

BIOISENÇÃO EM FOCO – RDC N.O 749 E FLUORESCÊNCIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

3

BIOWAIVER IN FOCUS – RDC NO 749 AND ULTRAVIOLET-VISIBLE FLUORESCENCE

José Antonio Martins¹, Mariana de Moraes Cardoso², Gabriela Marques Florencio³,
Vagner Sargentelli⁴

1- *Doutor em Ciências (Instituto de Química – Unicamp), Cientista de Dados, Nanotimize Tecnologia;* 2- *Engenheira Ambiental (Unesp – Sorocaba), Acadêmica de Desenvolvimento de Software Multiplataformas (Fatec – Itapira-SP), Pesquisadora, Nanotimize Tecnologia;* 3- *Geóloga (Unesp – Rio Claro), Acadêmica de Desenvolvimento de Software Multiplataformas (Fatec – Itapira-SP), Pesquisadora, Nanotimize Tecnologia;* 4- *Doutor em Química (Instituto de Química, Unesp – Araraquara), Cientista Sênior, Nanotimize Tecnologia*

Contato: contato@nanotimize.com.br

RESUMO

Um medicamento pode levar até décadas desde o momento da sua concepção até ser administrado em humanos. Após um tempo de vinte anos, prazo de duração de uma patente, podem ser produzidos genéricos do fármaco de referência. Para isto são necessários muitos estudos que, também, requerem tempo e investimento, os quais são denominados de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Em setembro de 2022, a Diretoria Colegiada (DC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) do Ministério da Saúde publicou a Resolução (R), portanto, uma RDC, de N.o 749. Esta resolução traz critérios para a isenção de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência, o que permite diminuir o tempo (e custo) de produção de um genérico, porém, mantendo o mesmo rigor científico. A norma aplica-se a situações específicas, por exemplo: soluções aquosas de uso oral, soluções aquosas oftálmicas, soluções aquosas e oleosas de uso parenteral, medicamentos inalatórios orais administrados via nebulizadores, entre outras. Para tais estudos, denominados de bioisenção, a técnica de fluorescência no ultravioleta-visível (UV-Vis), aliada à quimiometria, é uma poderosa ferramenta. Assim, neste trabalho apresentamos uma sinopse destas ferramentas e, concomitantemente, uma abordagem sobre um equipamento de fluorescência no UV-Vis que agrega quimiometria, e que possibilita, inclusive, a realização de investigações de formulações em soluções aquosas de modo eficaz e eficiente na busca da equivalência química em solução.

Palavras-Chave: Fluorescência UV-Vis. Quimiometria. Bioisenção.

ABSTRACT

A drug can take up to decades from the moment of its conception until it is administered to humans. After a period of twenty years, the duration of a patent, generics of the reference drug can be produced. For

this, many studies are necessary, which also require time and investment, which are called relative bioavailability/bioequivalence studies. In September 2022, the Collegiate Board of the National Health Surveillance Agency (Anvisa) of the Ministry of Health published RDC, No 749. This resolution brings criteria for the exemption of relative bioavailability/bioequivalence studies, which makes it possible to reduce the time (and cost) of producing a generic product, while maintaining the same scientific rules. The norm applies to specific situations, for example: aqueous solutions for oral use, aqueous ophthalmic solutions, aqueous and oil solutions for parenteral use, oral inhaled drugs administered via nebulizers, among others. For such studies, called biowaiver, the ultraviolet-visible (UV-Vis) fluorescence technique, combined with chemometrics, is a powerful tool. Thus, in this work we present a synopsis of these tools and, at the same time, an approach on a fluorescence UV-Vis equipment that adds chemometrics, and that even makes it possible to carry out investigations of formulations in aqueous solutions effectively and efficiently.

Keywords: Fluorescence UV-Vis. Chemometrics. Biowaiver.

