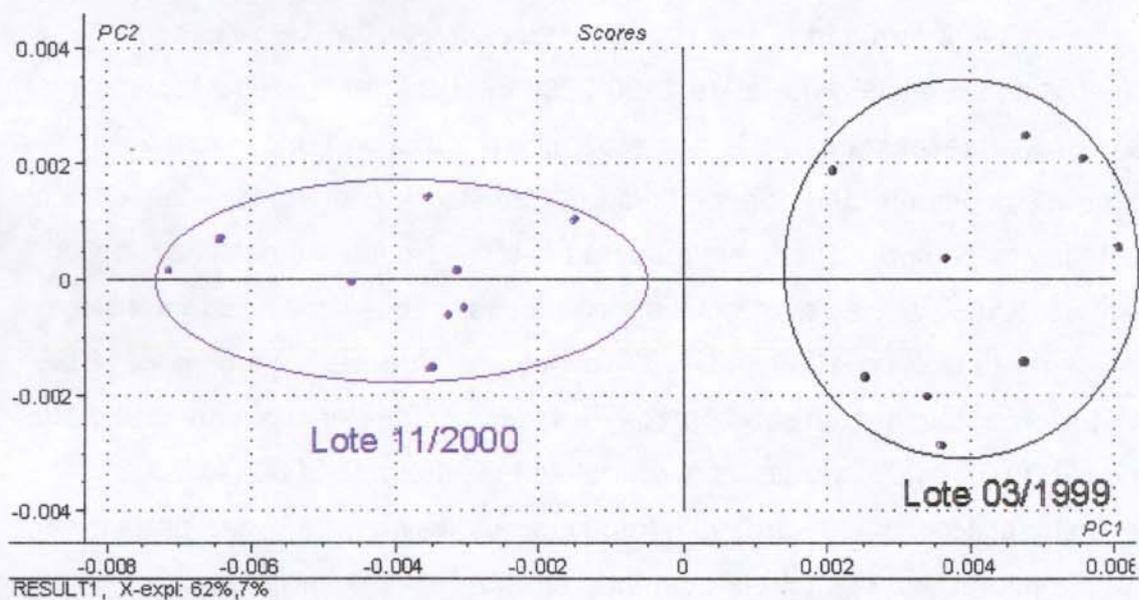


Figura 34. Gráfico de scores da PCA das amostras dos lotes 03/1999 e 11/2000. (Espectros obtidos em 22/02/2000).

Com base no gráfico de scores da figura 34 pode-se ver a grande separação de classes dos medicamentos vencidos e válidos no primeiro componente principal.

Verificada a distinção de classes dos espectros obtidos, construiu-se um modelo PCA com 40 espectros de 19 amostras dos dois lotes do medicamento Litocit com prazo de validade vigente, que serviu como padrão do medicamento. Este modelo utiliza 13 componentes principais para explicar 93% da variância, mas utilizando apenas 4 componentes principais (67 % da variância) é possível obter-se resultados seguros. Esse modelo foi posteriormente usado na classificação de novas amostras de Litocit vencidos e não vencidos via SIMCA.

Nas classificações de novas amostras realizadas, em todas as análises foi possível verificar a classificação correta de 100 % das amostras de medicamentos válidos de lotes com prazo de validade 08/2000 e 11/2000 como pertencente à classe padrão de Litocit válidos, discriminando-os dos medicamentos vencidos do lote 03/99, que em nenhum momento foram classificados como pertencentes à classe padrão de Litocit válidos.

O lote 09/99, apesar de ser um lote do medicamento vencido, apresentou como resultado a não classificação, na classe Litocit válidos, de 80 % das amostras, e a classificação de cerca de 20 % das amostras como pertencentes a classe Litocit válidos.

Uma das hipóteses para este fato, é de que por ter tido seu prazo de validade expirado há muito pouco tempo o medicamento ainda não apresentava uma alteração significativa em sua composição, tanto de princípio ativo quanto de excipientes, que o faria diferir do padrão de medicamentos válidos.

A figura 35 mostra a classificação de algumas amostras no modelo Litocit válido e é um gráfico de classificação S_i/S_o vs Leverage (H_i).

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir ser possível a análise e identificação por infravermelho próximo, de medicamentos com prazos de validade vencidos, ou que tenham alterações químicas de sua composição que os tornem diferentes do medicamento original.

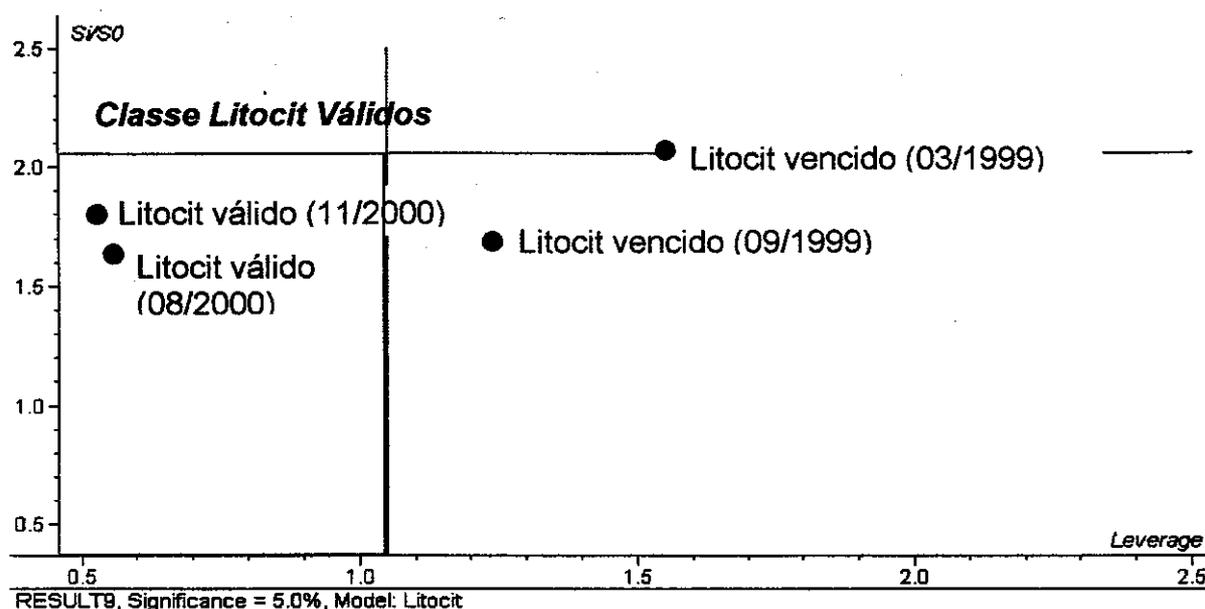


Figura 35. Gráfico de classificação de novas amostras vencidas e não vencidas no modelo Litocit válido.

Como pode ser visto pelos resultados, é perfeitamente possível a identificação e classificação correta de novas amostras de medicamentos com prazo de validade vigente na classe padrão do medicamento válido e a classificação de amostras de medicamentos com prazo de validade vencidos, como não pertencendo ao modelo padrão de medicamentos válidos. Isto mostra ser possível a identificação de medicamentos vencidos (que sofreram alterações em sua composição), ou que sofreram uma grande degradação por má conservação, problemas de produção ou de embalagem.

As medidas foram efetuadas em março de 2000, e em algumas oportunidades, foi verificada a classificação de amostras de medicamentos com data de vencimento 09/1999, como pertencendo a classe de medicamentos válidos. Estas amostras por vencerem pouco tempo antes da realização das medidas, tiveram poucas alterações em sua composição química e ainda mantinham as características do medicamento com validade vigente.

Pode-se concluir também, ser este estudo relevante na investigação do uso da espectroscopia NIR na identificação de medicamentos falsificados, uma vez que a

reutilização de medicamentos vencidos para comercialização com nova data de validade pode-se constituir em uma das formas de falsificações.

4.9 Identificação de Medicamentos Genéricos, Similares e de Referência

A adoção de uma política de medicamentos genéricos, envolvendo a produção, a garantia de qualidade, a prescrição, a dispensação e o uso dos mesmos, é parte fundamental de uma diretriz para promoção do uso racional de medicamentos no Brasil. A promoção do uso racional dos medicamentos é, também, uma das principais diretrizes preconizadas pela Organização Mundial de Saúde – OMS.

Diante do uso irracional de remédios, como os aumentos abusivos de preços e da monopolização no setor das indústrias farmacêuticas, surgiu no Brasil no ano de 1998 a necessidade da implantação de um sistema comumente utilizado em países como Estados Unidos, Inglaterra, Itália, Alemanha e Japão, onde os preços dos remédios são até 60 % mais baratos, que é a autorização da fabricação de medicamentos genéricos.

Medicamento genérico é uma cópia do medicamento de marca e quase sempre custa mais barato que os medicamentos de marca, por ser produzido após expiração patentária.

Entende-se por medicamento genérico, na concepção da OMS "Produto farmacêutico intercambiável", um produto farmacêutico que pretende ser intercambiável com o produto inovador (ou seja, deve apresentar a mesma segurança e eficácia do medicamento de referência), geralmente produzido após expiração da proteção patentária ou outros direitos de exclusividade, e designado pela Denominação Comum Brasileira, ou seja, não apresenta marca. Apresenta apenas em sua embalagem, como nome, o nome do princípio ativo utilizado e a designação de medicamento genérico da lei 9787/99.

O medicamento genérico deve conter o mesmo fármaco, na mesma dose, forma farmacêutica e via de administração do medicamento de referência eleito

pelo ministério da saúde. O medicamento de referência corresponde a um produto comercializado, eleito pelo ministério da saúde, com eficácia, segurança e qualidade comprovada, com o qual os outros produtos pretendem ser intercambiáveis na prática clínica.

O medicamento genérico é intercambiável com o medicamento de referência porque tem qualidade assegurada através de testes *In vitro* e *In vivo* e é considerado seu **equivalente terapêutico**, ou seja, tem a mesma eficácia clínica e o mesmo potencial para gerar efeitos adversos, em relação à referência. A equivalência terapêutica, na maioria das vezes, é assegurada pelos testes de bioequivalência e biodisponibilidade.

Biodisponibilidade é uma propriedade biológica, avaliada após a administração do medicamento no organismo por via extravascular, através da determinação de parâmetros relacionados à absorção do fármaco. Ela se refere à quantidade de fármaco absorvido a partir da forma farmacêutica administrada e à velocidade do processo de absorção.

A Bioequivalência está relacionada a ação terapêutica de uma substância ativa. Partindo do princípio de que a ação terapêutica de uma substância ativa depende da sua disponibilização no local de ação, numa concentração efetiva, durante um período determinado, é previsível que na presença de resultados farmacocinéticos semelhantes, obtenha-se um ação terapêutica equivalente. Sendo assim, dois medicamentos são considerados bioequivalentes quando não forem constatadas diferenças estatisticamente significativas entre a quantidade absorvida e a velocidade da absorção [30].

À investigação da utilização da espectroscopia NIR na identificação de medicamentos falsificados se inclui a possibilidade de se identificar e distinguir medicamentos genéricos de similares e de referência, a fim de se evitar, por exemplo, que medicamentos genéricos, por seu custo menor, sejam reembalados e vendidos como medicamentos de referência. A espectroscopia NIR também pode atuar como ferramenta analítica no controle de qualidade da fabricação de medicamentos genéricos.

4.9.1 Análise dos Medicamentos Contendo como Princípio Ativo Ampicilina 500 mg

Pela nova lei dos medicamentos genéricos (lei 9787/99), o medicamento genérico é uma cópia do medicamento de referência e sua eficácia é comprovada pelos testes de bioequivalência e biodisponibilidade. Para os medicamentos contendo o princípio ativo Ampicilina 500 mg, o medicamento de referência registrado no ministério da saúde é o Binotal 500 mg da Bayer S.A.. Antes da lei dos genéricos, a indústria farmacêutica EMS possuía no mercado brasileiro o medicamento registrado sob a marca de Ampicilina 500 mg, que por não possuir ainda os testes de bioequivalência e biodisponibilidade, era considerado como um medicamento similar. No ano de 1999 a indústria EMS, visando à nova lei dos genéricos, adequou seu processo de produção e lançou no mercado o medicamento sob a marca de Ampicilina 500 mg genérica, que possui comprovada eficácia pelos testes de bioequivalência e biodisponibilidade e é considerado como um medicamento genérico.

No presente trabalho averiguou-se a possibilidade de identificação de diferenças entre medicamentos genéricos, similares e de referência. Para isto, foram utilizados os medicamentos Ampicilina 500 mg (similar) e Ampicilina 500 mg genérica, ambos do fabricante EMS e o medicamento Binotal 500 mg da Bayer (referência). Estes medicamentos apresentam em sua formulação 575 mg do princípio ativo Ampicilina trihidratada, equivalente à 500 mg de Ampicilina anidra (D-(-)- α -aminobenzilpenicilina) por comprimido e são utilizados como antibiótico sistêmico simples. Os medicamentos da indústria EMS apresentam em sua formulação amido, polietilenoglicol, glicolato de amido sódico, estearato de magnésio, celulose microcristalina, talco, corante alumínio laca amarelo tartrazina 5 e corante laca azul 1 como excipientes.

O estudo foi dividido em duas etapas. A primeira etapa consistiu na análise e comparação entre a Ampicilina similar e a Ampicilina genérica, ambas da EMS, e outra etapa de comparação entre o medicamento de referência Binotal e seu genérico, a Ampicilina genérica.

4.9.2 Análise dos Medicamentos Ampicilina 500 mg Genérica e Similar (EMS)

Para a construção dos padrões de espectros deste medicamento, foram obtidos, sempre mantendo constantes os parâmetros de obtenção de espectros estudados, 60 espectros de 6 amostras de Ampicilina similar e 80 espectros de 10 amostras de Ampicilina genérica. Estes espectros também foram obtidos variando-se diversos parâmetros experimentais como faixa de comprimentos de onda utilizado e posição da amostra, mantendo-se constantes umidade ambiente e número de varreduras, visando a otimização das medidas até o ajuste dos parâmetros experimentais mais adequados. Para este medicamento, a faixa espectral de comprimento de onda utilizada foi de 1.100-2.200 nm. Valores acima de 2.200 nm só acrescentam ruídos aos espectros no modo refletância e foram, portanto, excluídos. Pela simples observação visual dos espectros NIR de ambos medicamentos como mostrado na figura 36, é possível a verificação de diferenças sutis. Porém, pela análise de componentes principais, foi verificada a definição de duas classes distintas de amostras, a classe das amostras de Ampicilina genérica e a classe de Ampicilina similar.

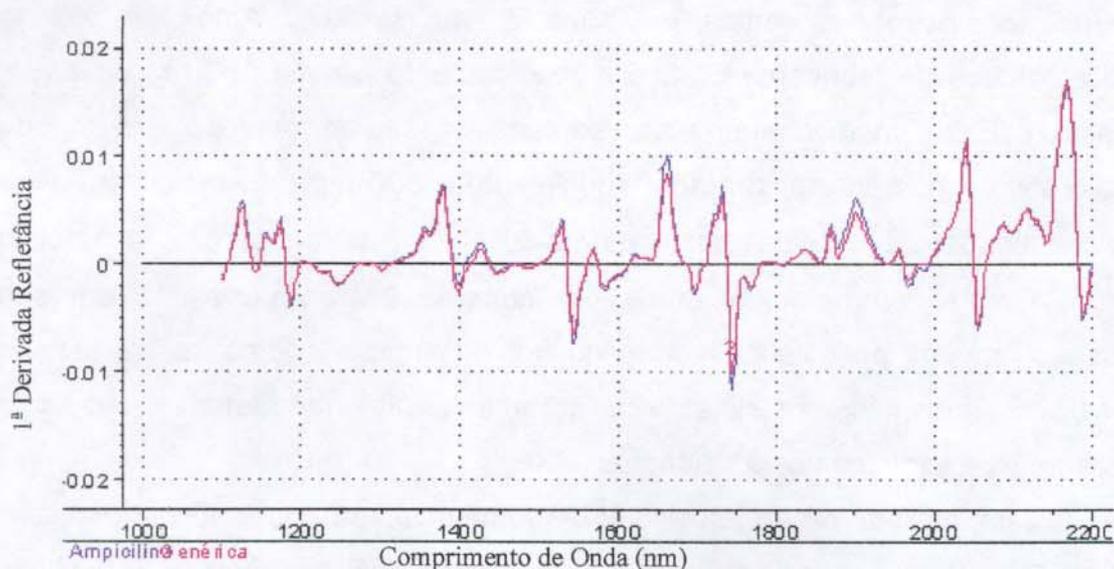


Figura 36. Espectros na forma da 1ª derivada dos medicamentos Ampicilina (Azul) e Ampicilina genérica (Rosa).

Esta discriminação é mostrada no gráfico de scores da Figura 37, onde pode ser visualizada perfeitamente a distinção das duas classes no primeiro componente principal.

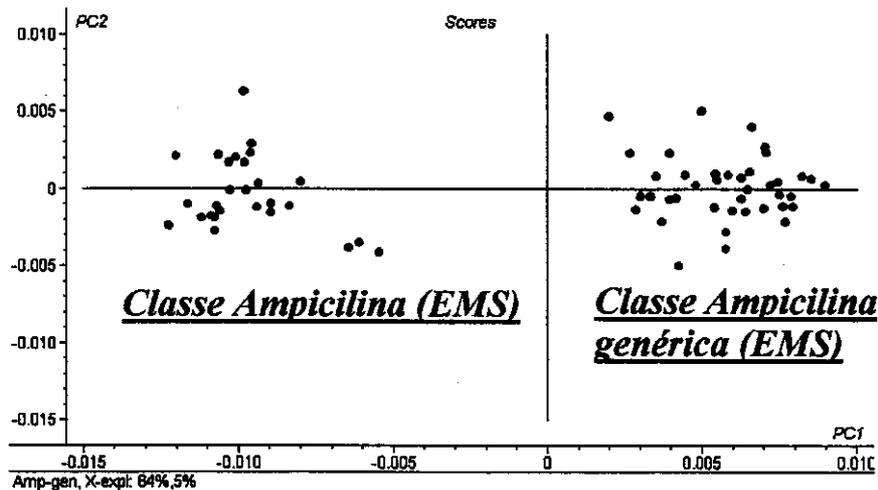


Figura 37. Gráfico de scores da Análise de Componentes Principais dos medicamentos Ampicilina e Ampicilina genérica.

Com base na PCA da Figura 37, pode-se verificar que amostras de comprimido dos medicamentos Ampicilina e Ampicilina genérica, apesar de visualmente semelhantes, possuem características espectrais na região NIR que as diferem. Sendo assim, concluiu-se ser possível a discriminação entre os dois tipos de medicamentos, genérico e similar.

