

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Perfil químico e tecnológico de medicamentos falsificados: uma abordagem estatística multivariada para os casos do Viagra e do Cialis

RAFAEL SCORSATTO ORTIZ

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Perfil químico e tecnológico de medicamentos falsificados: uma abordagem estatística multivariada para os casos do Viagra e do Cialis

Tese apresentada por **Rafael Scorsatto Ortiz**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mayorga Borges
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Pereira Limberger

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado – Desenvolvimento, Avaliação da Qualidade e Utilização de Insumos e Produtos Farmacêuticos e Cosméticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada, com a concessão de voto de louvor, em 22.03.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Adriano Otávio Maldaner

Academia Nacional de Polícia

Prof. Dr. George González Ortega

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Michel José Anzanello

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ortiz, Rafael Scorsatto

Perfil químico e tecnológico de medicamentos falsificados: uma abordagem estatística multivariada para os casos do Viagra e do Cialis / Rafael Scorsatto Ortiz. -- 2013. 90 f.

Orientador: Paulo Mayorga.

Coorientadora: Renata Pereira Limberger.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de PósGraduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR/RS, 2013.

1. Perfil químico. 2. Falsificação de medicamentos. 3. Estatística multivariada. 4. Viagra. 5. Cialis. I. Mayorga, Paulo, orient. II. Limberger, Renata Pereira, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo autor.

“Estudar sem pensar é fútil.

Pensar sem estudar é perigoso.”

— *Confúcio, em Os Analectos.*

“Aprendi pouco.

Mas gostei de aprender.

E continuo aprendendo”

— *Juremir Machado, em Cotidiano.*

Dedico este trabalho
aos meus pais, filha, esposa, irmãos e
familiares, pelos valores humanos; e, em
especial, a minha avó Doroti, pela sua
sabedoria no viver e pela sua fascinante
capacidade de enxergar as estrelas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Mayorga e Prof^a. Dr^a. Renata P. Limberger, pelo conhecimento prestado, pela visão de pesquisa científica colaborativa e, acima de tudo, pela oportunidade de nosso amigável e produtivo convívio.

Aos meus orientadores anteriores, Prof^a. Dr^a. Annelise E. Gerbase, pela curiosidade científica, Prof^a. Dr^a. Cristine Handel, pelo incentivo ao trabalho individual e Prof. Dr. George González-Ortega, pela abordagem estatística no desenho e na análise de experimentos.

Aos professores, funcionários e colegas da Faculdade de Farmácia, pela convivência enriquecedora.

Aos colegas do SETEC/RS, pelo excelente ambiente e filosofia de trabalho e estudo. Aos chefes Villela, Júlio, Fortes e Brunatto e aos companheiros da “*planície*”, Ávila, Neron, Leandro, Royer, Fernanda, Daniele, Gerson, Sander, Balinhas, Dirceu, Carina, Bruno, Miguel, Lienert, Klein, Gustavo, Kratz, Othelo, Brait, Gatteli, Rossi, Garcia, Carla e demais.

Ao Prof. Dr. Marcus N. Eberlin, pela acolhida no Laboratório Thompson (Campinas/SP) e pelas revisões em espectrometria de massas.

Ao Prof. Dr. Wanderson Romão, pela ótima parceria firmada em grande parte dos experimentos desta tese.

À colega PCF Carolina, pelo encaminhamento de amostras para perícia.

Aos amigos Diogo Miron e Vanessa Weisheimer, pelo auxílio na obtenção de padrões e arquivos relacionados a este trabalho.

Aos meus pais Hélio e Elizette, pelo amor e pelos esforços e incentivos incondicionais ao estudo e à correta conduta profissional.

A minha querida Mariana, pela satisfação de vê-la trilhando seu próprio caminho com passos firmes.

À Helen, meu exemplo de dedicação e conhecimento, ao Gabriel e ao Daniel pelo companheirismo.

Aos meus demais familiares, pela divisão das tristezas e soma das alegrias. À dinda Eliza pelo zelo, ao dindo Nininho pelo sagrado churrasco dominical, à tia Beth e tio Macário, pela preocupação com o desenvolvimento nestes mundos que habitamos.

À Kris, pela cumplicidade, pelas ideias, pelo carinho, pelo sorriso, pelo Amor e pelos nossos sonhos.

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Estatuto do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de capítulos, para melhor organização e discussão dos resultados obtidos em cada etapa. Assim, este trabalho encontra-se dividido da seguinte forma:

Introdução, contendo a caracterização e justificativa do estudo proposto bem como a formulação da hipótese de trabalho;

Objetivos, geral e específicos;

Revisão de literatura;

Capítulos I a V, artigos publicados, originados dos diferentes experimentos realizados e aceitos ou submetidos a periódicos científicos;

Discussão geral, visando um entendimento global dos resultados apresentados nas diferentes etapas do trabalho;

Conclusões;

Perspectivas;

Referências bibliográficas; e,

Anexos, contendo trabalhos colaborativos e apresentações em congressos originados deste projeto.

