

ESPECTROSCOPIA RAMAN APLICADA ÀS CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS: REVISÃO DE LITERATURA

Borio, V.G.C.¹, Machado, N.C.S.S¹, Cecílio, R.A.F.¹, Nicolau, R.A.², Silveira Jr, L.³

¹ Mestrado Engenharia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba, SJC, Brasil, Av. Shishima Hifumi, 2911- Urbanova, 12244-000, Fone/Fax: +55 12 3947 9999

² Laboratório de Biomodulação Tecidual, Universidade do Vale do Paraíba, 12244-000, Fone: +5512 3947 1135, Fax: +55 12 3947 9999

³ Laboratório de Espectroscopia Biomolecular, Universidade do Vale do Paraíba, 12244-000, Fone: +55 12 3947 1124 Fax: +55 12 3947 9999
vborio@univap.br, rani@univap.br, landulfo@univap.br

Resumo- A Espectroscopia Raman tem sido amplamente utilizada em análises farmacêuticas com substanciais vantagens em relação aos métodos clássicos. As duas maiores tecnologias usadas para coletar o espectro Raman são: Raman Dispersivo e *Fourier Transform Raman* (FT-Raman). O material utilizado para a realização do presente trabalho foi obtido através de buscas por trabalhos científicos já existentes na literatura. O objetivo foi realizar uma revisão das principais aplicações desta técnica na área de Farmácia na última década. Muitas aplicações da Espectroscopia Raman como a investigação da estrutura fundamental, análises quantitativas, interação droga–excipiente, formulações, limite de detecção, espécies dependentes de pH, possibilidade de efetuar análises em frascos, determinação de misturas líquidas, diferenciação de medicamentos falsos dos genuínos, entre outras são apresentadas.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman, Farmácia

Área do Conhecimento: IV- Ciências da Saúde

Introdução

A Espectroscopia Raman (ER) tem sido empregada em análises farmacêuticas apresentando inúmeras vantagens em relação a métodos convencionais, principalmente pelo fato de ser uma técnica rápida e não destrutiva. Permite identificar ativos farmacêuticos, assim como outras substâncias presentes nas formulações, sem necessidade de tratamento prévio das amostras (DE BEER et al., 2007). O interesse por técnicas confiáveis e mais ágeis, na determinação de teores em fármacos, é uma constante na área (VINHA JR. et al., 2002).

As duas maiores tecnologias usadas para a obtenção do espectro Raman são: Raman Dispersivo e *Fourier Transform Raman* (FT-Raman). A diferença entre as duas está no laser utilizado e na maneira como o espalhamento Raman é detectado e analisado. Cada técnica tem vantagens únicas e a escolha do método ideal depende da amostra em questão. Muitas formas farmacêuticas já foram estudadas pela ER, como: comprimidos, tabletes, cápsulas, soluções, suspensões, injetáveis, entre outros (VANKEIRSBILCK et al., 2002).

O objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão literária das principais aplicações desta técnica na área de Farmácia na última década, em que a tecnologia trouxe melhorias instrumentais à espectroscopia.

Metodologia

O material utilizado para a realização do presente trabalho foi obtido através de pesquisa bibliográfica e buscas por trabalhos científicos nos bancos de dados Medline, Science Direct, Scielo, Bireme, Web of Science. Foram selecionadas as referências que continham as palavras: Espectroscopia, Raman, Farmácia.