Visando a modelagem de cada classe de medicamento, foi construído um modelo PCA para a Ampicilina genérica e um modelo para a Ampicilina similar. O modelo PCA para a Ampicilina genérica utiliza 6 componentes principais (PC) e o modelo da Ampicilina similar utiliza 7 PCs. De posse dos modelos PCA para cada classe, foram feitas várias classificações, via SIMCA, de novas amostras de Ampicilina e Ampicilina genérica. Pode ser verificado, em 100 % das análises, que as amostras de Ampicilina genérica e similar classificaram apenas em suas respectivas classes de padrões, ou seja, as amostras de Ampicilina genérica classificaram como pertencendo apenas a classe padrão Ampicilina genérica, não classificando como pertencendo a classe padrão Ampicilina similar, ocorrendo o mesmo com Ampicilina similar.

Uma classificação de novas amostras pode ser visualizada no gráfico de S_i/S_o vs Leverage (H_i) da figura 38.

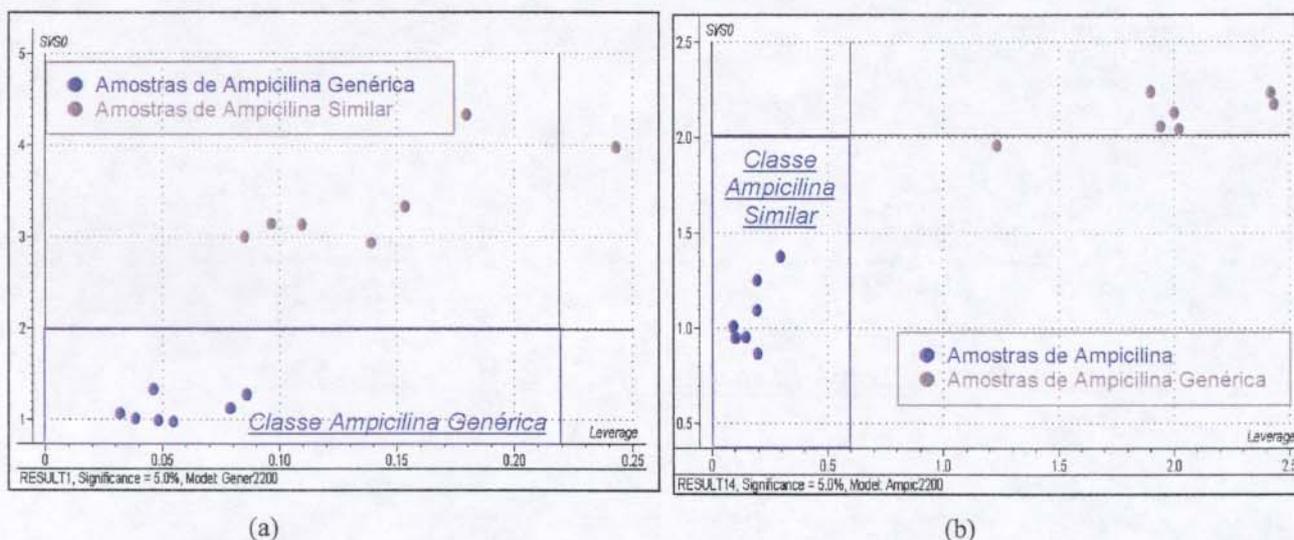


Figura 38. Gráfico de S_i/S_o vs Leverage de classificação SIMCA dos medicamentos Ampicilina genérica (a) e Ampicilina similar (b).

Na figura 38 (a), pode ser observada a classificação, como pertencendo à classe padrão de Ampicilina genérica, de amostras de Ampicilina genérica apenas, não ocorrendo a classificação de amostras de Ampicilina similar nesta classe. Já na figura 38 (b), ocorre apenas a classificação de amostras de Ampicilina similar, como pertencendo à classe padrão de Ampicilina similar, não ocorrendo a classificação de amostras de Ampicilina genérica como pertencendo à classe padrão Ampicilina similar.

A classificação das amostras dos medicamento genéricos e similares em apenas suas respectivas classes padrão permite sugerir que estes medicamentos, apesar de possuírem o mesmo teor de princípio ativo, apresentam diferenças em sua composição. Em uma análise por HPLC, observou-se que a diferença no teor de princípio ativo entre ambos era mínima (da ordem de 8 mg em média). Assim, a melhor hipótese para explicar as diferenças espectrais observadas, devem-se à uma mudança no teor, granulometria ou composição dos excipientes, talvez advinda da necessidade do fabricante de se adequar a nova legislação de genéricos vigente, no que se refere aos testes de Bioequivalência e Biodisponibilidade.

Deve-se também sugerir que o número excessivo de componentes principais para os medicamentos da indústria EMS tenha sido a não homogeneidade do comprimido, principalmente em sua superfície.

A utilização da espectroscopia NIR apresenta a vantagem da identificação de medicamentos e de sua utilização como ferramenta de análise e controle de qualidade de medicamentos genéricos, visando adequar o produto à nova lei dos genéricos.

Com relação aos dois medicamentos da indústria EMS, os dois apresentam praticamente a mesma quantidade de princípio ativo, o que nos remete a hipótese de que as diferenças espectrais observadas se devem a uma mudança no teor dos excipientes, talvez por necessidade do fabricante de se adequar a nova legislação de genéricos vigente, no que se refere aos testes de Bioequivalência e Biodisponibilidade.

4.9.3 Análise dos Medicamentos Ampicilina 500 mg Genérica e de Referência Binotal 500 mg

Para a construção dos padrões de espectros deste medicamento, foram obtidos e testados, sempre mantendo os parâmetros de obtenção de espectros estudados, 50 espectros de 17 amostras de Binotal 500 mg e 50 espectros de 8 amostras de Ampicilina genérica, na faixa espectral de 1100 à 2200 nm.

Como o medicamento Binotal não apresentava um formato de comprimido ideal para a análise, todos os comprimidos dos dois medicamentos foram macerados e novamente empastilhados.

Pela simples observação do espectro NIR de ambos medicamentos da figura 39, é possível a verificação de diferenças espectrais acentuadas. Através de uma análise de componentes principais, foi verificado duas classes distintas de amostras, a classe das amostras de Ampicilina genérica e a classe Binotal. A separação das classes se dá já no primeiro componente principal.

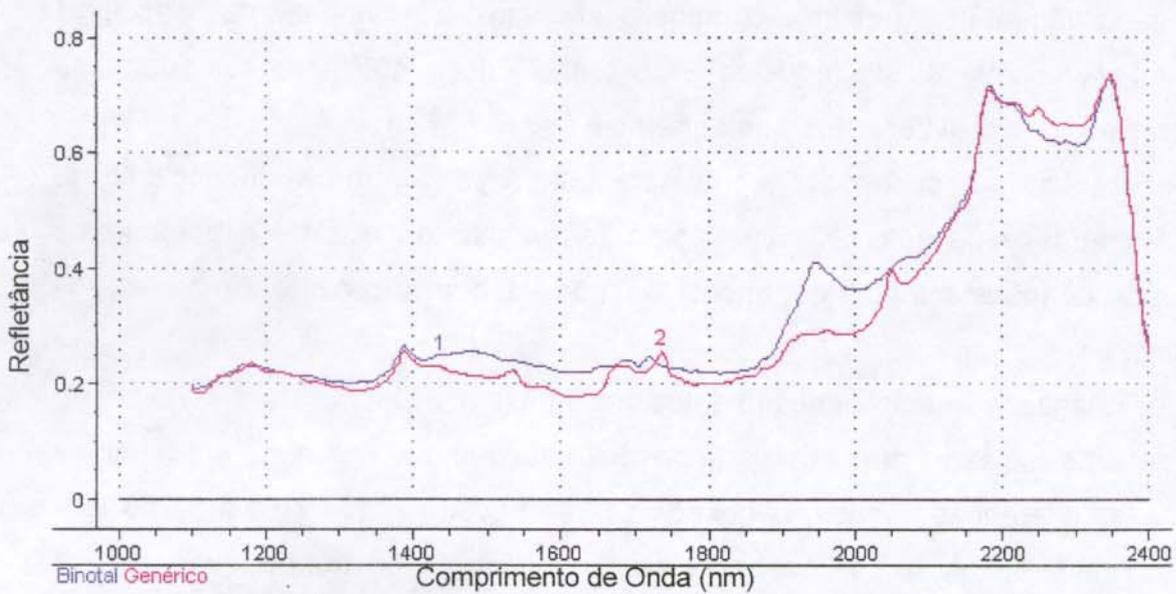


Figura 39. Espectros de refletância dos medicamentos Binotal (Azul) e Ampicilina genérica (Rosa).

Com base nos resultados da PCA da figura 40, pode-se verificar que os medicamentos Binotal e Ampicilina genérica possuem características espectrais por NIR que os diferem. Sendo assim, torna-se possível a discriminação entre os dois tipos de medicamentos, mesmo apresentando o mesmo princípio ativo nas mesmas quantidades.

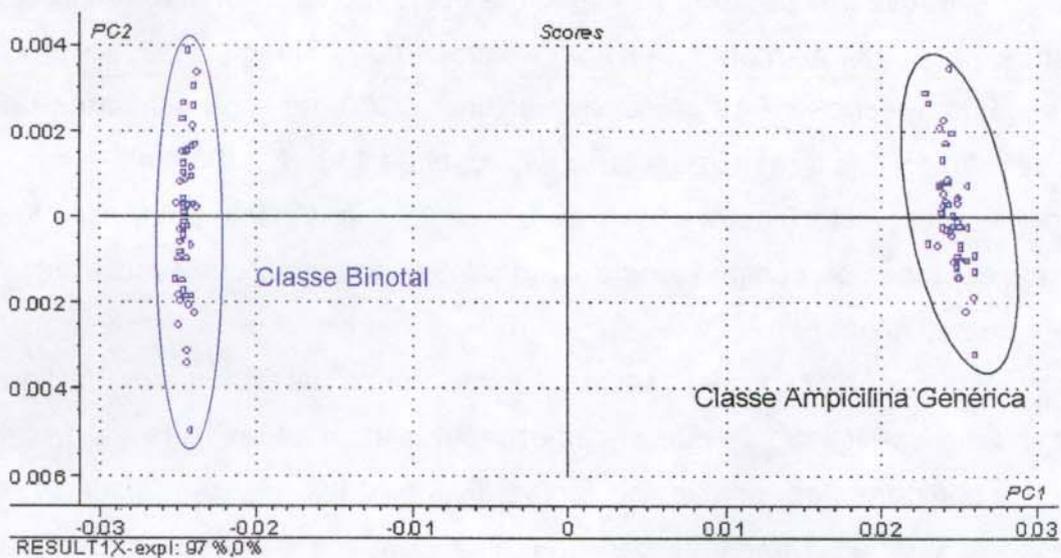


Figura 40. Gráfico de scores do PCA dos medicamentos Ampicilina genérica e Binotal.

Visando a modelagem de cada classe de medicamento, foi construído um modelo PCA para a Ampicilina Genérica e um modelo para Binotal. O modelo PCA para a Ampicilina Genérica utiliza 8 PCs e o modelo do Binotal utiliza 6 PCs. De posse dos modelos PCA para cada classe, foram feitas várias classificações, via SIMCA, de novas amostras de Binotal 500 mg e Ampicilina genérica. Pode ser verificada em 100 % das análises, que as amostras de Ampicilina genérica e Binotal 500 mg classificaram apenas em suas respectivas classes de padrões, ou seja, as amostras de Ampicilina genérica classificaram como pertencendo apenas a classe padrão Ampicilina genérica, não classificando como pertencendo a classe padrão Binotal, ocorrendo o mesmo com o Binotal.

Uma classificação de 10 novas amostras pode ser visualizada no gráfico de Coomans (S_i vs S_i) da figura 41.

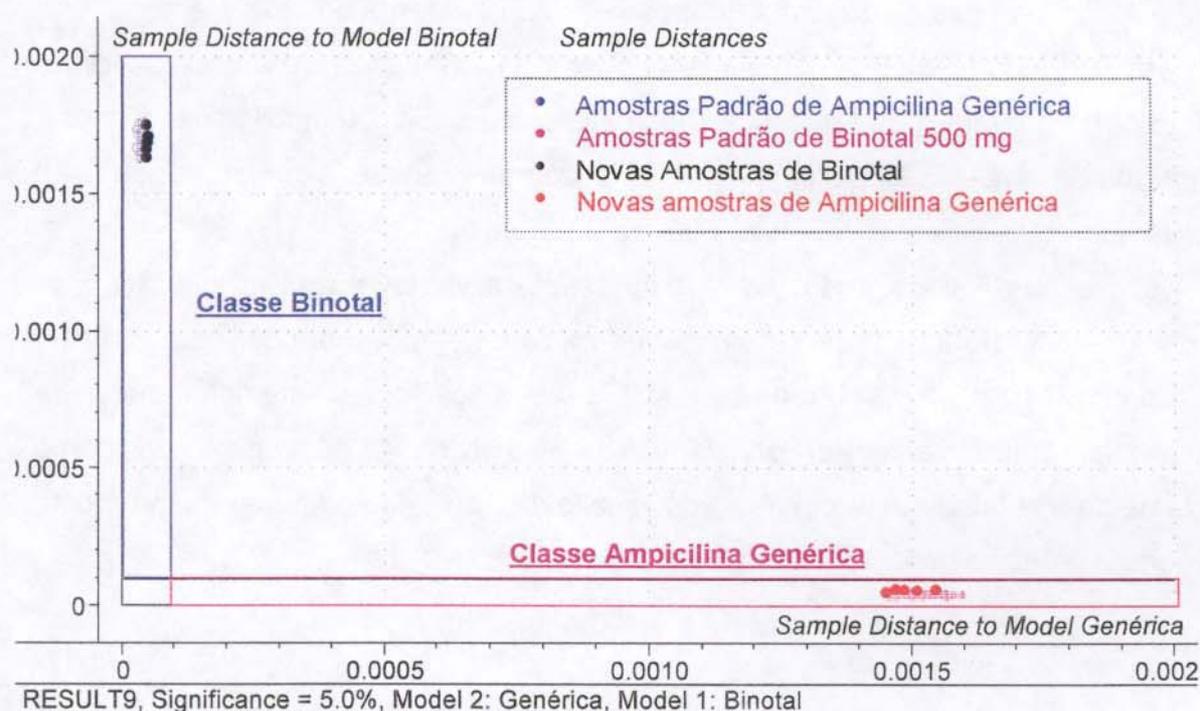


Figura 41. Gráfico de Coomans de classificação SIMCA dos medicamentos Ampicilina genérica e Binotal.

Na figura 41 pode ser observada a classificação correta de amostras de Ampicilina genérica na classe padrão de Ampicilina genérica e a classificação de

amostras de Binotal na classe padrão de Binotal, não ocorrendo a classificação de amostras de um medicamento em outra classe.

A classificação das amostras dos medicamentos genéricos e de referência em apenas suas respectivas classes padrões, remete ao fato de que estes medicamentos apesar de possuírem o mesmo teor de princípio ativo, apresentam diferenças em sua composição. Este fato, por sua vez, remete a hipótese de que as diferenças espectrais observadas se devem aos excipientes que compõe o medicamento. Não ocorreu também em nenhuma oportunidade, a classificação da Ampicilina similar nas classes Ampicilina Genérica ou do medicamento de referência Binotal.

Uma hipótese formulada para as diferenças espectrais observadas entre os medicamentos Ampicilina Genérica e o medicamento de referência Binotal, é de que estas diferenças se devem a uma composição diferente dos excipientes.

Este fato mostra que o medicamento Ampicilina Genérica do fabricante EMS, apesar de aprovado nos testes de Bioequivalência e Biodisponibilidade, e de ter comprovada sua eficácia, não possui uma composição de excipientes igual ao medicamento de referência Binotal 500 mg da Bayer.

A utilização da espectroscopia NIR apresenta a vantagem da identificação de medicamentos, no intuito de se evitar que medicamentos genéricos, em vista de seu preço menor, sejam reembalados e vendidos como medicamentos de referência. Outra vantagem da espectroscopia NIR, é sua utilização como ferramenta de análise e controle de qualidade de medicamentos Genéricos, visando adequar o produto à nova lei dos genéricos.

4.10 Identificação de Medicamentos Apresentados em Diferentes Concentrações

O objetivo deste estudo foi avaliar, com o auxílio da espectroscopia NIR, a possibilidade de identificação e classificação de medicamentos apresentados em

diferentes concentrações. Este tipo de análise apresenta a vantagem de identificar o medicamento por sua dosagem do teor de princípio ativo contido nos comprimidos, visando assim sua utilização em inspeções e fiscalizações de medicamentos.

4.10.1 Análise do Medicamento Pressotec 5, 10, 20 mg

Neste estudo, utilizou-se os medicamentos Pressotec 5, 10 e 20 mg como referência. Este medicamento apresenta em sua formulação 5, 10 ou 20 mg por comprimido do princípio ativo Maleato de Enalapril e é utilizado no tratamento de hipertensão essencial em todos os graus. Os comprimidos de Pressotec possuem basicamente a mesma massa de 326 mg, em média. Para esta massa de comprimido, o medicamento com 5 mg em sua formulação apresenta um teor de princípio ativo Maleato de Enalapril de 1,5% em massa (m/m). Para o medicamento apresentando em sua formulação 10 mg, o teor de princípio ativo é de 3,1% m/m e para o medicamento apresentando em sua formulação 20 mg, o teor de princípio ativo é de 6,1% m/m.

Para a construção dos padrões deste medicamento, foram obtidos e testados, mantendo-se os parâmetros de obtenção, 50 espectros de 10 amostras de cada um dos medicamentos Pressotec 5 mg, 10 mg e 20 mg, totalizando 150 espectros.

Todos os conjuntos de espectros foram obtidos nas duas faces do comprimido, utilizando o suporte amostrador como referência ("background"), na faixa espectral de 1100 à 2400 nm. Porém, os espectros apresentavam ruídos nas extremidades da faixa espectral. Deste forma, utilizou-se apenas a faixa de trabalho de 1160 à 2100 nm.

Pela observação dos espectros na forma de 1ª derivada (figura 42), quase não podem ser visualizadas diferenças espectrais entre as amostras de Pressotec. Então, foi feita uma análise de componentes principais com todas as amostras e verificado a distinção da classe do medicamento 20 mg das demais classes. Não houve, no entanto, separação clara das classes do medicamento de 5 e 10 mg,

como é mostrado no gráfico de *scores* do PCA da figura 43. Este modelo exigiu 4 componentes principais.