Sumário

RESUMO.....	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	5
Objetivo geral	6
Objetivos específicos	6
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
CAPÍTULO I – Perfil tecnológico	17
I.1 Introdução	18
I.2 Artigo: <i>Physical profile of counterfeit tablets Viagra and Cialis</i>	19
CAPÍTULO II – Perfil inorgânico.....	21
II.1 Introdução	22
II.2 Artigo: <i>Fingerprinting of Sildenafil Citrate and Tadalafil Tablets in Pharmaceutical Formulations via X-Ray Fluorescence Spectrometry (XRF)</i>	23
CAPÍTULO III – Perfil orgânico.....	25
III.1 Introdução	26
III.2 Artigo: <i>Chemical fingerprinting of counterfeits of Viagra and Cialis tablets and analogues via electrospray ionization mass spectrometry</i>	26
CAPÍTULO IV – Perfil de substâncias farmacologicamente ativas.....	29
IV.1 Introdução	30
IV.2 Artigo: <i>Profiling counterfeit Cialis, Viagra and analogues by UPLC-MS</i>	31
CAPÍTULO V – Perfil por espectroscopia de infravermelho	33
V.1 Introdução	34
V.2 Artigo: <i>Counterfeits Cialis and Viagra fingerprinting by ATR-FTIR spectroscopy with chemometry: a same pharmaceutical powder mixture can be used to falsify two medicines?</i>	35
DISCUSSÃO GERAL	37
CONCLUSÕES	57
PERSPECTIVAS.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	75
1 <i>A new methodology for detection of counterfeit Viagra and Cialis tablets by image processing and statistical analysis</i>	76

2	<i>Detection of counterfeit medicines with the video spectral comparator: the examples of Viagra and Cialis</i>	77
3	Utilização de características físicas de comprimidos na detecção de falsificações de medicamentos: os exemplos do Viagra e do Cialis	78
4	Determinação de citrato de sildenafil e tadalafila em apreensões de comprimidos similares de Viagra e falsificados de Cialis	79
5	<i>Investigating the Chemical Composition of Viagra and Cialis Packaging (Authentic and Counterfeit) by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Thermal Analysis (TG/DTA)</i>	80
6	<i>Blisters Packaging Fingerprinting of Viagra® and Cialis® via Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) allied to Chemometric Methods</i> - manuscrito submetido ao Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	81
7	Obtenção de perfis químicos de medicamentos falsificados com FTIR-ATR associada a métodos quimiométricos de análise: uma única mistura farmacêutica pode ser empregada na falsificação de Cialis e de Viagra?	82
8	<i>A Multivariate-based Wavelength Selection Method for Classifying Medicines Into Authentic or Counterfeit Classes</i> - manuscrito submetido ao Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	83
9	Pareceres da banca examinadora	84
	BIOGRAFIA	89

RESUMO

Estudos para obter perfis químicos ou físicos de drogas ilícitas destinam-se a provar materialmente a existência de um crime ou para fornecer informações precisas aos serviços de inteligência estratégica e operacional. Um perfil pode ser definido como um conjunto de características específicas selecionadas para proporcionar informações sobre determinada produção, por exemplo, clandestina. Historicamente, focados sobre drogas de abuso, tais estudos podem ser perfeitamente utilizados em outro problema das Ciências Forenses: a falsificação de medicamentos. Seguindo uma tendência mundial, a maior incidência de medicamentos falsificados no Brasil é dos produtos Viagra[®] (citrato de sildenafil, SLD, Pfizer) e Cialis[®] (tadalafila, TAD, Eli Lilly). Avaliaram-se perfis físicos e químicos de amostras forenses de Viagra e Cialis falsificados fazendo uso de Análise Multivariada de Dados (AMD). O controle físico dos comprimidos, o perfil inorgânico por espectrometria de fluorescência de raios – X (XRF), o perfil orgânico por espectrometria de massa com ionização por eletro spray (ESI-MS), o perfil de ingredientes farmacologicamente ativos (IFA) por cromatografia líquida acoplada espectrometria de massa (UPLC-MS) e o perfil por espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR) foram avaliados para caracterizar as amostras, detectando falsificações e agrupando amostras com propriedades semelhantes. Os resultados mostraram a presença de falsificações de risco à saúde com a existência de outros IFA do que o especificado na embalagem; a ocorrência simultânea de dois IFA em um mesmo produto; a existência de outros IFA (contaminantes); e concentrações de TAD e SLD muito mais elevadas do que nos medicamentos originais. A aplicação de ferramenta de AMD torna a representação dos dados experimentais mais clara e conclusiva relativamente às diferenças na composição das amostras testadas. Identificamos pares de amostras de apreensões diferentes estreitamente ligadas pelo perfil químico, que podem estar associadas a uma origem ilícita comum de mistura farmacêutica pré-compressão e/ou de ciclo de compressão. Além disso, nossos resultados sugerem a hipótese de uma mesma mistura farmacêutica, contendo apenas SLD, foi empregada na fabricação de comprimidos falsificados de Viagra e de Cialis.