INTRODUÇÃO

Um medicamento pode levar até décadas desde o momento da sua concepção até ser administrado em humanos. Muitos esforços, que requerem tempo e alto investimento, são necessários, em que há atuação de profissionais de diversas áreas do conhecimento. Um medicamento original é, normalmente, patenteado e após um tempo de vinte anos, prazo de duração de uma patente, podem ser produzidos genéricos. Um medicamento genérico é um medicamento com o mesmo princípio ativo, mesma forma farmacêutica, dosagem e com a mesma indicação farmacológica que o medicamento originador (denominado medicamento de referência ou fármaco de referência) o qual foi baseado. A Lei dos Medicamentos Genéricos (n.º 9.787, de 10 de fevereiro de 1999) autoriza a comercialização de medicamentos de origem sintética, cujas patentes expiraram, por qualquer laboratório no Brasil. Todavia, para se obter um genérico, são necessários muitos estudos que, igualmente, requerem tempo e investimento, os quais são denominados de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Isto é necessário para garantir que um genérico atue de modo exato ao medicamento de referência, sendo dada, inclusive, especial atenção aos efeitos adversos (ou efeitos colaterais).

Praticamente todos os países têm órgãos que estabelecem normas, critérios para estudos, produção de medicamentos, alimentos, e que são responsáveis por autorizar o uso e comercialização de um fármaco, ou alimento industrializado, pela população. Nos Estados Unidos da América (EUA) tem-se a Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA – *The Food and Drug Administration*), na Europa, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA – *European Medicines Agency*) e, no Brasil, o Ministério da Saúde, através da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), criada pela Lei n.º 9.782, de 26 de janeiro 1999, e que tem, por “finalidade institucional promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e consumo de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos aeroportos, fronteiras e recintos alfandegados” (ANVISA, 2023).

A Anvisa edita o que se estabelece por “Resolução da Diretoria Colegiada” (RDC). Uma RDC estabelece normas regulamentares, e critérios, que visam garantir boas práticas por meio

de altos padrões de qualidade de produtos e serviços. A Anvisa não atua somente na área de medicamentos, mas em outras, por exemplo: agrotóxicos, alimentos, cosméticos, gestão interna, laboratórios analíticos, portos, aeroportos e fronteiras, saneantes, tabaco entre outras. Existem RDC's tanto para as empresas quanto para os profissionais para cada área. São muitas RDC's e elencar todas aqui está fora do escopo, mas abaixo mencionamos algumas que foram publicadas no Diário Oficial da União (DOU) e que estão diretamente relacionadas com a produção de genéricos, de números (ANVISA, 2023; PANNUTI, 2022):

- ✓ 103, em 13 de maio de 2003. Os Centros que realizam estudos de Biodisponibilidade/Bioequivalência para fins de registro de medicamentos deverão observar as normas e regulamentos técnicos em vigor;
- ✓ 31, em 12 de agosto de 2010. Dispõe sobre os requisitos para a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo, a serem atendidos pelos Centros de Equivalência Farmacêutica e Patrocinador do Estudo;
- ✓ 37, em 05 de agosto de 2011. Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências;
- ✓ 27, em 22 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos;
- ✓ 56, em 10 de outubro de 2014. Dispõe sobre a Certificação de Boas Práticas para a realização de estudos de biodisponibilidade/bioequivalência de medicamentos e dá outras providências;
- ✓ 60, em 13 de outubro de 2014. Dispõe sobre os critérios para a concessão renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências;
- ✓ 166, em 25 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.
- ✓ 742, em 10 de agosto de 2022. Dispõe sobre os critérios para a condução de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e estudos farmacocinéticos.
- ✓ Além de RDC's a Anvisa também edita Resoluções Específicas (RE), contendo guias e instruções normativas, bem como manuais. Entre as RE, citam-se as de números:
- ✓ 894, em 02 de junho de 2003. Guia para protocolo e relatório técnico de estudo de bioequivalência;
- ✓ 895, em 02 de junho de 2003. Guia para elaboração de relatório técnico de estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência;
- ✓ 896, em 02 de junho de 2003. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos;
- ✓ 898, em 02 de junho de 2003. Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência.

Quanto aos manuais, o Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade Bioequivalência é relevante nesta área.