Resultados e Discussão

O método ideal de controle de qualidade para produtos farmacêuticos deve ser capaz de testar medicamentos de forma não destrutiva. A espectroscopia Raman Dispersiva no Infravermelho (IV) tem sido utilizada de forma direta na determinação do conteúdo de cápsulas, ou através do *blister* original. Niemczyk et al. (1998) determinaram a dosagem de Bucindolol pelas duas formas e observaram espectros idênticos, porém com menor intensidade no espectro obtido através do *blister* devido a perdas por reflexão da radiação incidente sobre as curvaturas da parede do invólucro. Segundo Minjung et al. (2007) a possibilidade de determinação de ativos através dos próprios frascos plásticos ou de vidro pode ser problemática devido às variações entre as paredes dos mesmos, além do posicionamento de cada frasco no experimento. Para isto, propuseram uma estratégia: a *Wide Area*

Illumination (WAI). Os autores quantificaram a Povidona em soluções oftálmicas através da WAI associado a um padrão externo, comparando ao sistema Raman convencional. Constataram que o WAI somado ao padrão externo aumentou a reprodutibilidade e confiabilidade das análises através de frascos.

A água apresenta um fraco espalhamento Raman, não causando alterações significativas no espectro. Em consequência disso, medições em meios aquosos se tornaram mais atrativas (DE BEER et al., 2004). Os mesmos determinaram o conteúdo do Acetato de Medroxiprogesterona (MPA) pelo espectro FT-Raman da amostra e em seguida por HPLC. Concluíram que o FT-Raman é mais confiável na quantificação do MPA em suspensão aquosa do que o HPLC, visto que este último requer o preparo das amostras e conhecimento do volume exato da suspensão e sua densidade, o que pode induzir a erros.

De acordo com esta propriedade da água, o Diclofenaco de Sódio (DS) foi quantificado em diversas diluições pelo sistema Raman Dispersivo de bancada e pelo sistema portátil. A técnica mostrou-se fiel devido às intensidades dos espectros obtidos estarem correlacionadas às concentrações do DS de cada diluição. Comparando-se o sistema portátil com o de bancada, obteve-se semelhança de resultados, mesmo com a utilização do cateter de fibra óptica pelo sistema portátil (SILVEIRA et al., 2000).

Segundo Mazurek et al. (2006), não é comum encontrar estudos de quantificação de fármacos por ER quando a concentração dos mesmos encontra-se inferior a 10%. Da mesma forma, estudos de soluções injetáveis são especialmente raros, visto que necessitam ser realizados nos recipientes originais. Os autores determinaram através de FT-Raman a quantificação de soluções comerciais injetáveis contendo 2,4% de DS e 2,4% de Aminofilina. Utilizaram o método PLS para quantificar as amostras baseado no espectro FT-Raman obtido. Concluíram que o método proposto tem potencial para quantificar ativos em soluções injetáveis de forma rápida e confiável.

Nesta mesma linha de pesquisa, Mazurek et al. (2006) testaram o potencial da FT-Raman em sistemas contendo menos de 10-20% da substância ativa. Utilizaram tabletes de Prednisolona e Captopril, inicialmente fazendo um modelo de calibração multivariada com base no espectro sem normalização. Após acrescentou-se um padrão interno às amostras e o espectro normalizado por esta intensidade de banda selecionada foi utilizado para construção de modelos de calibração. Confirmou-se o potencial da Espectroscopia FT-Raman

combinada com modelo de calibração multivariado encontrando concentrações de acordo com aquelas obtidas pelos métodos farmacopéicos.

Em relação ao Controle de Qualidade, Vinha Jr. et al. (2002) desenvolveram um estudo sobre a ER na quantificação de Paracetamol no Tylenol® gotas 200mg/ml. Os resultados foram analisados em relação aos parâmetros de linearidade, exatidão, precisão, determinação de limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). O fármaco foi diluído em polietilenoglicol e placebo de Tylenol gotas em várias concentrações, e apenas com o Paracetamol diluído a 200mg/ml em placebo do Tylenol gotas é que se obteve boa linearidade e exatidão. Nenhuma situação atendeu à precisão, nem aos critérios de LOD e LOQ.