ABSTRACT

Studies to obtain chemical or physical profiles of illicit drugs intended to materially prove the existence of a crime or to provide to accurate information the strategic and operational intelligence services. A profile can be defined as a series of specific characteristics selected to provide information about certain production (e.g., clandestine). Historically focused on drugs of abuse, such studies can be perfectly used in another problem on Forensic Sciences field: counterfeit medicines. Following a global trend, the highest incidence of counterfeit medicines in Brazil is on the products Viagra[®] (sildenafil citrate, SLD, Pfizer) and Cialis[®] (tadalafil, TAD, Eli Lilly). We studied physical and chemical profiles of forensic counterfeit Viagra and Cialis samples using also Multivariate Data Analysis (MDA). Physical control of tablets, inorganic profile by X – Ray fluorescence spectrometry (XRF), organic profile by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), active pharmacologically ingredients (API) profile by liquid chromatography coupled mass spectrometer (UPLC-MS) and infrared spectroscopy (FTIR-ATR) profiles were evaluated to characterize the samples allowing detection of counterfeits and grouping samples with similar properties. The results showed the presence of health risk counterfeits with the existence of API other than specified on the package, the simultaneous occurrence of two API in the same product, the existence of others contaminants API and concentrations of TAD and SLD much higher than in original commercial tablets. By applying a MDA tool the experimental data representation becomes more clear and conclusive with respect to the differences in composition of tested samples. We identified paired samples from different seizures closely linked by chemical profile, which can be associated with a common origin of mixture powders and/or tableting cycle. In addition, our results suggest the hypothesis of a unique pharmaceutical powder mixture containing only SLD, which was compressed into counterfeits Viagra and Cialis tablets.

INTRODUÇÃO

Um perfil pode ser definido como uma série de características específicas selecionadas de modo a fornecer informações acerca de determinada produção (por exemplo, clandestina) (Weyermann *et al.*, 2008; Marquis *et al.*, 2008). A partir do estabelecimento de correlações químicas e tecnológicas entre amostras, podem ser identificados vínculos específicos entre fornecedores e usuários, padrões de distribuição de produtos ilícitos, e a origem, inclusive geográfica, das amostras analisadas (UNDCP, 2001).

Os primeiros estudos sobre perfis químicos aplicados à Ciência Forense foram publicados na década de 1990 e, até os dias atuais, as drogas de abuso seguem como objetos mais frequentes de estudo. Neste sentido, destacam-se os trabalhos relacionados à heroína, à cocaína e aos anfetamínicos, tendo como principal fonte disseminadora de conhecimento o *Institut de Police Scientifique (École des Sciences Criminelles, Université de Lausanne, Suisse)* (UNODC, 2005; Dams *et al.*, 2001; Lociciro *et al.*, 2007; Lociciro *et al.*, 2008; Weyermann *et al.*, 2008; Marquis *et al.*, 2008; Dujourdy *et al.*, 2008; Andersson *et al.*, 2007; Ensing *et al.*, 1992).

Entende-se que os estudos de obtenção de perfis químicos e tecnológicos podem ser aplicados com sucesso a outro problema envolvendo as Ciências Farmacêuticas e a criminalidade: o comércio ilícito de medicamentos seja por falsificação, adulteração ou contrabando/descaminho de medicamentos. Trata-se de um problema mundial (WHO, 1999; WHO, 2008), abordado por muitos autores em estudos recentes (Newton *et al.*, 2006; Van Beek e Montoro, 2009; Santamaria-Fernandez *et al.*, 2009; Anderson, 2009; Lopes *et al.*, 2009; Rodionova *et al.*, 2005; Peinder *et al.*, 2008).

