

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS E PROCESSOS
INDUSTRIAIS – MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CONTROLE
E OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS INDUSTRIAIS**

Elisangela Gonçalves Rivero

**AVALIAÇÃO DE MEDICAMENTOS INDUSTRIALIZADOS CONTENDO
ACICLOVIR ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA POR REFLEXÃO NO
INFRAVERMELHO E ANÁLISE MULTIVARIADA**

Santa Cruz do Sul, abril de 2009

Elisangela Gonçalves Rivero

**AVALIAÇÃO DE MEDICAMENTOS INDUSTRIALIZADOS CONTENDO
ACICLOVIR ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA POR REFLEXÃO NO
INFRAVERMELHO E ANÁLISE MULTIVARIADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas e Processos Industriais - Mestrado, Área de Concentração em Controle e Otimização de Processos Industriais, Universidade de Santa Cruz do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Sistemas e Processos Industriais.

Orientador: Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão

Co-orientador: Prof. Dr. Luciano Marder

Santa Cruz do Sul, abril de 2009

Elisangela Gonçalves Rivero

**AVALIAÇÃO DE MEDICAMENTOS INDUSTRIALIZADOS CONTENDO
ACICLOVIR ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA POR REFLEXÃO NO
INFRAVERMELHO E ANÁLISE MULTIVARIADA**

Esta Dissertação foi submetida ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas e Processos Industriais – Mestrado – Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Sistemas e Processos Industriais.

Dr. Marco Flôres Ferrão
Professor Orientador

Dr. Luciano Marder
Professor Co-orientador

Dra. Fabiana Ernestina Barcelos da Silva

Dr. Rubén Edgardo Panta Pazos

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelos talentos.

Aos meus pais, Nilton e Clea Rivero, que mesmo longe sempre me apoiaram, sendo exemplo de garra e perseverança, (sem vocês nada seria possível).

Ao meu amor, Juliano Noecir Benini, pela cumplicidade na busca de meus objetivos profissionais e pessoais.

Ao meu orientador prof. Dr. Marco Flôres Ferrão, pelo seu apoio, pela sabedoria transmitida e pela clareza da orientação sempre prestada no decorrer deste trabalho.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Luciano Marder, pela paciência, dedicação e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas e Processos Industriais, por me acompanharem nessa caminhada.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, pela colaboração nos experimentos realizados no laboratório.

RESUMO

No presente trabalho foram empregadas técnicas de reflexão no infravermelho em conjunto com análises estatísticas de dados multivariados, como a análise por componentes principais (PCA) e análise por agrupamentos hierárquicos (HCA). Foram adquiridas 25 amostras em creme contendo 5% de aciclovir, sendo 22 amostras adquiridas no mercado nacional e 3 amostras no mercado argentino. Inicialmente os espectros reflectância total atenuada no infravermelho médio (ATR/FTIR, do inglês Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflection) foram adquiridos na faixa de 4.000 a 650 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras, utilizando um acessório de reflectância total atenuada com cristal de seleneto de zinco (ZnSe) da PIKE Technologies acoplado a um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier NICOLET Magna 550. Os espectros foram obtidos em quintuplicata e normalizados na escala. Já para os espectros de ATR/NIR foram adquiridos na faixa de 10.001 a 2.001 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras, utilizando uma acessório de reflectância total atenuada com cristal de ZnSe da PIKE Technologies acoplado a um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Spectrum 400 MIR/NIR da PERKIN ELMER, cedido pela Perkin-Elmer, sendo obtido apenas um espectro para cada amostra. Finalmente, os espectros NIRA foram adquiridos em duplicata na faixa de 8.890 a 4.200 cm^{-1} utilizando o espectrômetro FT-IR Spectrum 400 MIR/NIR da PERKIN ELMER acoplado a um acessório para transreflectância no infravermelho próximo, utilizando um detector integrado de InGaAs estabilizado de alto desempenho. Os espectros obtidos foram tratados por algoritmos de análise multivariada, utilizando-se a Análise por Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) através do programa computacional PIROUETTE 3.11 da INFOMETRIX, visando verificar a similaridade entre as formulações dos diferentes fabricantes, lotes e classificação (medicamentos de referência, genéricos e similares). A aplicação destas técnicas por reflexão no infravermelho (ATR/FTIR, ATR/NIR e NIRA) junto às de análise multivariada (HCA e PCA), foram eficientes para desenvolver uma metodologia simples, rápida e não destrutiva para a análise dos cremes contendo aciclovir, tendo como principal vantagem em relação às

metodologias usuais a não geração de resíduos, sendo adequadas ao controle e inspeção de medicamentos industrializados.

Palavras-chave: aciclovir, espectroscopia por reflexão no infravermelho, espectroscopia por transfectância no infravermelho, análise multivariada.

ABSTRACT

In this work, the Infrared reflectance spectroscopy associated with multivariate analysis were used to analyses of pharmaceutical formulation containing acyclovir, a medicine chooses to treat herpes. There were acquired 25 ointment samples containing 5 % of acyclovir, in which it has acquired 22 samples of national market and 3 samples of Argentinean market. The ATR-FTIR spectra set was acquired in the 4,000 a 650 cm^{-1} range, with 4 cm^{-1} resolution and 32 scans, using an attenuated total reflectance accessory with a ZnSe crystal from PIKE Technologies attached to a NICOLET Magna 550 spectrophotometer. The ATR-NIR spectra set was acquired in the 10,001 to 2,001 cm^{-1} range, with a resolution of 4 cm^{-1} and 32 scans, using the total attenuated reflectance accessory with ZnSe crystal of Pike Technologies attached to a PERKIN ELMER Spectrum 400 MIR/NIR infrared spectrophotometer, and obtained only one spectrum of each sample. Finally, the NIRA spectra set was acquired in duplicate in the 8,890 to 4,200 cm^{-1} range, using the PERKIN ELMER Spectrum 400 MIR/NIR infrared spectrophotometer attached to a accessory to transfectance (NIRA), using a detector of InGaAS stabilized with high performance. The spectra obtained have been treated with computer tools of multivariate analyses, using the principal components analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) algorithms, treated with the PIROUETTE 3.11 of INFOMETRIX, aiming to verify the similarity between the different pharmaceutical industries, lots and type (medicines of reference, generic and similar). Independently of the classification of the medicine as generic, similar or reference, all samples from the same laboratory always clustered, indicating that generic and similar medicines from them present similar compositions, showing that it might be the same medicine with a different label. The application of this infrared techniques (ATR/FTIR, ATR/NIR and NIRA) with the multivariate analyses (PCA and HCA) have been efficient to develop simpler, faster and non-destructive methodologies for the analysis of ointments containing acyclovir commercialized in Brazil and Argentina, highlighting the potentiality of these techniques in the control and inspection of industrialized medicines in these countries.

Key-words: acyclovir, infrared spectroscopy, multivariate analysis.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Herpes labial: Edema e lesões vesiculosas agrupadas lábio superior | 17 |
| Figura 2 - Herpes zoster: Lesões vesiculosas | 17 |
| Figura 3 - Estrutura química da aciclovir | 18 |
| Figura 4 – Curva de concentração sérica vs. tempo, mostrando a elevação máxima de concentração e a área sob a curva | 20 |
| Figura 5 - Principais tipos de vibrações no infravermelho | 23 |
| Figura 6 - Esquema ilustrativo para o interferômetro de Michelson e do espectro resultante da aplicação da transformada de Fourier | 26 |
| Figura 7 - Representação da propagação da radiação infravermelha através do elemento de ATR | 30 |
| Figura 8 - Esquema da transflectância no infravermelho (NIRA) | 43 |
| Figura 9 - Regiões de espectros de amostra aciclovir aplicado HCA e PCA | 44 |
| Figura 10 - Dendrograma dos sinais de espectros ATR/FTIR para 25 amostras de aciclovir creme | 46 |
| Figura 11 - Dendrograma fornecido pela HCA para o grupo destacado em verde | 47 |
| Figura 12- Dendrograma fornecido pela HCA para o grupo destacado em vermelho | 48 |
| Figura 13 - Dendrograma fornecido pela HCA para o grupo destacado em azul | 49 |
| Figura 14 - Dendrograma fornecido pela HCA para o grupo destacado em rosa | 50 |
| Figura 15 - Gráfico dos escores para a PCA dos espectros ATR/FTIR | 51 |
| Figura 16 - Dendrograma dos sinais de espectros ATR/NIR para 25 amostras de aciclovir creme | 53 |
| Figura 17 - Gráfico dos escores para a PCA dos espectros ATR/NIR | 54 |

| | |
|---|----|
| Figura 18- Dendrograma dos sinais de espectros NIRA para 22 amostras de aciclovir creme | 56 |
| Figura 19 - Gráfico dos escores para a PCA dos espectros NIRA | 58 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Codificação dos medicamentos contendo aciclovir..... | 42 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

ATR - Reflectância total atenuada, do inglês attenuated total reflectance.

ATR/FTIR - Reflectância total atenuada no infravermelho médio com transformada de Fourier, do inglês Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance.

ATR/NIR - Reflectância total atenuada no infravermelho próximo, do inglês attenuated total reflectance near infrared.

BPF - Boas Práticas de Fabricação.

CP - Componente principal.

DNA - Ácido desoxirribonucléico, do inglês desoxyribonucleic acid.

DOSC - Correção do sinal ortogonal.

dp - Profundidade de penetração.

DRIFTS - Espectroscopia por reflexão difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier, do inglês diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy.

FT-IR - Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier, do inglês Fourier transform infrared spectroscopy.

HCA - Análise por agrupamentos hierárquicos, do inglês hierarchical cluster analysis.

ICP-OES - Espectroscopia de emissão óptica.

MIR - Infravermelho médio, do inglês mid infrared.

MSC - Correção do sinal multiplicativo.

NIRA - Transflexão no infravermelho próximo.

NIRS ou NIRR - Espectroscopia por reflexão no infravermelho próximo, do inglês near infrared reflectance spectroscopy.

PAT - Processo analítico tecnológico, do inglês process analytical technology.

PCA - Análise por componentes principais, do inglês principal component analysis.

PCR - Regressão por componentes principais, do inglês principal component regression.

PLS - Mínimos quadrados parciais, do inglês partial least squares.

RSD - Desvio padrão relativo.

SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês Acquired Immunodeficiency Syndrome.

SDV - Decomposição do valor singular.

SNV - Variação normal padrão.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1 OBJETIVOS..... | 16 |
| 1.1 Objetivo geral..... | 16 |
| 1.2 Objetivos específicos..... | 16 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 17 |
| 2.1 Aciclovir..... | 18 |
| 2.2 Mecanismos de ação e dosagem..... | 18 |
| 2.3 Biodisponibilidade e bioequivalência | 19 |
| 2.4 Espectroscopia no infravermelho..... | 21 |
| 2.4.1 Principais técnicas de reflexão no infravermelho..... | 27 |
| 2.5 Análise multivariada..... | 31 |
| 2.5.1 Tratamento e pré-processamento dos dados..... | 32 |
| 2.5.2 Análise por agrupamentos (HCA)..... | 33 |
| 2.5.3 Análise por componentes principais (PCA)..... | 35 |
| 2.6 Aplicação do NIR na análise de medicamentos..... | 37 |
| 2.7 Infravermelho e análise multivariada na identificação de medicamentos.... | 37 |
| 3 METODOLOGIA..... | 42 |
| 3.1 Amostragem..... | 42 |
| 3.2 Aquisição dos espectros..... | 43 |
| 3.3 Modelagem dos espectros..... | 44 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 46 |
| 4.1 Resultados para o conjunto de espectros ATR/FTIR..... | 46 |
| 4.2 Resultados para o conjunto de espectros ATR/NIR..... | 52 |
| 4.3 Resultados para o conjunto de espectros NIRA..... | 55 |

| | |
|------------------|----|
| CONCLUSÕES..... | 59 |
| REFERÊNCIAS..... | 60 |
| ANEXO A | 64 |

INTRODUÇÃO

O aumento do número de laboratórios que produzem medicamentos vem causando uma preocupação em relação ao controle de qualidade, pois medicamentos fora de suas especificações podem proporcionar risco ao paciente, em especial, se este não for de procedência adequada ou estiver fora das especificações desejadas. Isto ocorre devido à substituição do medicamento pelo placebo, que não contém a substância ativa, ou por redução na quantidade da substância ativa, o que diminui, ou anula a ação medicamentosa. Por isso, é necessário haver um controle de qualidade do produto desde sua fabricação até o consumidor final.

O controle de qualidade em indústrias farmacêuticas faz parte de um conjunto de ações denominadas Boas Práticas de Fabricação (BPF), dirigida no sentido de diminuir os riscos inerentes a cada etapa do processo e podem ser divididas em duas etapas bem características: o controle de qualidade da formulação durante o processo de produção e o controle de qualidade do produto final. Para as duas etapas, há exigência, por parte dos órgãos reguladores, de métodos de análise confiáveis e robustos e que possam ser utilizados na rotina para assegurar a qualidade do produto final (BRASIL, 2003).

Neste sentido o uso de técnicas analíticas modernas é capaz de determinar a composição do fármaco, de forma qualitativa ou quantitativa, sendo muito utilizadas em indústrias com o objetivo de controlar a qualidade destes.

Por outro lado, o desenvolvimento de métodos alternativos que possam ser utilizados em controle de processos são úteis, uma vez que substituem uma das etapas no controle desses produtos, permitindo a determinação, em menor tempo, e reduzindo os custos referentes ao consumo de reagentes (TREVISAN & POPPI, 2006).

O presente trabalho justifica-se pelo estudo de metodologias analíticas capazes de analisar medicamentos inferindo sobre as diferenças e semelhanças nas formulações, viabilizando a possível falsificação e alteração ou redução na quantidade da sua substância ativa.

Para tanto foram desenvolvidas metodologias de análise para o aciclovir, fármaco empregado no tratamento do herpes, baseadas na reflexão no infravermelho, constituindo-se em métodos rápidos e eficientes, que apresentam resultados adequados e necessitam uma pequena quantidade de amostra. Além disto, são aplicadas análises estatísticas de dados multivariados (análise quimiométrica), como a análise por componentes principais (PCA) e análise por agrupamentos hierárquicos (HCA), cujos resultados permitem inferir sobre a similaridade das formulações farmacêuticas comercializadas nos mercados nacional e argentino.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo verificar a similaridade diferentes formulações de medicamentos contendo aciclovir na forma creme, empregando espectros de reflexão no infravermelho em associações com as técnicas de análise por componentes principais (PCA) e análise por agrupamentos hierárquicos (HCA).

1.2 Objetivos específicos

a) Empregar a espectroscopia por reflectância total atenuada no infravermelho médio com transformada de Fourier (ATR/FTIR) para construção de métodos alternativos para comparar as diferentes formulações de aciclovir em medicamentos comercializados;

b) Avaliar a semelhança entre as diversas formulações de aciclovir comercializadas no Brasil (medicamentos de referência, similares e genéricos) empregando PCA e HCA;

c) Comparar os dados obtidos por espectroscopia no infravermelho médio (ATR/FTIR) com dados obtidos por espectroscopia no infravermelho próximo como NIRA e ATR/NIR.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Herpes é uma doença que aparece e desaparece sozinha, dependendo de certos fatores como estresse, cansaço, esforço exagerado, febre, exposição ao sol, traumatismo e menstruação. Existem dois tipos de herpes: o simples, mais comum, que aparece esporadicamente e não tem cura, o herpes zoster que ataca apenas uma vez e imuniza a pessoa. Nas Figuras 1 e 2 podem ser observados exemplos de lesões causadas por herpes (Herpes labial e Herpes Zoster).

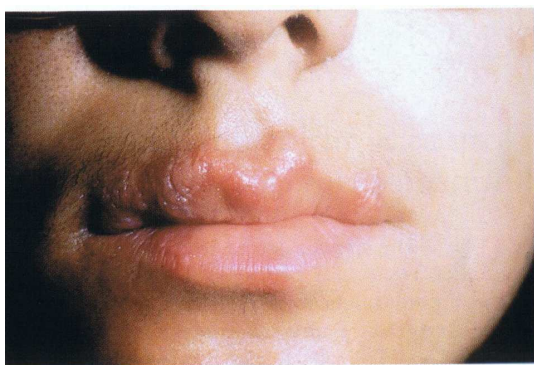


Figura 1 :Herpes Labial: Edema e lesões vesiculosas agrupadas lábio superior

Fonte: LUPI, O. (2000, p.233-54).



Figura 2: Herpes Zoster: Lesões vesiculosas

Fonte: LUPI, O. (2000, p.233-54).

O vírus do herpes simples, Herpesvirus hominis, determina quadros variáveis benignos ou graves. É uma doença universal. Há dois tipos de vírus: tipo-1, responsável por infecções face e tronco, e o tipo-2, relacionado às infecções na genitália e de transmissão geralmente sexual. O herpes genital ocorre o aparecimento de vesículas agrupadas, aparecem no pênis, vulva ou ânus. O quadro pode ser acompanhado de febre, cefaléia e linfadenopatia. Entretanto ambos podem infectar qualquer área da pele e mucosa (SAMPAIO, 2001).

Dentre os medicamentos disponíveis para “tratar” o herpes, encontra-se o aciclovir que é amplamente comercializado no Brasil e no mundo.

2.1 Aciclovir

O aciclovir é o protótipo dos fármacos anti-herpédicos. Apresenta maior especificidade do que outros medicamentos utilizados para o vírus do herpes. Os vírus herpes simples tipos 1 e 2, o vírus zoster da varicela e algumas infecções mediadas pelos vírus Epstein-Barr são sensíveis ao aciclovir. O uso mais comum do aciclovir é no tratamento das infecções genitais por herpes. Também é administrado profilaticamente em pacientes soropositivos antes do transplante de medula óssea e após transplantes cardíacos para proteger os indivíduos durante o tratamento imunossupressor pós-transplante (HOWLAND & MYCEK, 2007).