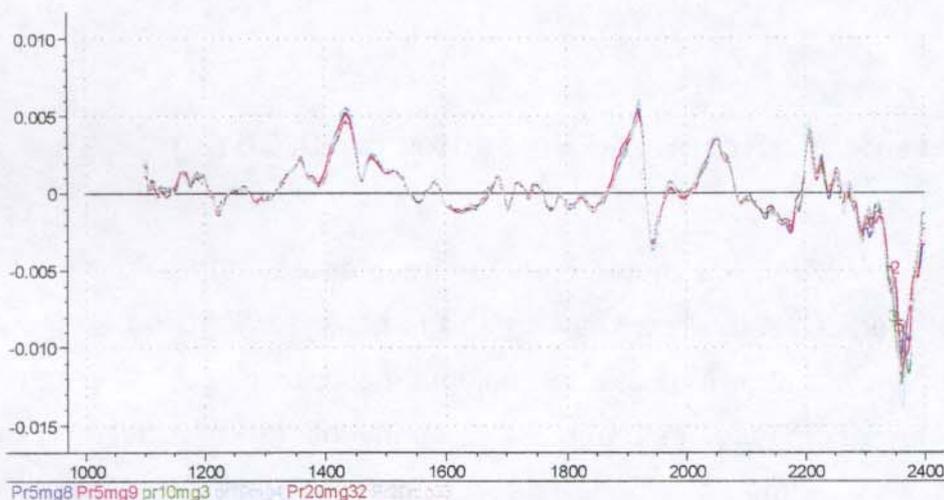


Figura 42. Espectros na forma de 1ª derivada do medicamento Pressotec 5 mg (Rosa), 10 mg (Azul) e 20 mg (Verde).

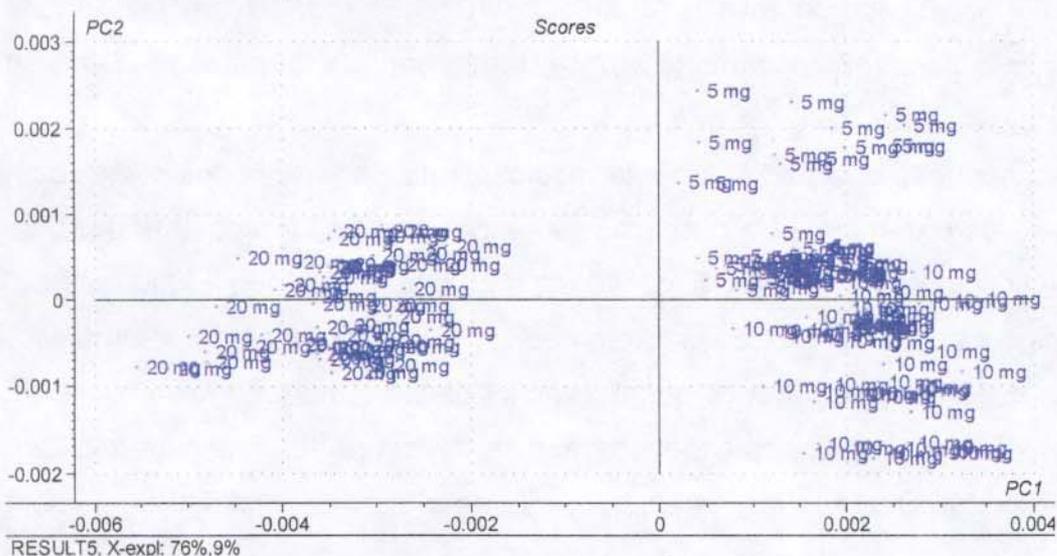


Figura 43. Gráfico de *scores* do PCA do medicamento Pressotec 5, 10 e 20 mg.

Um dos problemas enfrentados durante a análise do medicamento Pressotec, foi do modelo ter sido feito com amostras reais de medicamentos, sujeitas a até $\pm 10\%$ de variação na concentração do princípio ativo e devido a semelhanças espectrais causadas pela pequena quantidade de princípio ativo das três

formulações, o que dificulta a discriminação entre modelos construídos através de PCA.

Foi construído um modelo PCA para cada um dos 3 grupos de amostras para verificar a classificação de novas amostras que não fizeram parte do conjunto de calibração. Cada modelo utiliza 3 componentes principais para descrevê-lo. Posterior a construção dos modelos, foram feitas classificações de novas amostras de Pressotec em cada modelo e verificado a classificação correta, em todas as análises de amostras de Pressotec 20 mg em sua respectiva classe padrão. Os medicamentos Pressotec 10 mg e Pressotec 5 mg, por possuírem uma pequena quantidade de princípio ativo, possuem características espectrais semelhantes, não ocasionando uma boa separação de classes na análise de componentes principais, como mostrado na figura 43. Isto causa uma sobreposição das classes devido a pequena distância entre os modelos, tornando a classificação de novas amostras prejudicada. Novas amostras de Pressotec 5 e 10 mg foram classificadas como pertencendo a ambas as classes, sendo assim, não foi possível por este método, a distinção de novas amostras destes dois tipos de medicamentos. Uma classificação de 9 novas amostras que não fizeram parte do conjunto de calibração é mostrada na tabela de classificação 4. O asterisco indica que a amostra foi classificada como pertencendo ao respectivo modelo. O gráfico de S_i / S_o x Leverage das figuras 44 e 45 também mostra esta classificação.

Tabela 4. Classificação de novas amostras de Pressotec 5, 10 e 20 mg nos modelos Pressotec 5, 10 e 20 mg. O asterisco em vermelho indica as classificações errôneas.

Pressotec	Modelo Pressotec 5 mg	Modelo Pressotec 10 mg	Modelo Pressotec 20 mg
5 mg 1	*	*	
5 mg 2	*	*	
5 mg 3	*	*	
10 mg 1	*	*	
10 mg 2	*	*	
10 mg 3	*	*	
20 mg 1			*
20 mg 2			*
20 mg 3			*

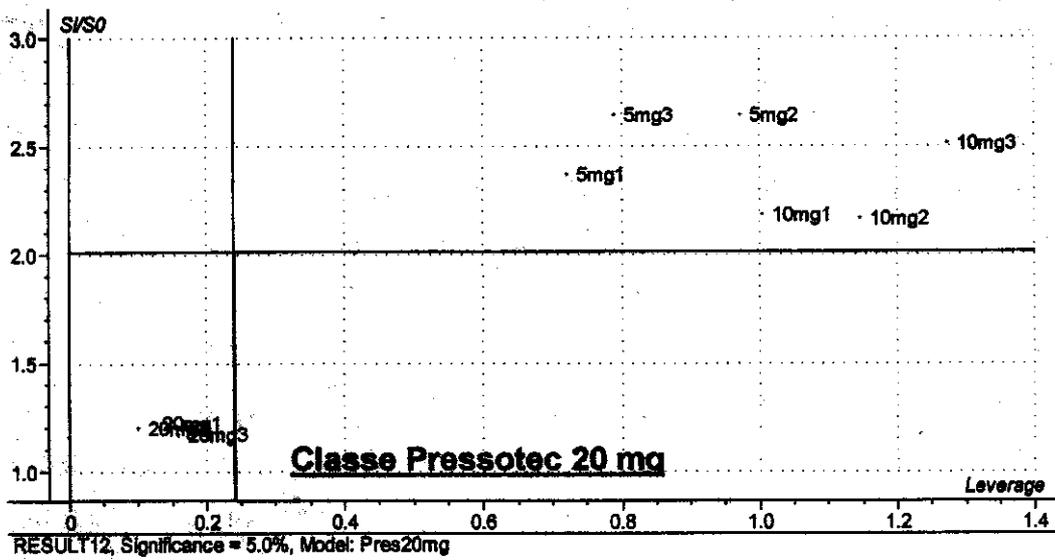


Figura 44. Classificação de novas amostras de Pressotec 5, 10 e 20 mg no modelo Pressotec 20 mg.

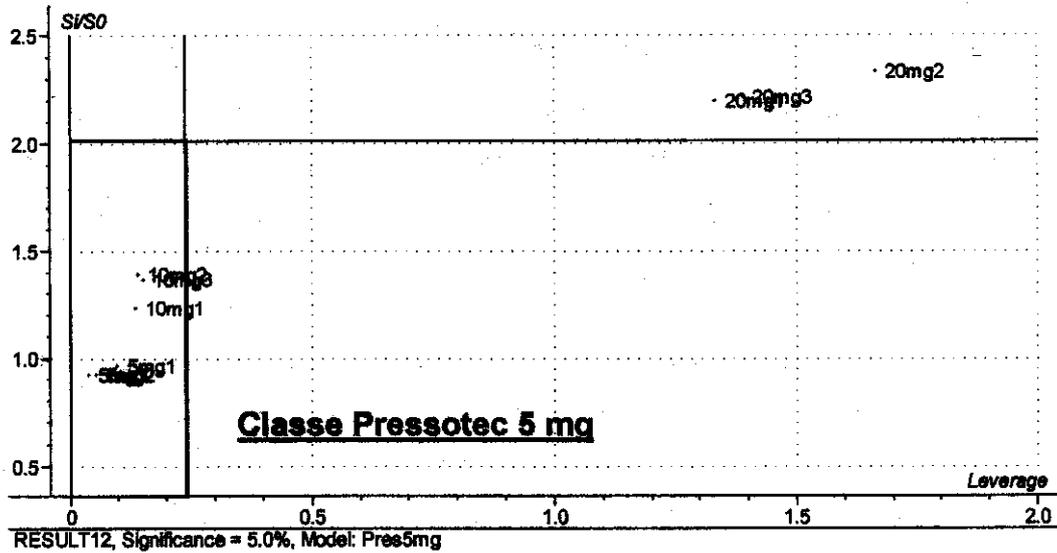


Figura 45. Classificação de novas amostras de Pressotec 5, 10 e 20 mg no modelo Pressotec 5 mg.

4.10.2 Análise do Medicamento Pressotec 5, 10, 20 mg Utilizando Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Através da Espectroscopia NIR é possível fazer uma análise quantitativa do teor de princípio ativo de um medicamento [10,22].

Obtém-se o espectro de um determinado número de amostras para a construção do modelo do medicamento. Atribui-se ao espectro referente ao comprimido, o valor obtido na quantificação do medicamento por um método padrão de quantificação de medicamentos como HPLC ou pelo método da farmacopéia. Através de uma regressão por mínimos Quadrados Parciais (PLS) é possível construir uma curva de calibração e posterior quantificação de novas amostras. O método PLS1 é o mais recomendado para ser utilizado na calibração multivariada e a validação cruzada ("Cross Validation") como método de validação.

A quantificação de princípios ativos de novas amostras por PLS é baseada em uma equação que relaciona os valores das intensidades luminosas (refletância, absorvância) do espectro NIR a cada comprimento de onda com valores de concentração ou uma propriedade. Na calibração, coeficientes ponderam a influência de cada uma das variáveis na relação com um valor de concentração. Esta equação, que atribui um coeficiente ou peso ao valor de intensidade luminosa de cada comprimento de onda e relaciona à um valor de concentração, é utilizada na previsão de novas amostras. Os coeficientes definidos na equação de calibração para cada variável, são utilizados pela nova amostra, que a partir desta equação, retorna o valor de concentração ou da propriedade da nova amostra.

Visto não ser possível a discriminação por PCA dos medicamentos Pressotec 5 e 10 mg, foi utilizado, na tentativa de discriminação do medicamento por seu teor de princípio ativo, a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Na regressão por mínimos quadrados parciais, uma calibração é construída com espectros das amostras nas 3 concentrações e a previsão de novas amostras fornece como resultado, o valor de concentração estimado. Utilizando-se o PLS, os valores da matriz de dados são relacionados com o vetor de concentração. Isto faz com que na construção das componentes principais, os valores dos scores das

amostras sejam ajustados conforme o valor da concentração. Este ajuste da posição da amostra conforme seu valor de concentração relacionado, fornece uma melhor separação das classes, como é mostrado na figura 46. A identificação da nova amostra pode então ser feita por comparação do valor do teor previsto pelo modelo PLS com o valor nominal. Neste caso, novas amostras serão consideradas como pertencendo a uma das classes, quanto maior sua aproximação do valor nominal estipulado.

Para a construção do modelo quantitativo PLS, foram atribuídos aos espectros, os valores nominais 5, 10 e 20 mg de teor de princípio ativo do medicamento Pressotec. Os espectros utilizados foram os mesmos utilizados no PCA.

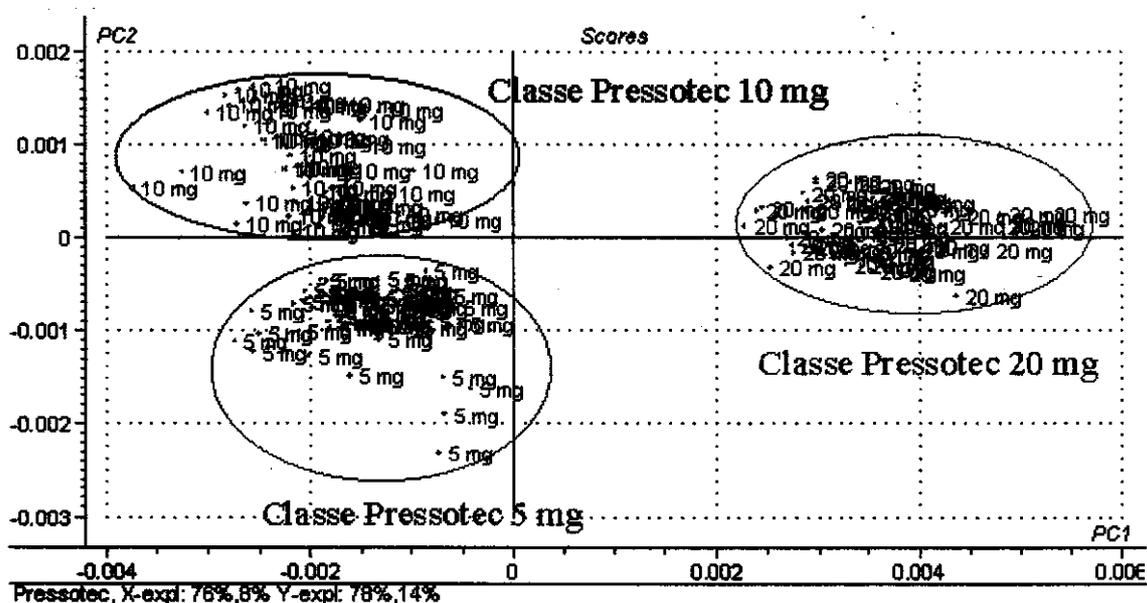


Figura 46. Gráfico de Scores do modelo PLS do Medicamento Pressotec 5, 10 e 20 mg.

O modelo PLS utilizou 4 componentes principais na sua construção. O número de componentes principais foi escolhido, com base na variância explicada para as matrizes de dados e de concentração e com menores erros de calibração (RMSEC) e previsão (RMSEP).

Os valores dos erros de calibração e previsão foram: RMSEC = 0,727 e RMSEP = 0,809. mg. Os resultados de previsão, para amostras do padrão, mostram as faixas de valores quantitativos aceitáveis para cada concentração. Para o medicamento Pressotec 5 mg esta faixa vai de 3,5 mg à 7 mg. Para o medicamento Pressotec 10 mg esta faixa vai de 8 mg à 12 mg e para o medicamento Pressotec 20 mg esta faixa vai de 18 mg à 21 mg.

A previsão para novas amostras resultou em valores de teor de princípio ativo previstos por NIR bem próximos dos valores nominais estipulados. Com isto, pode ser efetuada a identificação do medicamento em cada um das formulações a partir da comparação do valor previsto com o valor nominal.

Previsões de 9 amostras contidas na tabela 5, exibem valores de teor de princípio ativo previstos por NIR bem próximos dos valores nominais estipulados.

Tabela 5. Previsão de novas amostras de Pressotec 5, 10 e 20 mg por PLS

Amostra	Previsto NIR (mg)	Valor nominal (mg)
5mg 1	5.6	5.0
5mg 2	3.9	5.0
5mg 3	4.3	5.0
Média 5 mg	4.6	5.0
10mg 1	9.0	10.0
10mg 2	9.5	10.0
10mg 3	8.3	10.0
Média 10 mg	8.9	10.0
20mg 1	18.9	20.0
20mg 2	19.9	20.0
20mg 3	19.4	20.0
Média 20 mg	19.4	20.0

Pode-se observar deste estudo, que a distinção por PCA de medicamentos que apresentam diferentes concentrações de princípios ativos pode ser dificultada. No caso dos medicamentos como Pressotec 10 mg e Pressotec 5 mg, a dificuldade advém do pequeno teor de princípio ativo, proporcionando características

espectrais muito semelhantes à ambos, não permitindo uma boa separação de classes com o uso da análise de componentes principais. Esta semelhança espectral, causa uma sobreposição das classes devido a pequena distância entre os modelos PCA. Sendo assim, não foi possível por este método, a distinção de novas amostras destes medicamentos. A solução encontrada para a identificação de medicamentos apresentados em diferentes concentrações, foi a utilização da regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) para efetuar a discriminação a partir de resultados quantitativos. Os resultados obtidos por PLS se mostraram muito bons e permitem a distinção da formulação do medicamento pela previsão do seu teor de princípio ativo.

4.11 Identificação de Medicamentos nas Diversas Formas de Apresentação

O objetivo deste estudo foi avaliar a possibilidade da identificação, através da técnica NIR, de medicamentos nas mais diversas formas de apresentação, como pomadas, líquidos ou xaropes e cápsulas.

Muitos medicamentos, são apresentados nas formas descritas acima e muitas vezes eles apresentam diferentes formulações e teores de princípio ativo quando apresentados de outra forma, além daquela de comprimidos.

Na análise dos medicamentos na forma de pomadas e cápsulas, os espectros foram obtidos no modo refletância no espectrofotômetro Free Space Luminar 2030, que atua na faixa espectral de 1100 à 2400 nm. Na análise dos medicamentos na forma de líquidos, os espectros foram obtidos no modo absorvância por intermédio de uma sonda para líquidos, no espectrofotômetro Luminar 2000, que atua na faixa espectral de 850 à 1800 nm.

Este estudo é de grande valia na investigação do uso da espectroscopia NIR na identificação de medicamentos falsificados, principalmente por que, algumas das principais formas de falsificação de medicamentos devem-se a formulação de cápsulas, em farmácias de manipulação, que não contém o princípio ativo ou nas

quais este está presente em teores abaixo do necessário. Outro tipo de falsificação já identificada, é a falsificação de cremes utilizados como anti-rugas e estrias.

Devido a esta diversificação da falsificação de medicamentos, o estudo da identificação por NIR de medicamentos apresentados nas mais diversas formas é de fundamental importância.