A realidade da perícia brasileira, vivenciada nos Laboratórios da Criminalística do Departamento de Polícia Federal (Ames e Souza, 2012), corrobora estatísticas que apontam para as especialidades Viagra[®] (citrato de sildenafil, SLD, Pfizer) e Cialis[®] (tadalafila, TAD, Eli Lilly) como sendo responsáveis pelos maiores índices de falsificação no país (Brasil, 2008). Tais medicamentos são empregados no tratamento da disfunção erétil masculina, por atuarem como inibidores seletivos da fosfodiesterase tipo-5 (PDE-5) (Hardman *et al.*, 2003). Além do aspecto criminal do tema, tipificado pela legislação brasileira como *crime hediondo contra a saúde pública* (Lei 9677/98),

cabe salientar que o comércio ilegal destes produtos pode acarretar sérios problemas de saúde pública no mundo todo (Jung *et al.*, 2012).

Neste contexto, a hipótese básica deste estudo está centrada em responder a seguinte questão: *Os estudos de perfil químico e tecnológico podem ser aplicados aos casos de falsificação dos medicamentos Viagra e Cialis de modo a detectar e, quiçá, rastrear falsificações?*. Entre inúmeros pensamentos que advêm desta premissa inicial, ainda se pergunta: *“Qual(is) a(s) técnica(s) analítica(s) mais adequada(s) para gerar um perfil que permita a detecção de falsificações?”*; *“Que ferramenta(s) estatística(s) de análise melhor se aplica(m) ao tratamento dos dados experimentais gerados?”*; *“É possível classificar amostras de diferentes apreensões em um grupo de amostras quimicamente relacionadas?”*; *“É possível propor algum novo método que facilite a verificação forense da autenticidade ou inautenticidade de um medicamento apreendido, em especial, nos locais nos quais um perito não dispõe dos equipamentos ideais?”*.

Tendo como ponto de partida tais pressupostos, abordagem de tratamento e questionamentos, encontram-se dispostos na sequência os trabalhos desenvolvidos para obtenção de perfis tecnológicos e químicos de amostras forenses examinadas no Setor Técnico-Científico da Polícia Federal em Porto Alegre/RS. Além da revisão bibliográfica, dos resultados e suas discussões bem como das conclusões, são relacionadas perspectivas de prosseguimento deste trabalho de pesquisa científica.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Desenvolver ferramentas analíticas tendo em vista sua aplicação em atividades forenses, no sentido de subsidiar os sistemas de informações estratégicas para o combate do comércio ilícito de medicamentos, seja por falsificação, adulteração, contrabando ou descaminho.

Objetivos específicos

- Estabelecer metodologia para determinação do teor de SLD e de TAD por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) com fotoarranjo de diodos (DAD) e detector por espectrometria de massas (MS) a partir de comprimidos.
- Estabelecer metodologia para análise da fração inorgânica em comprimidos contendo SLD e TAD, empregando espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF).
- Estabelecer metodologia para análise da fração orgânica em comprimidos contendo SLD e TAD, empregando cromatografia líquida (LC) com injeção direta e detecção por espectrometria de massas (MS).
- Estabelecer metodologia de análise para identificação de marcas comerciais e detecção de falsificações em comprimidos contendo SLD e TAD por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier a partir de seus complexos pulveréneos.
- Investigar o perfil químico e tecnológico de amostras comerciais e de amostras apreendidas pelo DPF suspeitas de conter SLD e/ou TAD e encaminhadas para perícia no Setor Técnico-Científico no Rio Grande do Sul (SETEC/RS) empregando os métodos analíticos retro citados com o auxílio de Análise Multivariada de Dados (AMD).
- Executar ação efetiva visando o desenvolvimento da Ciência Forense conforme o previsto no Convênio de Cooperação Técnico-Científica vigente entre a UFRGS, através da Faculdade de Farmácia, e o DPF/RS com a finalidade de estabelecer e regular os programas de Cooperação Técnico-Científica e de Formação e Capacitação de Recursos Humanos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Historicamente, os primeiros estudos sobre perfil químico aplicados à Ciência Forense foram publicados na década de 1990 e, até os dias atuais, os objetos mais frequentes de estudo são: heroína, cocaína, *Cannabis* e anfetaminas, incluindo a MDMA (3,4-metilenodioximetanfetamina), comumente conhecida por *ecstasy*. Tanto os produtos de origem natural quanto os sintéticos são constituídos, normalmente, de misturas complexas que raramente contêm a droga isolada. Como consequência de condições de produção peculiares a laboratórios clandestinos, isentos de controle de qualidade na produção, sua composição química exhibe grande variabilidade (UNODC, 2005; Dams *et al.*, 2001; Locicero *et al.*, 2007; Locicero *et al.*, 2008; Weyermann *et al.*, 2008; Marquis *et al.*, 2008; Dujourdy *et al.*, 2008; Andersson *et al.*, 2007; Ensing *et al.*, 1992).