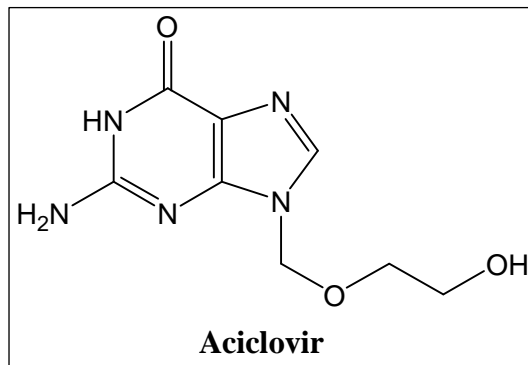


Figura 3 – Estrutura química do aciclovir

Fonte: Farmacopéia Brasileira (2002, p. 172).

2.2 Mecanismo de ação e dosagem

O mecanismo de ação do aciclovir ocorre pela ação catalítica das timidinoquinases dos vírus herpes simples e varicela zoster, às quais o fármaco se liga 200 vezes mais firmemente que à enzima celular. O aciclovir é convertido em monofosfato de aciclovir, um nucleotídeo, que é convertido ao difosfato pela guanilato-quinase e ao trifosfato por várias enzimas celulares. O trifosfato interfere com a polimerase do vírus citado e inibe a replicação do DNA, o que provoca a morte do vírus. Esta ação é seletiva e para inibir o crescimento das células do hospedeiro seria necessária uma concentração 3.000 vezes maior que a atingida no vírus (KOROLKOVAS, 2003).

Este quimioterápico antiviral (aciclovir), quando administrado por via oral, é parcialmente absorvido pelo trato gastrointestinal e sua absorção não é significativamente afetada pelo alimento. Amplamente distribuídos aos tecidos e fluidos orgânicos, possui uma baixa ligação às proteínas plasmáticas (9 - 33%), atravessa a barreira placentária, sofre biotransformação hepática, dando um metabólito inativo, excretada quase totalmente pela urina, por filtração glomerular e secreção tubular (KOROLKOVAS, 2003).

O medicamento aciclovir é comercializado na forma de comprimidos, pomadas, cremes e soluções injetáveis. Segundo a Anvisa estão disponíveis no mercado nacional apresentações classificadas como medicamento genérico, medicamento similar e medicamento de referência.

2.3 Biodisponibilidade e Bioequivalência

Após a administração oral de um medicamento, os dados resultantes da coleta e análise do conteúdo do fármaco em amostras sanguíneas em intervalos determinados compõem um gráfico (Figura 4) que produz o tipo de curva de concentração de fármaco. O eixo vertical mostra a concentração sanguínea (sérica ou plasmática) e o eixo horizontal representa o tempo em que as amostras foram obtidas depois da administração (ANSEL *et al.*, 2000; SHARGEL *et al.*, 2004).

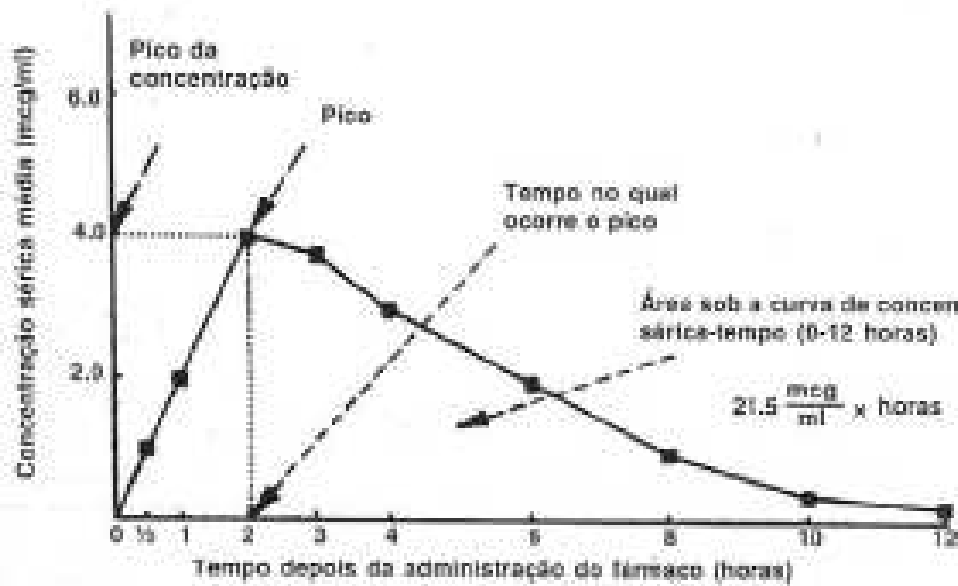


Figura 4 – Curva de concentração sérica vs. tempo, mostrando a elevação máxima de concentração e a área sob a curva

Fonte: (ANSEL *et al.*, 2000).

No momento que o fármaco é administrado por uma via não sistêmica (tempo zero) a concentração sanguínea também deve ser zero. Quando passa pelo estômago e/ou o intestino, no caso da via oral, é liberado na forma farmacêutica e finalmente se dissolve e é absorvido. Conforme a amostragem e a análise prosseguem, as amostras sanguíneas revelam concentrações crescentes do fármaco até que a concentração máxima seja atingida. A seguir a concentração do fármaco do sangue diminui progressivamente e, se não forem administradas outras doses, no final cai para zero. Esta diminuição indica que a velocidade de eliminação do fármaco da corrente sanguínea é maior que a de absorção para o sistema circulatório. No entanto, a absorção não termina depois da concentração máxima ser atingida, podendo continuar por um certo período. De modo similar o processo de eliminação é contínuo (ANSEL *et al.*, 2000; SHARGEL *et al.*, 2004).

Para os produtos considerados equivalentes farmacêuticos, o primeiro objetivo é demonstrar a equivalência terapêutica de um medicamento em relação ao seu

medicamento de referência, o que normalmente pode ser feito por meio da determinação do nível sanguíneo do fármaco e excreção na urina (ANVISA, 2009).

Em relação ao medicamento de referência, o produto inovador registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializado no País, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao órgão federal competente, por ocasião do registro. Para ser considerado genérico, a forma farmacêutica proposta deve ser equivalente ao produto farmacêutico e bioequivalente ao de referência. Sendo que, equivalentes farmacêuticos são aqueles produtos que têm a mesma substância ativa, na mesma quantidade, com forma farmacêutica, via de administração e rotulagem similares. Devem atender os mesmos padrões de qualidade, como aqueles existentes na United States Pharmacopeia (USP), e serem produzidos segundo as diretrizes de BPF (ANVISA, 2009).

Em relação aos medicamentos similares, segundo a ANVISA, são aqueles que contêm a mesma ou as mesmas substâncias ativas e apresentam a mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, preventiva ou diagnóstica do medicamento de referência registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária, podendo diferir somente em características relativas ao tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca (ANVISA, 2009).

2.4 Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho é uma das técnicas analíticas mais importantes, pois sua área de aplicação envolve medicamentos, identificação de compostos orgânicos e inorgânicos, análise de misturas complexas, entre outras.

A energia do infravermelho corresponde à região do espectro eletromagnético situada na faixa de ondas entre $14.290-200\text{ cm}^{-1}$. O infravermelho próximo, de $14.290-4.000\text{ cm}^{-1}$, com aplicação principalmente em análises quantitativas de amostras de matrizes complexas, é o que tem recebido mais atenção nestes últimos anos. Já a faixa do infravermelho médio ($4.000-400\text{ cm}^{-1}$) é preferencialmente utilizada na análise qualitativa e na avaliação da pureza de muitas substâncias, em especial das substâncias ativas empregados nos medicamentos (BARBOSA, 2007).

A absorção da radiação no infravermelho está restrita a espécies moleculares que apresentam pequena diferença de energia entre os diversos estados vibracionais ou rotacionais, já que não possui energia suficiente para promover transições eletrônicas como radiação ultravioleta ou visível. Portanto para que uma molécula absorva radiação no infravermelho é necessário que exista alteração no momento dipolo elétrico como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional, resultando em absorção de energia radiante (SKOOG *et al.*, 1998).

Dois tipos principais de vibrações podem ocorrer a partir da absorção da radiação no infravermelho: deformações axiais (estiramento) e deformações angulares. Uma vibração de deformação axial consiste na mudança contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos, aumentando e diminuindo alternadamente, podendo ser de dois tipos: estiramento simétrico (ν_{as}) que provoca um movimento harmônico da distância interatômica e o estiramento assimétrico (ν_{as}) que promove um movimento desarmônico da distância interatômica. As vibrações de deformação angular consistem na mudança do ângulo entre duas ligações, podendo ser classificadas em quatro tipos de vibrações fundamentais (que apresentam denominações características em relação ao movimento): deformação angular simétrica no plano (ρ ; balanço) e fora do plano (ω , sacudida), e deformação angular assimétrica (δ , tesoura) e fora do plano (τ , torção), (SKOOG *et al.*, 1998), Figura 5.

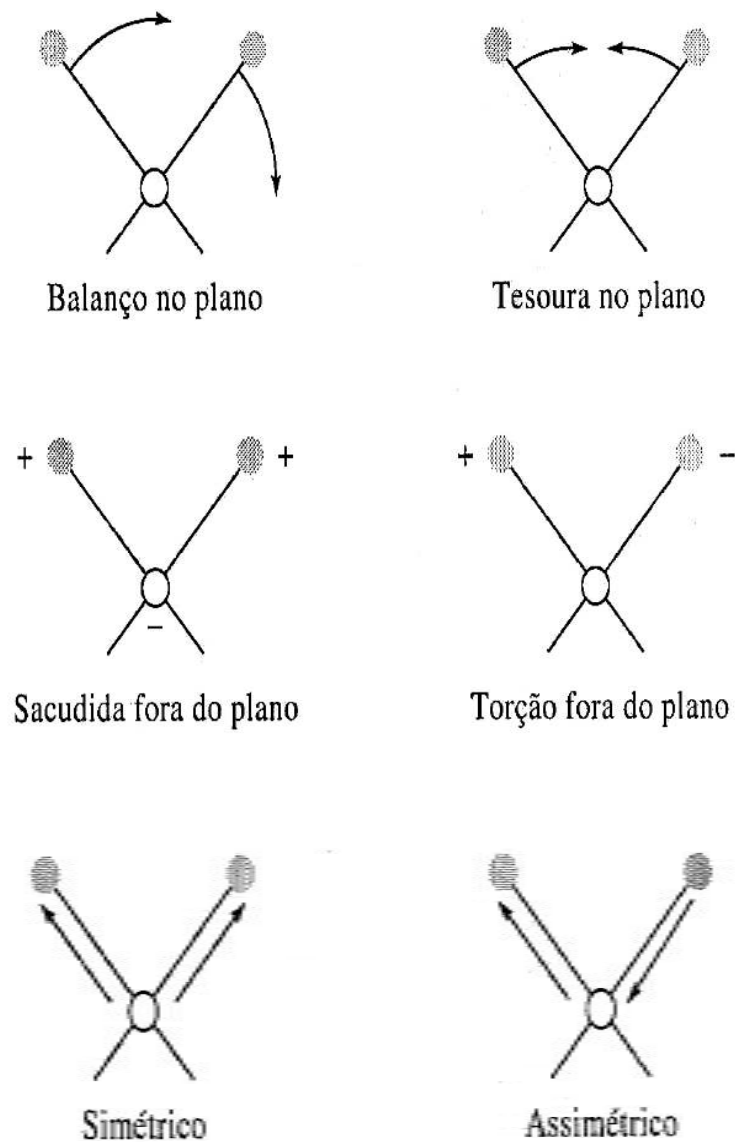


Figura 5: Principais tipos de vibrações no infravermelho.

Fonte: SKOOG *et al.*, 1998

A combinação da transformada de Fourier e da nova geometria dos espectrofotômetros com a utilização do interferômetro de Michelson vem contribuindo para o avanço da espectroscopia no infravermelho médio como técnica para análise quantitativa.

Os princípios do interferômetro de Michelson, tanto para as aquisições de espectros realizadas na região do infravermelho médio, quanto nas análises que

empregam a região do infravermelho próximo, estão sendo amplamente empregados em vários trabalhos (FERRÃO, 2001).

Uma experimentação recente da técnica foi apresentado no trabalho de Sabin *et al.*(2003), no qual foi aplicado para a identificação de diferentes concentrações de fármacos antidepressivos, obtendo resultados satisfatórios.

Outra aplicação recente é a identificação de diferentes formulações de medicamentos manipulados contendo piroxicam, empregando espectros de reflexão difusa no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFTS), em associação com a técnica de HCA. Onde os resultados demonstram que a técnica de DRIFTS em conjunto com HCA constituiu uma alternativa para o controle de qualidade dos processos de produção de medicamentos (PARISOTTO *et al.*, 2005).

O uso dos espectros de reflexão difusa no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFTS), junto a análises quimiométricas podem ser empregados como alternativa na dosagem de diclofenaco de potássio, agregando como vantagens frente aos métodos usuais, a não geração de resíduos, a fácil realização de análise e baixo custo operacional (SOUZA & FERRÃO, 2006).

O interferômetro de Michelson (Figura 6) consiste basicamente em dois espelhos planos posicionados perpendicularmente um ao outro, sendo um deles fixo e o outro móvel. Um espelho semitransparente (denominado separador de feixes) é alinhado com a fonte de radiação. Esse separador é formado por um material tal que, quando a radiação o atinge, 50% é transmitido para o espelho móvel e 50% é refletida no espelho fixo. Os dois raios são refletidos por esses espelhos, retornando ao separador de feixes, onde se recombina e sofre interferência. É claro que novamente 50% da radiação que chega ao divisor de feixe é refletida em direção à fonte. O raio que emerge do separador de feixe em direção à amostra, e em seguida ao detector, é denominado de radiação transmitida. O movimento do espelho produz uma diferença de caminho óptico nos dois braços do interferômetro,

conhecido como retardo óptico (α). O retardo óptico é igual a duas vezes x ($\alpha = 2x$), sendo x a distância deslocada pelo espelho. Isso ocorre uma vez que a radiação tem uma distância adicional x para alcançar o espelho e outra distância x , para retornar ao ponto onde o espelho se encontrava antes de se mover (BARBOSA, 2007).

Após a construção do interferograma, utilizam-se procedimentos matemáticos, a FT para obtenção de um espectro convencional, passível de interpretação (BARBOSA, 2007; VOORT, 1992). A partir do tratamento matemático do sinal pela FT, os espectros apresentam melhor razão sinal-ruído, sendo obtidos em poucos segundos, com maior resolução e precisão nas medidas de número de ondas (HARRIS, 1999).

Espectros que operam na região do infravermelho médio podem fornecer espectros a partir de dois modos distintos relacionados à forma como a radiação atinge a amostra: transmissão ou reflexão (BARBOSA, 2007)

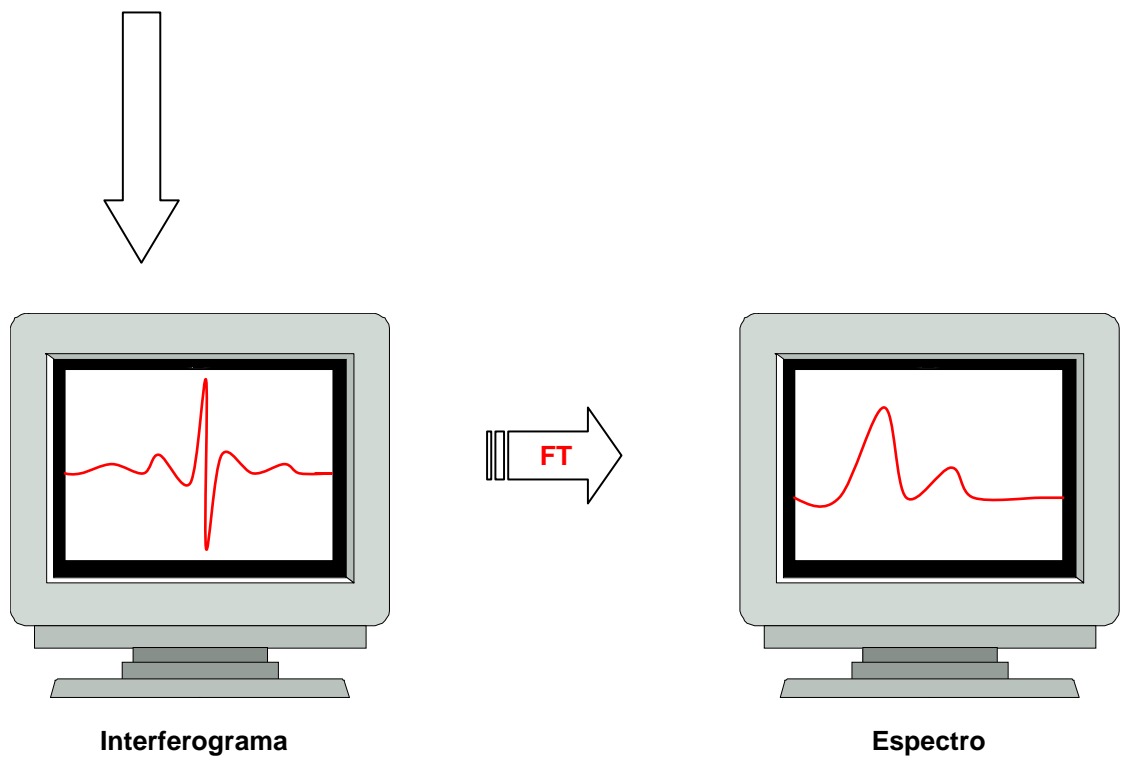
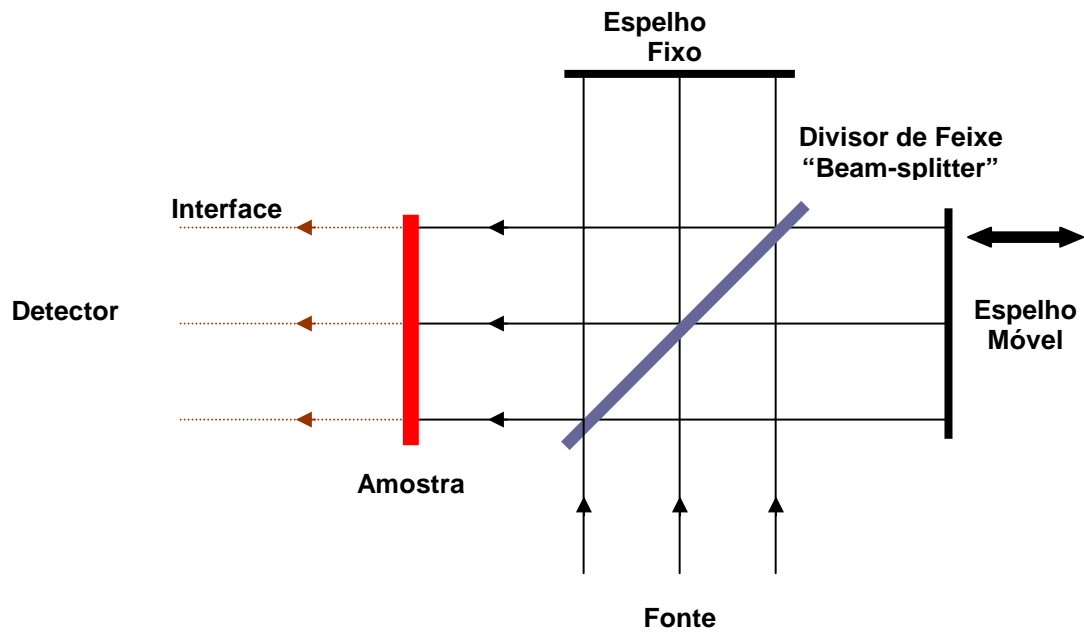


Figura 6 - Esquema ilustrativo para o interferômetro de Michelson e do espectro resultante da aplicação da transformada de Fourier. (adap. ref: VOORT, 1992)

2.4.1 Principais técnicas de reflexão no infravermelho

Segundo a maioria dos autores (BARBOSA, 2007), três métodos de reflexão no infravermelho têm apresentado aplicações práticas na aquisição de espectros que contenham informações químicas de determinada matriz. São eles: o método por reflexão especular (ou externa); o método por reflexão difusa (DRIFTS); e o método por reflexão total atenuada (ATR).

a) Reflexão especular

Esta técnica não é muito popular em espectroscopia no infravermelho, pois há de se considerar o seu potencial de utilização, uma das razões está na forma dos espectros que, em geral, são muito diferentes daqueles quando os espectros são visualizados no formato de transmitância ou absorbância.