4.11.1 Identificação de Medicamentos na Forma de Pomadas

Neste estudo, por suas características apropriadas foram utilizados como medicamentos de referência, os medicamentos na forma de pomadas Takil, Sunil e Plastenan. O medicamento Takil apresenta em sua formulação 700 mg do princípio ativo Tioconazol e 1050 mg de Tinidazol e é utilizado no tratamento de Tricomoníases e Candidíases vaginais, isoladas ou associadas a Vulvovaginites Bacterianas. Isto representa um teor de 2% de Tioconazol e 3% de Tinidazol em bisnagas contendo 35 g.

O medicamento Sunil apresenta em sua formulação 35 mg do princípio ativo Cloranfenicol e 350 mg de Sulfacetamida sódica e é utilizado como pomada oftálmica em infecções oculares. Isto representa aproximadamente um teor de 1% de Cloranfenicol e 10% de Sulfacetamida sódica em bisnagas contendo 3,5 g.

O medicamento Plastenan apresenta em sua formulação 50 mg g⁻¹ do princípio ativo Acexamato de Sódio e é utilizado no tratamento de queimaduras e cicatrizes. Isto representa aproximadamente um teor de 5% de Acexamato de Sódio em bisnagas contendo 40 g.

Para a construção dos padrões deste medicamento, foram obtidos e testados, sempre mantendo os parâmetros de obtenção de espectros estudados, 30 espectros de amostras de Takil, 20 espectros de amostras de Plastenan e 10 espectros de amostras de Sunil, todos obtidos em um suporte plástico na faixa espectral de 1100 à 2400 nm.

Através da observação dos espectros obtidos, podem ser visualizadas grandes diferenças espectrais entre as amostras. Foi feita então, uma análise de componentes principais com todas as amostras e verificado a distinção das três classes de medicamentos, como é mostrado no gráfico de scores do PCA da figura 47.

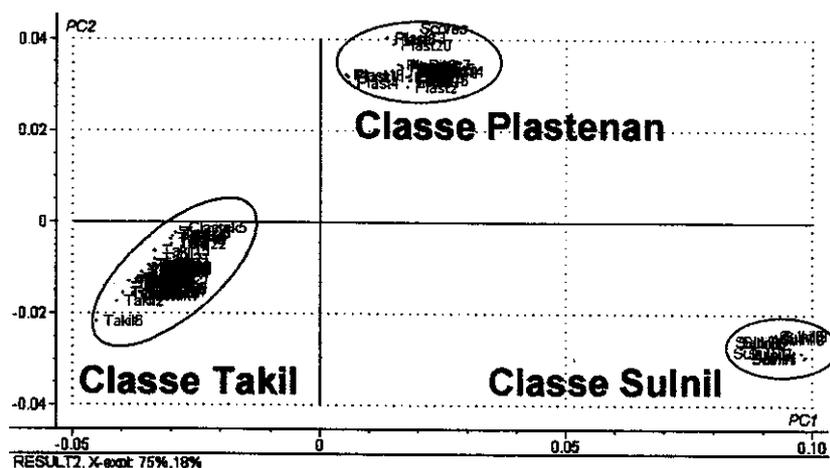


Figura 47. Gráfico de scores da Análise de Componentes Principais dos medicamentos Takil, Sulnil e Plastenan.

Verificada a distinção de classes dos espectros obtidos, foi construído apenas um modelo PCA com 30 espectros do medicamento Takil, que serviu como padrão do medicamento para classificação de novas amostras. Para a construção do modelo PCA do medicamento foi utilizada como técnica de validação, a validação cruzada ("Cross Validation").

Este modelo utiliza 3 componentes principais e foi posteriormente usado na classificação de novas amostras de Takil e dos outros medicamentos via SIMCA.

Nas classificações de novas amostras feitas, em todas as análises, foi possível verificar a classificação correta de 100 % das amostras do medicamento Takil como pertencendo a sua respectiva classe padrão. Não houve, em nenhum momento, a classificação de outros medicamentos na classe Takil.

A figura 48 mostra um gráfico de classificação S_i/S_0 vs Leverage (H_i), de algumas amostras no modelo Takil, onde pode ser visualizada a classificação de novas amostras de Takil apenas.

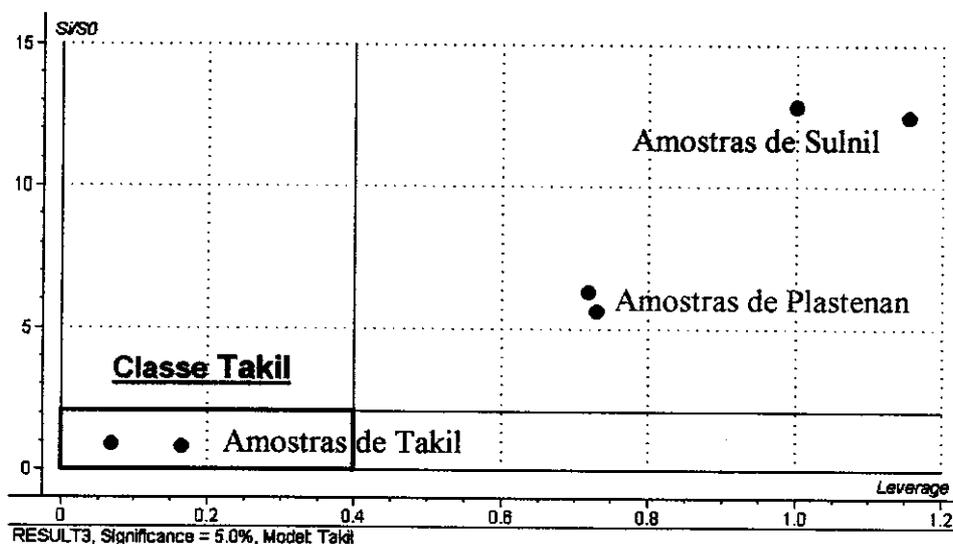


Figura 48. Gráfico de classificação de novas amostras no modelo Takil. Para a classe Takil, somente a localização de algumas amostras é apresentada.

As diferenças observadas entre os medicamentos na PCA devem-se não só aos diferentes princípios ativos que cada medicamento apresenta, mas à composição (princípio ativo + excipientes) diferenciada de cada medicamento.

4.11.2 Identificação de Medicamentos na Forma de Líquidos

Neste estudo, por suas características apropriadas foram utilizados como referência os medicamentos na forma de líquidos Farlac, Lactutona e Retemic. O medicamento Farlac apresenta em sua formulação 667 mg ml^{-1} do princípio ativo lactutose e é utilizado no tratamento sintomático da constipação intestinal. O medicamento Lactutona também apresenta em sua formulação 667 mg ml^{-1} do princípio ativo lactutose. O medicamento Retemic apresenta em sua formulação 1 mg ml^{-1} do princípio ativo Cloridrato de Oxibutinina e é utilizado como antiespasmódico urinário.

Para a construção dos padrões destes medicamentos, foram obtidos e testados, sempre mantendo os parâmetros de obtenção, 40 espectros de

amostras de Farlac, 20 espectros de amostras de Lactutona e 20 espectros de amostras de Retemic, todos obtidos com o auxílio de uma sonda para líquidos, utilizando um caminho óptico de 10 mm, na faixa espectral de 850 à 1600 nm. Pela observação dos espectros obtidos na figura 49, não puderam ser visualizadas grandes diferenças espectrais entre as amostras dos medicamentos Farlac e Lactutona que possuem o mesmo princípio ativo.

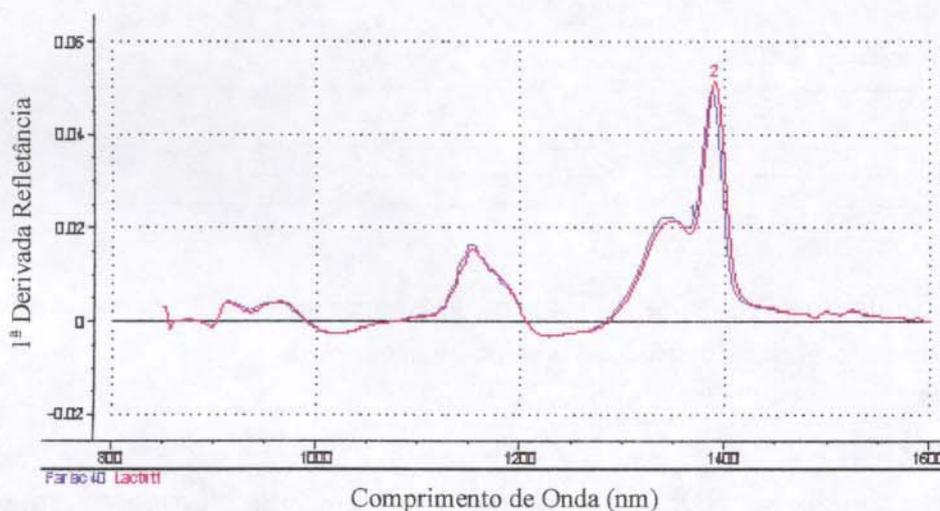


Figura 49. Espectros na forma de 1ª derivada dos medicamentos Farlac (Azul) e Lactutona (Rosa).

Então, foi feita uma análise de componentes principais com os espectros de todas as amostras e verificada a distinção das três classes de medicamentos, como é mostrado no gráfico de *scores* do PCA da figura 50.

Verificada a distinção de classes dos espectros obtidos, foi construído apenas um modelo usando PCA com 40 espectros do medicamento Farlac, que serviu como padrão do medicamento para classificação de novas amostras. Para a construção do modelo PCA do medicamento foi utilizado como técnica de validação, a validação cruzada. Este modelo utiliza 3 componentes principais e foi posteriormente usado na classificação de novas amostras de Farlac e dos outros medicamentos via SIMCA.

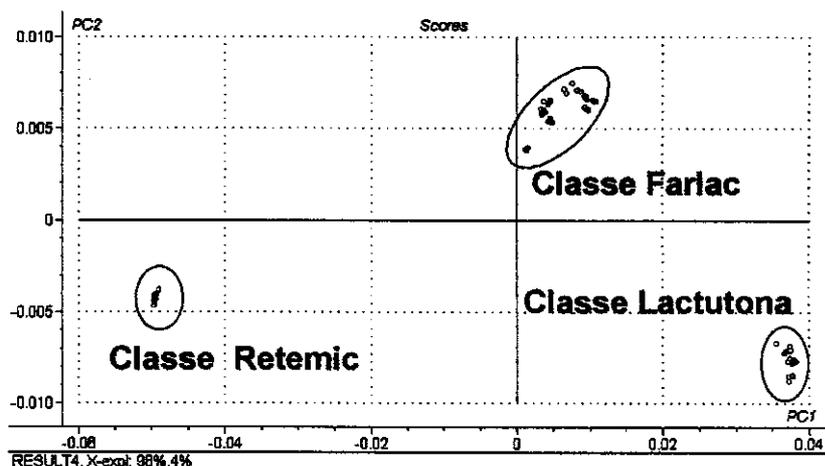


Figura 50. Gráfico de scores da Análise de Componentes Principais dos medicamentos Farlac, Lactutona e Retemic.

Nas classificações de novas amostras feitas, em todas as análises, foi possível verificar a classificação correta de 100 % das amostras do medicamento Farlac como pertencendo a sua respectiva classe padrão. Não houve, em nenhum momento a classificação de outros medicamentos na classe Farlac.

Pela composição diferente, era esperado que amostras do medicamento Retemic, classificassem como não pertencendo a classe padrão do medicamento Farlac. Em nenhum momento ocorreu a classificação do medicamento Lactutona na classe Farlac, apesar de sua composição semelhante. Uma das hipóteses elaborada para as diferenças espectrais que fazem com que seja possível a distinção de medicamentos Farlac e Lactutona, é que estas diferenças devem-se a composição de excipientes diferenciada entre os medicamentos, já que o princípio ativo e seu teor são iguais em ambos medicamentos. Contudo, novamente não é possível a observação de diferenças espectrais sem a ajuda de métodos quimiométricos de análise.

A figura 51 mostra um gráfico de Coomans ($S_i \times S_i$) de classificação de algumas amostras no modelo Farlac, onde pode ser visualizada a classificação correta de novas amostras de Farlac.

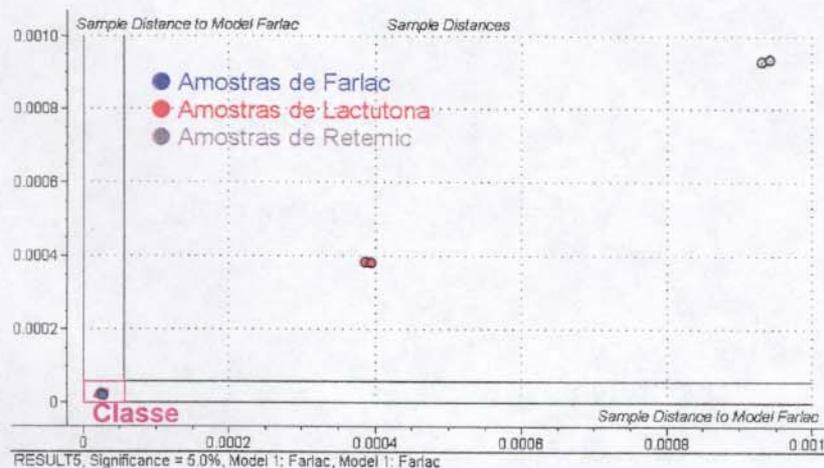


Figura 51. Gráfico de classificação de novas amostras no modelo Farlac.

4.11.3 Identificação de Medicamentos na Forma de Cápsulas

Este estudo tem por finalidade a investigação da possibilidade de identificação por NIR de medicamentos falsificados, comercializados na forma de cápsulas. De forma distinta dos comprimidos, o conteúdo das cápsulas formulados comumente por farmácias de manipulação, constitui uma das maiores fontes de adulteração e falsificação de medicamentos.

A figura 52 mostra uma foto da forma de obtenção dos espectros de cápsulas no modo refletância, empregando-se o espectrofotômetro Free Space Luminar 2030.

Neste estudo, por suas características apropriadas, utilizou-se como referência o medicamento na forma de cápsula Primeral. O medicamento Primeral se apresenta na forma de cápsulas com aproximadamente 718 mg. Em sua formulação, cada cápsula apresenta 5 mg do princípio ativo Bromoprida (0,7% em massa da cápsula), 50 mg de Dimeticona (7% em massa), 13 mg de Pepsina (1,81% em massa), 24 mg de Alfa-amilase fúngica (3,34% em massa) e 50 mg de Lipase fúngica (7% em massa) e é utilizado no tratamento de perturbações e insuficiência digestiva.



Figura 52. Foto do suporte de amostra adaptado para a obtenção do espectro de refletância do medicamento na forma de cápsulas.

O medicamento Primeral foi escolhido para este estudo por possuir sua cápsula totalmente preenchida, não permanecendo espaços entre a cápsula e o produto em seu interior. Para a construção dos padrões deste medicamento, foram obtidos e testados, 52 espectros de 26 amostras de Primeral utilizando-se como “background” a cápsula vazia do medicamento, sempre mantendo os parâmetros de obtenção de espectros estudados. Para simulação de medicamentos falsificados e a classificação de novas amostras, foram obtidos 12 espectros de 6 amostras de cápsulas Primeral adulteradas preenchidas com Lactose, 8 espectros de 4 amostras de Primeral adulteradas com Amido, 6 espectros de 3 amostras de cápsulas vazias de Primeral, 4 espectros de uma amostra do medicamento Flogene e 4 espectros de 2 amostras do medicamento Permixon, também utilizando-se como referência a cápsula vazia. Todos os espectros foram obtidos em um suporte plástico especial de cápsulas, mantendo-se as cápsulas em uma única direção e na faixa espectral de 1100 à 2400 nm. A utilização da cápsula vazia como “background” tem por finalidade eliminar a informação em comum de todas as amostras, para que seja considerada apenas a informação do conteúdo da cápsula, onde estão os princípios ativos.

As amostras de Primeral foram adulteradas retirando-se o conteúdo das cápsulas e adicionando-se, até completo preenchimento, Lactose e Amido.

Foi construído um modelo PCA dos 52 espectros do medicamento Primeral utilizando toda faixa espectral de 1100 à 2400 nm. Este modelo contém 4 componentes principais. Para a construção do modelo PCA do medicamento utilizou-se a validação cruzada ("Cross Validation") como técnica de validação.

Após a construção do modelo, foram feitas classificações via SIMCA de novas amostras de Primeral e dos medicamentos adulterados. Como resultado, as previsões de novas amostras apresentaram a classificação de todas as amostras como pertencendo a classe padrão Primeral, inclusive as adulteradas e a cápsula vazia. Não ocorreu no entanto, a classificação dos medicamentos Flogene e Permixon. Como as cápsulas dos medicamentos adulterados e original eram idênticas, a espectroscopia NIR não foi capaz de identificar e distinguir os medicamentos adulterados do original, utilizando toda a faixa espectral.

Foi feita uma tentativa de descarte das variáveis que continham as informações espectrais referentes apenas à cápsula, mantendo as informações referentes ao medicamento contido na cápsula. Foi necessário efetuar-se, então, uma seleção de variáveis. Esta seleção de variáveis visa à obtenção da informação espectral do medicamento contido na cápsula apenas e não da própria cápsula, uma vez que nem mesmo a utilização da cápsula vazia como "background" foi capaz de obter as informações referentes ao medicamento contido na cápsula. Baseando-se nas sutis diferenças entre os espectros na forma de 1ª derivada, dos medicamentos adulterados e originais, foram escolhidas três faixas de comprimento de onda contendo apenas 35 variáveis. As faixas escolhidas foram de 1240-1252, 1382-1394 e 1724-1764 nm. Esta escolha foi reforçada pela visualização do pesos ("Loadings") destas variáveis na modelagem via PCA.

Este novo modelo com 35 variáveis necessita de 13 componentes principais para explicação de 99% da variância dos dados. Nas classificações de novas amostras no novo modelo feitas, em todas as análises, foi possível verificar a classificação correta de 100 % das amostras do medicamento Primeral como pertencendo a sua respectiva classe padrão e a classificação como não pertencendo, de amostras das cápsulas adulteradas e dos outros medicamentos. Esta classificação reforça a hipótese de que as variáveis escolhidas, contém

informação referentes ao conteúdo da cápsula, permitindo a distinção das amostras do medicamento original dos adulterados. Deve-se, no entanto, observar que o modelo produzido se apresenta de forma bastante complexa, exigindo um número expressivo de componentes principais. Desta forma, sua estabilidade deve ser motivo de averiguações futuras. Técnicas mais robustas de seleção de variáveis poderão ser também averiguadas com o objetivo de simplificar este modelo.

A figura 53 mostra um gráfico de S_1/S_0 vs Leverage (H_i), de classificação de amostras no modelo Primeral com apenas 35 variáveis. Neste gráfico pode ser visualizada a classificação correta de amostras de Primeral em sua respectiva classe padrão.