Nesse contexto, estudos de caracterização física e química de drogas e de medicamentos ilícitos podem fornecer informações de grande utilidade para as autoridades policiais. Podem ser estabelecidos vínculos químicos e tecnológicos entre amostras, permitindo que materiais de diferentes apreensões possam ser classificados em grupos de amostras relacionadas. Conseqüentemente, e mais importante do ponto de vista criminal, vínculos específicos entre fornecedores e usuários, padrões de distribuição de drogas/medicamentos ilícitos, e a origem, inclusive geográfica, das amostras analisadas podem ser identificados (UNDCP, 2001).

Sob as denominações “perfil químico”, “*drug profile*”, “*profiling*”, “*fingerprinting*”, “assinatura química”, “*drug intelligence*”, “DNA das drogas”, entre outras, estudos com obtenção de perfis químicos e/ou físicos de amostras de drogas e de medicamentos ilícitos visam provar materialmente a existência de um crime ou subsidiar com informações precisas os serviços de inteligência estratégica e operacional.

Para amostras de drogas sintéticas encontradas sob a forma farmacêutica de comprimidos, em geral – assume-se que apreensões com características correspondentes advêm de um mesmo lote de produção, enquanto que comprimidos que exibem características divergentes têm origem em fabricantes diferentes. Os diferentes estágios de produção de comprimidos contendo uma droga ilícita, que pode ser entendida como drogas de abuso ou

fármacos provenientes ou usados de forma ilícita, geram um conjunto de características físicas e químicas ao produto final, qual seja o comprimido (Weyermann *et al.*, 2008; Marquis *et al.*, 2008). As principais etapas de produção podem ser elencadas como segue: (1) síntese do princípio ou ingrediente ativo, caracterizada pela sua composição orgânica e impurezas, tais como coprodutos de síntese e solventes oclusos, ambos relacionados à rota sintética empregada e não completamente removidos do produto final, além de produtos de degradação (2) adição de adjuvantes tecnológicos que viabilizam a produção da forma farmacêutica, tais como diluentes, aglutinantes e deslizantes, bem como suas impurezas. Esta mistura na forma de pó é definida em um estudo preliminar denominado pré-compressão do lote (Weyermann *et al.*, 2008) (3) compressão da mistura pulveréa em comprimidos; um conjunto de comprimidos produzidos por uma determinada máquina de comprimir fornece propriedades que definem um estudo denominado pós-compressão do lote (Marquis *et al.*, 2008). Estes diferentes processos, síntese, adição de adjuvantes e compressão, podem ser realizados em locais distintos e devem ser considerados separadamente durante a realização de estudos de obtenção de perfis. Segundo Milliet e colaboradores (2009), após a compressão, as amostras submetidas à análise não costumam sofrer alterações até o consumo ou apreensão pelas forças policiais.

Parece sensato pensar que a obtenção do perfil químico visando inicialmente às drogas de abuso pode perfeitamente ser aplicada e fornecer informações valiosas sobre outro problema atual que envolve as Ciências Farmacêuticas e a criminalidade: a origem ilícita de produtos farmacêuticos, legalmente permitidos para consumo, seja por falsificação, adulteração, contrabando ou descaminho.

A produção de medicamentos falsificados é um problema criminal que acarreta sérios riscos à saúde pública no mundo todo. Estudos sugerem que o crescimento significativo deste indesejável fenômeno na última década pode ser associado a um acesso mais fácil por parte dos falsários às tecnologias necessárias para copiar produtos farmacêuticos originais (Fernandez *et al.*, 2011). Além disso, as vendas pela *internet* permitem a qualquer pessoa comprar qualquer medicamento sem receita médica, de forma fácil e anônima,

por vezes em *sites* fraudulentos (Sacré *et al.*, 2010; Rodomonte *et al.*, 2010). Na tentativa de combater este fenómeno, a Organização Mundial da Saúde criou em 2006 uma coalizão global denominada *IMPACT (International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce)*. O grupo tem trabalhado ativamente na formação da necessária colaboração internacional para buscar soluções globais para este desafio bem com na conscientização sobre os perigos da contrafação de produtos farmacêuticos (WHO, 2008). Por definição, medicamentos falsificados são produtos farmacêuticos que "*foram rotulados de forma errônea – deliberada e fraudulentamente – no que diz respeito à identidade e/ou à origem*" (WHO, 1999).

Em consonância com diretrizes das Organizações das Nações Unidas no combate à falsificação em medicamentos (WHO, 1999), diferentes autores abordam a identificação dessas, inclusive fazendo uso de uma gama variada de técnicas analíticas (Newton *et al.*, 2006; Van Beek e Montoro, 2009; Santamaria-Fernandez *et al.*, 2009; Anderson, 2009; Lopes *et al.*, 2009; Rodionova *et al.*, 2005; Peinder *et al.*, 2008).