As aplicações mais comuns do método de reflexão especular envolvem estudos diretos de filme, revestimentos de superfície, contaminantes de superfícies diversas, incluindo metais. Essas medidas são denominadas de transfectância ou absorção reflexão. A radiação passa pela amostra duas vezes, uma, ao penetrar na amostra e outra, ao ser refletida. Isto resulta em um espectro duas vezes mais intenso do que o obtido pelo método de transmitância normal, através de um filme (BARBOSA, 2007).

b) Reflexão difusa

A aplicação dessa técnica tem sido realizada associada aos equipamentos que operam no infravermelho próximo, geralmente designada de espectroscopia de reflexão no infravermelho próximo (NIRS ou NIRRR); ou associada àqueles que operam na região do infravermelho médio, sendo conhecida por espectroscopia por reflexão difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier (DRIFTS, do inglês diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy).

A espectroscopia por refletância difusa é, em geral, observada em amostras sólidas pulverizadas, sendo sua aplicação muito difundida na literatura. Ela pode ser utilizada em equipamentos que operam na região do infravermelho próximo (OSBORNE & FEARN, 1986; STARK *et al.*, 1986; WILLIAM & NORRIS, 1987; PASIKATAN *et al.*, 2001; PASQUINI, 2003).

Observa-se a refletância difusa quando uma luz incide em uma matriz descontínua, penetra na amostra (pó, sólido, placa ou filme) e reflete trazendo informações espectrais. O caminho percorrido pela luz no interior da matriz pode ser considerado aleatório devido a múltiplas reflexões. Algumas destas reflexões, após percorrerem o interior de algumas partículas, constituem a amostra. Desta forma, a luz refletida pode ser atenuada por absorção e o espectro resultante é similar ao obtido através da técnica no infravermelho por transmissão utilizando brometo de potássio (KBr).

Uma importante diferença se dá entre a transmissão e a refletância devida ao diferente caminho óptico percorrido pela luz. Enquanto que na transmissão o caminho óptico é constante para todo número de onda, na refletância, por sua vez, o caminho pode ser variável. Em regiões do espectro onde a amostra absorve fracamente a luz, penetra mais fundo na matriz e o contrário acontece quando há forte absorção. Portanto, ao se comparar o espectro obtido por transmissão (pastilhas de KBr) com o obtido por refletância, as intensidades relativas das bandas serão diferentes. Por exemplo, as bandas fracas no espectro da transmissão aparecem mais fortes na refletância.

É importante salientar que em um experimento de refletância difusa será observada também a reflexão especular, sendo a mais importante aquela que ocorre na interface da superfície da matriz. Ela também ocorre nas faces das partículas, mas o efeito pode ser minimizado pela redução do tamanho da partícula. A reflexão especular é de maior intensidade na região onde a amostra apresenta forte

absorção e, neste caso, podem ocorrer severas distorções no espectro obtido (FERRÃO, 2001).

Deve-se ressaltar a diferença marcante entre infravermelho médio e próximo. No infravermelho próximo, as distorções nos espectros são quase que imperceptíveis, enquanto que no infravermelho médio, são mais frequentes. Uma maneira de contornar esse efeito indesejado é diluindo as amostras numa matriz não-absorvente, como KBr (OLINGER & GRIFFITHS, 1993; PASIKATAN *et al.*, 2001).

c) Reflexão total atenuada (RTA ou ATR)

A reflexão total atenuada (ATR), por sua vez, é uma técnica de amostragem rápida que requer uma mínima preparação da amostra e, além disso, apresenta fácil obtenção de espectros de materiais espessos e fortemente absorventes e difíceis de serem analisados através da espectroscopia por transmissão (OLINGER & GRIFFITHS, 1993).

Esta técnica caracteriza-se pelas múltiplas reflexões de radiação infravermelha que ocorrem no interior de cristais, de materiais com alto índice de refração como, por exemplo, o seleneto de zinco (ZnSe), interagindo apenas com a amostra que estiver superficialmente no cristal (FERRÃO, 2001).

O princípio deste tipo de espectroscopia baseia-se na ocorrência de reflexão com a passagem de um feixe de radiação de um meio mais denso (cristal de ATR) para um menos denso (amostra). A fração do feixe de luz incidente refletida aumenta de forma direta e progressiva ao ângulo de incidência. A reflexão torna-se completa quando excede um determinado ângulo crítico. Conforme observações experimentais, no ponto de reflexão, o feixe atua como se penetrasse uma pequena distância dentro da amostra (Figura 7). A profundidade de penetração (d_p) é dada pela equação 1:

$$dp = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \left[\sin^2 \theta_i - \left(\frac{n_3}{n_2} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}} \quad (1)$$

onde: n_1 = índice de refração (cristal ATR); n_3 = índice de refração (amostra); θ_i = o ângulo de incidência; λ = o comprimento de onda da radiação.

A radiação de penetração é chamada de onda evanescente. Se a amostra absorve determinado comprimento de onda evanescente, há uma atenuação do feixe ao comprimento de ondas e que corresponde às bandas de absorção no infravermelho. É em função deste mecanismo que surge o espectro

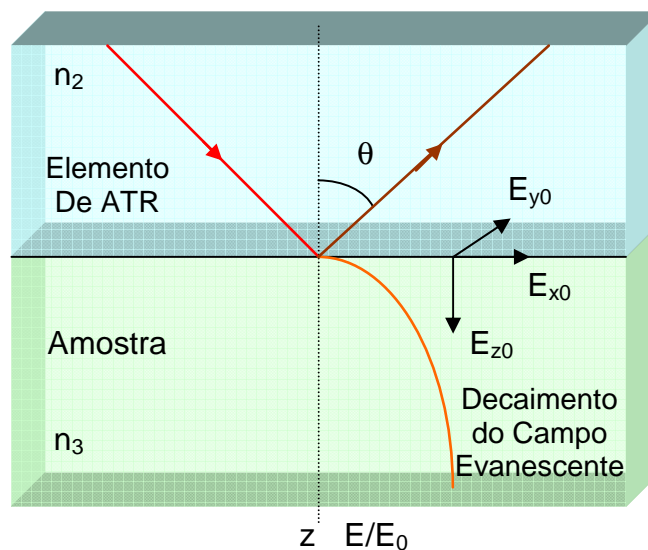


Figura 7 - Representação da propagação da radiação infravermelha através do elemento de ATR. **Fonte:** (Adap. Mirabella,1985) .

A dificuldade de obter-se uma boa reprodutibilidade no contato da amostra com o elemento de ATR é um fator de limitação dessa técnica. Isto é observado na variação da intensidade das bandas com a pressão aplicada. Conforme a pressão empregada, aumenta-se a eficiência de contato e, por conseguinte, as intensidades

das bandas. Um outro fator que influencia na intensidade das bandas para uma boa reprodutibilidade é a área de contato entre o cristal e a amostra. Para aferirem-se as medidas quantitativas deve-se colocar toda a área do cristal em contato com a amostra (FERRÃO, 2001).

2.5 Análise multivariada

A análise multivariada é a rigor, qualquer abordagem analítica que considere o comportamento de duas ou mais variáveis simultaneamente, num vasto campo do conhecimento que envolve uma grande multiplicidade de conceitos estatísticos e matemáticos (PEREIRA, 1999). Essa área da quimiometria desenvolve ferramentas computacionais que permitem explorar os resultados obtidos por meio de análises químicas, a fim de verificar a existência de similaridades entre as amostras que, por sua vez, correspondem às semelhanças na composição (CORREIA & FERREIRA, 2007).

Na análise multivariada a representação gráfica de todo o conjunto de dados facilita a interpretação dos resultados. Trabalha-se com os algoritmos para a realização das análises e para elaboração destes gráficos.

Os métodos de análise multivariada aplicados na modelagem de informação química fazem parte da área da quimiometria e são assim denominados, pois no caso da espectroscopia permitem manipular dados de absorbância espectrais associados a uma ou mais frequência ao mesmo tempo. Estes métodos têm, recentemente, possibilitado modelar propriedades químicas e físicas de dados simples e complexos a partir de dados espectrais (ZAMORA *et al.*; 2005).

As análises qualitativas e quantitativas de medicamentos, utilizando espectroscopia na região do infravermelho, expandiram-se a partir do momento em que os dados gerados por um espectrofotômetro FT-IR puderam ser digitalizados, habilitando os métodos estatísticos na resolução de problemas da análise química. A

possibilidade de utilizar várias freqüências do espectro tem aumentado o tipo de amostras que podem ser analisadas por espectroscopia no infravermelho (PASQUINI, 2003).

2.5.1 Tratamento e pré-processamento dos dados

Uma etapa anterior à utilização dos dados para construção de modelos de calibração refere-se à transformação dos mesmos, com objetivo de distribuí-los adequadamente, possibilitando a extração de informações úteis e facilitando a interpretação (FERREIRA, 2002). A transformação de dados multivariados consiste basicamente em:

a) tratamento, ou seja, remoção de variáveis não desejadas como efeito de espalhamento, mudança na linha de base ou fatores externos não controláveis (GELADI & KOWALSKI, 1985). Dentre os tratamentos comumente aplicados aos dados espectroscópicos temos a correção da variação normal padrão (SNV). Nesse procedimento cada espectro é corrigido individualmente sendo os valores centrados e posteriormente escalados pelo desvio padrão calculado dos valores espectrais individuais e usado para remover a variação da inclinação e corrigir os efeitos do espalhamento da radiação (SAMISTRARO, 2008).

b) pré-processamento, que permitem comparar as variáveis em diferentes dimensões. Os pré-processamentos mais utilizados consistem em centrar os dados na média, ou seja, subtrair cada intensidade do respectivo valor médio para cada comprimento de onda, e autoescalar os dados, ou seja, centrar os dados na média e dividir pelo respectivo desvio padrão (GELADI *et. al.*, 1985).

2.5.2 Análise por agrupamentos (HCA)

Esta técnica reúne indivíduos ou objetos em grupos, tais que, os objetos do mesmo grupo são mais parecidos uns com os outros, do que, com os objetos de outros grupos. A idéia é maximizar a homogeneidade de objetos dentro de grupos, ao mesmo tempo em que se maximiza a heterogeneidade entre os grupos. O foco da análise de agrupamento é a comparação de objetos com base na variável estatística e não na estimação da variável estatística em si, tornando a definição da variável estatística feita pelo pesquisador um passo crítico na análise (HAIR, 2005).

A técnica de agrupamento hierárquico (Hierarchical Cluster Analysis - HCA) é uma ferramenta excelente para análise preliminar dos dados, sendo útil para determinar a semelhança entre objetos e identificar amostras anômalas. O método relaciona amostras de forma que as mais semelhantes são agrupadas entre si com relação às variáveis usadas no processo de agrupamento (MORGANO *et al.*, 1999).

A HCA consiste no tratamento matemático de cada amostra como um ponto no espaço multidimensional descrito pelas variáveis escolhidas. Nesta técnica é possível tratar cada variável como um ponto no espaço multidimensional descrito pelas amostras, ou seja, pode-se ter agrupamento de amostra ou de variáveis de acordo com o interesse de cada situação. Quando uma determinada amostra é tomada como um ponto no espaço das variáveis, é possível calcular a distância deste ponto a todos os outros, constituindo-se assim uma matriz que descreve a proximidade entre todas as amostras estudadas (MOITA NETTO, 2004). Para proceder a esta classificação, é necessário definir matematicamente o conceito de proximidade, ou seja, a distância entre dois objetos. Entre as medidas mais usuais para estabelecer o conceito de distância n e m , destacam-se o coeficiente de correlação de Pearson, a distância Euclidiana e a distância de Manhattan.

Segundo Moita Netto (2004), existem várias maneiras de aglomerar matematicamente estes pontos no espaço multidimensional para formar os

agrupamentos hierárquicos. Cada um corresponde a um algoritmo específico, ou seja, o modo particular como os cálculos serão feitos pelo computador, que usa as informações da matriz de proximidade para criar um dendrograma de similaridade. A interpretação de um dendrograma de similaridade entre amostras fundamenta-se na seguinte intuição: duas amostras próximas devem ter também valores semelhantes para as variáveis medidas, isto é, devem ser próximas matematicamente no espaço multidimensional. Portanto, quanto maior a proximidade entre as medidas relativas às amostras, maior a similaridade entre elas.

O dendrograma hierarquiza esta similaridade de modo que se pode ter uma visão bidimensional da similaridade ou dissimilaridade de todo o conjunto de amostras utilizado no estudo. Quando o dendrograma construído é das variáveis, a similaridade entre duas variáveis aponta forte correlação entre estas variáveis do conjunto de dados estudado. Os dendrogramas de amostras são mais comuns e geralmente mais aplicados nas áreas química e farmacêutica.

Este método tem por finalidade verificar a semelhança entre as linhas (amostras) de uma matriz de dados (espectros), calculando-se a distância no espaço n-dimensional (variáveis), na maioria das vezes, a distância Euclidiana, conforme equação 2.

$$d_{ab} = \sqrt{\sum_{i=1}^m (x_{ai} - x_{bi})^2} \quad (2)$$

O resultado é apresentado na forma gráfica denominado dendrograma (FERREIRA, 2002; SABIN *et al.*, 2003) assemelhando-se a uma estrutura em forma de árvore, sendo que d_{ab} corresponde à distância entre os pontos a e b, e $d_{\text{máx}}$ representa a distância entre qualquer par de pontos (amostras), onde são informadas a similaridade conforme equação 3 .

$$S_{ab} = 1 - \frac{d_{ab}}{d_{m\acute{a}x}} \quad (3)$$

Utilizam-se vários métodos para calcular a similaridade entre as amostras. No presente estudo foram empregados os métodos de construção simples, incremental e flexível definidos pelas equações 4, 5 e 6, respectivamente (INFOMETRIX, 1999).

$$d_{ab \Rightarrow c} = 0,5d_{ac} + 0,5d_{bc} - 0,5|d_{ac} - d_{bc}| \quad (4)$$

$$d_{ab \Rightarrow c} = \frac{\left((n_a + n_c)d_{ac}^2 + (n_b + n_c)d_{bc}^2 - n_c d_{ab}^2 \right)^{1/2}}{n_a + n_b + n_c} \quad (5)$$

$$d_{ab \Rightarrow c} = \left(0,625d_{ac}^2 + 0,625d_{bc}^2 + 0,25d_{ab}^2 \right)^{1/2} \quad (6)$$

2.5.3 Análise por componentes principais (PCA)

A análise dos componentes principais é uma técnica estatística poderosa, que pode ser utilizada para redução do número de variáveis, e para fornecer uma visão estatisticamente privilegiada do conjunto de dados. Fornece as ferramentas adequadas para identificar as variáveis mais importantes no espaço dos componentes principais. Os fundamentos da análise dos componentes principais serão apresentados escrevendo passos matemáticos e estatísticos a partir das necessidades de interpretação adequada da matriz de dados. O entendimento exaustivo do assunto requer conhecimento de operações como matrizes, por isso, opta-se por uma abordagem conceitual usando as noções de álgebra linear (MOITA NETTO, 2004).

Aplicando-se um algoritmo de PCA num conjunto de variáveis como, por exemplo, espectros no infravermelho, o conjunto original dessas variáveis é substituído por um novo conjunto de variáveis denominadas de componentes principais (CPs). A principal característica desse novo conjunto é a ortogonalidade, porém, é facilmente reconstruído a partir da combinação linear das variáveis

originais (espectros). Como vantagem, o novo conjunto de variáveis (CPs) geralmente concentra a maior parte de informação (variância) em poucas variáveis, diminuindo, assim, a dimensionalidade dos dados, sem perda significativa da informação química. A maioria dos aplicativos disponíveis utiliza a técnica de decomposição do valor singular (SDV) para obter as CPs, sendo, neste caso, a primeira componente principal (CP1), definida na direção (eixo) de maior variância do conjunto de variáveis originais. De forma decrescente em termos de variação são definidas as demais componentes principais, que serão sempre ortogonais a CP1 e entre si.