Mais recentemente, a Anvisa publicou no DOU, em 08 de setembro de 2022, a RDC N.º 749, que dispõe sobre a isenção de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. A

RDC N.o 749 possibilita estudos de bioisenção, mas assegurando que estes proporcionem a mesma garantia do genérico em relação ao de referência se fossem feitos estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. A Resolução se aplica aos medicamentos genéricos, similares, novos e inovadores. Quanto às disposições gerais, a norma esclarece que “a empresa interessada na isenção do estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência deverá apresentar um relatório específico na petição de registro ou de pós-registro, contendo o racional técnico para a bioisenção com base nos requisitos previstos nesta Resolução”. E, no seu Artigo (Art.) 7.o, deixa claro que os estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência poderão ser dispensados para:

- ✓ soluções aquosas de uso oral, pós ou outras formas farmacêuticas que resultem em soluções aquosas orais antes da administração, que:
 - a) contenham o mesmo fármaco, na mesma concentração em relação ao medicamento comparador (equivalentes farmacêuticos); e
 - b) apresentem formulação qualitativamente idêntica em relação a todos os excipientes e quantitativamente similar em relação aos excipientes do medicamento comparador que possuem impacto em aspectos da absorção do fármaco, como solubilidade, motilidade gastrointestinal, tempo de trânsito e permeabilidade intestinal, incluindo mecanismos de transporte;
- ✓ soluções aquosas e oleosas de uso parenteral ou outras formas farmacêuticas que resultem em soluções antes da administração, que sejam equivalentes farmacêuticos ao medicamento comparador e apresentem formulação qualitativamente idêntica e quantitativamente similar em relação a todos excipientes presentes no medicamento comparador;
- ✓ medicamentos inalatórios orais administrados via nebulizadores, bem como sprays e aerossóis nasais, sob a forma de soluções, para ação local, que sejam equivalentes farmacêuticos ao medicamento comparador e apresentem formulação qualitativamente idêntica e quantitativamente similar em relação a todos excipientes presentes no medicamento comparador;
- ✓ soluções aquosas oftálmicas, que sejam equivalentes farmacêuticos ao medicamento comparador e apresentem formulação qualitativamente idêntica e quantitativamente similar em relação a todos excipientes presentes no medicamento comparador;
- ✓ soluções aquosas otológicas que sejam equivalentes farmacêuticos ao medicamento comparador e apresentem formulação qualitativamente idêntica e quantitativamente similar em relação a todos excipientes presentes no medicamento comparador;
- ✓ medicamentos de uso oral que sejam equivalentes farmacêuticos ao medicamento comparador e contenham fármacos destinados à ação local no trato gastrintestinal, descritos em ato normativo específico; ou,
- ✓ formas farmacêuticas de aplicação tópica, não destinados a efeitos sistêmicos, que sejam equivalentes farmacêuticos ao medicamento comparador e que tenham os mesmos excipientes nas mesmas quantidades e mesmo comportamento físico-químico e microestrutural.

Pode ser constatado que a ênfase da RDC N.º 749 é para medicamentos que se encontram em fase aquosa antes de serem administrados. Assim, estudos devem ser conduzidos para provar que o medicamento genérico é equivalente ao de referência e, por se tratar de soluções aquosas, é imperativo que se determine que não existam espécies em solução que sejam interferentes na propriedade terapêutica e/ou intensifiquem os efeitos adversos.

Em solução podem existir equilíbrios tautômeros-zwiteriônicos do insumo farmacêutico ativo (IFA), principalmente na presença de excipientes. A tautomeria é uma isomeria dinâmica, e ocorre quando dois compostos com funções diferentes estão na mesma solução em equilíbrio dinâmico. Trata-se de um caso particular da isomeria de função. Zwitterion, do alemão "zwitter" (híbrido), significa "íon dipolar", que é um composto químico eletricamente neutro, mas que possui cargas opostas em diferentes átomos. Os equilíbrios tautômeros-zwiteriônicos podem ser afetados e/ou formados quando nas moléculas dos princípios ativos, ou dos excipientes, existam grupamentos tais como: carboxílico, amina, amida, ceto-enólico, sulfona, tiofeno, piridil, hidroxila fenólica, entre outros (ANTONOV, 2014).