A verificação da falsificação de um medicamento fundamenta-se basicamente em uma comparação entre o produto original ou dados da literatura e o produto questionado. Sua detecção envolve uma análise detalhada de diferentes elementos existentes nas embalagens e na forma farmacêutica propriamente dita, incluindo, de uma maneira geral:

(1) exames macroscópicos das embalagens e bulas, referentes aos padrões de impressão, incluindo fontes e figuras, hologramas e existência de tinta reativa. Trata-se de uma avaliação muitas vezes subjetiva e que pode ser prejudicada pelo fato de não haver embalagem em determinada apreensão;

(2) avaliação externa da forma farmacêutica, referente aos aspectos visuais – podendo incluir o auxílio de equipamentos de ampliação e imageamento – e aspectos tecnológicos – para o caso de comprimidos incluindo medidas de dimensões e massa, gerando um perfil dos aspectos físicos, e;

(3) análises químicas para caracterização da formulação visando identificar ou quantificar fármacos e adjuvantes tecnológicos por sistemáticas e

técnicas clássicas de separação e identificação de substâncias. Estes exames são executados cronologicamente nesta sequência com cotejo dos resultados contra materiais de referência ou dados da literatura.

A legislação brasileira criminaliza a falsificação de medicamentos na Lei 9677/98, em seus artigos 273º e 275º, como um crime hediondo contra a saúde pública, inafiançável, com pena de reclusão de até quinze anos, além de sanção pecuniária (conforme segue). Cabe lembrar que, em se tratando de matéria criminal, o resultado da análise pode ser contestado no âmbito judicial. Assim, uma decisão fundamentada em dados não confiáveis pode acarretar consequências legais injustas para as partes envolvidas (Peters *et al.*, 2007). Sendo assim, a certeza fornecida no resultado final de uma análise forense tem de ser a maior possível, não devendo ser descartada nenhuma informação que auxilie o juiz a formar sua convicção.

Lei 9677, de 02 de julho de 1998.

(...)

Art. 273. *Falsificar, corromper, adulterar ou alterar produtos destinados a fins terapêuticos ou medicinais:*

Pena - reclusão, de 10 (dez) a 15 (quinze) anos, e multa.

§ 1º Nas mesmas penas incorre quem importa, vende, expõe à venda, tem em depósito para vender ou, de qualquer forma, distribui ou entrega a consumo o produto falsificado, corrompido, adulterado ou alterado.

§ 1º A. Incluem-se entre os produtos a que se refere este artigo os medicamentos, as matérias-primas, os insumos farmacêuticos, os cosméticos, os saneantes e os de uso em diagnóstico.

§ 1º B. Está sujeito as penas deste artigo quem pratica as ações previstas no § 1º em relação à produção em qualquer das seguintes condições:

I - sem registro, quando exigível, no órgão de vigilância sanitária competente;

II - em desacordo com a fórmula constante do registro previsto no inciso anterior;

III - sem as características de identidade e qualidade admitidas para a sua comercialização;

IV - com redução de seu valor terapêutico ou de sua atividade;

V - de procedência ignorada;

VI - adquiridos de estabelecimento sem licença da autoridade sanitária competente.

Modalidade culposa

§ 2º *Se o crime é culposo:*

Pena - detenção, de 1 (um) a 3 (três) anos, e multa.

(...)

Art. 275. *Inculcar, em invólucro ou recipiente de produtos alimentícios, terapêuticos ou medicinais, a existência de substâncias que não se encontra em seu conteúdo ou que nele existe em quantidade menor que a mencionada:*

Pena - reclusão, de 1 (um) a 5 (cinco) anos, e multa.

Todos os tipos de medicamentos podem ser falsificados, mas o sucesso de mercado dos inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (PDE-5) para o tratamento da disfunção erétil: a SLD (Viagra[®], Pfizer), a TAD (Cialis[®], Eli Lilly), e a vardenafila (Levitra[®], Bayer) levou a uma explosão em versões falsificadas destes produtos (Holzgrabe e Malet-Martino, 2011). Inibidores PDE-5 são a primeira escolha para a falsificação devido ao seu alto custo e ao embaraço associado com a patologia subjacente, levando as pessoas a recorrer à *internet* para a compra anônima.