Por exemplo, um sistema que seja reduzido a 3 CPs (CP1, CP2 e CP3) se assemelha ao sistema cartesiano de coordenadas e em que todos os eixos serão linearmente independentes, isto é, ortogonais entre si. Para os casos de conjuntos de espectros, considera-se inicialmente matriz de dados \mathbf{X} ($m \times n$), sendo que “ m ” corresponde ao número de amostras (espectros) e “ n ” o número de variáveis (frequências do espectro), que pode ser decomposta em 3 outras matrizes, U, S e V (FERREIRA *et al.*, 2002), conforme equação 7.

$$\mathbf{X} = \mathbf{USV}^t \quad (7)$$

As colunas de “U e V” são ortogonais. A matriz “V” é a matriz dos pesos, em que a primeira coluna contém os pesos de PC1 e assim por diante. O produto “U x S” corresponde à matriz “T” dos escores. Por fim, “S” é matriz diagonal, cujos elementos (valores singulares) contêm informações sobre a quantidade de variância que cada componente principal descreve. A matriz “S” é importante na determinação da dimensionalidade intrínseca da matriz de dados, podendo os analistas definir quantas CPs ou fatores devem ser utilizados para análises posteriores. Os autovalores que forem pequenos serão excluídos e as informações relevantes podem, de alguma maneira, ser separadas, eliminando-se, assim, os ruídos experimentais.

Dentre as aplicações da análise exploratória podemos citar o trabalho de Ferreira *et al.* (2002) avaliando os teores de Ca, Cu, K, Mg, Na, P e S determinados simultaneamente em sucos e refrigerantes de uva utilizando espectrometria de emissão ótica com plasma de argônio induzido (ICP-OES) como técnica analítica. Os dados obtidos foram submetidos a dois métodos de análise exploratória: análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (HCA). A análise exploratória mostrou-se útil para o tratamento dos dados em questão, produzindo informações que dificilmente seriam visualizadas diretamente na matriz de dados.

2.6 Aplicações do NIR na análise de medicamentos

Os métodos de análise convencionalmente usados no controle de qualidade de medicamentos tanto pela indústria farmacêutica quanto pelos órgãos de fiscalização são principalmente a titulação clássica e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Estes métodos são lentos, destrutivos, invasivos, apresentam um alto custo de operação e de manutenção e geram resíduos químicos prejudiciais ao meio-ambiente. Para superar estes inconvenientes, uma boa alternativa é o desenvolvimento de métodos analíticos baseados no uso da espectroscopia no infravermelho próximo, que aliada a métodos quimiométricos tem sido considerada uma boa alternativa para as análises quantitativas aplicadas ao controle de qualidade de medicamentos (BURNS & CIURCZAK, 2001).

2.7 Infravermelho e análise multivariada na identificação de medicamentos

A espectroscopia no infravermelho tem extensa aplicação na identificação de compostos químicos, sendo a região entre 1200 a 700 cm^{-1} do espectro conhecida como “região de impressão digital”, a região que contém maior informação sobre os compostos orgânicos, em particular aqueles que apresentam atividade biológica. Indústrias de diferentes setores fazem o uso da espectroscopia no infravermelho médio para identificação de matérias-primas, principalmente devido à facilidade de

obtenção dos espectros, manuseio mínimo da amostra e baixo custo de análise quando comparado às técnicas clássicas de química úmida (WATSON, 1999).

Entretanto, a maior parte dos trabalhos publicados nos últimos anos em relação à determinação quantitativa de compostos químicos (como fármacos ou excipientes) em produtos farmacêuticos, utilizam a região do NIR (ROGGO *et al.*, 2007).

Outra aplicação recente da espectroscopia do NIR descreve uma técnica rápida e analítica que oferece muitas vantagens para a extensão de aplicações industriais. O desenvolvimento recentes no domínio farmacêutico onde pode ser aplicado a partir de material industrial bruto para a liberação do produto final. As características do NIR permitem que a técnica seja implementada como um processo analítico tecnológico (PAT). Além disso, recentes desenvolvimentos abrem as perspectivas de inúmeras aplicações na área de análise de imagens no NIR, (LUYPAERT *et al.*, 2007).

O uso do NIR tem permitido, ainda, avaliar o polimorfismo presente em determinados fármacos, pois possibilita o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada com a capacidade de quantificar polimorfos em uma mistura (BLANCO, *et al.*, 2000),(BLANCO, *et al.*, 2004) (BRAGA & POPPI, 2004).

A pureza polimórfica de medicamentos é de um grande interesse farmacêutico onde freqüentemente dita sua biodisponibilidade. Estudos revelam um eficiente e rápido método para a determinação de polimorfo azitromicina utilizando espectrômetro infravermelho (NIR). O medicamento é caracterizado pela comparação com um espectro laboratorial NIR que permite determinar se, o montante de uma forma cristalina contida em um exemplar não cristalino de azitromicina, excede níveis permitidos. (BLANCO *et al.*, 2004).

No que se refere à aplicação da espectroscopia molecular no estudo de formulações tipo creme (pomada), poucos trabalhos tem sido publicados. Em 2004,

Luypaert *et al.* apresentam numa revisão a possibilidade da combinação de NIR com algum método quimiométrico, e é investigado com uma técnica para classificar exemplos de estudo clínico de uma pomada. Neste estudo, a influência de diferentes métodos na remoção de variações espectrais, devido a algumas fontes, foram investigadas. Os métodos aplicados são padrões variáveis normais (SNV) e derivadas de primeira e segunda ordem. As diferentes fontes investigadas são formadas por diferentes ingredientes, além das amostras da mesma porção, dias e posições diferentes desta amostra no acessório.

Entretanto diversos problemas vêm sendo relatados, inerentes a aquisição dos espectros no infravermelho. Segundo Luypaert *et al.*(2002) algumas dessas anomalias experimentais podem ser minimizadas pela correção do sinal ortogonal (DOSC), que vem sendo aplicada para corrigir a maioria das fontes variáveis assim como os efeitos de temperatura, do tempo e diferenças instrumentais em dados infravermelho (NIR). As fontes analisadas são cremes contendo diferentes concentrações de uma substância ativa, sendo um creme não iônico-aquoso. O objetivo é classificar as fontes de acordo com as concentrações do composto ativo (LUYPAERT *et al.*, 2007)

Diferentes métodos para a correção dos sinais experimentais têm sido propostas como, por exemplo, a correção do sinal ortogonal (DOSC), variação normal padrão (SNV), múltiplas correções dispersas (MSC), primeira e segunda derivação, correção equivalente e minimizada. Estas correções são aplicadas em 2 séries de espectros no NIR de um creme dermatológico com diferentes concentrações de um composto ativo. A influência destes métodos na classificação correta das amostras, é avaliada utilizando a distância Euclidiana. Além disso, os métodos de regressão PLS e PCR são utilizados para fazer um prognóstico da concentração do composto ativo. Dentre as correções estudadas, o DOSC foi o que forneceu melhores resultados (LUYPAERT *et al.*, 2002).

Já no que se refere à aplicação da espectroscopia visando a avaliação e/ou quantificação do Aciclovir em medicamentos, destaca-se o trabalho de Basavaiah e

Prameela, (2002) na região do Visível, no qual realizam um estudo onde um simples e efetivo método espectrofotômetro é descrito pela determinação de aciclovir em medicamentos. O método é baseado na formação de derivados de coloração azul quando a substância ativa reage com o reagente Ciocalteu-Folin (F-C) em meio alcalino. As espécies coloridas têm uma absorção máxima em 760 nm e segue a lei de Beer na faixa de concentração de 50-450 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O método proposto foi aplicado com sucesso para determinação de aciclovir em formular farmacêuticas. Uma análise estatística indicou que não há diferença significativa entre os resultados obtidos pelo procedimento daqueles obtidos por métodos oficiais (BASAVIAH & PRAMEELA, 2002).

Por outro lado, novas perspectivas vêm sendo traçadas, com o crescimento nos últimos anos da utilização da espectroscopia infravermelho médio (FERRÃO *et al.*, 2004), e o contínuo desenvolvimento de métodos no infravermelho próximo (MORGANO, 2005), se devem, principalmente, à procura de métodos analíticos rápidos e limpos. Neste caso evitando o emprego de reagentes agressivos ou a geração de resíduos danosos ao ambiente. O uso da análise por reflexão no infravermelho médio e próximo pode satisfazer os dois quesitos acima, pois requerem pouco ou nenhum tratamento das amostras. Porém, é imperioso reconhecer que a análise multivariada de dados foi uma ferramenta valiosa que contribuiu para o emprego mais extensivos daquelas técnicas. Os programas computacionais disponíveis comercialmente, que podem ser utilizados sem a necessidade de conhecimento mais aprofundado do tema, impulsionou o estudo de novos métodos analíticos usando a região do infravermelho (FERREIRA *et al.*, 2006).

Finalmente, com base em estudos realizados, a importância de métodos para identificar os efeitos de uma medicação vem sendo de extrema necessidade. Alguns testes como controle visual, testes dissociados ou teste simples de reação coloridas revelam somente a falsificação. A viabilidade de boas informações como demonstrados com métodos analíticos, juntamente com a calibração multivariada, para detectar falsas medicações. Além disso, análises multivariadas são aplicadas fornecendo informações adicionais nos diagnósticos. A espectroscopia tem se

tornado muito útil para a identificação de regiões não homogêneas na formação de medicamentos (RODIONOVA *et al.*, 2005).

3 METODOLOGIA

3.1 Amostragem

Para o desenvolvimento deste estudo foram empregadas 25 amostras de medicamentos sob a forma de creme contendo 0,05% de aciclovir. Estes medicamentos foram adquiridos no mercado nacional (22 amostras) e no mercado argentino (3 amostras), sendo estes diferentes quanto ao fabricante, lote e classificação (medicamentos de referência, genéricos e similares). Na Tabela 1 é apresentada a relação dos medicamentos utilizados. Para cada medicamento utilizado foi adotado um código que permite identificar o fabricante, a procedência, o lote e a classificação do medicamento.

Tabela 1. Codificação dos medicamentos contendo aciclovir.

| Código | Fabricante | Procedência | Lote |
|--------|------------|-------------|------|
| R01 | A | N | I |
| R02 | A | N | II |
| G03 | B | N | I |
| G04 | B | N | II |
| G05 | C | N | I |
| G06 | D | N | I |
| G07 | D | N | I |
| G08 | E | N | I |
| S09 | F | N | I |
| S10 | F | N | II |
| G11 | F | N | I |
| S12 | G | N | I |
| S13 | H | N | I |
| S14 | H | N | II |
| S15 | I | N | I |
| S16 | J | N | I |
| S17 | K | N | I |
| S18 | K | N | II |
| G19 | K | N | I |
| S20 | L | N | I |
| S21 | M | N | I |
| G22 | N | N | I |
| D23 | O | A | I |
| D24 | P | A | I |
| D25 | Q | A | I |

Classificação: R (referência), S (similar), G (genérico), D (desconhecido)

Procedência: N (nacional), A (argentina).

3.2 Aquisição dos espectros

Os espectros de FTIR/ATR foram adquiridos na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras, utilizando um acessório de reflectância total atenuada horizontal com cristal de seleneto de zinco (ZnSe) da PIKE Technologies acoplado a um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier NICOLET Magna 550, disponível no laboratório de espectroscopia da UNISC. Os espectros foram obtidos em quintuplicata e normalizados na escala.

Já os espectros de NIR/ATR foram adquiridos na faixa de 10.001 a 2.001 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras, utilizando um acessório de reflectância total atenuada horizontal com cristal de seleneto de zinco (ZnSe) da PIKE Technologies acoplado a um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Spectrum 400 MIR/NIR cedido pela Perkin-Elmer ao Laboratório da UFSM, sendo obtido apenas um espectro para cada amostra. Cabe ressaltar que na faixa de aquisição acima referenciada, também está incluída uma parte da região do infravermelho médio (4.000-2.001 cm^{-1}).

Finalmente, os espectros NIRA (Figura 8) foram adquiridos em duplicata na faixa de 7.096 a 4.003 cm^{-1} utilizando o espectrômetro FT-IR Spectrum 400 MIR/NIR, cedido pela PERKIN ELMER, acoplado a um acessório para transreflectância no infravermelho próximo, utilizando um detector integrado de InGaAs estabilizado de alto desempenho. Destaca-se, porém que neste experimento foram somente utilizadas 22 amostras de aciclovir em creme.

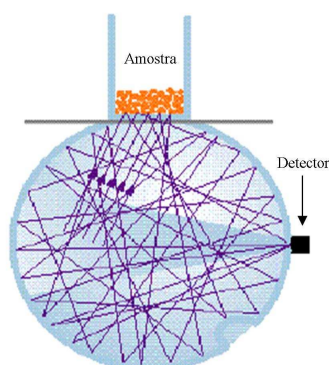


Figura 8: Esquema da transreflectância no infravermelho (NIRA).

Fonte: Perkin-Elmer

A radiação oriunda da fonte atinge a amostra, e são refletidas para dentro da esfera, sendo direcionada ao detector, obtendo os espectros.

3.3 Modelagem dos espectros

Os espectros obtidos foram tratados por ferramentas computacionais de análise multivariada, utilizando-se a Análise de Agrupamentos Hierárquico (HCA), Análise por Componentes Principais (PCA), através do programa computacional PIROUETTE 3.11 da INFOMETRIX, visando verificar a similaridade entre as formulações dos diferentes fabricantes, lotes e classificação (medicamentos de referência, genéricos e similares). A Figura 9 apresenta o conjunto de espectros obtidos para a região do infravermelho médio por reflexão total atenuada.

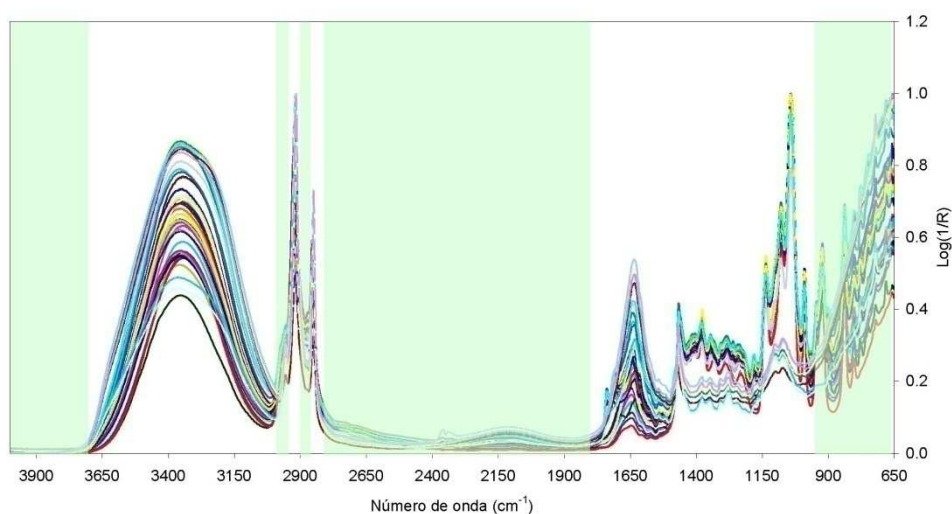


Figura 9: Regiões de espectros de amostra aciclovir aplicado HCA e PCA.

A segunda derivada foi inicialmente aplicada para a obtenção da matriz de dados a ser submetida aos algoritmos PCA e HCA. As regiões nas quais houve informação do espectro, bem como nas que havia ruídos com pequenas informações espectrais provenientes de vapor de água e dióxido de carbono foram excluídas. Por esta razão, para as análises foram utilizadas as seguintes regiões dos

espectros: 785-1800 cm^{-1} , 2665-2840 cm^{-1} e 2930 a 3700 cm^{-1} , conforme destacado na figura 9.

Na seqüência, serão apresentados os principais resultados para a análise dos espectros obtidos através das técnicas ATR/FTIR, ATR/NIR e NIRA, associadas à análise multivariada de dados, empregando HCA e PCA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 – Resultados para o conjunto dos espectros ATR/FTIR

Na Figura 10 é apresentado o dendrograma obtido para o conjunto de espectros ATR/FTIR. Este dendrograma permitiu a identificação de quatro grandes grupos constituídos das 25 amostras de medicamento na forma de creme.

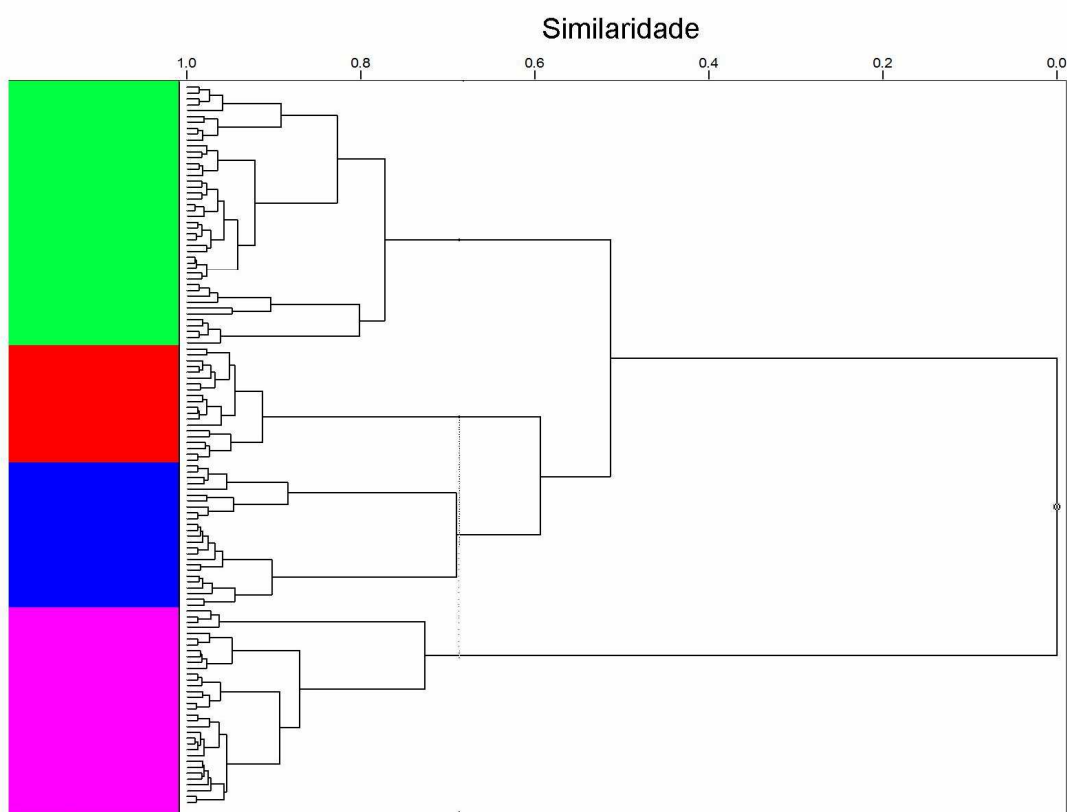


Figura 10: Dendrograma dos sinais de espectros ATR/FTIR para 25 amostras de aciclovir creme.