Assim como o anterior, Orkoula et al. (2006) compararam FT-Raman com HPLC em relação aos requisitos de validação de métodos analíticos: linearidade, exatidão, precisão, LOD e LOQ. Quantificaram o Hidrocloridrato de Difenidramina (DPH) no Benadryl (elixir). O resultado obtido com as duas técnicas foi praticamente o mesmo. A diferença foi que o HPLC apresentou menor LOD, mas em compensação o FT-Raman mostrou-se superior em não necessitar de preparo de amostra e de analisar o elixir de forma não-destrutiva. Concluíram que a técnica FT-Raman é uma ferramenta atrativa para a indústria na determinação e monitorização da presença do princípio ativo.

Zhihong et al. (2004) estudaram o espectro Raman de soluções supersaturadas de boratos durante acidificação/alcalinização e diluição, a fim de conhecer profundamente o comportamento químico dos sais em soluções aquosas. Demonstraram a influência da diluição nos picos do espectro, devido à ocorrência de polimerização/despolimerização. Demonstraram ainda os picos relativos a cada grupamento químico, mostrando a clara influência do pH na formação ou dissolução de sais. Concluíram que a ER é válida na verificação do comportamento químico de compostos em solução.

Muitos estudos Raman quantitativos têm sido aplicados na determinação de misturas líquidas. Berrú et al. (2004) mostraram a necessidade de introduzir uma expressão matemática para relacionar a intensidade de um determinado sinal Raman com a respectiva concentração do fármaco em líquidos puros ou em misturas, tornando possível a análise quantitativa. Misturas de 2, 3, 4 e 5 solventes foram analisadas. Na mistura de 2 ou 3 solventes, os resultados foram bons, porém, quando misturou-se 4 ou 5 o desvio padrão já foi maior. Este fato ocorreu devido a interações

químicas entre as substâncias, mas não a problemas com a ER ou com o modelo matemático em si.

Mifune et al. (2006) salientam que durante as análises podem ocorrer alterações com os fármacos, como modificações cristalinas ou nas fases, interações com excipientes, ou ainda alterações por aquecimento e/ou mudanças na pressão do sistema. Além disso, os processos utilizados atualmente para este fim são destrutivos. Utilizaram FT Raman para examinar o estado de algumas substâncias em várias amostras: tabletes de Alacepril, tabletes, pós e nanopartículas de Esparfloxacina, partículas de Sulfato de Quinidina e Cafeína. Indicaram que nos tabletes de Alacepril, e nos grânulos de cafeína e Sulfato de Quinidina, as substâncias ativas não apresentaram alteração após o processo de produção. Todavia, o estado da Esparfloxacina em nanopartículas modificou-se, ao contrário do que se verificou na produção de tabletes e pós da mesma substância. Estes resultados mostraram que FT-Raman pode ser utilizado no controle de qualidade de preparações farmacêuticas cristalinas.

Segundo De Beer et al. (2007), dentre as formas farmacêuticas já analisadas pela ER, as menos estudadas são as pomadas e os cremes. Além disso, o tamanho das partículas influencia a intensidade do sinal Raman, o que pode resultar em conclusões errôneas sobre a quantidade das substâncias. Os autores compararam o Ácido Salicílico (AS) utilizado no preparo de pomadas por diferentes farmacêuticos, com aquele utilizado no desenvolvimento de um modelo de calibração. A seguir determinaram o conteúdo do AS em todas as pomadas pelo método de referência (HPLC) e pelo FT-Raman. Concluíram que FT-Raman é confiável na determinação de AS em pomadas, mas a repetibilidade, embora aceitável, não superou a obtida pelo método de referência. Ficou claro que para um bom resultado, o tamanho da partícula do ativo presente nas amostras deve ser semelhante àquele utilizado no preparo dos padrões.

A ER foi utilizada por Cuffini et al. (2007) na caracterização físico-química do Deflazacort, sabendo que, embora seja bastante comercializada em suspensões e tabletes, as características deste esteróide no estado sólido e sua cristalização são pouco conhecidas. Os autores objetivaram determinar estas características utilizando vários métodos: FT-Raman no IV, Espectroscopia Raman Dispersiva, Termogravimetria, e Ressonância Nuclear Magnética. Cada uma das técnicas contribuiu na determinação de um parâmetro físico-químico. Os autores concluíram que a Espectroscopia Raman trouxe informações adicionais sobre as

interações intermoleculares dos cristais do Deflazacort.