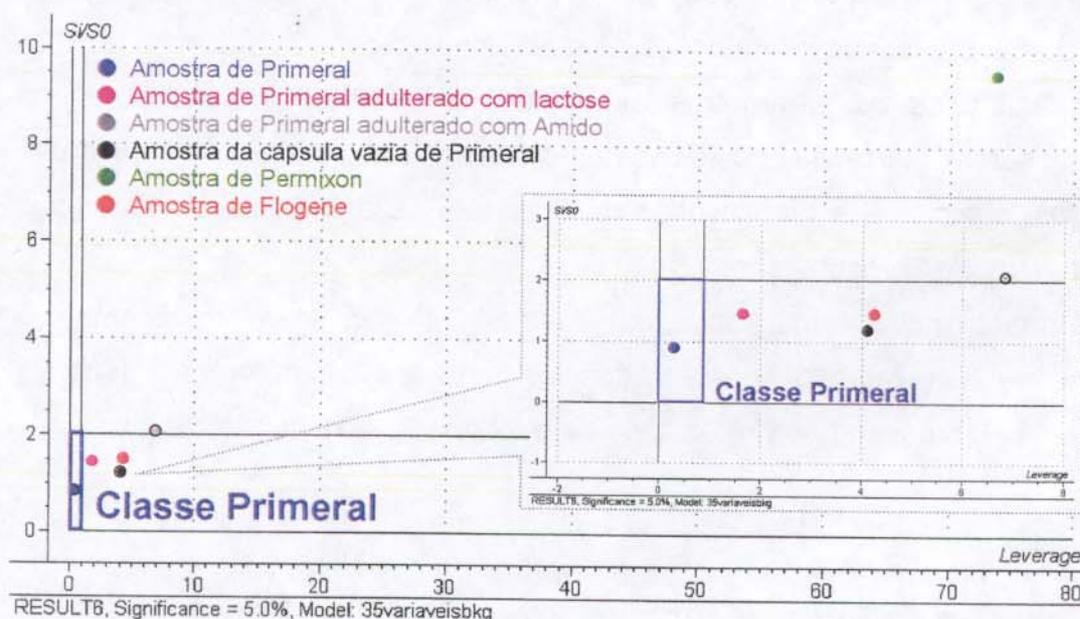


Figura 53. Gráfico de Classificação S_1/S_0 x H_i do medicamento na forma de cápsulas Primeral.

Pode-se concluir destes estudos, que é possível a identificação por NIR de medicamentos nas mais diversas formas de apresentações: pomadas, líquidos e cápsulas.

Em vista da não disponibilidade de medicamentos falsos na forma de pomada e líquidos e da dificuldade de simulação de um medicamento falso, foi necessária a utilização de outros medicamentos apresentados nestas formas para uma

simulação da falsificação e para a investigação da possibilidade de identificação de medicamentos nestas formas. A identificação de medicamentos na forma de líquidos apresentou bons resultados e foi uma das análises de mais fácil manuseio experimental, não necessitando ajustes como posicionamento das amostras, mas só a escolha do caminho óptico. A repetibilidade de obtenção dos espectros se reflete também na menor dispersão das amostras observadas no gráfico dos *scores*, nos primeiros componentes principais do modelo PCA.

A identificação de medicamentos na forma de pomadas apresentou bons resultados, mas a maior dificuldade deste tipo de análise é o difícil manuseio e a superfície irregular das amostras.

A análise de medicamentos na forma de cápsulas também representou um desafio à técnica de identificação, por necessitar seleção mais rigorosa de variáveis que exprimam as informações do medicamento contido na cápsula.

Porém, ajustados os parâmetros experimentais e efetuada a escolha das variáveis a serem utilizadas, posicionamento da amostra, controle de umidade, entre outros, é possível a identificação de amostras de medicamentos nas mais diversas formas de apresentação.

É importante, no entanto, observar que a distinção entre medicamentos falsificados ou não, quando apresentados na forma de cápsulas seria feita de forma mais fácil removendo-os e expondo-os diretamente a radiação NIR.

4.12 Avaliação da Performance do Programa Real-Time Predictor

1.26 da Brimrose

Para a utilização do Real -Time Predictor são necessários ajustes prévios de alguns parâmetros fazendo-se diversas avaliações e repetições. Estes ajustes se referem ao arquivo ou arquivos de padrões a serem utilizados, os pré-processamentos matemáticos aplicados, números de varreduras, faixa de comprimentos de onda utilizada e estipulação do valor de distância crítica ideal para a classe utilizada. Com os ajustes destes dados é possível fazer uma

classificação on-line, e verificar em poucos segundos se a amostra desconhecida pertence ou não a classe ou classes de referência.

Para avaliação deste método de classificação, foram utilizados os espectros dos padrões de medicamentos verdadeiros Aspirina utilizados na classificação de novas amostras pelo programa quimiométrico Unscrambler e amostras de outros medicamentos.

Os resultados se mostraram muito bons quando estipulada uma distância crítica adequada para cada medicamento, obtendo a classificação correta na classe padrão de todas as amostras verdadeiras analisadas e a não classificação de amostras de outros medicamentos. O mesmo procedimento de classificação foi utilizado para os medicamentos Melhoral, Ampicilina genérica e Yomax fornecendo como resultado a classificação correta na classe padrão de todas as amostras verdadeiras analisadas e a não classificação de amostras de outros medicamentos.

O medicamento Pressotec na forma de comprimidos possui três formulações: 5, 10 e 20 mg. Este medicamento foi utilizado no intuito da avaliação de identificação do medicamento como pertencente ou não à classe padrão. Deve-se avaliar também, caso o medicamento pertença à classe padrão, a formulação (teor de princípio ativo) em que o medicamento analisado se apresenta.

4.12.1 Análise do Medicamento Aspirina 500 mg

Na análise do medicamento Aspirina, foram utilizados os dados do grupo padrão contendo 200 espectros de Aspirina 500 mg de 1100 a 2000 nm, na forma de sua 1ª derivada, 300 varreduras por espectro e estipulada uma distância crítica ideal no valor de 0,0800.

A escolha do valor ideal de distância crítica foi feita da seguinte maneira:

1. Foram obtidos 200 espectros em ambas as faces do medicamento, mantendo-se constantes os parâmetros de obtenção de espectros. Estes espectros serviram como padrão do medicamento.

2. Mantendo-se as mesmas condições, foram obtidos espectros de comprimidos de Aspirina que não fizeram parte do conjunto de amostras do padrão.
3. Verificou-se a Distância Crítica (DC) (ver item 1.8.4) que cada amostra de Aspirina forneceu. Este valor foi de 0,0750 em média.
4. Mantendo-se as mesmas condições, foram obtidos espectros de comprimidos de composição semelhante como Melhoral, Doril e AAS.
5. Verificou-se a distância crítica que cada amostra forneceu. Os valores foram em média de 0,1200 para o Melhoral, 0,1820 para o Doril e 0,1220 para o AAS.
6. Estipulou-se, então, um valor de DC igual à 0,0800, que permite que amostras de Aspirina sejam classificadas corretamente, não permitindo que amostras de Melhoral ou medicamentos semelhantes sejam classificadas na classe Aspirina.

O resultado obtido foi a classificação correta, em todas as oportunidades, de novas amostras de Aspirina, para as quais se obtiveram valores de distância crítica inferiores ao estipulado para seus conjuntos e a não classificação na classe Aspirina, de amostras de outros medicamentos, que resultaram em valores de distância crítica superiores ao estipulado para o conjunto citado acima.

Mesmo com um perfil espectral parecido, quando ajustada uma distância crítica ideal, não houve nenhum caso de classificação incorreta dos medicamentos Aspirina e Melhoral 500 mg ou de outros medicamentos similares, diferentes, montados em laboratório ou adulterados com acréscimo de excipientes.

A figura 54 mostra a tela do programa contendo o resultado de uma das análises feita com uma amostra de Aspirina 500 mg verdadeira, classificada corretamente em seu grupo.

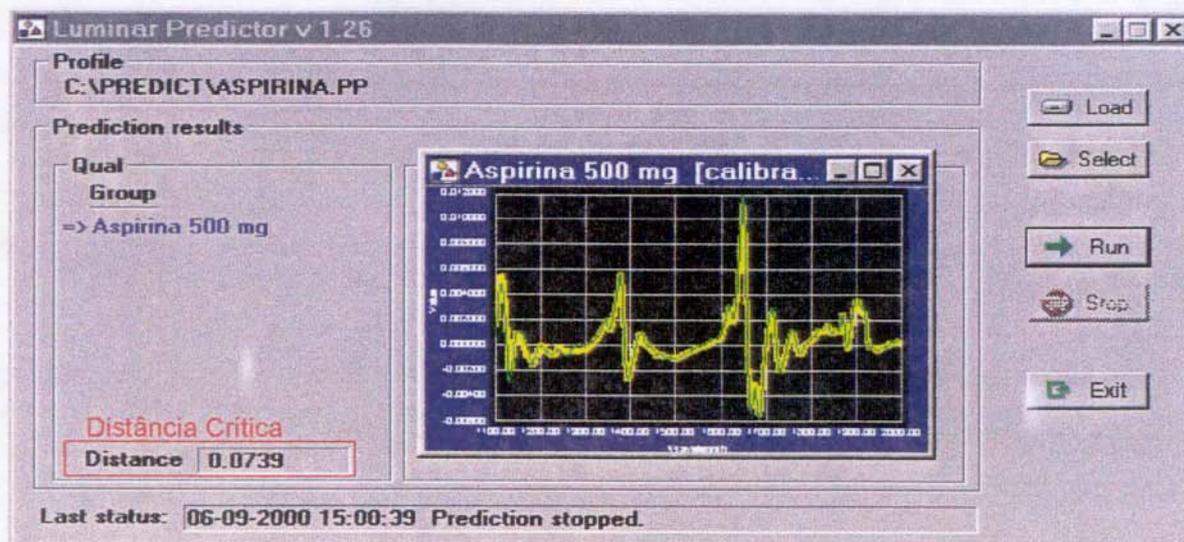


Figura 54. Tela do programa mostrando o espectro obtido no Real Predictor 1.26 para a classificação do medicamento Aspirina 500 mg na sua classe padrão. O espectro em verde representa as amostras padrões de Aspirina 500 mg, o espectro em amarelo representa a amostra utilizada na classificação "On Line".

4.12.2 Análise do Medicamento Pressotec 5, 10 e 20 mg

Na análise do medicamento Pressotec, foram utilizados os dados dos três grupos de espectros padrão. Do grupo padrão contendo 50 espectros de Pressotec 5 mg, 50 espectros de Pressotec 10 mg e 50 espectros de Pressotec 20 mg, na faixa de 1200 a 2100 nm na forma de sua 1ª derivada, 300 varreduras por espectro e estipulada uma distância crítica ideal no valor de 0,1000. O valor de distância crítica ideal foi estipulado de maneira semelhante ao estipulado para o medicamento Aspirina, mas utilizando outros medicamentos para se avaliar o valor de DC que permite que amostras de Pressotec classifiquem e outros medicamentos não classifiquem. A análise de novas amostras só poderia apresentar 4 resultados possíveis: a não classificação da amostra em nenhum dos grupos padrão e a classificação em uma das três classes padrão com 5, 10 e 20 mg. Além da análise qualitativa, o programa Real-Time predictor, baseado no

modelo PLS construído no Unscrambler a partir dos espectros dos medicamentos nas três formulações, faz uma análise quantitativa da nova amostra, devolvendo como resultado o teor de princípio ativo do medicamento.

Os resultados se mostraram muito bons quando estipulada uma distância crítica adequada para o medicamento, obtendo a classificação correta das amostras dos medicamentos, em suas respectivas classes padrão, que obtiveram valores de distância crítica inferiores ao estipulado para o conjunto das três formulações e a não classificação, em nenhuma das classes, de amostras de outros medicamentos, que obtiveram valores de distância crítica superiores ao estipulado para o conjunto citado acima. Em algumas oportunidades ocorreu a classificação errônea das amostras contendo 5 mg como pertencendo à classe 10 mg e vice-versa. Uma das hipóteses para este acontecimento, é a não distinção das diferenças espectrais entre os medicamentos nas duas formulações, devido ao pequeno teor de princípio ativo de ambos. Os resultados quantitativos também não eram muito bons para amostras contendo 5 mg, que apresentavam como resultados valores mais altos que o estipulado. Os resultados quantitativos para amostras contendo 5 mg mostraram resultados com valores de aproximadamente 4 mg acima do valor estipulado. Para amostras contendo 10 mg, os resultados quantitativos apresentaram resultados com desvios de aproximadamente ± 2 mg em relação ao valor nominal estipulado. Amostras contendo 20 mg apresentaram resultados com desvios de aproximadamente ± 1 mg em relação do valor estipulado.

Como pode ser observado, os resultados se apresentaram mais próximos do valor estipulado, quando eram analisadas amostras com teores mais altos, como os medicamentos contendo 10 e 20 mg. Pode-se com isso, observar que, quanto maior o teor de princípio ativo, melhor será sua quantificação.

A tela do programa contendo o resultado de uma das análises feita com uma amostra de Pressotec 20 mg verdadeira classificada corretamente em sua respectiva classe padrão é mostrada na figura 55. O valor do teor de Maleato de Enalapril obtido foi de 20,5 mg, bem próximo do valor nominal de 20 mg.

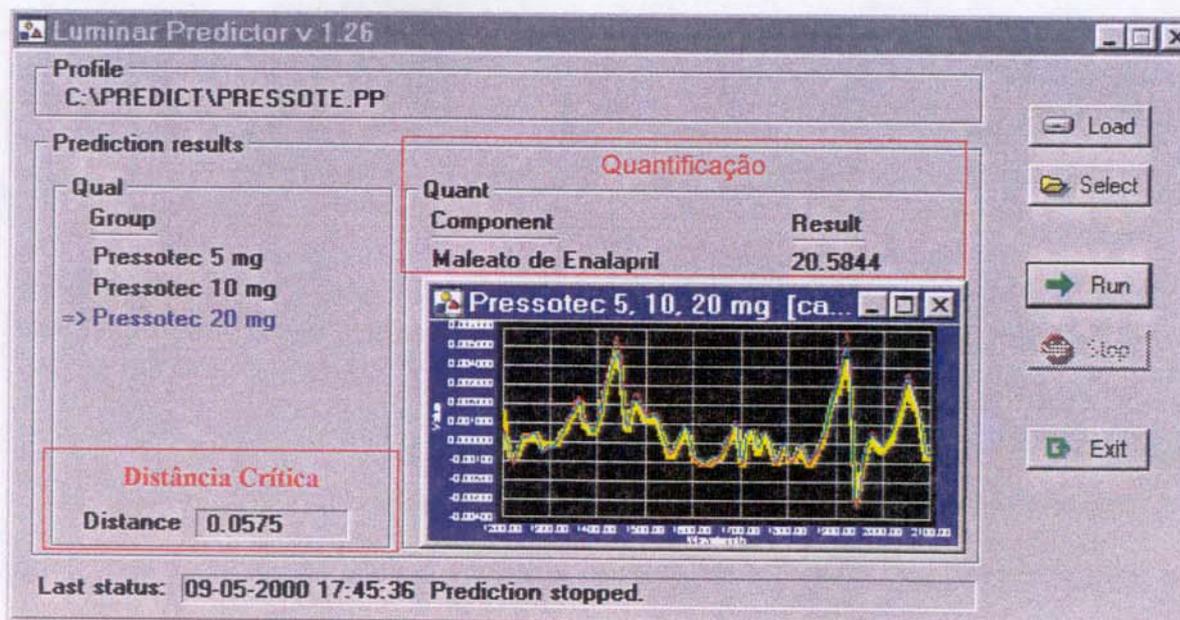


Figura 55. Tela do programa mostrando o espectro obtido no Real Predictor 1.26 para a classificação do medicamento Pressotec 20 mg na sua classe padrão. O espectro em vermelho, verde e azul representam as amostras padrões de Pressotec 5, 10 e 20 mg, o espectro em amarelo representa a amostra utilizada na classificação "On Line". O valor no quadro *quantificação* representa o valor do teor de princípio ativo obtido da quantificação da nova amostra por PLS.

O tratamento de dados, utilizando o programa Real Time Predictor 1.26, mostrou bons resultados em relação à classificação de novas amostras. Quando se ajusta uma distância crítica ideal à cada classe de medicamentos, a classificação correta das amostras dos medicamentos no respectivo modelo de referência e a não classificação das amostras de outros medicamentos, foi observada em todos os experimentos.

Este programa apresenta a vantagem de executar uma classificação direta e rápida ("on-line") de novas amostras nos modelos de espectros de referência. Porém, apresenta como limitação de seu uso, a impossibilidade de uma escolha de variáveis ou comprimentos de onda durante a análise, permitindo apenas a escolha de faixas contínuas de comprimentos de onda e a exclusão de comprimentos de onda nos extremos da faixa de trabalho. Outra limitação do programa é que, antes de sua utilização, deve ser efetuada uma escolha

adequada da distância crítica (DC) ideal para cada medicamento. A escolha da distância crítica ideal foi baseada nos valores de distâncias críticas obtidas para amostras padrões de cada medicamento e nos valores obtidos por outros medicamentos. Esta distância crítica ideal permite que o medicamento verdadeiro seja classificado como pertencente a classe padrão e não permitindo que outros medicamentos sejam classificados desta forma.

A análise de dados, utilizando o programa Real Time Predictor 1.26, mostrou também, bons resultados em relação a classificação e predição de valores quantitativos de novas amostras. Este programa apresenta a vantagem de executar uma previsão direta dos valores quantitativos de novas amostras utilizando modelos construídos com espectros de referência.

4.13 Identificação de Medicamentos Falsificados

Um lote de amostras reais de diversos medicamentos comprovadamente falsificadas, foi gentilmente cedido pelo laboratório Noel Nutels do Rio de Janeiro. Este lote é composto por amostras de medicamentos que apresentam dois tipos de falsificação. Em um deles, a falsificação se deve à alteração da embalagem e rotulagem, sendo o medicamento em si verdadeiro. O outro tipo, apresenta a falsificação do produto pela alteração de sua composição.

Dentre os medicamentos cuja falsificação se deve a falsificação da embalagem e rotulagem, estão os medicamentos: Combiron líquido (Aché), Mucolin xarope (Knoll), Tanakan F (Knoll), Aldomet 250 mg (Prodome), Omcilon-A "M" (Squibb), Floxacin 400 mg (Merck S.& D.) e Decadron (Prodome). Dentre os medicamentos cuja falsificação se deve a falsificação do produto, estão os medicamentos: Femme com flúor (Aché), Melleril 200 mg (Sandoz), Sulfanilamida pó (Medic), Tylenol gotas (Cilag) e Citoneurin 5000 (Merck).