O primeiro grupo ao qual corresponde a faixa verde, na Figura 10 é formado pelas amostras G06 e G07 (sendo estes medicamentos genéricos de diferentes lotes, mas do mesmo fabricante), as amostras G03 e G04 (são medicamentos do mesmo fabricante, mas de lotes diferentes), amostra G08 (única amostra analisada), as amostras D23 e D25 (são amostras Argentinas, de lote e fabricante diferentes), amostra S16 (corresponde a uma única amostra de medicamento similar) e a amostra S20 (corresponde a uma única amostra de um medicamento similar) conforme destacado na Figura 11.

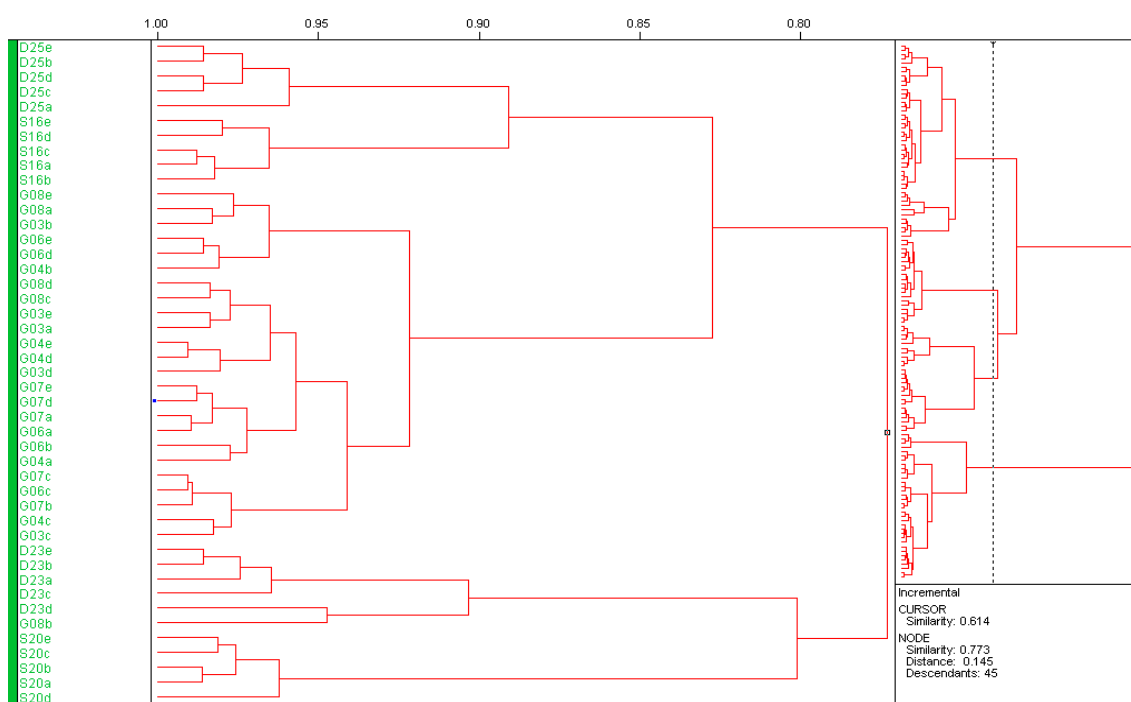


Figura 11: Dendrograma fornecido pela HCA para o grupo destacado em verde.

O segundo grupo corresponde a faixa vermelha da Figura 10 é formado pelas amostras R01 e R02 (onde corresponde, duas amostras de distintos lotes, sendo o mesmo fabricante, e correspondem ao medicamento de referência), amostra D24 (corresponde a um medicamento Argentino) e a amostra G05 (corresponde a um medicamento genérico analisado) conforme destacado na Figura 12.

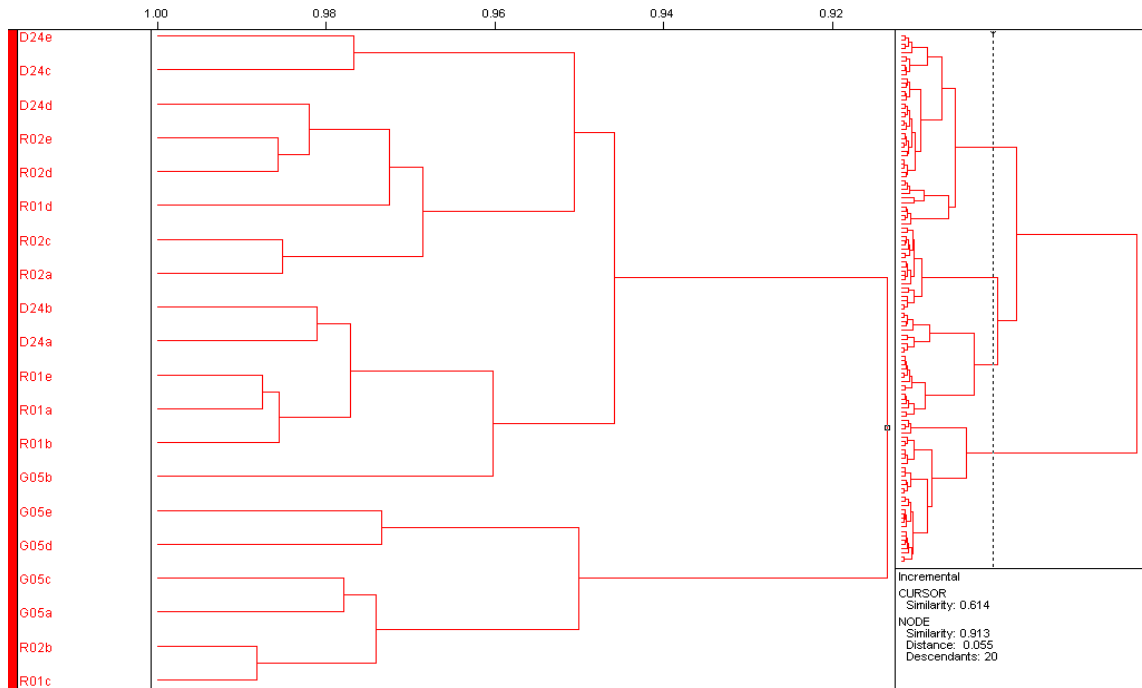


Figura 12: Dendrograma fornecido pela HCA para o grupo destacado em vermelho.

O terceiro grupo corresponde a faixa azul da Figura 10, é formado pelas amostras G19, S17 e S18 (corresponde a um medicamento genérico e dois medicamentos similares de lotes distintos, sendo todos do mesmo fabricante), amostra G22 (corresponde a um medicamento genérico) e a amostra S21 (corresponde a um medicamento similar) conforme destacado na Figura 13.

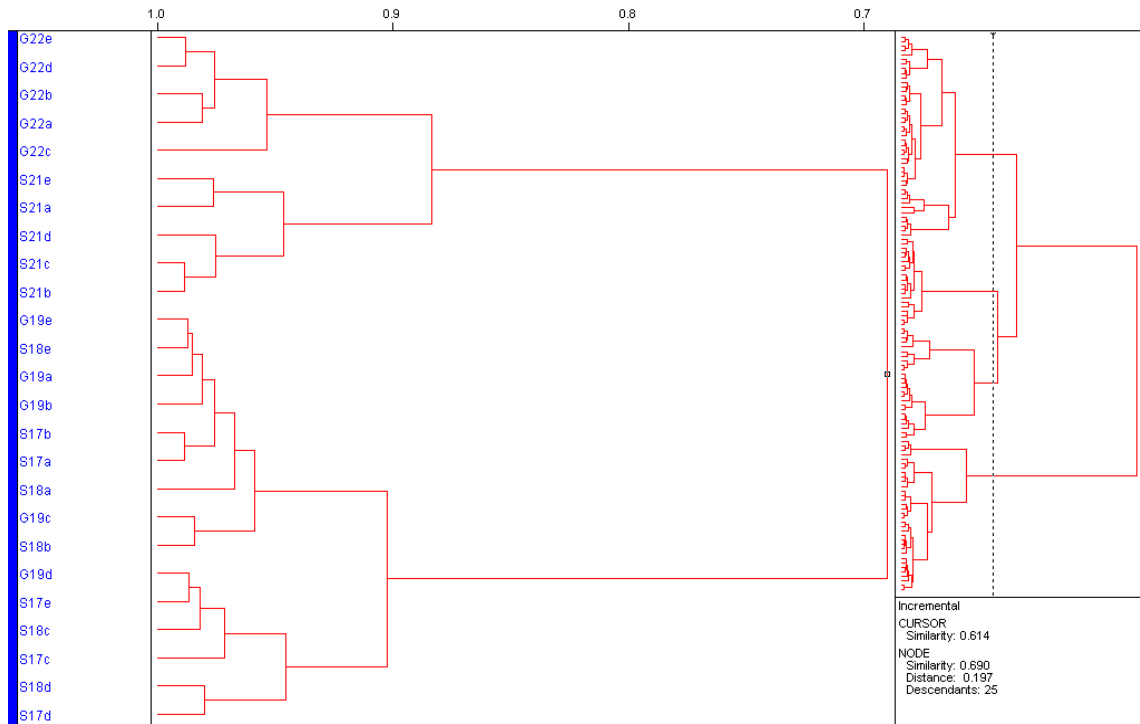


Figura 13: Dendrograma fornecido pela HCA para o grupo destacado em azul.

Finalmente, o quarto grupo, o qual corresponde a faixa rosa na Figura 10, é formado pelas amostras S09, S10 e G11 (que correspondem a duas amostras de um medicamento similar de diferentes lotes e a um medicamento genérico, todos do mesmo laboratório) e amostras S12, S13, S14, S15 (correspondes a dois medicamentos similares de diferentes laboratórios, ainda, duas amostras de um medicamento similar de um mesmo fabricante, porém de lotes diferentes) conforme destacado na Figura 14 .

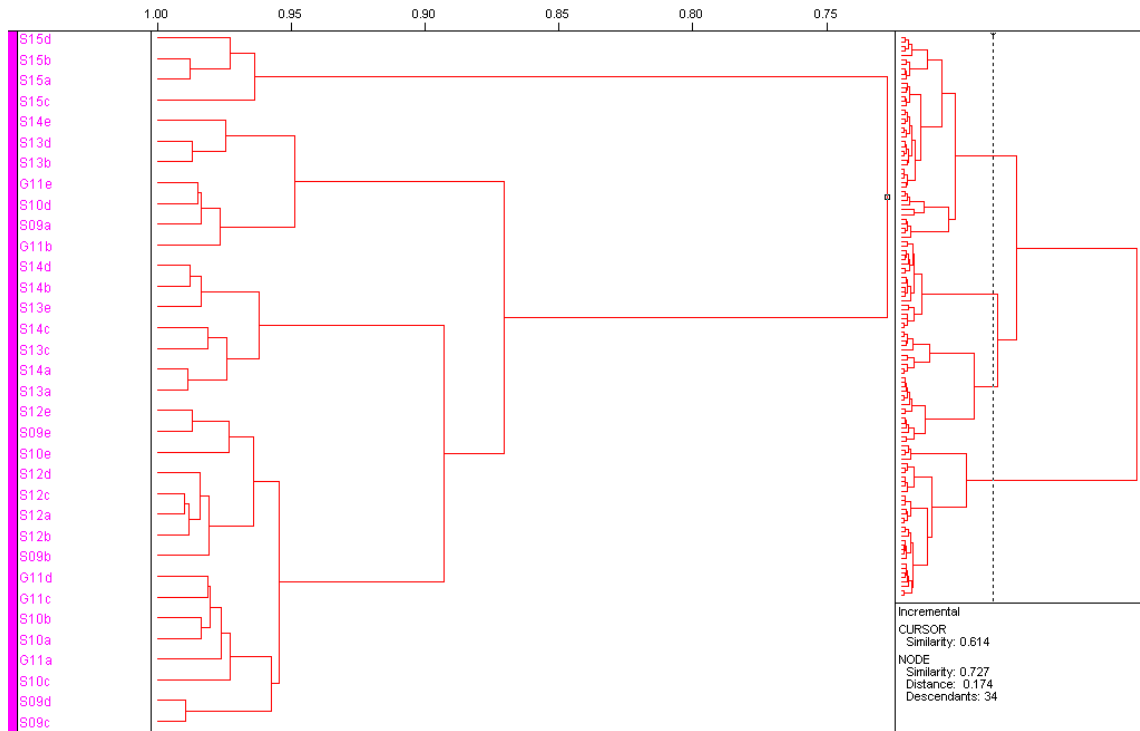


Figura 14: Dendrograma fornecido pela HCA para o grupo destacado em rosa.

Os resultados referentes aos $PC_1 \times PC_2$ da PCA são apresentados na Figura 15, sendo confirmado pelo gráfico os quatro grandes grupos, formados pelas amostras de medicamentos. Nesta figura podemos destacar o grupo circulado em vermelho, no qual as amostras apresentaram maior homogeneidade em relação ao espectros. Este grupo é formado pelas amostras R01 e R02 (as quais correspondem a diferentes lotes de um medicamento de referência), amostra D24 (corresponde a um medicamento Argentino) e amostra GO5 (corresponde a um medicamento genérico).

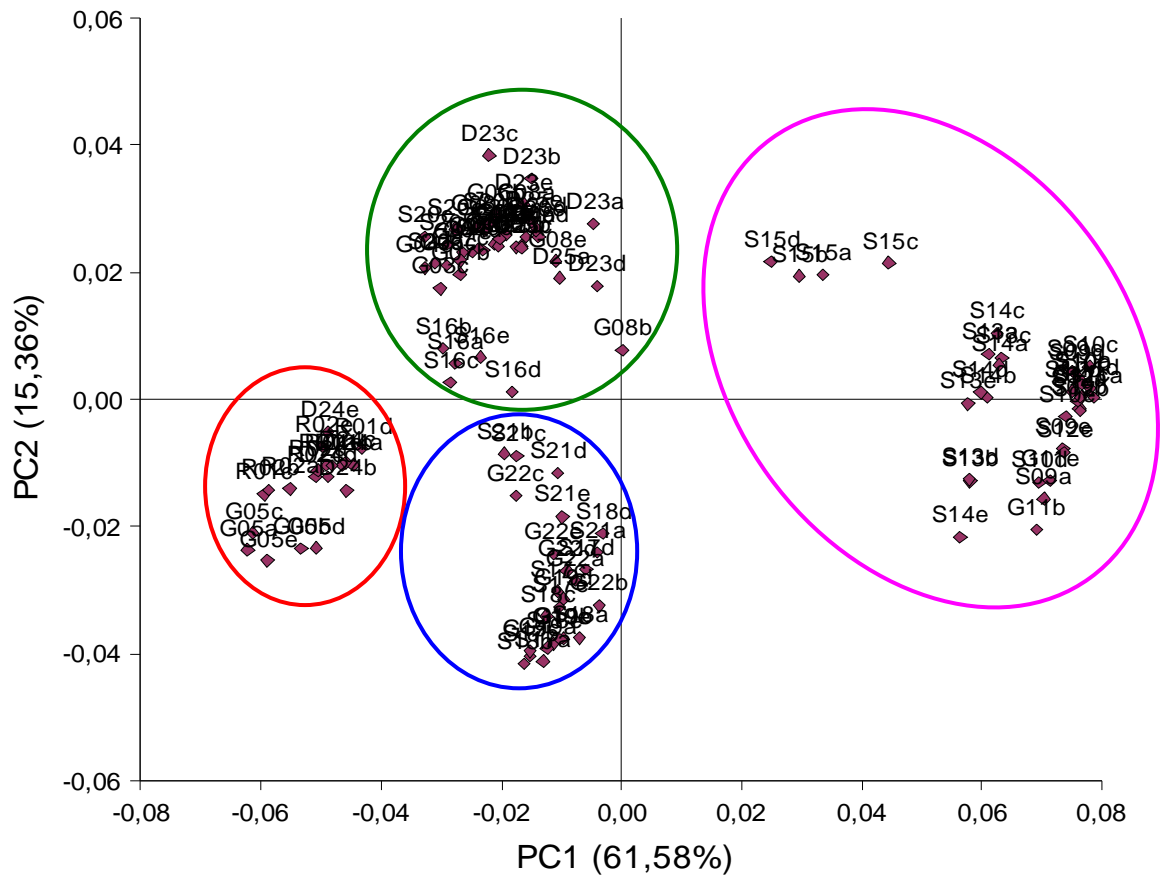


Figura 15: Gráfico dos escores para a PCA dos espectros ATR/FTIR.

Algumas considerações importantes podem ser obtidas a partir destes resultados, salientando que o grupo de amostras nacionais empregado neste estudo representam quase que todas as amostras de aciclovir disponíveis no mercado nacional.

Podemos dizer, inicialmente, que não há uma formulação diferenciada para todas as amostras Argentinas, uma vez que elas não se reúnem no mesmo grupo. Mas, nada pode ser generalizado em relação a essas amostras, pois somente três foram utilizadas nesse estudo. É necessário destacar que uma dessas amostras apresenta grande semelhança a uma amostra de referência, fabricada no Brasil. Nesta formulação podem estar presentes os mesmos excipientes, nas mesmas proporções da amostra do medicamento de referência nacional.

Uma importante evidência mostra que ambos medicamentos, genéricos e similares, reúnem no mesmo grupo, indicando que não há uma formulação básica

para esses tipos de medicamentos. Mas, está claro que independente do medicamento ser genérico ou similar, os medicamentos fabricados no mesmo laboratório apresentam composições similares e, geralmente, são do mesmo grupo.