A família dos flavonóides apresenta semelhança estrutural e baixo peso molecular. Um destes compostos é a 3-Hidroxi-flavona, a qual foi analisada pela ER convencional e pela Surface Enhanced Raman Scattering (SERS), cuja invenção facilitou a detecção de moléculas de muito baixa concentração. O espectro SERS foi obtido sobre um eletrodo de Ag (sob aplicação de vários potenciais) e sobre um colóide de Ag (vários pH). A principal diferença entre SERS e ER normal foi a intensidade das bandas na região de 1600cm^{-1} devido as ligações carbonila, hidroxila e a ligação dupla contida no anel (WANG et al. 2007).

Um problema crescente na indústria farmacêutica são as falsificações de medicamentos até mesmo nos países desenvolvidos. De Veij et al (2007) testaram a ER na diferenciação de medicamentos genuínos dos adulterados, comparando o método com Análise colorimétrica e LC-MS. Concluíram que a ER é útil para diferenciar tabletes antimaláricos genuínos dos falsificados, e pode ainda determinar a “impressão digital” dos diferentes tipos de adulterantes.

Conclusão

Nesta revisão pode ser observada a versatilidade da Espectroscopia Raman em relação às aplicações na área de farmácia, como a sua extrema valia na determinação qualitativa, semi-quantitativa e quantitativa de fármacos em diversas formas farmacêuticas, na caracterização das suas formas cristalinas, entre outras aplicações. Foi constatada a existência de algumas técnicas que podem ser associadas à ER, a fim de melhorar a eficiência do sistema, contornando eventuais dificuldades.

Por fim, de acordo com os trabalhos analisados, pode ser verificado o aprimoramento da técnica nesta última década, e principalmente que a ER tornou-se uma ferramenta de grande potencial na indústria farmacêutica. Ao utilizá-la, deve-se, porém considerar as características individuais das amostras, desde a possibilidade de proceder a análise no próprio frasco do medicamento até a necessidade da utilização de técnicas auxiliares.

Referências

- DE BEER, T.R.M., BAEYENS, W.R.G., HEYDEN, V.Y., REMON, J.P., VERVAET, C., VERPOORT, F. Influence of particle size on the quantitative determination of salicylic acid in a pharmaceutical ointment using FT-Raman spectroscopy. *Eur J Pharm Sci.* V.30 p. 229–35, 2007.