A técnica mais sensível conhecida do estado da arte e aplicada na observação de mudanças desses equilíbrios de espécies que podem se apresentar em suas várias formas, carregadas ou não, é a fluorescência na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) do espectro eletromagnético. Pequenas alterações em fatores como pH, concentração de estabilizantes, força iônica e polaridade podem alterar os referidos equilíbrios químicos e, usualmente, provocam deslocamentos em bandas espectrais de excitação e emissão da substância (dos tautômeros-zwiterions), que são observadas pela técnica de fluorescência no UV-Vis (ALBANI, 2007).

FLUORESCÊNCIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

As espectroscopias podem ser compreendidas como sendo técnicas de análises que utilizam a interação da radiação eletromagnética com a matéria para obter informações tanto físicas quanto químicas. É de conhecimento, e amplamente difundido, que o espectro eletromagnético compreende o intervalo de comprimento de onda (λ) de 10-14 metros, m, (10-5 nm) – região dos raios gama – a 106 m, região das ondas de rádio. A região do ultravioleta está compreendida entre $\lambda = 200$ e 400 nm e a visível está compreendida entre 380 (violeta) a 740 nm (vermelho).

A fluorescência é o fenômeno pelo qual uma substância emite luz visível quando radiações do tipo ultravioleta, raios catódicos ou raios X incide sobre a mesma. As radiações absorvidas (que são invisíveis ao olho humano) transformam-se em luz visível. Assim, o comprimento de onda da luz emitida é maior que o da radiação incidente. A fluorescência ocorre somente durante o processo de absorção de luz, cessando quando a luz incidente deixa de interagir com a substância. A origem da fluorescência se dá nas transições eletrônicas, em que elétrons em estado fundamental são excitados, pela radiação incidente, a níveis energéticos mais elevados, os quais são instáveis. Os elétrons, então, tendem a retornar ao estado fundamental e, quando o fazem, fluorescem emitindo luz na região do visível. Para que um

composto presente o fenômeno da fluorescência é necessária a presença de regiões específicas no mesmo, tais como elétrons delocalizados, insaturações ou anéis (VOGEL, 2002).

A técnica analítica de fluorescência na região espectral do UV-Vis é uma importante ferramenta de investigação em muitas áreas da ciência analítica, devido à sua sensibilidade e seletividade extremamente altas. Com muitos usos em uma ampla gama de pesquisas químicas, bioquímicas e médicas, tornou-se uma técnica de investigação essencial, permitindo a observação detalhada e em tempo real da estrutura e dinâmica de sistemas biológicos intactos com resolução extremamente alta. Além disso, por ser um método extremamente sensível, mesmo baixas concentrações de amostra podem ser estudadas, o que a torna uma técnica de grande interesse para estudos químicos e farmacêuticos, e, assim, é particularmente usada na indústria farmacêutica, onde substituiu quase completamente a rotulagem radioquímica (ALBANI, 2007).

O principal avanço nas aplicações tecnológicas desta técnica foi possível pelo desenvolvimento da computação e pela nova disciplina de quimiometria. A quimiometria envolve a aplicação de métodos estatísticos e matemáticos, bem como aqueles baseados na lógica matemática, à análise química, fornecendo as ferramentas para a coleta de informações e seu uso racional (OTTO, 2017; BROWN, 2017). Alguns autores descreveram a aplicação da técnica de espectroscopia de fluorescência UV-Vis aliada a tratamento de dados por quimiometria avançada em estudos de equilíbrio químico em solução, demonstrando a capacidade da técnica na avaliação de estruturas químicas em função da polaridade, do pH, força iônica e outros fatores, como por exemplo, a presença e ausência de oxigênio e alteração da concentração do analito de interesse (MARTINS, 1999).