O Brasil segue essa tendência tendo o Viagra[®] e o Cialis[®] como os medicamentos mais falsificados atualmente, segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2008). No âmbito da Criminalística do Departamento de Polícia Federal (DPF), medicamentos contendo a SLD e a TAD são objetos de exames periciais que podem ser agrupados de duas formas, segundo a tipificação penal envolvida: a) falsificação das especialidades farmacêuticas Viagra[®] e Cialis[®] e b) contrabando ou descaminho de medicamentos de origem estrangeira, internalizados de modo irregular no Brasil. O banco de dados do DPF mostra que 80% dos laudos periciais envolvendo medicamentos declarados falsificados incluíram Cialis e/ou Viagra falsificados – dados de Janeiro de 2007 a setembro de 2010, correspondendo a 371 laudos com 295 laudos apontando positivo para falsificação (Ames e Souza, 2012). Tal como ocorre com outros produtos ilegais apreendidos pelas forças policiais, esta estatística deve representar apenas uma pequena parcela dos números do mercado real. Ou seja, trata-se

da “*ponta do iceberg*”, um fenômeno que em criminologia recebe o nome de “*cifra negra*”.

A SLD e a TAD (Figura 1) são fármacos empregados no tratamento da disfunção erétil masculina, por atuarem como inibidores seletivos da fosfodiesterase tipo-5 (Hardman *et al.*, 2003). No mercado farmacêutico brasileiro são comercializadas, na forma de comprimidos perorais, as especialidades farmacêuticas Cialis[®] – contendo a TAD, na forma de base – e o Viagra[®] seguido de dezenas de marcas comerciais e genéricas que o seguiram, depois de expirado o prazo de proteção patentária – todas contendo a SLD na forma de citrato. Curiosamente, ainda de um ponto de vista criminal, diferentes estudos apontam o emprego de inibidores da PDE-5 na adulteração de produtos de origem vegetal de uso lícito, como suplementos alimentares energizantes ou virilizantes (Zou *et al.*, 2006; Reepmeyer e Woodruff, 2007; Singh *et al.*, 2008), e de uso ilícito, como maconha (Venhuis e De Kaste, 2008).

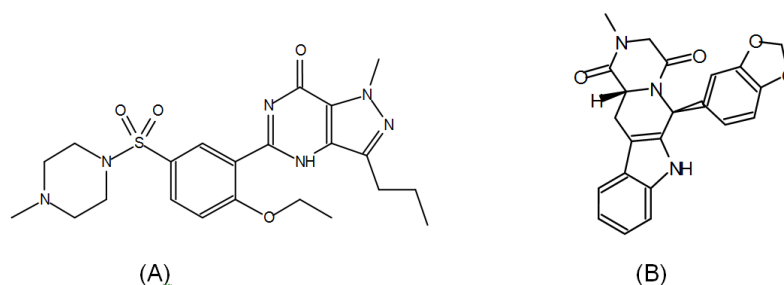


Figura 1. Estruturas químicas da sildenafil (A) e da tadalafila (B).

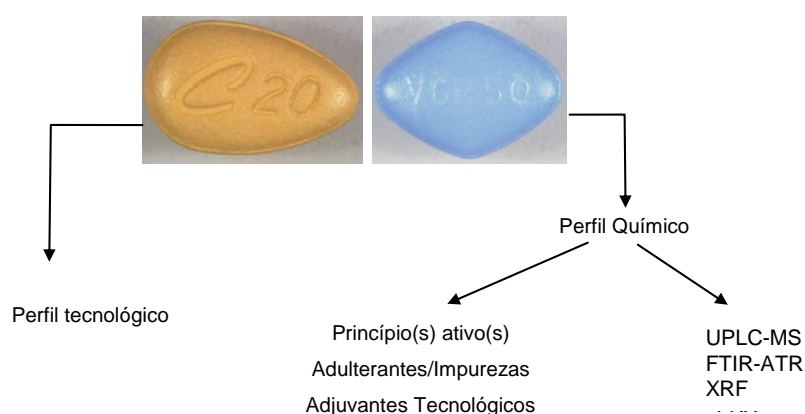
SLD e TAD não estão sujeitas a controle especial pela Portaria nº 344 da Secretaria de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde, segundo a Resolução RDC nº 79 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 04/11/2008, que atualizou as listas de substâncias sujeitas a controle especial da referida Portaria (Brasil, 2008). Entretanto, a dispensação de medicamentos contendo tais fármacos em drogarias e farmácias deve ser precedida da apresentação de receita médica pelo paciente (a qual não necessita ser retida no estabelecimento). O uso indevido sem orientação médica destes medicamentos pode causar uma série de efeitos adversos, os quais vão da cefaleia até a insuficiência cardíaca (Hardman *et al.*, 2003).