4.13.1 Medicamentos com Embalagem e Rotulagem Falsificada e Produto Verdadeiro

Muitos dos medicamentos apreendidos, analisados e classificados como resultado de falsificação são medicamentos que tiveram suas embalagens e rotulagens falsificadas. O produto contido nestas embalagens é verdadeiro, ou seja, o medicamento é realmente o fabricado pela indústria, mas sua embalagem não corresponde a verdadeira ou dela foram apagadas a inscrição “**Amostra grátis**”. Este tipo de falsificação ocorre principalmente pelo reembalamento de amostras grátis em novas embalagens para sua comercialização e corresponde a 40 % das amostras de medicamentos falsificados apreendidas.

O medicamento Aldomet 250 mg é um dos medicamentos cuja falsificação se deu pela reembalagem de amostras grátis. Neste caso, o produto é verdadeiro, mas sua embalagem não é verdadeira (Figura 56).

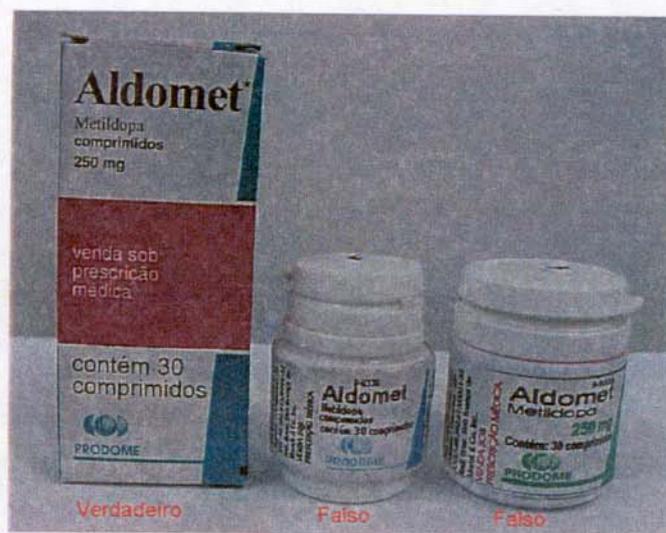


Figura 56. Foto da embalagem do medicamento Aldomet 250 mg verdadeira e falsas.

No intuito de se investigar se a falsificação do medicamento se restringia a embalagem e rotulagem ou se estendia também ao produto, foram obtidos 60 espectros de refletância de 15 amostras de Aldomet 250 mg verdadeiro que

serviram como padrão do medicamento. Foram obtidos também, 30 espectros de 10 amostras de Aldomet 250 mg falsificado. A faixa espectral utilizada de 1.100 à 2.200 nm. A figura 57 mostra os espectros do medicamento Aldomet 250 mg verdadeiro e falso.

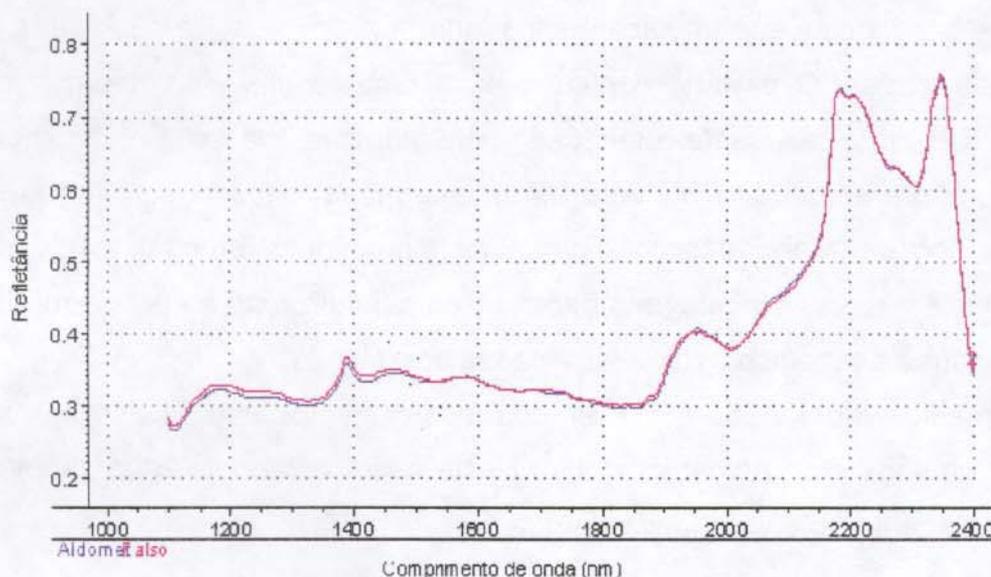


Figura 57. Espectros de refletância do medicamento Aldomet 250 mg verdadeiro (Azul) e falso (Rosa).

O medicamento Aldomet 250 mg tem por princípio ativo o composto Metildopa e é utilizado como agente anti-hipertensivo. Os comprimidos de Aldomet 250 mg possuem em média uma massa de 350 mg, sendo 250 mg de Metildopa (valor nominal) e aproximadamente 100 mg de excipientes. O teor de Metildopa no comprimido é de cerca de 71%.

Não é possível pela observação dos espectros a verificação de diferenças espectrais pronunciadas. Foi feita então, uma análise de componentes principais (PCA) dos 90 espectros dos medicamentos verdadeiro e falso e verificado a não distinção de classes entre medicamentos. Este fato constitui um indicativo da similaridade entre as amostras.

Foi construído um modelo PCA dos espectros do medicamento Aldomet verdadeiro. O modelo PCA de Aldomet 250 mg utiliza 7 componentes principais

(PC) para explicar 78% da variância de seus dados, mas a utilização de apenas 4 componentes principais com uma variância de 70%, fornece bons resultados de classificação. O modelo de Aldomet 250 mg construído, foi usado na classificação através de SIMCA de novas amostras de Aldomet 250 mg não incluídas no conjunto de amostras utilizadas para a construção do modelo PCA. Foi feita também, a classificação dos 30 espectros das amostras de Aldomet 250 mg falsificadas.

O resultado obtido foi a classificação na classe Aldomet verdadeiro, de todas as amostras de Aldomet, tanto verdadeiras quanto falsas. Estes resultados comprovam que o produto não é falsificado, mas apenas a embalagem do produto.

Uma classificação de novas amostras de Aldomet 250 mg e Aldomet 250 mg falsificado é mostrada no gráfico de S_i/S_o x Leverage (H_i) da figura 58.

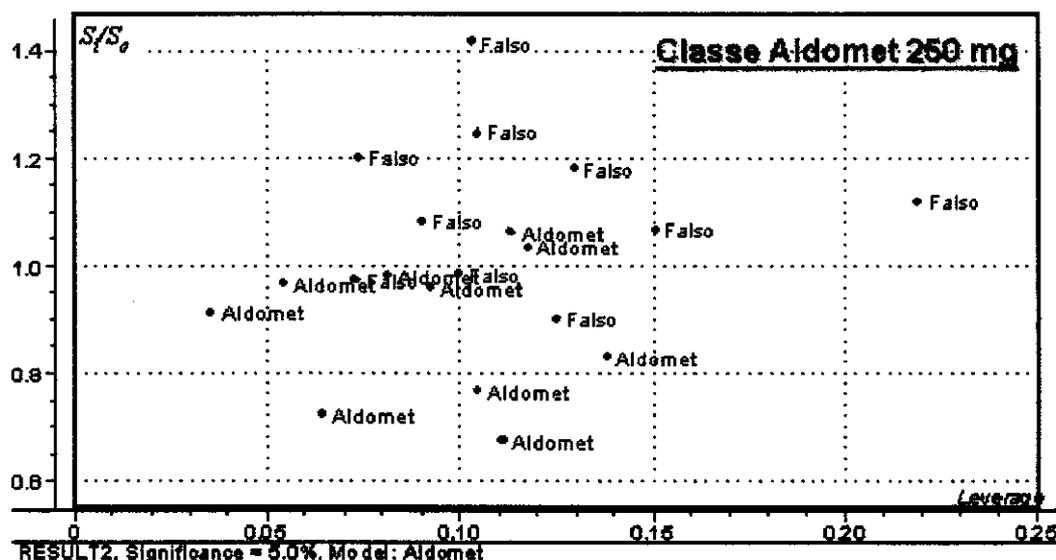


Figura 58. Gráfico de classificação de amostras de Aldomet 250 mg verdadeiras e falsas no modelo Aldomet 250 mg verdadeiro.

Como pode ser visto no gráfico da figura 58, as amostras de Aldomet verdadeira e falsa classificam-se na classe padrão Aldomet. Este resultado mostra que o produto era verdadeiro, apesar de estar contido em uma embalagem do medicamento falsificada. Foram obtidos, também, espectros dos medicamentos de

marca Combiron, Mucolin, Tanakan F, Omcilon-A "M", Floxacin e Decadron, nas formas verdadeira e falsa. Pela observação visual dos espectros e através do SIMCA, verificou-se não haver diferenças significativas entre o medicamento verdadeiro e falso de cada uma das marcas, comprovando, mais uma vez, que o produto é verdadeiro, apesar de estar contido em uma embalagem falsificada do medicamento.

Nas figuras 59 e 60 são mostradas as fotos contendo a embalagem verdadeira e falsa dos medicamentos de embalagem falsificada.



Figura 59. Fotos mostrando as embalagens de medicamentos apreendidas no comércio cujas embalagens foram adulteradas. Medicamentos Tylenol (A), Decadron (B), Combiron (C), Floxacin (D)



Figura 60. Fotos mostrando as embalagens de medicamentos apreendidas no comércio cujas embalagens foram adulteradas. Medicamentos Tanakan F (E), Mucolin (F) e Omcilon-A "M" (G).

Os resultados obtidos mostram ser possível uma identificação de amostras dos medicamentos verdadeiros embalados em embalagens falsas. Isto evidencia o potencial da espectroscopia NIR na verificação da autenticidade de medicamentos.

4.13.2 Medicamentos com Produto Falsificado

Como foi visto, muitos dos medicamentos apreendidos, analisados e de comprovada falsificação são medicamentos que tiveram suas embalagens e rotulagens falsificadas. O produto contido nestas embalagens é verdadeiro, mas sua embalagem não.

Outro tipo de falsificação, que traz maiores conseqüências à saúde, é a falsificação do produto, ou seja, da alteração da composição do medicamento por diminuição do teor de princípio ativo ou utilização de outros compostos que não fazem parte do medicamento. Os medicamentos utilizados no trabalho, cuja falsificação se deve a falsificação do produto, foram: Femme com flúor, Melleril 200 mg, Sulfanilamida pó, Tylenol gotas e Citoneurin 5000.

No intuito de se investigar a possibilidade de distinção do medicamento verdadeiro do medicamento de comprovada falsificação, foram obtidos 60 espectros de refletância de 30 amostras de Femme com flúor verdadeiro que serviram como padrão do medicamento. Foram obtidos também, 10 espectros de 5 amostras de Femme com flúor falsificado. A faixa espectral utilizada foi de 1.100 à 2.200 nm. A figura 61 mostra os espectros do medicamento Femme verdadeiro e falso.

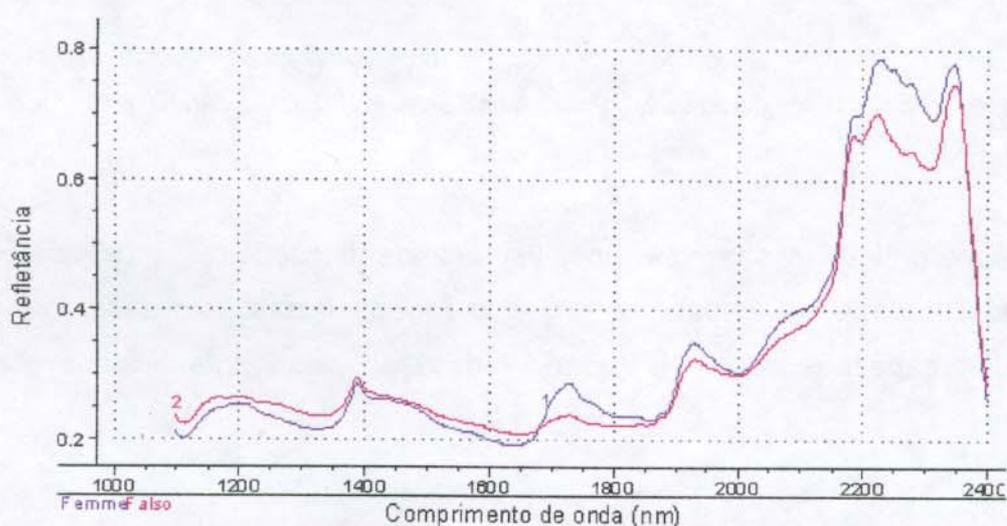


Figura 61. Espectros de refletância do medicamento Femme verdadeiro (Azul) e falso (Rosa).

O medicamento Femme é um complexo vitamínico e é utilizado como suplemento vitamínico mineral na gravidez. Os comprimidos de Femme possuem em média uma massa de 1430 mg.

Pela observação dos espectros, é possível a verificação de diferenças espectrais pronunciadas. A análise de componentes principais (PCA) dos 70 espectros dos medicamentos verdadeiro e falso mostrou a distinção de classes entre os medicamentos.

Foi construído um modelo PCA dos espectros do medicamento Femme verdadeiro. O modelo PCA de Femme utiliza 3 componentes principais (PC) para explicar 91% da variância de seus dados. O modelo de Femme construído, foi usado na classificação por SIMCA de novas amostras de Femme não incluídas no conjunto de amostras utilizadas para a construção do modelo PCA. Foi feita também, a classificação dos 10 espectros das amostras de Femme falsificadas.

O resultado obtido foi a classificação de todas as amostras de Femme verdadeiras como pertencendo à classe padrão Femme e a classificação como não pertencendo, das amostras do medicamento falsificado. Estes resultados mostram que o produto contido no medicamento Femme falsificado não possui as características que permitam que ele seja inserido no conjunto padrão do medicamento verdadeiro, podendo assim, ser classificado como falso.

Uma classificação de novas amostras de Femme verdadeiro e falsificado é mostrada no gráfico de S_1/S_0 x Leverage (H_i) da figura 62.

Como pode-se ver no gráfico da figura 62, ocorreu a classificação na classe padrão Femme verdadeira, das amostras de Femme verdadeiras e a não classificação das amostras de Femme falsas. Com a utilização desta metodologia, baseado nos resultados obtidos, pode-se concluir que o medicamento analisado é um produto falsificado.

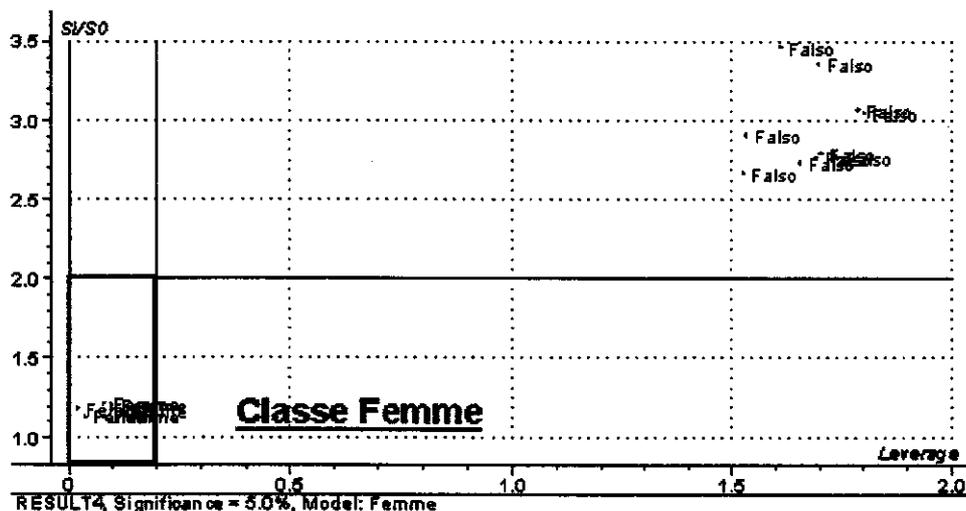


Figura 62. Gráfico de classificação SIMCA de amostras de Femme verdadeiras e falsas no modelo Femme verdadeiro.

Outro medicamento analisado e de comprovada falsificação, utilizado no trabalho, foi o medicamento Sulfanilamida em pó.

O medicamento Sulfanilamida é um medicamento que tem por princípio ativo a sulfanilamida e é utilizado como agente anti-bacteriano. Este medicamento é apresentado na forma de pó em cartuchos de 10 g.

De maneira similar ao medicamento Femme, foram obtidos 40 espectros de refletância de amostras de Sulfanilamida verdadeira que serviram como padrão do medicamento. Foram obtidos também, 6 espectros de amostras de Sulfanilamida falsificada. A faixa espectral utilizada foi de 1.100 à 2.400 nm. O medicamento Sulfanilamida por estar na forma de pó, precisou ser empastilhado no empastilhador construído no laboratório.

Na figura 63 é possível a visualização dos espectros do medicamento Sulfanilamida verdadeiro e falso.

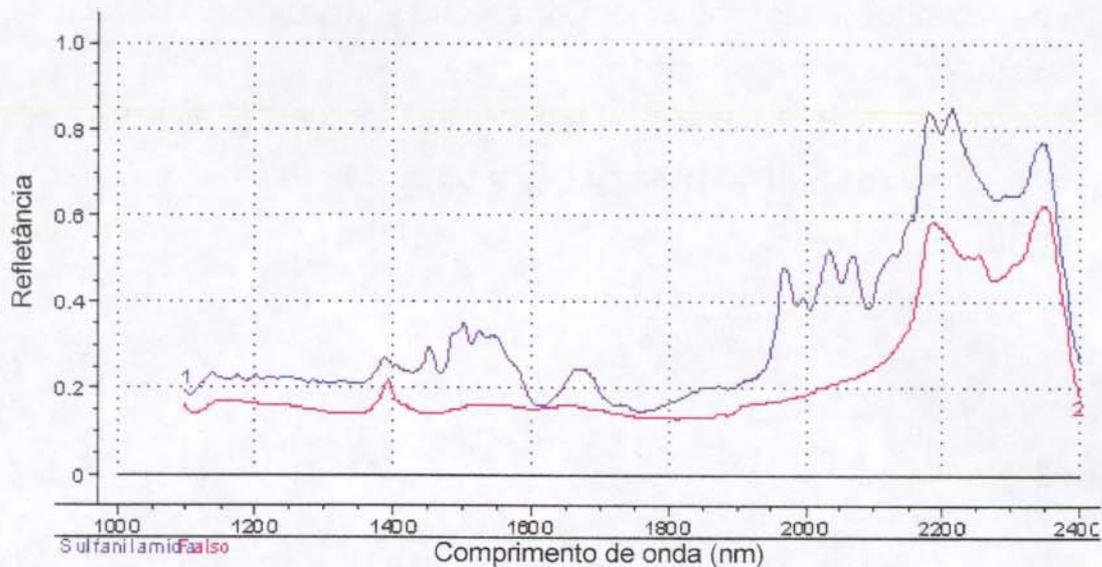


Figura 63. Espectros de refletância do medicamento Sulfanilamida verdadeiro (Azul) e falso (Rosa).