QUIMIOMETRIA

Para compreender o que a quimiometria pode fazer através da aplicação de métodos estatísticos em química, considere o fato de se ter um sistema químico constituído de uma mistura de cinco componentes (A, B, C, D, E), em que se deseja determinar qual é a melhor razão entre os componentes A e B que maximiza uma determinada propriedade ou resposta do sistema. O método clássico consiste em fixar A e variar B e, depois, fixar B e variar A, e avaliar a propriedade/resposta, determinando qual é a proporção A/B que melhor traz resultado esperado. Empregando-se quimiometria, um conjunto mais amplo de experimentos são realizados variando-se A e B de forma simultânea, mas controlada, e, portanto, resultados mais robustos são obtidos na busca do máximo global da proporção A/B que melhor traz os resultados de forma a minimizar as armadilhas dos máximos, ou mínimos, locais no sistema em estudo.

Devido à complexidade dos cálculos, a quimiometria desenvolveu-se praticamente concomitantemente com o campo da ciência da computação e, embora já existissem programas computacionais utilizados em quimiometria, um significativo avanço foi feito com o software Matlab (1989) que é, ainda hoje, um dos softwares de escolha em quimiometria e que vem se aprimorando a cada ano. Menciona-se que por se tratar de uma área de investigação científica,

os métodos em quimiometria estão sempre se inovando e se aperfeiçoando. Assim, não é possível parar no tempo em termos de desenvolvimento de ferramentas matemáticas, pois, dependendo do sistema em estudo e o que se quer obter, novos procedimentos estão sendo continuamente elaborados (OTTO, 2017; BROWN, 2017; FERREIRA, 2016).

Dentre as áreas que abrangem a quimiometria, podem ser citados: calibração multivariada, planejamento e aperfeiçoamento de experimentos, processamento de sinais analíticos, reconhecimento e classificação de padrões, métodos de inteligência artificial etc. (OTTO, 2017; FERREIRA, 2016). Para compreender o que é a calibração multivariada, é possível dividir o termo em:

- ✓ Calibração: processo que permite estabelecer a relação entre a resposta instrumental (sinal analítico) e uma determinada propriedade (física e/ou química) de uma amostra (analito) e,
- ✓ Multivariada: análise de várias fontes ou múltiplas respostas (por exemplo: medidas de absorvância em vários comprimentos de onda) relacionadas a uma ou mais propriedades desconhecidas de uma amostra.

De um modo simplista, os métodos de calibração multivariada em quimiometria podem ser divididos como sendo "qualitativos" e "quantitativos". Os primeiros são mais usados para identificação/comparação de similaridades, e são denominados de Técnicas de Reconhecimento de Padrão (TRP) que, por sua vez, são divididas em "supervisionada" e "não supervisionada". Isto se faz conforme o uso ou não de informações prévias sobre as amostras que constituem o conjunto para construção do modelo. Nas não supervisionadas, a presença de agrupamentos sem o conhecimento prévio do conjunto de amostras (ou das classes) é avaliada e utilizam medidas somente de algumas propriedades. Os segundos, como o próprio nome diz, são mais empregados para a quantificação (OTTO, 2017; FERREIRA, 2016).

Dentre os métodos não supervisionados, destaca-se a Análise por componentes principais (PCA - *Principal Component Analysis*), e dentre os quantitativos, os métodos de regressão, entre eles a Regressão por quadrados mínimos parciais (PLS - *Partial Least Squares*). O PLS é um método de calibração multivariada onde não é necessário o conhecimento de todos os componentes da amostra. Como se trata de uma calibração multivariada, o PLS permite analisar problemas complexos, onde se lida com variáveis X (independentes) e com variáveis de resposta Y (dependentes). O principal objetivo do PLS é prever as variáveis Y a partir das variáveis X, em que se encontram novas variáveis, denominadas de latentes, tanto para matrizes X como para Y. Para obter os parâmetros de um modelo PLS estão disponíveis vários algoritmos, entre os quais, o mais utilizado é o Algoritmo dos Mínimos Quadrados Parciais Iterativos Não - Lineares (NIPALS, *Nonlinear Iterative Partial Least Squares*). O método PLS pode ser utilizado para determinação de um ou de vários analitos na matriz de dados Y, contudo, a técnica realiza a regressão no domínio dos dados transformados e, portanto, não possibilita uma interpretação físico-química direta dos resultados (FERNANDES, 2013).