Cabe uma reflexão, pois os medicamentos genéricos necessitam de testes de biodisponibilidade para sua comercialização podendo resultar em maiores custos. Uma vez que a composição é praticamente a mesma entre os genéricos e similares de um mesmo Laboratório Farmacêutico, pode-se levantar a hipótese de que as Empresas acabam buscando inserção em ambos os mercados; seja ele de similares ou genéricos, comercializando a mesma formulação.

Finalmente, diferentes lotes de um mesmo medicamento se agrupam (R01 e R02; G03 e G04; S09 e S10; S13 e S14; S17 e S18), bem como, medicamentos com duas amostras do mesmo lote, também se agrupam no mesmo grupo (G06 e G07), o que era esperado para validar essa avaliação.

4.2 Resultados para o conjunto dos espectros ATR/NIR

Na seqüência são apresentados os principais resultados para a análise dos espectros obtidos através da técnica ATR/NIR, associada à análise multivariada de dados empregando HCA e PCA.

A HCA permitiu a identificação de três grandes grupos constituídos através dos espectros das amostras estudadas, os quais estão presentes no dendrograma apresentado na Figura 16.

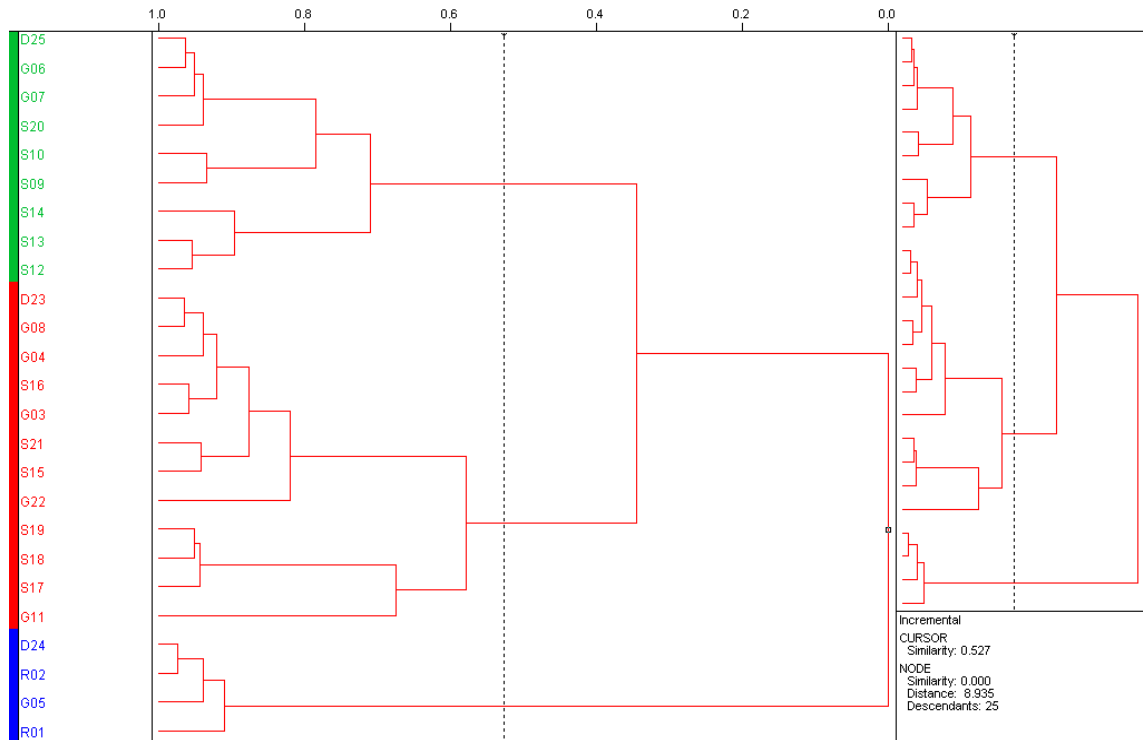


Figura 16: Dendrograma dos sinais de espectros ATR/NIR para 25 amostras de aciclovir creme.

Descreve-se a seguir, os grupamentos identificados por cor, para realçar os resultados dos procedimentos realizados separadamente. Sendo que denominam-se de grupo verde, grupo vermelho e grupo azul.

No grupo verde, conforme mostra a Figura 16, são formado pela amostra D25 (medicamento Argentina), pelas amostras G06 e G07 (que correspondem a um medicamento genérico de diferentes lotes, mas do mesmo fabricante), pelas amostras S09 e S10 (um medicamento similar do mesmo laboratório, porém de diferentes lotes), pela amostra S12 (uma amostra similar), pelas amostras S13 e S14 (que correspondem a duas amostras similares de um mesmo fabricante, mas de lotes diferentes) e pela amostra S20 (uma outra amostra similar).

No segundo grupo, ao qual corresponde a faixa vermelha, conforme a Figura 16, são formado pelas amostras G03 e G04 (um medicamento genérico do mesmo laboratório, mas de dois lotes diferentes), pela amostra G08 (uma outra amostra genérica de outro laboratório), pela amostra G11 (amostra de medicamento genérico), pelas amostras S15 e S16 (que correspondem a duas amostras similares

de diferentes fabricantes), pelas amostras S17, S18 e G19 (três amostras do mesmo fabricante, sendo duas de lotes distintos de um medicamento similar e uma de um medicamento genérico), pela amostra S21 (uma outra amostra similar), pela amostra G22 (amostra de um medicamento genérico) e pela amostra D23 (uma amostra de medicamento Argentino).

No terceiro grupo, o qual corresponde a faixa azul, conforme a Figura 16 são formado pelas amostras R01 e R02 (os dois lotes distintos do medicamento de referencia), pela amostra G05 (um medicamento genérico) e pela amostra D24 (uma amostra de medicamento Argentina).

Os resultados apresentados na Figura 17 usando os escores $PC_1 \times PC_2$ para a PCA, confirmam a formação de três grande grupos formados pelos medicamentos, onde as amostras R01, R02, G05 e D24 formaram um grupo identificado pela cor azul (idêntico ao resultado do HCA).

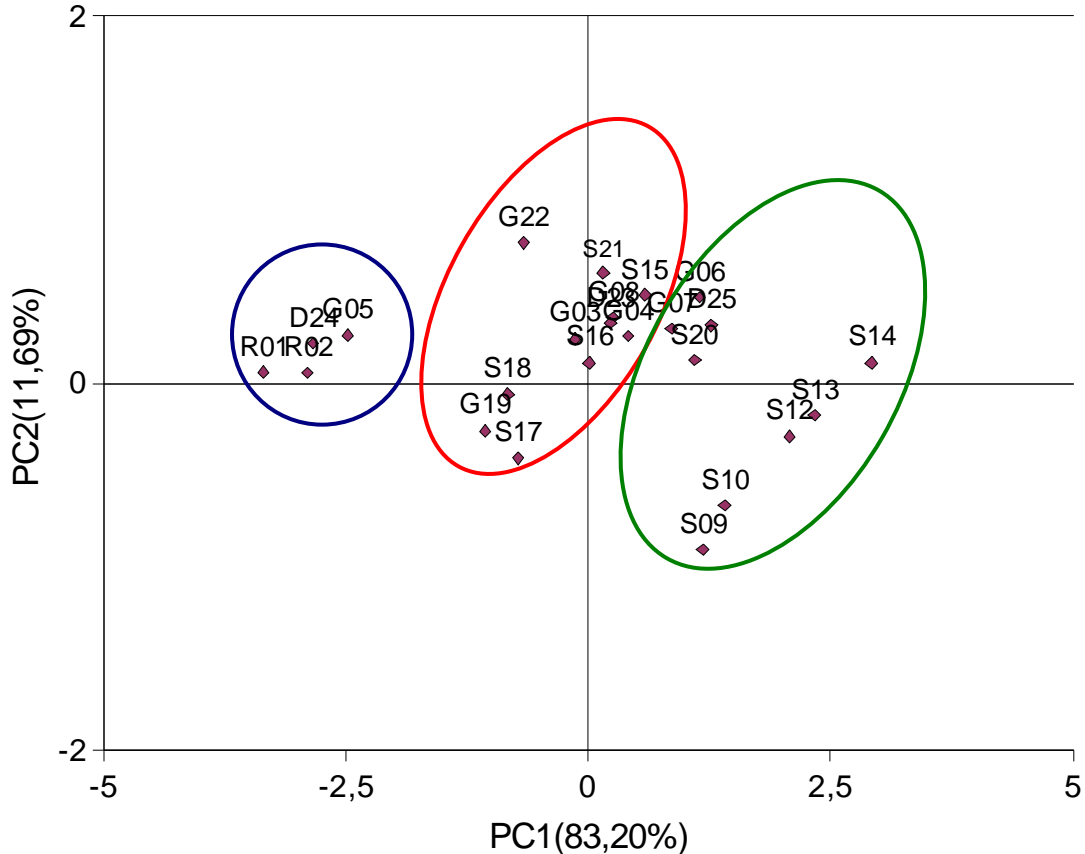


Figura 17: Gráfico dos escores para a PCA dos espectros ATR/NIR.

Algumas considerações podem ser obtidas em relação aos resultados do dendrograma ATR/NIR, pois nesta técnica empregada permitiu a identificação de três grandes grupos, onde ambos medicamentos genéricos e similares reúnem no mesmo grupo.

Observa-se que medicamentos, tanto genéricos e similares sendo do mesmo fabricante, porém com lotes distintos se agrupam. Uma importante constatação que as amostras R01, R02, G05, D24, formaram o grupo azul, os mesmo se agruparam de forma igual em relação a técnica anterior utilizada (ATR/FTIR), indicando a alta similaridade dos componentes existentes na formulação farmacêutica.

Nesta técnica podemos observar a formação de três grupos, pois ela nos permite menos informações espectrais em relação às outras técnicas utilizadas.

Já a formação dos escores para a PCA, confirma a formação de três grandes grupos, sendo estes formados pelos mesmos conjuntos de amostras descritos no HCA.

4.3 Resultados para o conjunto dos espectros NIRA

Na Figura 18, podemos observar os resultados dos espectros obtidos através da técnica do NIRA, associada à análise multivariada. Estes foram tratados empregando o pré processamento *Mean center*, distância euclidiana e construção incremental. Neste dendrograma se utilizou apenas 22 amostras em duplicatas, sendo identificadas por 'A' e 'B'. O dendrograma (Figura 18), permitiu a identificação de quatro grandes grupos constituídos através dos espectros das 22 amostras estudadas

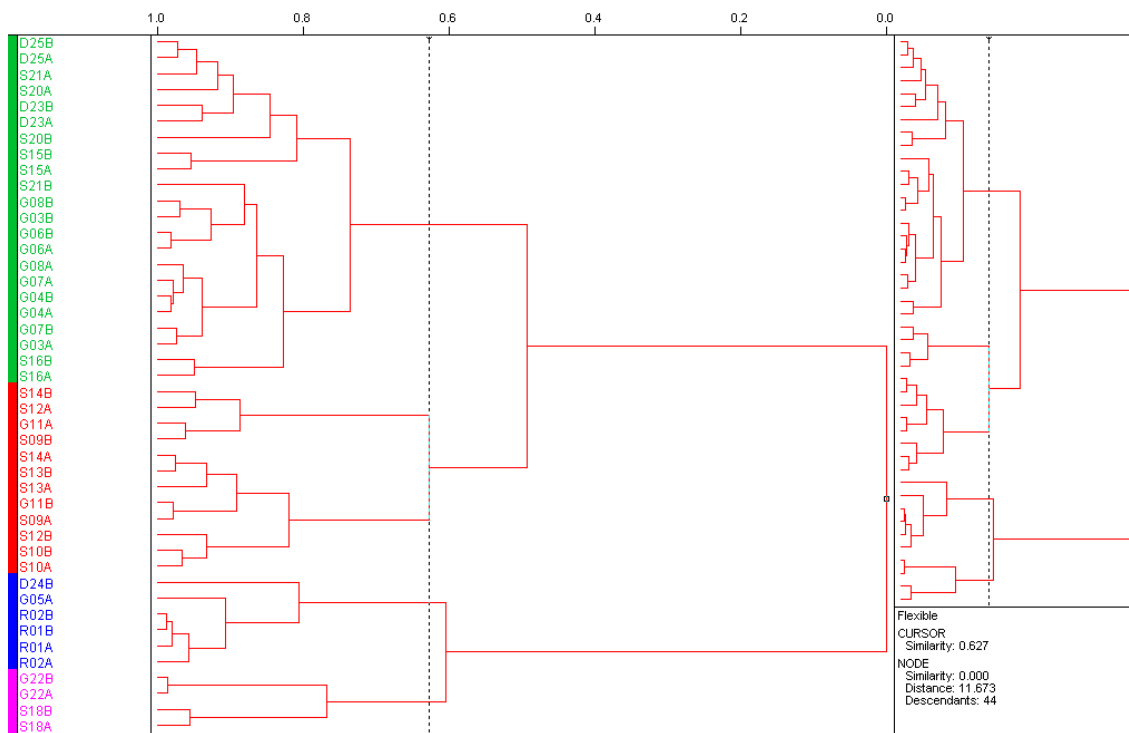


Figura 18: Dendrograma dos sinais de espectros NIRA para 22 amostras de aciclovir creme.

No primeiro grupo utilizando os espectros NIRA das amostras, foram agrupadas as amostras G03 e G04 (amostra de medicamento genérico, mas fabricantes diferentes), amostras G06 e G07 de (um outro laboratório genérico de mesmo fabricante, mas dois lotes diferentes), amostra G08 (amostra de um medicamento genérico), amostras S15, S16, S20 e S21 (quatro amostras de medicamento similares e de laboratórios diferentes), pelas amostras D23 e D25 (duas amostras desconhecidas de laboratórios diferentes, Argentina).

O segundo grupo está representado pela faixa vermelha na Figura 18 formado pelas amostras S09, S10 e G11 (que correspondem a duas amostras de medicamentos similar e uma amostra de medicamento genérico, ambas de mesmo fabricante), pela amostra S12 (uma amostra similar), pelas amostras S13, S14 (duas amostras de lotes diferentes de um medicamento similar).

O terceiro grupo representado pela faixa azul (Figura 18) é formado pelas amostras R01 e R02 (dois lotes distintos de medicamentos de referência), pela

amostra G05 (um medicamento genérico) e pela amostra D24 (uma amostra de um medicamento Argentino).

O quarto grupo, representado pela faixa rosa, na Figura 18, formado pelas amostras S18 e S22 (duas amostras de medicamento similar, porém de diferentes laboratórios).

Os resultados referentes aos *scores* $PC_1 \times PC_2$ para a PCA apresentados na Figura 19, confirmam os grupos, formados pelas amostras de medicamentos. Neste caso podemos destacar aquele circulado em azul, no qual as amostras apresentaram maior homogeneidade em relação ao espectro. Este grupo é formado pelas amostras R01 e R02 (as quais correspondem a diferentes lotes de um medicamento de referência), amostra D24 (corresponde a um medicamento Argentino) e amostra G05 (corresponde a um medicamento genérico).

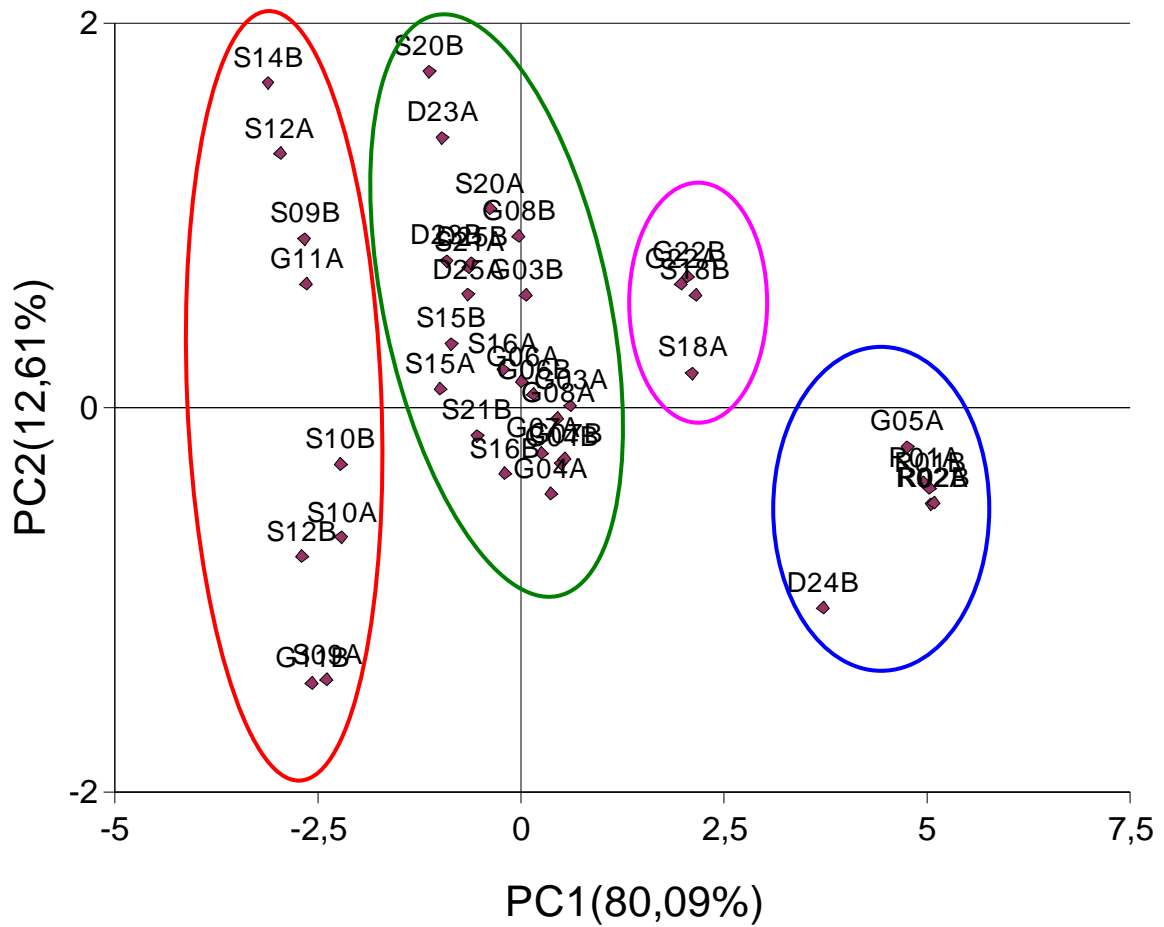


Figura 19: Gráfico dos escores para a PCA dos espectros ATR/NIRA.