- VINHA JR., R. **Espectroscopia Raman na determinação quantitativa de Paracetamol. 2002. Dissertação** (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2002.
- VANKEIRSBILCK, T., VERCAUTEREN, A., BAEYENS, W., VAN DER WEKEN, G., VERPOORT, F., VERGOTE, G., REMON, J.P. Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis. **Trends Analyt Chem**, V.21, n.12, 2002.
- Niemczyk, T.M, Delgado-Lopez, M.M, Allen, F.S., Quantitative determination of Bucindolol concentration in intact gel capsules using Raman Spectroscopy. **Anal. Chem.**, V. 70, p. 2762-5, 1998.
- KIM, M., CHUNG, H, WOO, Y., KEMPER, M. S. A new non-invasive, quantitative Raman technique for the determination of an active ingredient in pharmaceutical liquids by direct measurement through a plastic bottle. **Anal Chim Acta** V.587, p.200-7, 2007.
- DE BEER, T.R.M., BAEYENS, W.R.G., HEYDEN, V.Y., REMON, J.P., VERVAET, C., VERPOORT, F. Development and validation of a direct, non-destructive quantitative method for medroxyprogesterone acetate in a pharmaceutical suspension using FT-Raman spectroscopy. **Eur J Pharm Sci**. V.23 p. 355–62, 2004.
- SILVEIRA JR, L., DUARTE, J., NICOLAU, R.A., ZÂNGARO, R.A., PACHECO, M.T.T., GRAÇA, F.A.S., MARTINS, R.A.B.L. Dosagem de Diclofenaco Sódico por Espectroscopia Raman: Novas Perspectivas em Farmacologia Clínica. **Rev Facul Med Vet Val.**, Ano I, V.2, 2000.
- MAZUREK, S., SZOSTAK, R. Quantitative determination of diclofenac sodium and aminophylline in injection solutions by FT-Raman spectroscopy. **J Pharm Biomed Anal**. V.40 p.1235-42, 2006.
- MAZUREK, S., SZOSTAK, R. Quantitative determination of captopril and prednisolone in tablets by FT-Raman spectroscopy. **J Pharm Biomed Anal**. V.40 p.1225-30, 2006.
- ORKOULA, M.G., KONTOYANNIS, C.G., MARKOPOULOU, C.K., KOUNDOURELLIS, J.E. Quantitative analysis of liquid formulations using FT-Raman spectroscopy and HPLC The case of diphenhydramine hydrochloride in Benadryl®. **J Pharm. Biomed Anal**. V.41 p.1406-11, 2006.
- ZHIHONG, L., B.O, G., SHUNI, L., MANCHENG, H., SHUPING, X. Raman spectroscopic analysis of supersaturated aqueous solution of MgO·B₂O₃–32%MgCl₂–H₂O during acidification and dilution. **Spectrochim Acta Part A**, V 60 p.3125-8, 2004.
- BERRÚ, R. Y. S., VALTIERRA, J. M., GUTIÉRREZ, C. M., REYES, C. F. Quantitative NIR Raman analysis in liquid mixtures. **Spectrochim Acta Part A**, V 60 p.2225-2229, 2004.
- MIFUNE, M., IWASAKI, T., KOZAKI, Y., TSUKAMOTO, I., SAITO, M., KITAMURA, Y., YAMAGUCHI, T., SAITO, Y. Evaluation of the state of active ingredients in pharmaceutical preparations using Fourier Transform-Raman difference spectra. **Yamagaku Zasshi**, V.126, n.12, p.1363-7, 2006.
- DE BEER, T.R.M., BAEYENS, W.R.G., HEYDEN, V.V., REMON, J.P., VERVAET, C., VERPOORT, F. Influence of particle size on the quantitative determination of salicylic acid in a pharmaceutical ointment using FT-Raman spectroscopy, **Eur J Pharm Sci**. V.30 p. 229–35, 2007.
- CUFFINI, S.L., ELLENA J.F., MASCARENHAS, Y.P., AYALA, A. P., SIELSER, H.W., FILHO, J. M., MONTI, G. A., AIASSA, V., SPERANDE, N. R. Physicochemical characterization of deflazacort: **Therm, crystallogr spectr study**, **Steroids**, V.72, p.261-9, 2007.
- WANG, M., TESLOVA, T., XU, F., SPATARU, T., LOMBARDI, J.R., BIRKE, R. L. Raman and Surface Enhanced Raman Scattering of 3-Hydroxyflavone, **J Phys Chem C**, V.111 p.3038-43, 2007.
- DE VEIJ, M., VANDENABEELE, P., HALL, K.A, FERNANDEZ, F.M., GREEN, M.D., WHITE, N.J., DONDORP, A.M., NEWTON, P.N., MOENS, L. Fast detection and identification of counterfeit antimalarial tablets by Raman spectroscopy, **J Raman Spectrosc**. V 38, p.181-7, 2007.
- PIINZARU, S.C., PAVEL, I., LEOPOLD, N., KIEFER, W. Identification and characterization of pharmaceuticals using Raman and surface-enhanced Raman scattering, **J Raman Spectrosc**. V 35, p.338-46, 2004.