Outra técnica quimiométrica, dentro da análise multivariada quantitativa, é o que se denomina por método de Resolução Multivariada de Curvas (MCR - *Multivariate Curve Resolution*), que se constitui em um método de processamento de sinais analíticos que têm o

intuito de resolver misturas de sinais. O método de MCR apresenta o pré-requisito de que, em um conjunto de dados, a resposta do sistema seja linear em relação à quantidade de analito. Os principais objetivos do MCR são o isolamento, a resolução e a quantificação das fontes de variação do conjunto de dados. O modelo bilinear MCR decompõe uma matriz de dados de uma amostra de acordo com a equação 1 (TAULER, 1995):

$$X = CS^T + E \quad (1)$$

Na equação 1, tem-se que o modelo bilinear MCR. X ($i \times j$) é a matriz de dados obtida experimentalmente, a matriz C ($i \times f$) é geralmente associada com perfis de concentração, S ($j \times f$) é a matriz associada com os perfis experimentais espectrais puros para cada analito, E é a matriz de resíduos e f o número de componentes matemáticos, o qual, idealmente, deve ser igual ao número de ingredientes/componentes químicos presentes na amostra, ou amostras.

Os parâmetros do modelo são estimados utilizando-se mínimos quadrados alternantes (ALS – *Alternating Least Squares*), que iterativamente ajusta as matrizes C e S ao conjunto de dados X , utilizando um número de fatores f pré-definidos e uma estimativa inicial de C ou S , a qual pode ser obtida de diferentes maneiras, entre as quais, a análise de fatores evolucionários (EFA – *Evolving Factors Analysis*), a decomposição de valores singulares (SVD – *Singular Value Decomposition*) e conhecimento prévio do sistema. O número de analitos pode ser estimado utilizando o conhecimento prévio do sistema em estudo ou a partir dos resultados de análise por SVD da matriz de dados constituída das amostras utilizadas na etapa de calibração (IZQUIERDO-RIDORSA, 1997).

A imposição de uma ou mais restrições ao MCR, entre as quais, não-negatividade, unimodalidade, posto local, trilinearidade e igualdade, pode ser utilizada para ajudar na convergência do algoritmo, resolver problemas de ambiguidade rotacional e garantir que os resultados apresentem significado químico. A restrição de trilinearidade consiste em forçar que os perfis instrumentais/espectrais e de concentração não variem de amostra para amostra, ou seja, no caso de análise cromatográfica, por exemplo, não poderiam ocorrer variações nos tempos de retenção. Na restrição de igualdade, o perfil instrumental ou de concentração é fixado durante a otimização do modelo, esta restrição pode ser aplicada no caso de conhecer previamente o perfil experimental ou de concentração do sistema em estudo. A restrição de posto local é utilizada quando se tem conhecimento prévio que determinado analito está ausente em uma ou mais amostras. Neste caso, esta informação é passada ao modelo fazendo com que o perfil de concentração deste analito seja igual a zero nas respectivas amostras em que ele estiver ausente. Esta restrição é muito útil nos casos em que amostras contendo interferentes são decompostas conjuntamente como amostras de calibração, onde é requerido que o perfil de concentração do interferente seja zero.