Em relação à análise das amostras em duplicata de medicamentos, onde utilizou-se a técnica por ATR/NIRA podemos observar a formação de quatro grande grupos, onde os grupos formados pelas amostras em duplicatas permaneceram juntas, sendo elas do mesmo fabricante e lote.

Em relação ao grupo azul onde estão presentes as amostras R01, R02, G05 e D24 permaneceu as mesmas amostras, mostrando a eficiência da técnica.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que o uso das técnicas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com reflexão total atenuada (FTIR/ATR), (NIR/ATR) e espectroscopia no infravermelho próximo por transflectância (NIRA), associadas à Análise dos Componentes Principais (PCA) e Análise dos Agrupamentos Hierárquicos (HCA), permitem a identificação e diferenciação de medicamentos comerciais contendo aciclovir.

Na maior das análises realizadas as replicatas das amostras, bem como os diferentes lotes utilizados, sempre se agruparam, apresentando alta similaridade, Apesar dos resultados para o PCA e HCA serem diferentes em função das diferentes regiões espectrais utilizadas (MID e NIR).

Outra importante constatação foi que independente da classificação do medicamento como genérico e similar, todas as amostras de um mesmo laboratório sempre se agrupam, indicando que os medicamentos genéricos e similares desses laboratórios apresentam composições semelhantes, mostrando que se tratam do mesmo medicamento, porém em embalagens diferentes.

A aplicação do HCA e PCA na análise multivariada junto aos dados obtidos pelas distintas técnicas de infravermelho experimentadas (FTIR/ATR, NIR/ATR e NIRA) foram eficientes para desenvolver uma metodologia simples, rápida e não destrutiva para análise de cremes contendo aciclovir comercializados no Brasil e Argentina, destacando a potencialidade dessa técnica, no controle e inspeção de medicamentos industrializados.

REFERÊNCIAS

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. *Farmacotécnica-Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos*, 6º ed.; São Paulo; Editorial Premier, p. 568, 2000.

ANVISA. Bulário Eletrônico Nacional Disponível em <[http:// www. bulário.bvs.br](http://www.bulário.bvs.br)>. Acesso em 17 de abril 2009.

BARBOSA, Luis Cláudio de Almeida. *Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de Compostos Orgânicos*. Viçosa, 2007.

BASAVAI AH, K. ; PRAMEELA, H. C. Simple spectrophotometric determination of acyclovir in bulk drug and formulations.// *Farmaco*, v. 57, n. 6, p. 443-449, 2002.

BLANCO, A. M.; VALDÉS, A, D M.S. BAYOD, F. FERNÁNDEZ-MARI, I. Characterization and analysis of polymorphs by near-infrared spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, v. 502, p.221-227, jan. 2004.

BLANCO, M.; COELHO, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S.; PÉREZ-MASEDA, C.; Determination of polymorphic purity by near infrared spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, v. 407, p.247-254, fev. 2000.

BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J., Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. *Quim. Nova*, v. 27, n. 6, p. 1004-1011, 2004.

BRASIL RDC 210, de 04 de agosto de 2003, *Diário Oficial da União*.DF, 2003. Dispõe sobre o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 2003.

BURNS, D. A.; CIURCZAK, E.W. *Hand-Book of Near-infrared analysis. Second Edition*, Marcel Dekker, Inc, N.York, 2001.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Química nova*, São Paulo, v. 30 n. 2, p.481-487, mar./abr. 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ºed. São Paulo: Atheneu, p. 172, 2002.

FERRÃO, M. F. Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. *Tecno-lógica*, Santa Cruz do Sul, v. 5, n. 1. 63-85, 2001.

FERRÃO, M. F.; CARVALHO, C. W.; MULLER, E. I.; DAVANZO, C. U. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 24, p. 333-340, 2004.

FERREIRA, C. V.; HERMES, N.; HELFER, G. A.; FERRÃO, M. F. Aplicação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.4, p.779-786, 2006.

FERREIRA, E. C.; RODRIGUES, S. H. B. G.; FERREIRA, M. M. C.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva. *Eclet. Química*, São Paulo, v.27. n.especial, p. 77-90, 2002.

FERREIRA, M.M.C.; Multivariate QSAR, *J. Braz. Chem. Soc.*, v.13, p.742-753, 2002.

GELADI, P.; KOWALSKI B. R.; Partial least-squares: a tutorial, *Anal. Chim. Acta*, v. 185, p. 1-17, 1985.

GELADI, P.; MACDOUGALL, D. ; MARTENS, H. Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat, *Appl. Spectrosc.*, v.39, p. 491-500, 1985.

HAIR, J. R. *Análise Multivariada de Dados*. 5º ed.; Rio de Janeiro: Bookman, 2005.

HARRIS, D. C., *Análise Química Quantitativa*, 5 ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999.

HOWLAND, D. R.; MYCEK, M. J. *Farmacologia Ilustrada*, 3º ed. Porto Alegre: Artmed – Bookman, 2007.

INFOMETRIX, INC., PIROUETTE 2.70, WOODINVILLE, WA, 1999.

KOROLKOVAS, A. *Dicionário Terapêutico*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

LUPI, O. Terapeuta anti-herpética. Herpes:clínica, diagnóstico e tratamento. *Educação Médica Continuada*, Rio de Janeiro, v. 75. n.3., p. 233-54, 2000. Disponível em <d:\Aciclovir\Herpes simples Anais Brasileiros de Dermatologia.htm>. Acesso em outubro, 2008.

LUYPAERT A, J.; MASSART, D.L.; VANDER HEYDEN, Y. Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis. Belgium: Chemistry and Pharmaceutical Technology, Pharmaceutical Institute. *Analytica Chimica Acta*, p. 181–189, 2007.

LUYPAERT, J.; HEUERDINGB, S.; VANDER HEYDEN, Y.; MASSART, D. L. The effect of preprocessing methods in reducing interfering variability from near-infrared measurements of creams. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* : Suíça, v.36, p. 495–503, 2004.

LUYPAERT, S.; HEUERDING, S de J.; MASSART, D.L. An evaluation of direct orthogonal signal correction and other preprocessing methods for classification of clinical study lots of a dermatological cream. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , Belgica: Instituto de Farmácia, p.453-466, 2002.

MIRABELLA, F. M.; Internal reflection spectroscopy, *Appl. Spectrosc. Rev.* v. 21, p.45-178, 1985.

MOITA NETTO. J. M. Estatística Multivariada: uma visão didática-metodológica, 2004. Disponível em <<http://criticanarede.com/termos.html>>. Acesso em ago. 2008.

MORGANO, M. A. Determination of protein in raw coffee for NIR spectroscopy and regression PLS. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 25, n. 1, p. 25-31, 2005.

MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S.; FERREIRA, M. Aplicação da Análise Exploratória na diferenciação de vegetais. *Brazilian Journal of Food Technology.* v. 21, n. 1, p. 73-79, 1999.

OLINGER, J. M.; GRIFFITHS, P. R. Effects of sample dilution and particle size/morfology of diffuse reflection spectra of carbohydrate systems in the Near-and Mid-infrared. *Applied Spectroscopy*, v.47, p.687-694, 1993.

OSBORNE, B. G.; FEARN, T. *NIR Spectroscopy in Food Analysis*. New York: John Wiley and Sons, 1986.

PARISOTTO, G.; SOUZA, J. S.; FERRÃO, M.F; FURTADO, J.C.; MOLZ, R.F.; Análise exploratória aplicada no estudo de medicamentos contendo piroxicam. *Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n. 4, p. 499-505, out./dez. 2005.

PASIKATAN, M. C. ; STEELE, J. L. ; SPILLMAN, C. K. ; HAQUE, E. ; Near infrared reflectance spectroscopy for online particle size analysis of powders and ground materials. *J. Near Infrared Spectrosc.* v. 9, n. 3, p. 153-164, 2001.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals practical aspects and analytical applications. *J. Braz. Chem. Soc.* São Paulo, v.14, n. 2, p. 138-219, 2003.

PEREIRA, J. C. *Análise de dados qualitativos: estratégias metodológicas para as ciências da saúde, humanas e sociais*. 2. ed. São Paulo, 1999.

RODIONOVA,O.Y.; HOUMOLLER, L. P.; POMERANTSEV, A. L.; GELADI, P.; BURGER, J.; DOROFEYEV, V. L.; ARZAMASTSEV, A. P. NIR spectrometry for counterfeit drug detection: A feasibility study. *Analytica Chimica Acta*, v. 549, p. 151-158, 2005.

ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAUER, L.; LEMA-MARTINEZ, C.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Pharm.Biomed.Anal.* v. 44, p. 683-700, 2007.

SABIN, J.G.; BANET, E.V.; FERRÃO, M.F. Análise exploratória aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte I: Análise hierárquica de agrupamentos. *Tecno-lóg.*, Santa Cruz do Sul, v.7, n.1, p. 69-88, 2003.

SAMISTRARO, Gisely. Propriedades químicas e físicas da poupa e papel kraft por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR). 2008. 115f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Paraná, Curitiba, 2008.

SAMPAIO, S. A. P. *Dermatologia*. 2º ed.; São Paulo, Artes Médicas p.411-417, 2001.

SHARGEL, L.; WU-POMG S.; YU, A.B.C. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. 5. ed. Norwalk: Appleton & Lange, 2004.

SKOOG, D.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Principles of instrumental analysis*. Orlando: Harcourt Brace & Company , 1998.

SOUZA, J. S.; FERRÃO, M. F. Aplicação da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I: Dosagem por regressão multivariada. *Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas* v. 42, n.3, jul./set., 2006.

STARK, E.; LUCHTER, K.; MARGOSHES, M. Near-infrared analysis (NIRA): A technology for quantitative and qualitative analysis. *Appl. Spect. Rev.*, v. 22, n. 4, p. 335-399, 1986.

TREVISAN, M.G.; POPPI, R.J. Química Analítica de Processos. *Química Nova*. v.29 p. 1065-1061, 2006.

VOORT, F.R. *Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis*, *Food Res. Int.* v. 25, p. 397- 403, 1992.

WATSON, D.G. *Pharmaceutical Analysis*. London: Harcourt Plublishers Limited , p. 93-117, 1999.

WILLIAM, P. C.; NORRIS, K. H. *Near-infrareds technology in the agricultural and food industries*. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 1987.

ZAMORA, P. P.; MORAIS, J. L.; NAGAT, N. Por que otimização multivariada?. *Eng. Sanit. Ambient.* v. 10, n. 2, p.106-110, 2005.

ANEXO A

Trabalho publicado nos anais da XIV International Conference on Industrial Engineering and Operations Management, Rio de Janeiro, 2008.

APPLIED CLEAN TECHNOLOGIES TO THE STUDY OF PHARMACEUTICAL FORMULATIONS

Elisângela Gonçalves Rivero (UNISC)

elisgrivero@hotmail.com

Luciano Marder (UNISC)

lucmarder@yahoo.com.br

Marco Flôres Ferrão (UNISC)

ferrao@unisc.br

Carine Lima Hermes (UNISC)

carinehermes@mx2.unisc.br

Adilson Ben da Costa (UNISC)

adilson@unisc.br



The search for clean technologies to analyze pharmaceutical products has been focused by the pharmaceutical industry, which has been trying to aggregate the advantages of the so called 'Green Chemistry' and the consequent decrease of pollutant emissions to the environment. Therein, infrared techniques, particularly infrared reflectance spectroscopy associated with multivariate analysis presents great potential to evaluate pharmaceutical formulations. In this work 25 acyclovir ointment samples (3 Argentinean and 22 Brazilian) were used and their spectra acquired in the 4000 - 650 cm⁻¹ range by Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance (FTIR/ATR). The multivariate analysis algorithms used were Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA). HCA and PCA results show that there is not a different formulation for the all Argentinean samples since they did not cluster in the same group, but one of them presents great resemblance to the reference pharmaceutical formulation made in Brazil, and thus must present in its formulation the same excipients and these in the same proportion of the national reference pharmaceutical formulation. Independently of the pharmaceutical formulation classification as generic, similar or reference, all samples from the same laboratory always clustered, indicating that their generic and similar samples present alike compositions. Finally, the application of HCA and PCA multivariate analysis techniques to the data obtained by FTIR/ATR have been efficient to develop simpler, faster and non-destructive methodologies to analyze pharmaceutical ointment formulations containing acyclovir, highlighting the potentialities of these techniques to control and inspect pharmaceutical end products.



XIV INTERNATIONAL CONFERENCE ON INDUSTRIAL
ENGINEERING AND OPERATIONS MANAGEMENT
The integration of productive chain with an approach to sustainable manufacturing.
Rio de Janeiro, Brazil, 12 to 16 October - 2021

Palavras-chaves: multivariate analysis, infrared spectroscopy, clean technologies, pharmaceutical formulations, acyclovir, green chemistry

1. Introduction

Acyclovir, whose chemical structure is presented in Figure 1, is an antiviral drug which has low toxicity for human cells (KEENEY, KIRK & BRIGDEN, 1982). It is a highly effective inhibitor for the replication of Herpes simplex types 1 and 2 and for varicella-Zoster virus (KEENEY, KIRK & BRIGDEN, 1982; LASKIN, 1984). The pharmaceutical formulations containing this active principle have been produced in large scale by pharmaceutical industries, both as generic and similar medicines, and it is vital to develop efficient and fast methods for better quality control of pharmaceutical end products.

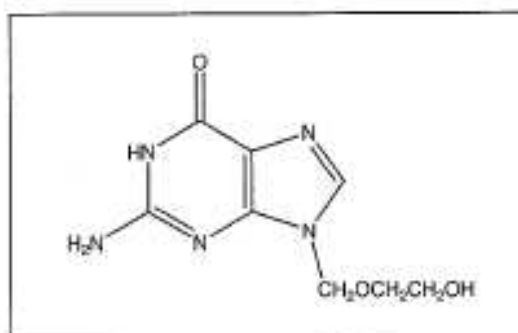


Figure 1 – Acyclovir structural formula (SULTAN, 2002)

Therein, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) associated with multivariate analysis methods has been widely used. This is because the infrared methodologies which were developed are non-destructive and cleaner methods than analytical techniques traditionally applied to the analysis of medicines. In a work carried out with samples containing the active principle piroxicam, Parisotto *et al.* (2005) demonstrate the potentiality of the technique to identify different formulations for this medicine, applying Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS) in association with Hierarchical Cluster Analysis (HCA). In another work by the same group of authors (PARISOTTO *et al.* 2007), they demonstrate the technique capacity to quantify the active principle amoxicillin in pharmaceutical formulations, applying DRIFT spectra and Partial Least-Squares (PLS) Regression.

The present work has the objective of identifying different formulations of medicines containing acyclovir, applying Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance (FTIR/ATR) in association with Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) techniques.

2. Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance (FTIR/ATR)

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) allows the fast acquisition of qualitative and quantitative information and when associated with Attenuated Total Reflectance (ATR)

simplifies the execution of analyses (BORIN & POPPI, 2005). In FTIR/ATR the sample is put into contact with an internal reflection element (IRE) built with a high refraction material, such as zinc selenide (ZnSe). In Figure 2 a scheme of how the internal reflection occurs is presented (MIRABELLA, 1985).

The principle of the technique is based on the occurrence of reflection with the transition of a radiation beam from a denser element (ATR crystal) to a less dense element (sample). The fraction of light beam reflected increases directly and progressively with the incidence angle. Reflection is complete when a determined critical angle is exceeded. According to experimental observations, at the reflection point the beam acts as if it penetrated a short distance inside the sample. The depth of penetration (d_p) is given by equation 1:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \left(\sin^2 \theta_i - \left(\frac{n_2}{n_1} \right)^2 \right)^{1/2}} \quad (\text{Eq. 1})$$

where θ_i is the incidence angle, n_1 is the refraction index from the ATR element and n_2 the sample refraction index.

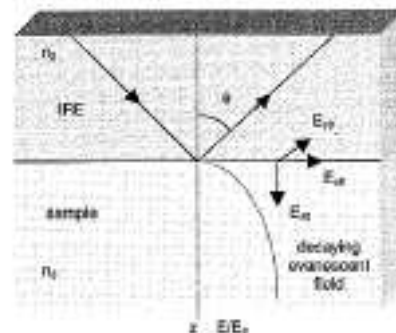


Figure 2 - Representation of the infrared radiation propagates through the IRE (FERRÃO, 2000)

The penetration radiation is called evanescent wave. If the sample absorbs a determined evanescent wavelength, there is attenuation of the wavelength beam which corresponds to the infrared absorption bands. Because of this process the spectrum appears (FERRÃO, 2001).

3. Multivariate Analysis

The advances in microinformatics and instrumentation by the end of last century, together with Multivariate Analysis (MA) tools have made possible the manipulation of spectral absorbance data associated with more than one frequency at the same time. These methods have allowed modeling chemical and physical properties of simple or complex systems from their spectroscopic data, such as in the study of pharmaceutical formulations (GABRIELSSON, LINDBERG & LUNDSTEDT, 2002; PASQUINI, 2003; YOON *et al.*, 2004).



On the other hand, the Multivariate Analysis tools allow modeling systems where there is the superposition of spectral or chromatographic information from various components throughout various spectral regions selected for analysis (SABIN, BANET & FERRÃO, 2003; SABIN, FERRÃO & FURTADO, 2004). The data are represented by a matrix where lines correspond to the samples and columns to the variables (wavelengths) (LAVINE, 2002; SABIN, BANET & FERRÃO, 2003).

To extract the information from obtained signals more efficiently, such as the ones obtained by infrared techniques, it's possible to apply methods of dimensionality compression such as Principal Component Analysis (PCA), or simply calculate the n-dimensional distance between each matrix line (sample) applying the similarity concept (FERREIRA *et al.*, 2002; GABRIELSSON, LINDBERG, LUNDSTEDT, 2002; SILVA *et al.*, 2002).