A análise de componentes principais (PCA) dos 46 espectros dos medicamentos verdadeiro e falso mostrou a distinção de classes entre medicamentos. Porém, pela observação dos espectros, já é possível a verificação de diferenças espectrais pronunciadas.

Foi construído então, um modelo PCA dos espectros do medicamento Sulfanilamida verdadeira. Este modelo PCA utiliza 10 componentes principais (PC) para explicar 81% da variância de seus dados. Porém, a utilização de apenas 2 componentes principais é suficiente para uma classificação correta das amostras. O modelo PCA construído foi usado na classificação por SIMCA de novas amostras de Sulfanilamida não incluídas no conjunto de amostras utilizadas para a construção do modelo PCA e na classificação dos 10 espectros das amostras de Sulfanilamida falsificadas.

O resultado da classificação obtido, foi a classificação como pertencendo a classe padrão, de todas as amostras de Sulfanilamida verdadeiras e a classificação como não pertencendo das amostras do medicamento falsificado. Estes resultados mostram que o produto contido no medicamento Sulfanilamida falsificado não possui as características que permitam que ele seja classificado

como pertencendo a classe padrão (medicamento Sulfanilamida verdadeiro), podendo assim, ser classificado como falso.

Uma classificação de novas amostras de Sulfanilamida verdadeira e falsificada é mostrada no gráfico de S_i/S_o x Leverage (H_i) da figura 64.

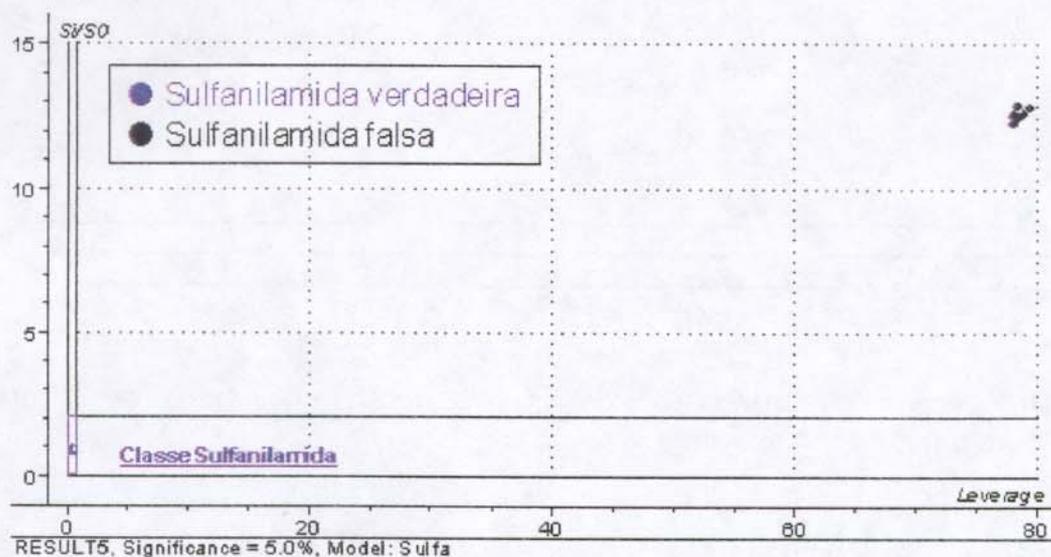


Figura 64. Gráfico de classificação SIMCA de amostras de Sulfanilamida verdadeiras e falsas no modelo Sulfanilamida verdadeira.

Como pode ser visto no gráfico da figura 64, ocorreu a classificação na classe padrão Sulfanilamida verdadeira, das amostras de Sulfanilamida verdadeiras e a não classificação das amostras de Sulfanilamida falsas. Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o medicamento analisado é um produto falsificado.

O medicamento Melleril 200 mg é um medicamento que tem por princípio ativo o Cloridrato de tioridazina e é utilizado em sintomas variados de distúrbios mentais psicóticos e não-psicóticos. Este medicamento, apresentado na forma de comprimido, possui em média uma massa de 410 mg e um teor de princípio ativo de 49%.

De maneira similar aos outros medicamentos, foram obtidos 64 espectros de refletância de amostras de Melleril 200 mg verdadeiro que serviram como padrão do medicamento. Foram obtidos também, 4 espectros de 2 amostras de Melleril

200 mg falsificado. A faixa espectral utilizada foi de 1.100 à 2.200 nm. Na figura 65 podem ser visualizados os espectros do medicamento Melleril 200 mg verdadeiro e falso.

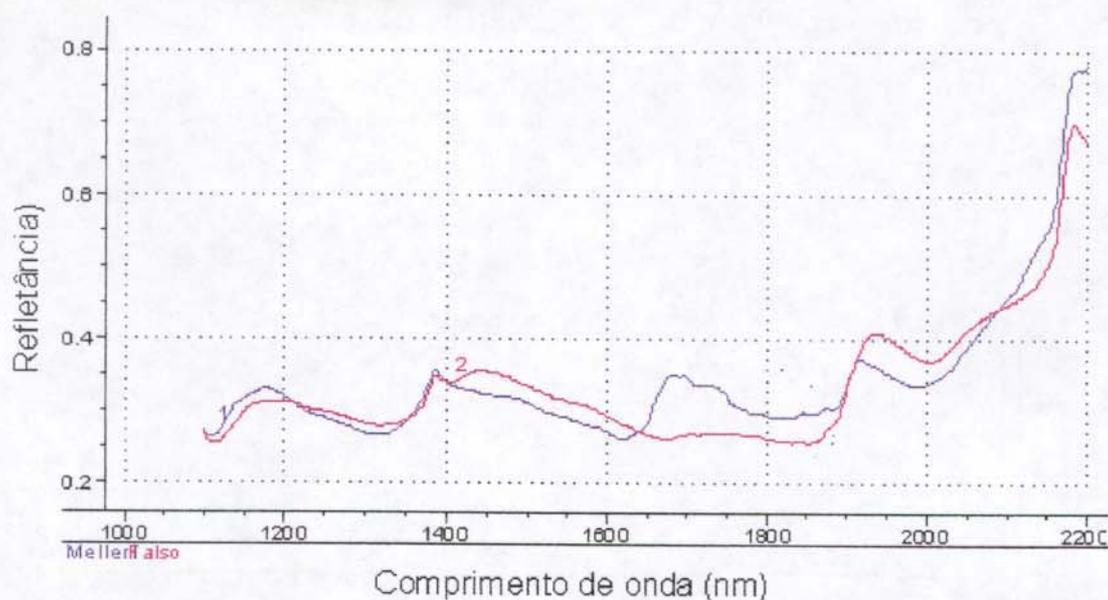


Figura 65. Espectros de refletância do medicamento Melleril 200 mg verdadeiro (Azul) e falso (Rosa).

Pela simples observação dos espectros, é possível a verificação de diferenças espectrais pronunciadas entre medicamentos. Foi construído um modelo PCA dos espectros do medicamento Melleril 200 mg verdadeiro. O modelo PCA de Melleril 200 mg utiliza 10 componentes principais (PC) para explicar 75% da variância de seus dados. Porém, a utilização de apenas 3 componentes principais é suficiente para uma classificação correta das amostras. O modelo de Melleril construído, foi usado na classificação por SIMCA de 4 espectros das amostras de Melleril falsificadas e novas amostras de Melleril não incluídas no conjunto de amostras utilizadas para a construção do modelo PCA.

O resultado obtido foi a classificação, como pertencendo a classe padrão Melleril, de todas as amostras de Melleril verdadeiras e a classificação como não pertencendo das amostras falsas. O resultado mostra que o produto contido no

medicamento Melleril falsificado não possui as características que permitam que ele seja classificado como pertencendo à classe do medicamento Melleril verdadeiro, podendo assim ser considerado como falso.

Uma classificação de novas amostras de Melleril 200 mg verdadeiro e falsificado é mostrada no gráfico de S_i/S_0 x Leverage (H_i) da figura 66.

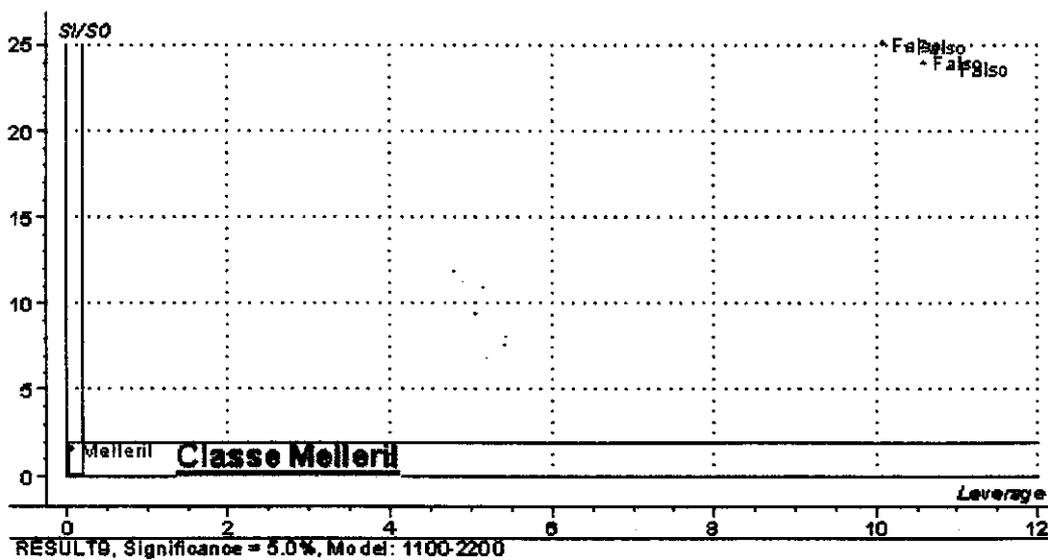


Figura 66. Gráfico de classificação SIMCA de amostras de Melleril 200 mg verdadeiras e falsas no modelo Melleril verdadeira.

Como pode ser visto no gráfico da figura 66, há a ocorrência da classificação na classe padrão Melleril verdadeiro, de amostras de Melleril verdadeiros, e que isto não ocorre para amostras do medicamento falsificado. Baseando-se nos resultados obtidos, pode-se concluir que o medicamento analisado é um produto falsificado.

O medicamento Citoneurin 5000 é um medicamento que tem por princípio ativo Mononitrato de tiamina (Vitamina B₁), Cloridrato de piridoxina (Vitamina B₆) e Cianocobalamina (Vitamina B₁₂) e é utilizado como antineurítico, antineurálgico e suplemento vitamínico. Este medicamento apresenta em sua formulação drágeas com aproximadamente 700 mg, contendo 100 mg de vitamina B₁, 100 mg de

vitamina B₆ e 5000 µg de vitamina B₁₂. Os teores de vitamina B₁, vitamina B₆ e vitamina B₁₂ na drágea são de 14%, 14% e 1%, respectivamente.

Foram obtidos 60 espectros de refletância de amostras de Citoneurin verdadeiro que serviram como padrão do medicamento. Foram obtidos, também, 4 espectros de amostras de Citoneurin falsificado. A faixa espectral utilizada foi de 1.100 à 2.200 nm. Na figura 67, é possível a visualização dos espectros do medicamento Citoneurin verdadeiro e falso.

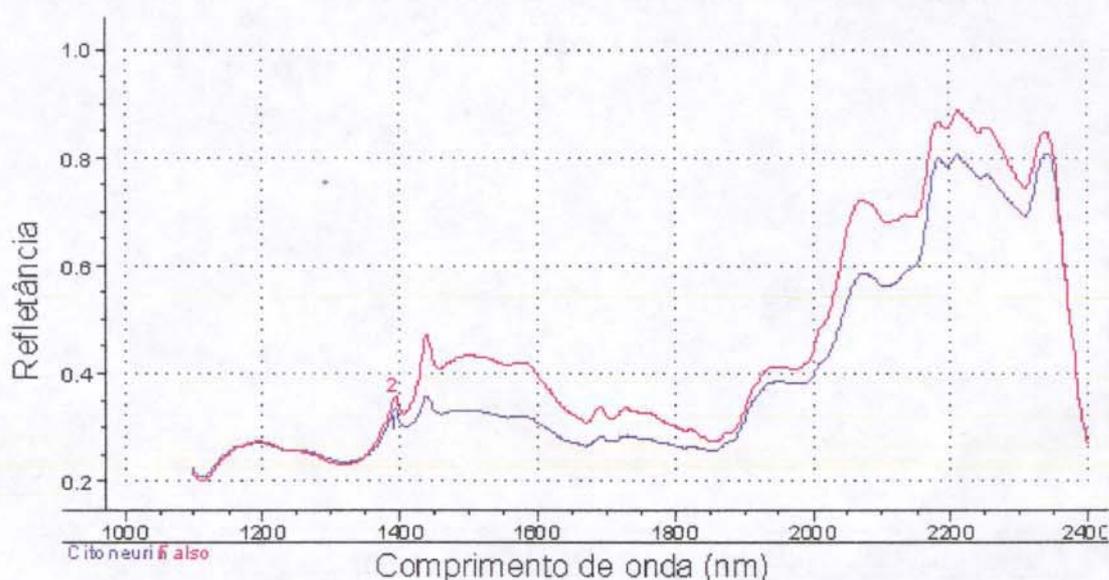


Figura 67. Espectros de refletância do medicamento Citoneurin verdadeiro (Azul) e falso (Rosa).

Pela observação dos espectros, é possível a verificação de diferenças espectrais pronunciadas entre medicamentos.

Foi construído um modelo PCA dos espectros do medicamento Citoneurin verdadeiro. Este modelo PCA utiliza 6 componentes principais (PC) para explicar 88% da variância dos dados. O modelo PCA construído, foi usado na classificação por SIMCA dos 10 espectros das amostras de Citoneurin falsificado e novas amostras de Citoneurin não incluídas no conjunto de amostras utilizadas para a construção do modelo PCA.

O resultado da classificação obtido, foi a classificação como pertencendo a classe padrão, de todas as amostras de Citoneurin verdadeiro e a classificação como não pertencendo das amostras falsas do medicamento. O resultado mostra que o produto contido na embalagem do medicamento Citoneurin falsificado não possui as características que permitam que ele seja classificado como pertencendo à classe padrão (medicamento Citoneurin verdadeiro), podendo assim, ser classificado como falso.

Uma classificação de novas amostras de Citoneurin verdadeiro e falso é mostrada no gráfico de S_1/S_0 x Leverage (H_i) da figura 68.

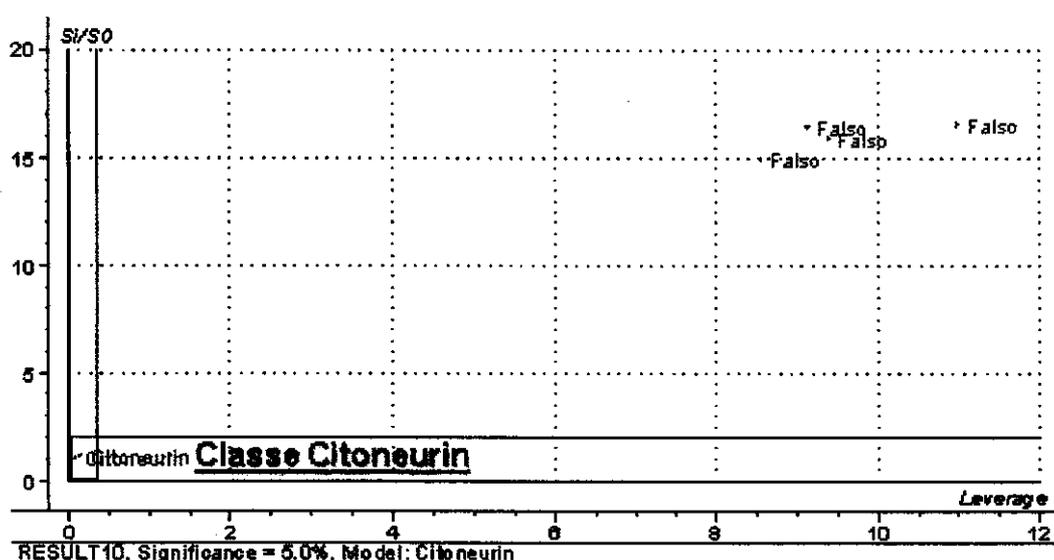


Figura 68. Gráfico de classificação SIMCA de amostras de Citoneurin verdadeiro e falso no modelo Citoneurin verdadeiro.

A ocorrência da classificação na classe padrão Citoneurin verdadeiro, de amostras de Melleril verdadeiros, e a não classificação de amostras do medicamento falsificado, mostram que medicamento analisado não possui as características do medicamento verdadeiro. Com isto, pode-se concluir que o medicamento analisado trata-se de uma falsificação.

O medicamento Tylenol é um medicamento que tem por princípio ativo o Paracetamol e é utilizado como analgésico e antitérmico. Este medicamento, apresentado em frascos de 15 ml na forma de líquido (gotas), possui 200 mg ml^{-1}

de Paracetamol. Além de, neste caso, ser o produto falsificado, a embalagem também apresentava problemas por ter sido apagada a inscrição “Amostra Grátis”, que caracteriza falsificação.

Com a utilização de uma sonda própria para amostras líquidas, foram obtidos 75 espectros de absorvância de amostras de 5 lotes de Tylenol verdadeiro que serviram como padrão do medicamento. Foram obtidos também, 10 espectros de amostras de Tylenol falsificado. A faixa espectral utilizada foi de 850 à 1.800 nm. Na figura 69 podem ser visualizados os espectros do medicamento Tylenol verdadeiro e falso.