Por fim, menciona-se outro método de análise multivariada quantitativa, o método de Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC – *Parallel Factor Analysis*), que é uma técnica multivariada de análise de dados amplamente utilizada em quimiometria para análise de espectros multivariados, como espectros de fluorescência e espectros de absorção UV-VIS. O

objetivo do método PARAFAC é decompor um conjunto de dados multivariados em três matrizes, conhecidas como fatores, que são chamadas de fatores de modo-1, modo-2 e modo-3. Cada um desses fatores representa uma fonte de variação nos dados e pode ser interpretado como uma espécie química, uma classe de amostras ou um conjunto de características espectrais. O método PARAFAC é capaz de modelar interações complexas entre as variáveis e, portanto, pode ser usado para identificar padrões ocultos nos dados, detectar pontos discrepantes (outliers) e realizar análises de classificação. Uma das principais vantagens do método PARAFAC é que o método é capaz de tratar dados altamente correlacionados e que não podem ser analisados usando técnicas univariadas tradicionais (SMILDE; DOORNBOS, 1991; SMILDE et al., 1994).

A união da técnica da fluorescência no UV-Vis com a quimiometria e, concomitantemente, com o avanço das tecnologias, permitiu a construção de instrumentos robustos que são imprescindíveis para estudos químicos e, especialmente, para a investigação de formação de tautômeros/zwitterions em solução, aqui incluindo os medicamentos.

INSTRUMENTAÇÃO

Os espectrômetros são utilizados em laboratórios e diversos equipamentos estão disponíveis hoje no mercado. Estes equipamentos podem apresentar vários arranjos instrumentais, mas, em geral, possuem três elementos básicos: uma fonte de radiação, um monocromador e um detector. A maior parte destes equipamentos comerciais são fechados e, a partir da colocação da amostra, fornecem diretamente o espectro desejado (PAVONI, 2014). Para um fluorímetro, as principais fontes de radiação utilizadas são: lâmpadas de mercúrio, deutério, tungstênio ou xenônio, diodos emissores de luz ou lasers.

Atualmente, os espectrofluorímetros no UV-Vis têm na computação uma importante aliada para tratar os dados. Os espectros podem ser obtidos tridimensionalmente que resulta em um gráfico de contorno do comprimento de onda de excitação vs. comprimento de onda de emissão vs. intensidade de fluorescência. Isso é conhecido como Matriz de Excitação-Emissão (EEM – *Excitation-Emission Matrix*). Os dados da EEM são analisados com um software de quimiometria para extrair informações de componentes do conjunto de dados tridimensionais.

No entanto, existe um problema fundamental para a fluorescência. Amostras em concentrações mais altas produzem diferentes espectros. Essa distorção é denominada de efeito do filtro interno (IFE - *Inner Filter Effect*). Consequentemente, o conjunto de dados EEM, quando processado através da análise multivariada, pode identificar incorretamente diferentes componentes, quando estes são, na verdade, um componente em concentrações diferentes. Isso pode levar a conclusões errôneas. A única maneira de resolver isso é fazer uma segunda medição, uma medição de absorvância, com um instrumento diferente. Em seguida, fazer os cálculos para corrigir o EEM para este fenômeno. Outro problema com a coleta de um EEM é que pode levar de 30 a 60 minutos apenas para coletar uma EEM de fluorescência. Este tempo não inclui uma medição secundária e posterior correção de dados. Portanto, o tempo que leva para obter os dados e o fato de que um EEM tradicional não é uma impressão digital absoluta,

impediu que os dados EEM de fluorescência fossem aplicados a análise de componentes analíticos até o presente momento.

A Horiba Instruments Incorporated introduziu um novo instrumento de fluorescência no UV-Vis, denominado de Aqualog®, que utiliza uma fonte de luz contínua de arco de xenônio de 150 W sem ozônio, e é acoplado a um software que utiliza a quimiometria para tratar os dados. O espectrômetro Aqualog® combina medições de fluorescência e absorvância simultaneamente com resolução de banda óptica correspondente. O Aqualog resolveu ambas as limitações fundamentais. Adquire uma fluorescência EEM em segundos a minutos, e, simultaneamente, obtém absorção e transmissão. Não só produz informações adicionais de absorvância sobre componentes não fluorescentes, mas, também, oferece informações de transmissão espectral da amostra. O Aqualog® usa os dados de absorvância para corrigir a fluorescência EEM e o efeito de filtro interno. Isso é conhecido como Matriz de Emissão Absorvância, Transmitância e Excitação (A-TEEM – *Absorbance, Transmittance and Excitation Emission Matrix*), uma impressão digital molecular da amostra. As aquisições A-TEEM permitem componentes mais precisos de análise em uma faixa mais ampla de concentrações (HORIBA, 2023).