3.1. Hierarchical Cluster Analysis (HCA)

This method has the aim of verifying the similarity between the lines (samples) of a data matrix (spectra), calculating the distance in n-dimensional space (variables), most of time the Euclidian distance, according to equation 2:

$$d_{ab} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_{ai} - x_{bi})^2} \quad (\text{Eq. 2})$$

The result is presented in the graphic form denominated dendrogram (FERREIRA, 2002; LAVINE, 2002; SABIN, BANET & FERRÃO, 2003) being similar to a tree-shaped structure, with d_{ab} corresponding to the distance between points a and b , and d_{max} representing the distance between any pair of points (samples), where the similarity is informed according to equation 3:

$$S_{ab} = 1 - \frac{d_{ab}}{d_{max}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Various methods are used to calculate the similarity between the samples. In the present study the incremental construction method was applied, being defined by equation 4 (INFOMETRIX, 1999).

$$d_{ab|c} = \frac{((n_a + n_c)d_{ac}^2 + (n_b + n_c)d_{bc}^2 - n_c d_{ab}^2)^{1/2}}{n_a + n_b + n_c} \quad (\text{Eq. 4})$$

where n_i corresponds to the number of samples in group i .

3.2. Principal Component Analysis (PCA)

Principal Component Analysis (PCA) is one of the most commonly applied methods to analyze information (BROWN, 1995; FERREIRA, 2002; MANLY, 2008), being principally used for its capacity of data compression in function of the existence of correlation between various measured variables.

When we apply a PCA algorithm to a variable set, such as infrared spectra, the original set of these variables is replaced by a new set of variables denominated Principal Components (PC). The main characteristic of this new set is the orthogonality, but it is easily rebuilt from the



linear combination of original variables (spectra). As an advantage the new set of variables (CP's) usually concentrate most part of the information (variance) in a few variables, thus decreasing the data dimensionality without significant loss of chemical information.

Most of available devices use the Singular Value Decomposition (SVD) technique to obtain the CP's, being the first principal component (CP₁) defined in the direction (axis) of the most variance of the original variable set. Decreasingly in terms of variance, the remaining principal components are defined, but they will always be orthogonal to CP₁ and to each other.

For example, a system which is reduced to 3 CPs (CP₁, CP₂ e CP₃) is similar to a cartesian coordinate system, in which all the axes are linearly independent, that is, orthogonal to each other. For the spectra sets the data matrix **X** (*m* x *n*) was initially considered, being *m* correspondent to the number of samples (spectra) and *n* the number of variables (spectrum frequencies) that can be decomposed into 3 other matrixes **U**, **S** e **V** (FERREIRA, 2002), according to equation 5.

$$\mathbf{X} = \mathbf{USV}^T \quad (\text{Eq.5})$$

The columns **U** and **V** are orthogonal. Matrix **V** is the weight matrix, in which the first column contains PC₁ weights and so on. The product **U** x **S** corresponds to the score matrix **T**. Finally, **S** is the diagonal matrix, whose elements (singular values) contain information about the variance quantity that each principal component describes. Matrix **S** is important to determine the intrinsic dimensionality of the data matrix, being the analysts able to define how many CPs or factors must be used for further analyses. The autovalues which are small will be excluded and the relevant information can be somehow separated, thus eliminating experimental noise.

4. Materials and Methods

4.1. Sampling

For the development of this study 25 ointment samples containing acyclovir were applied. These medicines were acquired in the national market (22 samples) and in the Argentinean market (3 samples), being different concerning manufacturer, lot and classification (reference, generic and similar medicines). For each used commercial medicine a code which allows the identification of the manufacturer, the origin, the lot and the classification was adopted, as shown in Table 1.

| Code | Manufacturer | Origin | Lot |
|------|--------------|--------|-----|
| R01 | A | N | I |
| R02 | A | N | II |
| G03 | B | N | I |
| G04 | B | N | II |
| G05 | C | N | I |
| G06 | D | N | I |
| G07 | D | N | I |
| G08 | E | N | I |
| S09 | F | N | I |
| S10 | F | N | II |
| G11 | F | N | I |



| | | | |
|-----|---|---|----|
| S12 | G | N | I |
| S13 | H | N | I |
| S14 | H | N | II |
| S15 | I | N | I |
| S16 | J | N | I |
| S17 | K | N | I |
| S18 | K | N | II |
| G19 | K | N | I |
| S20 | L | N | I |
| S21 | M | N | I |
| G22 | N | N | I |
| D23 | O | A | I |
| D24 | P | A | I |
| D25 | Q | A | I |

Classification: R (reference), S (similar), G (generic), D (unknown)

Origin: N (national), A (Argentinean)

Source: Elaborated by the authors

Table 1 – Sample codification of medicines containing acyclovir

4.2 Acquisition of FTIR/ATR spectra

The spectra were acquired in the 4000 a 650 cm^{-1} range, with 4 cm^{-1} resolution and 32 scans, using an attenuated total reflectance accessory with a ZnSe crystal from PIKE Technologies attached to a NICOLET Magna 550 Fourier transform infrared spectrophotometer. For each sample five spectra were obtained, being each spectrum normalized on scale.

4.3 Multivariate Analysis

The second derivative was initially applied to the obtained spectra matrix. In sequence, the resulting matrix was mean centered for each of the obtained variables. For Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) the spectral information was treated with the Infometrix software Pirouette[®]. The regions in which little spectral information was found, as well as the ones with spectrum noise due to present water vapor and carbon dioxide were excluded. Therefore, the developed models were achieved in the following spectral regions: 785 to 1800 cm^{-1} , 2665 to 2840 cm^{-1} , 2860 to 2900 cm^{-1} and 2930 to 3700 cm^{-1} , as shown in Figure 3.

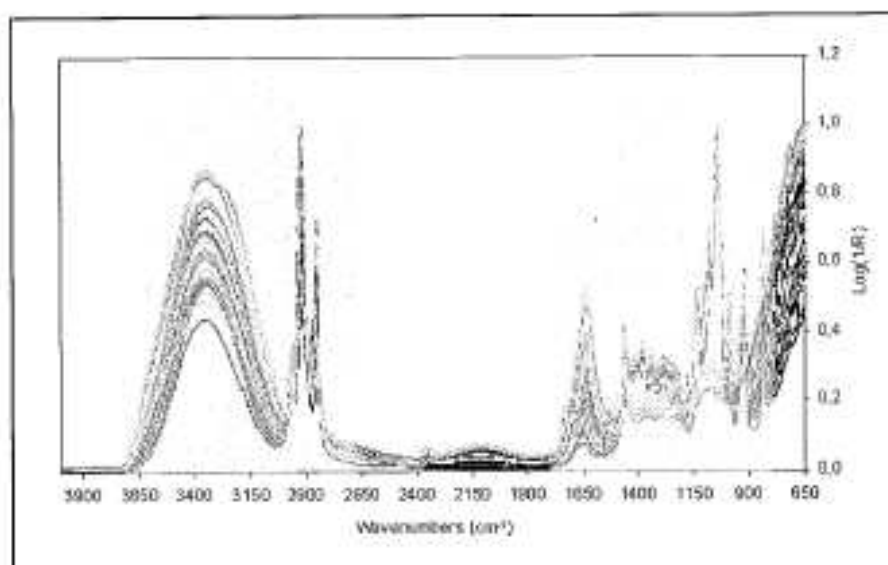


Figure 3 – Spectral regions from acyclovir samples applied for HCA and PCA.

5. Results and Discussions

Hierarchical Cluster Analysis (HCA) allowed the identification of 4 big groups constituted by the sample spectra studied, as presented in the dendrogram in Figure 4.

The first group, which corresponds to the green band in Figure 4, is formed by G06 and G07 samples (which correspond to samples of one generic medicine from the same lot, that is, equal lots), G03 and G04 samples (which correspond to two different lots of another generic medicine), G08 sample (which corresponds to a lot of a third generic medicine analyzed), D23 and D25 samples (which correspond to two of the Argentinean samples analyzed), S16 sample (which corresponds to one of the similar medicines studied) and S20 sample (which corresponds to another similar medicine studied).

The second group, which corresponds to the red band in Figure 4, is formed by R01 and R02 samples (which correspond to two distinct lots of a reference medicine), D24 sample (which corresponds to one Argentinean medicine) and G05 sample (which corresponds to one of the generic medicines analyzed).

The third group, which corresponds to the blue band in Figure 4, is formed by G19, S17 and S18 samples (which correspond to one generic medicine and two different lots of one similar medicine, both from the same laboratory), G22 sample (which corresponds to another generic medicine analyzed) and S21 sample (which corresponds to one of the similar medicines).

Finally the fourth group, which corresponds to the pink band in Figure 4, is formed by S09, S10 and G11 samples (which correspond to two different lots of one similar medicine and one generic medicine, both from the same laboratory) and S12, S13, S14 and S15 samples (which

correspond to three similar medicines from three different laboratories, being one of them with two lots).

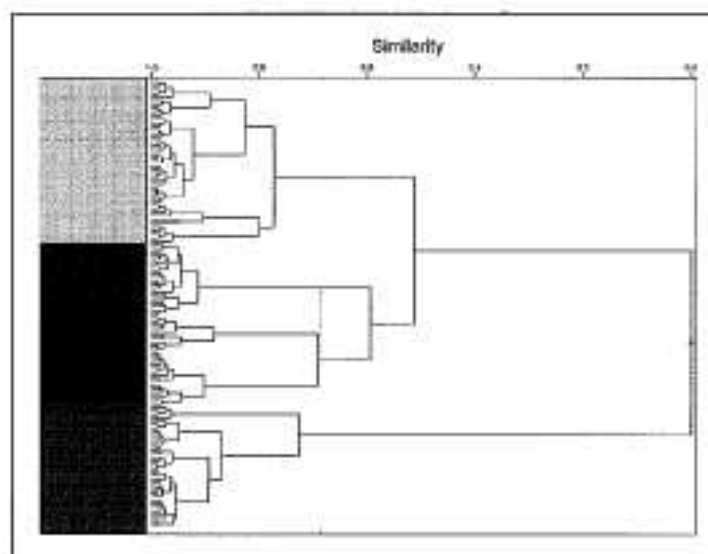


Figure 4 – Resulting dendrogram of spectrum signals from 25 acyclovir samples

The PCA results presented in Figure 5 using the scores $PC_1 \times PC_2$ graph confirm the four big groups formed by medicines. In these groups we can highlight the one circled in red which presents the most homogeneity among the sample spectra, containing R01 and R02 samples (which correspond to two distinct lots of a reference medicine), D24 sample (which corresponds to one Argentinean medicine) and G05 sample (which corresponds to one of the generic analyzed), as previously presented for HCA.

Some important considerations can be made from these results, highlighting that the group of national samples applied in this study represent almost all the acyclovir samples available in the national market.

We can initially highlight that there is no differentiated formula for the all Argentinean samples, once they did not cluster in the same group. But nothing can be generalized in relation to these samples because only three were used in this study. It is necessary to point out that one of these samples presents great resemblance to one reference medicine made in Brazil, hence presenting in its formulation the same excipients and these in the same proportion as the national reference medicine.

Important evidence is that both similar and generic medicines clustered in the same group, indicating that there is no basic formulation for these different kinds of medicines. But it was clear that independently of the medicine being declared generic or similar in its label, the medicines made by the same laboratory present similar compositions, belonging to the same group.

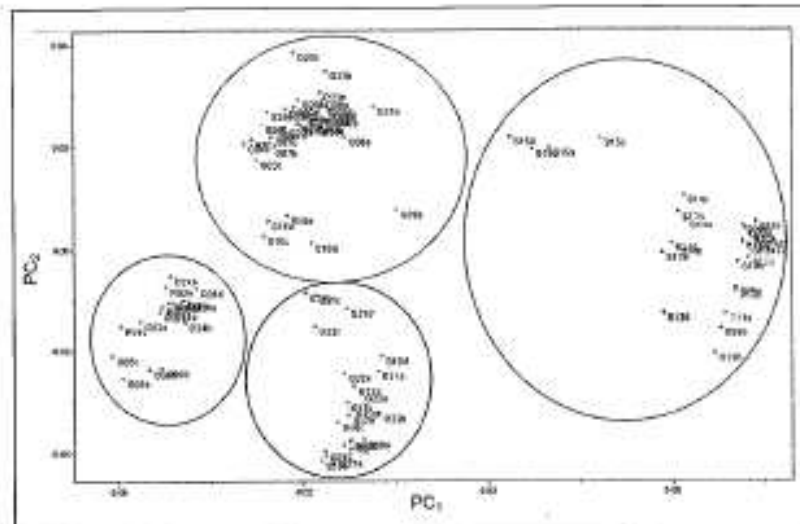


Figure 5 – Scores PC₁xPC₂ graph for PCA of 25 acyclovir sample spectra

Here is some food for thought: once generic medicines need bio-availability tests for their sale and might result in higher costs as the composition is practically the same between generic and similar medicines from the same pharmaceutical laboratory, we can consider the hypothesis that companies end up searching for the insertion in both markets, similar or generic markets, commercializing the same formulation.

Finally, different lots from the same medicine got clustered (R01 and R02; G03 and G04; S09 and S10; S13 and S14; S17 and S18), as well as that medicine with two samples from the same lot that also clustered in the same group (G06 and G07), which was expected to validate this evaluation.

6. Conclusions

The present work has demonstrated that Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance (FTIR/ATR) spectrum signals associated with Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) allows the identification of different formulations of medicines containing acyclovir.

Independently of the classification of the medicine as generic, similar or reference, all samples from the same laboratory always clustered, indicating that generic and similar medicines from them present similar compositions, showing that it might be the same medicine with a different label.

The application of HCA and PCA multivariate analysis techniques to the data obtained by FTIR/ATR has been efficient to develop simpler, faster and non-destructive methodologies for the analysis of ointments containing acyclovir commercialized in Brazil and Argentina, highlighting the potentiality of these techniques in the control and inspection of industrialized



XIV INTERNATIONAL CONFERENCE ON INDUSTRIAL
ENGINEERING AND OPERATIONS MANAGEMENT
The integration of productive chain with an approach to sustainable manufacturing.
Rio de Janeiro, Brazil, 13 to 16 October - 2008

medicines in these countries.



References

- BORIN, A. & POPPI, R.J.** Application of mid infrared spectroscopy and iPLS for the quantification of contaminants in lubricating oil. *Vibrational Spectroscopy* Vol. 37, p. 27-32, 2005.
- BROWN, S.D.** Chemical systems under indirect observation: Latent properties and chemometrics. *Applied Spectroscopy* Vol. 49, n.12, p.14A-31A, 1995.
- FERRÃO, M.F.** Aplicação de técnicas espectroscópicas de reflexão no infravermelho no controle de qualidade de farinha de trigo. 219p. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- FERRÃO, M.F.** Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. *Tecno-Lógica* Vol. 5, n. 1, p. 63-85, 2001.
- FERREIRA, E.C.; RODRIGUES, S.H.B.G.; FERREIRA, M.M.C.; NÓBREGA, J.A. & NOGUEIRA, A.R.A.** Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva. *Eclética Química* Vol. 27, p. 77-90, 2002.
- FERREIRA, M.M.C.** Multivariate QSAR. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 13, n.6, p.742-753, 2002.
- GABRIELSSON, J.; LINDBERG, N.O. & LUNDSTEDT, T.** Multivariate methods in pharmaceutical applications. *Journal of Chemometrics* Vol. 16, n.3, p. 141-160, 2002.
- INFOMETRIX, Inc.** *Pirouette 2.70*. Woodinville, WA, 1999.
- KEENEY, R.E.; KIRK, R.E. & BRIGDEN, D.** Acyclovir tolerance in humans. *American Journal of Medicine* Vol. 72:1A, p. 176-181, 1982.
- LAVINE, B.K.** Clustering and classification of analytical data. In: MEYERS, R.A. (Ed.) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. Vol. 16, p. 9689-9710, 2002.
- LASKIN, O.L.** Acyclovir pharmacology and clinical experience. *Archives of Internal Medicine* Vol. 144, p. 1241-1246, 1984.
- MANLY, B.J.F.** *Métodos Estatísticos Multivariados: Uma Introdução*. Porto Alegre: Bookman, 2008.
- MIRABELLA, F.M.Jr.** Internal reflection spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews* Vol.21, p. 45-178, 1985.
- PARISOTTO, G.; SOUZA, J.S.; FERRÃO, M.F.; FURTADO, J.C. & MOLZ, R.F.** Análise exploratória aplicada no estudo de medicamentos contendo piroxicam. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* Vol. 41, n. 4, p.499-505, 2005.
- PARISOTTO, G.; FERRÃO, M.F.; FURTADO, J.C. & MOLZ, R.F.** Determination of amoxicillin content in powdered pharmaceutical formulations using DRIFTS and PLS. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* Vol. 43, n. 1, p. 89-96, 2007.
- PASQUINI, C.** Near infrared spectroscopy: fundamentals practical aspects and analytical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society* Vol. 14, n.2, p. 198-219, 2003.
- SABIN, J.G.; BANET, E.V. & FERRÃO, M.F.** Análise exploratória aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. *Parte I: Análise Hierárquica de Agrupamentos*. *Tecno-Lógica* Vol. 7, n.1, p. 69-88, 2003.
- SABIN, J.G.; FERRÃO, M.F. & FURTADO, J.C.** Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. *Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* Vol. 40, n.3, p. 387- 396, 2004.
- SILVA, F.V.; KAMOGAWA, M.Y.; FERREIRA, M.M.C.; NÓBREGA, J.A. & NOGUEIRA, A.R.A.** Discriminação geográfica de águas minerais do Estado de São Paulo através da análise exploratória. *Eclética Química* Vol. 27, p. 91-102, 2002.
- SULTAN, M.** Spectrophotometric determination of acyclovir in some pharmaceutical formulations. *II Farmaco* Vol. 57, p. 865-870, 2002.



XIV INTERNATIONAL CONFERENCE ON INDUSTRIAL
ENGINEERING AND OPERATIONS MANAGEMENT

The integration of productive chain with an approach to sustainable manufacturing.
Rio de Janeiro, Brazil, 13 to 16 October - 2006

YOON, W.L.; JEE, R.D.; CHARVILL, A.; LEE, G. & MOFFAT, A.C. *Application of near-infrared spectroscopy to the determination of the sites of manufacture of proprietary products.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Vol. 34, n.5, p. 933-944, 2004.