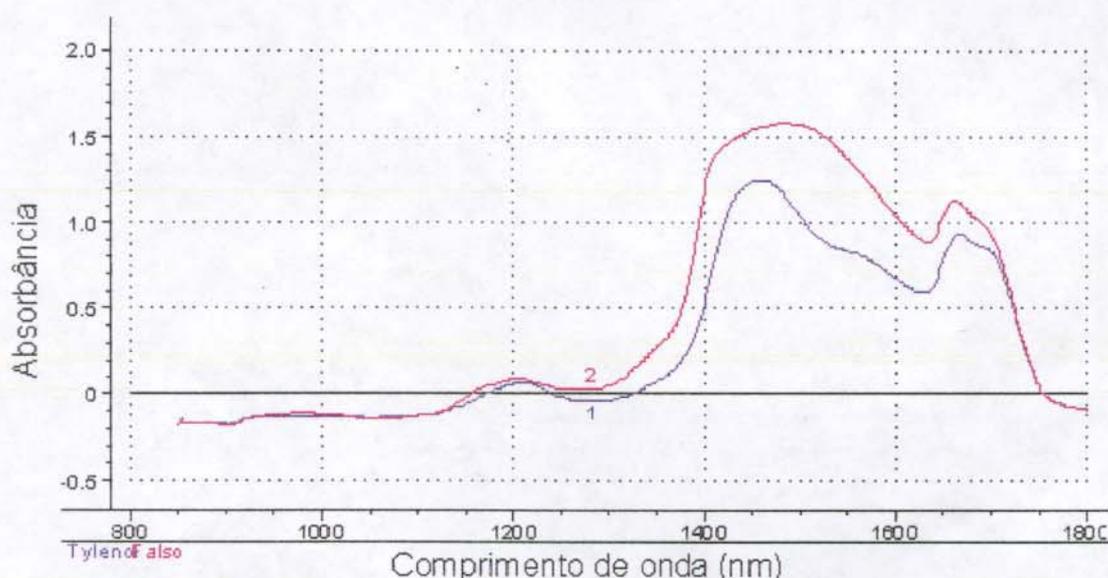


Figura 69. Espectros de refletância do medicamento Tylenol verdadeiro (Azul) e falso (Rosa).

Pela simples observação dos espectros, é possível a verificação de diferenças espectrais pronunciadas entre os medicamentos verdadeiros e falsos.

Para uma confirmação da não similaridade entre medicamentos, foi construído um modelo PCA dos espectros do medicamento Tylenol verdadeiro. O modelo PCA de Tylenol utiliza 2 componentes principais (PC) para explicar 98% da variância de seus dados. O modelo de Tylenol construído, foi usado na classificação por SIMCA de 10 espectros das amostras de Tylenol falsificadas e novas amostras de Tylenol verdadeiro.

O resultado obtido, foi a classificação, como pertencendo a classe padrão Tylenol, das amostras de Tylenol verdadeiro e a classificação como não pertencendo das amostras falsas. O resultado mostra que o produto contido na embalagem do medicamento Tylenol falsificado não possui as características que permitam que ele seja classificado como pertencendo à classe do medicamento Tylenol verdadeiro, podendo assim ser considerado como falso.

Uma classificação de novas amostras de Tylenol verdadeiro e falsificado é mostrada no gráfico de S_1/S_0 x Leverage (H_i) da figura 70.

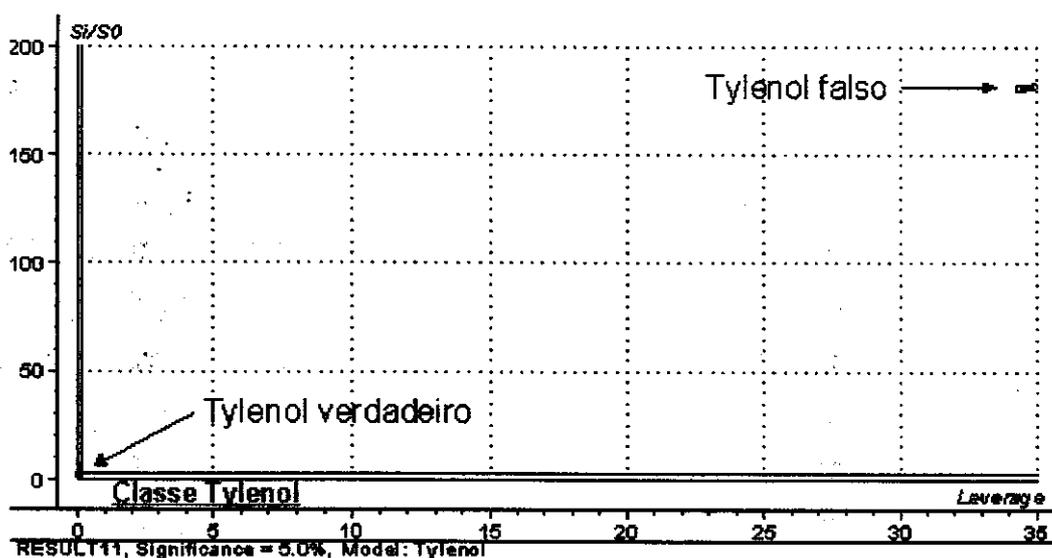


Figura 70. Gráfico de classificação SIMCA de amostras de Tylenol verdadeiras e falsas no modelo Tylenol verdadeiro.

Neste gráfico há a ocorrência da classificação na classe padrão Tylenol verdadeiro, de amostras de Tylenol verdadeiros, não havendo este fato para amostras do medicamento falsificado. Baseado nos resultado obtidos, pode-se concluir que o medicamento Tylenol analisado é um produto falso.

5. Conclusões

Este trabalho efetuou uma investigação detalhada do uso da espectroscopia na região do infravermelho próximo na identificação de medicamentos. A influência de parâmetros físicos da amostra e ambientais na obtenção dos espectros NIR foi avaliada, permitindo estabelecer a sua relevância. Observou-se que aspectos como a umidade e temperatura ambientes, posicionamento da amostra, sua geometria e granulometria devem ser considerados durante a obtenção dos espectros de refletância. De forma a assegurar a qualidade da análise, estes fatores, preferencialmente, devem ser mantidos constantes ou a sua variação deve ser considerada durante a construção do modelo.

A investigação feita mostrou resultados conclusivos para a aplicação da espectroscopia NIR na identificação de amostras reais cuja composição foi alterada, caracterizando a sua falsificação. Todas as amostras cuja falsificação se devia a alteração de composição do produto, foram corretamente classificadas como não pertencendo ao conjunto de espectros das amostras verdadeiras, o que permitiu a sua identificação como sendo um medicamento falsificado. Resultados conclusivos também foram obtidos na identificação de amostras reais de medicamentos cuja falsificação se deve a alteração da embalagem do produto, que possui em seu conteúdo, um medicamento verdadeiro. Todas as amostras cuja falsificação se devia a alteração da embalagem do produto, foram corretamente classificadas como pertencendo ao conjunto de espectros das amostras verdadeiras.

Além desta constatação, talvez a mais relevante deste trabalho, a investigação conduzida permite avaliar a potencialidade da espectroscopia NIR para o controle de qualidade de medicamentos ou a sua identificação como falso ou verdadeiro. Neste aspecto se destaca a capacidade derivada da técnica em distinguir medicamentos genéricos de referência ou de similares, quantificar o princípio ativo, verificar alterações de composição causadas por expiração do prazo de validade e realizar análises no interior da própria embalagem do medicamento.

A técnica NIR apresentou alta versatilidade não somente devido aos pontos acima abordados, mas também pela possibilidade, demonstrada de trabalhar com medicamentos nas suas mais variadas formas de apresentação: Sólido, pastas e líquidos. Em qualquer uma das formas, a espectroscopia NIR garante a obtenção de resultados rápidos e não destrutivos.

Os programas quimiométricos avaliados se revelaram suficientes para a utilização da espectroscopia NIR para a finalidade deste trabalho. Em vista da menor interferência do usuário necessária quando a técnica PCA/SIMCA é empregada, esta é recomendada quando comparada à técnica da Distância Crítica fornecida junto com o espectrofotômetro BRIMROSE. Esta última técnica, em vista de seu algoritmo poder ser executado à tempo real, imediata e automaticamente após a obtenção do espectro, possibilita uma maior agilidade na classificação da amostra.

A análise global dos resultados obtidos através das investigações feitas no decorrer deste trabalho permite concluir que a espectroscopia NIR apresenta alto potencial para ser empregada na fiscalização de fármacos. Obviamente, um programa real de fiscalização baseado nesta técnica deveria ser precedido de algumas medidas que somente poderiam ser implementadas através de organismos reguladores oficiais como a agência Nacional de Vigilância Sanitária. Estes organismos poderiam estabelecer os procedimentos necessários a construção da biblioteca de espectros NIR de medicamentos verdadeiros, obrigando os fabricantes a fornecerem lotes destes medicamentos e comunicarem qualquer alteração de composição, principalmente aquelas associadas aos excipientes. Desta forma uma biblioteca confiável estaria sempre disponível para a fiscalização.

Dos resultados obtidos neste trabalho, é possível sugerir um procedimento para a construção dos modelos dos medicamentos de referência e para sua utilização na verificação da autenticidade de uma amostra. Este procedimento pode ser observado na figura 71.

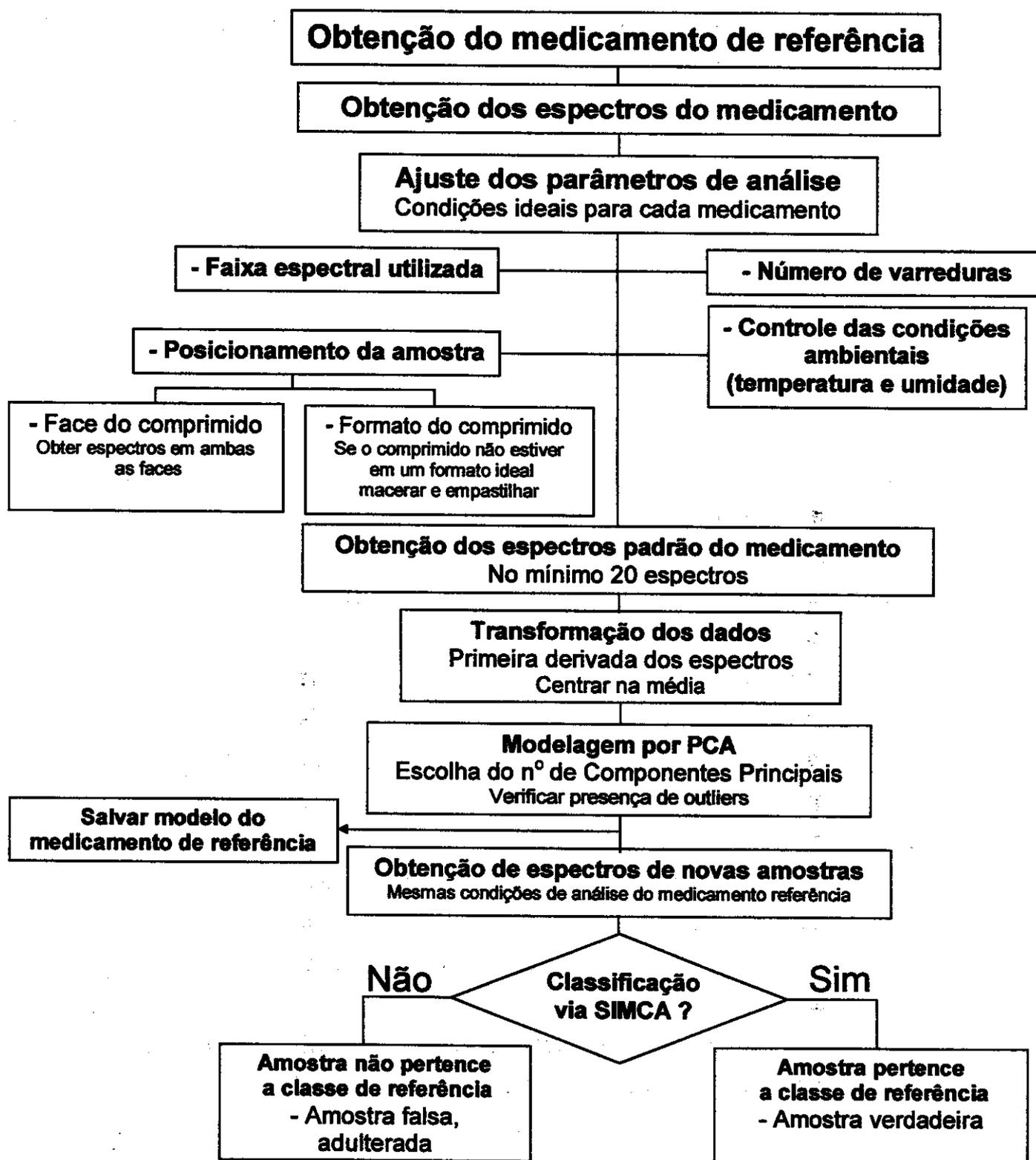


Figura 71. Diagrama proposto para a estratégia de utilização da espectroscopia NIR na identificação de medicamentos.

6. Referências Bibliográficas

- [1] Bokobza, L.; "Near Infrared Spectroscopy", *J. Near Infrared Spectrosc.*, **6**, (1998), 3-17.
- [2] Drennen, J.K., Kraemer, E.G. and Ladder, R.A., "Advances and perspectives in Near Infrared Spectrophotometry", *CRC-Critical Ver. In Anal. Chem.*, **22**, (1991), 443-475.
- [3] Barton, F.E. II, Himmelsback, D.S., Dukworth, J.J. and Smith, M.J., "2-Dimensional vibration spectroscopy – correlation of MID-Infrared and Near-Infrared regions", *Appl. Spectrosc.*, **46**, (1992), 420-429.
- [4] Wetzel, D.L., "Near Infrared Reflectance Analysis – Sleeper Among Spectroscopic Techniques", *Anal. Chem.*, **55**, (1983), 1165A-1176A.
- [5] Dominguez, L.m. and Seymor, S.K., in *Making Light Work: Advances in Near Infrared Spectroscopy*, Ed. Murray, I. and Cowe, I., VCH, Weinheim, **178**, (1992).
- [6] McClure, W.F., in *Making Light Work: Advances in Near Infrared Spectroscopy*, Ed. Murray, I. and Cowe, I., VCH, Weinheim, **1**, (1992).
- [7] Carrol, J.E., *Photonics Spectra*, March, (1995).
- [8] Workman, J.J.; Mobvley, P.R.; Kowalski, B.R. and Bro, R.; "Review of chemometrics applied to spectroscopy: 1985-95 .2.", *Appl. Spectroscopy Reviews*, **31**, (1996), 347-368.

- [9] Barges, N.; Conan, H. and Poisson, N.; "NIR Spectrophotometry: Qualitative and quantitative applications in pharmaceutical industry", *Analisis*, **26**, (1998), M43-M46.
- [10] Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; De la Pezuela, C.; "Quantification of the active compound and major excipients in a pharmaceutical formulation by near infrared diffuse reflectance spectroscopy with fibre optical probe", *Anal. Chim. Acta*, **333** (1996) 147-156.
- [11] Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; De la Pezuela, C.; "Strategies for constructing the calibration set in the determination of active principles in pharmaceuticals by Near Infrared reflectance Spectrometry", *Analyst*, **122** (1997) 761-765.
- [12] Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; De la Pezuela, C.; Russo, E.; "Control analysis of a pharmaceutical preparation by Near Infrared reflectance spectroscopy. A comparative study of a spinning module and fibre optic probe", *Anal. Chim. Acta*, **298**, (1994) 183-191.
- [13] Dreassi, E.; Ceramelli, G.; Corti, P.; Massacesi, M. and Perruccio, P. L.; "Quantitative Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy in the quality control of solid pharmaceutical formulations", *Analyst*, **120** (1995) 2361-2365.
- [14] Gerhäuser, C. I. and Kovar, K. A.; "Strategies for constructing Near Infrared Spectral libraries for the identification of drug substances", *Appl. Spectrosc.*, **51**, (1997), 1504-1510.
- [15] Creaser, C.S. and Davies A.M.C.; "*Analytical Applications of Spectroscopy*", Ed. The Royal Society of Chemistry, London, 1988.

- [16] Candolfi, A.; Massart, D.L.; Heuerding, S.; "Investigation of sources of variance which contribute to NIR spectroscopic measurement of pharmaceutical formulations", *Anal. Chim. Acta*, **345** (1997) 185-196.
- [17] Downey, G.; "Qualitative analysis in the Near Infrared region", *Analyst*, **119** (1994) 2367-2375.
- [18] Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S.; De la Pezuela, "Near Infrared Spectroscopy in pharmaceutical industry", *Analyst*, **123** (1998) 135R-150R.
- [19] Manual do Usuário "The Unscrambler 7.5", CAMO S.A., Noruega, 1998.
- [20] Dredáň, J. ; Zelkó, R. ; Antal, I. ; Bihari, E. e Rácz, I. ; "Effect of particle size and coating level on the diffuse reflectance of Wax matrices", *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, (1998) 139-142.
- [21] Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S.; Eustáquio, A.; "Analytical control of pharmaceutical production steps by Near Infrared reflectance Spectroscopy", *Analytica Chimica Acta*, **392** (1999) 237-246.
- [22] Eustaquio, A. ; Graham, P. ; Jee, R.D. ; Moffatt, A.C. e Trafford, A.D. ; "Quantification of Paracetamol in tablets using Near Infrared transmittance Spectroscopy", *Analyst*, **123**, (1998), 2303-2306.
- [23] Dempster, M.A. ; MacDonald, B.F. ; Gemperline, P.J. ; Boyer, N.R. ; "A Near Infrared reflectance analysis method for the noninvasive identification of film-coated and non-film-coated, blister-packed tablets", *Analytica Chimica Acta*, **310**, (1995), 43-51.

- [24] Aldridge, P.K. ; Mushinsky, R.F. ; Andino, M.M. e Evans, C.L. ; "Identification of tablet formulations inside blister packages by Near Infrared Spectroscopy", *Applied Spectroscopy*, **48**, (1994), 1272-1276.
- [25] Coene, M. ; "Identification of Tablets in blisters using Brimrose AOTF Free Space technology ", *Relatório Brimrose*, 1998.
- [26] McCreery, R.L. ; Horn, A.J. ; Spencer, J. ; Jefferson, E. ; "Noninvasive identification of materials inside USP vials with Raman Spectroscopy and a Raman spectral library", *J. Pharm. Sciences*, **87**, (1998), 1-8.
- [27] Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Serrano, D. ; "Near Infrared analytical control of pharmaceuticals. A single calibration model from mixed phase to coated tablets", *Analyst*, **123**, (1998), 2307-2312.
- [28] Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Eustaquio, A. ; "Development and validation of a method for the analysis of a pharmaceutical preparation by Near Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy", *J. Pharm. Sciences*, **88**, (1999), 551-556.
- [29] Skoog, D.A. and Leary, J.J. ; "*Principles of Instrumental Analysis*", Ed. Saunders College, 4 Ed., EUA, 1992.
- [30] Ribeiro, A.L.F.; "*Medicamentos Genéricos*", Publicação do CRF, São Paulo, 2000.
- [31] Coates, J. ; "Vibrational Spectroscopy. Instrumentation for Infrared and Raman spectroscopy", *Appl. Spectrosc. Rev.*, **33**, (1998), 267-425.

- [32] Guchardi, R. ; “Espectroscopia no Infravermelho Próximo com o uso de Filtro Óptico-Acústico Sintonizável. Instrumentação e Aplicações”, Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas –SP, 2000.