Assim, com o avanço da tecnologia e a elaboração de equipamentos robustos, como o Aqualog®, a técnica de fluorescência no UV-Vis pôde ter aplicações mais diversificadas, entre as quais, a investigação de tautômeros-zwiteriônicos em formulações farmacêuticas, sendo uma importante técnica em estudos de bioiseração, atendendo, conseqüentemente, a RDC N.º 749 da ANVISA. Por fim, ressalta-se que a técnica de fluorescência no UV-Vis, aplicada a investigações de medicamentos, utilizando o Aqualog®, foi validada pela Farmacopeia dos Estados Unidos (USP – *United States Pharmacopeia*) (HORIBA, 2023).

CONCLUSÃO

A RDC N.º 749 traz critérios para a iseração de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência, o que permite diminuir o tempo (e custo) de desenvolvimento para a produção e lançamento de um genérico, porém, mantendo o mesmo rigor científico, sendo um marco regulatório para a indústria farmacêutica. O avanço da tecnologia proporcionada por instrumentos como o Aqualog®, da Horiba Instruments Incorporated, permite que a técnica de fluorescência no UV-Vis, aliada à quimiometria, seja uma ferramenta de grande utilidade em análises e em diversos estudos, incluindo os que atendam a RDC N.º 749, ou seja, os de bioiseração.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/orgaos/agencia-nacional-de-vigilancia>. Acesso em: 26/03/2023.

ALBANI, J. R. **Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy**. Wiley-Blackwell, Hoboken-New Jersey, 2007.

ANTONOV, L. et al. **Tautomerism: Concepts and Applications in Science and technology**. Wiley-VHC, Weinheim, 2016.

BROWN, S. D. The chemometrics revolution re-examined, **Journal Chemometrics**, v. 31: e3856, p. 1–23, 2017.

FERNANDES, D. D. S. **Espectroscopia UV-VIS para avaliação de biodiesel e misturas de biodiesel/diesel**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Programa de Pós – Graduação em Ciências Agrárias, Campina Grande – PB, 70 p., 2013.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2016.

HORIBA INSTRUMENTS INCORPORATED, 2023. Disponível em: www.horiba.com. Acesso em: 28/03/2023.

IZQUIERDO-RIDORSA, A. et al. Second-order multivariate curve resolution applied to rank-deficient data obtained from acid-base spectrophotometric titrations of mixtures of nucleic bases. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 38, n. 2, p. 183–196, 1997.

MARTINS, J. A. et al. Fluorescence piroxicam study in the presence of cyclodextrins by using the PARAFAC method. **Applied Spectroscopy**, v. 53, n. 5, p. 510-522, 1999.

OTTO, M. **Chemometrics: Statistics and computation application in analytical chemistry**, 3. ed., Weinheim: Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017.

PAVONI, J. F. et al. Uma montagem experimental para a medida de fluorescência. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 36, n. 4, 2014.

PANNUTI, E. M. B. **Saúde em contexto**, 2022. Disponível em: <https://saudeemcontexto.com.br/as-resolucoes-de-bioequivalencia-no-brasil/>. Acesso em: 25/03/2023.

SMILDE et al. Multicomponent determination of chlorinated hydrocarbons using a reaction-based chemical sensor. 3. **Analytical Chemistry**, v. 66, 3345-3351, 1994.

SMILDE, A. K.; DOORNBOS, D.A. Three-way methods for the calibration of chromatographic systems: comparing PARAFAC and Three-way PLS. **Journal of Chemometrics**, v. 5, p. 345–360, 1991.

14

TAULER, R. et al. Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. **Journal of Chemometrics**, v. 9, p. 31-58, 1995.

VOGEL, A. R. et al. **Análise Química Quantitativa**, 6.^a ed., São Paulo: Litros Técnicos e Científicos, 2002.

Os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.