Atualmente não se encontram inseridas em códigos oficiais monografias da SLD e da TAD. A identificação destas substâncias na forma pura ou em formas farmacêuticas é realizada com sucesso por diferentes técnicas analíticas, tais como, espectroscopia Raman (Veij *et al.*, 2008; Trefi *et al.*, 2008), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H , ^{13}C e ^{15}N) (Wawer *et al.*, 2005; Trefi *et al.*, 2008), difratometria de raios-X (Maurin *et al.*, 2007), espectrometria no infravermelho próximo (Vredembregt *et al.*, 2006) e espectrofotometria após complexação (Dinesh *et al.*, 2002(a); Weinert *et al.*, 2008).

São encontradas inúmeras referências na literatura sobre o emprego da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a diferentes tipos de detectores para determinação quantitativa da SLD e da TAD, isoladas ou simultaneamente, a partir de matrizes analíticas de natureza diversa (Daragmeh *et al.*, 2001; Dinesh *et al.*, 2002; Aboul-Enein e Ali 2005). Sinteticamente, Shing e colaboradores (2008), propondo estratégias para caracterizar SLD, TAD, vardenafila e uma série de respectivos análogos em adulterações de suplementos alimentares de origem vegetal, resumem os métodos existentes. Segundo os autores, a HPLC com detector na região do ultravioleta ou com detector de massas tem sido extensivamente empregada para detecção e quantificação de inibidores da PDE-5 e seus análogos. Estes podem facilmente ser detectados pela confirmação do tempo de retenção relativo, em comparação com material de referência. Geralmente octadecilsilano (C18) é usado como fase estacionária, enquanto que uma combinação de fase aquosa ácida e acetonitrila é empregada como fase móvel.

Em confronto com a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida mostra-se vantajosa na execução dos exames periciais solicitados nesses casos por contornar a labilidade térmica do citrato de SLD que se decompõe durante a fusão, a 189,4 °C (Melnikov *et al.*, 2003; Moffat, 2004; Singh *et al.*, 2008). O emprego da CG para a detecção de inibidores da PDE-5 e seus análogos é referido em raras situações – análises em cabelo ou elucidação estrutural de alguns análogos não caracterizados adequadamente pela espectrometria de massas – invariavelmente exigindo a derivatização química da amostra como etapa pré-analítica (Saisho *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2008).

Considerando a configuração física e química do sistema encontrado neste estudo, obtiveram-se perfis químicos pela geração de dados acerca do(s) princípio(s) ativo(s), adulterantes/impurezas (substâncias com ação farmacológica, incluindo análogos farmacológicos, coprodutos de síntese) e adjuvantes tecnológicos (diluentes, aglutinantes). Nesse sentido o conjunto de técnicas analíticas que se propõe fazer uso na obtenção do perfil químico e tecnológico de comprimidos contendo SLD e/ou TAD pode ser ilustrado na Figura 2.



Legenda: Cromatografia Líquida de Ultra eficiência (UPLC); Espectrometria de Massas (MS); Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR); Refletância Total Atenuada (ATR); Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X (XRF).

Figura 2. Uma visão geral do estudo realizado.

Em paralelo, durante a obtenção dos perfis químicos – foco principal deste projeto –, houve a preocupação de desenvolver novas técnicas que possibilitem facilitar a detecção da falsificação destes medicamentos. Entende-se que este tipo de conhecimento adquire elevada importância, em especial, em ambientes nos quais um perito não dispõe dos equipamentos ideais para resolver o *simples* problema da autenticidade de um medicamento apreendido.

Com relação ao crescimento impressionante da aplicação da Análise Multivariada de Dados (AMD) às Ciências Forenses, o mesmo é facilmente comprovado. Buscas realizadas em bancos de dados com as palavras "*multivariate statistics*" ou "*chemometry*" - denominação utilizada quando AMD é aplicada em na área química ou farmacêutica - e "*forensics*", limitada à última década, resultam em milhares de artigos. Parece que as Ciências Forenses

encontraram um instrumento essencial de trabalho. Com os mesmos resultados experimentais obtidos por meio de técnicas analíticas e equipamentos já disponíveis e de uso consolidado na comunidade científica, a redescoberta dessas ferramentas matemáticas e estatísticas permite trabalhar as informações de modo muito mais profundo e conclusivo. Este pensamento foi muito bem resumido nas palavras de Rajalahti e Kvalheim (2011) em uma revisão sobre a AMD na área farmacêutica: "*dados experimentais não são o mesmo que informação*". Resultados extremamente positivos ocorrem, por exemplo, quando a AMD é aplicada em um caso comumente encontrado na rotina forense, que é estabelecer a autenticidade de um produto questionado, apreendido por forças policiais. Esta difícil tarefa do cientista forense pode materializar a ocorrência de um crime e resultar adequada punição judicial ao infrator. Portanto, a certeza da conclusão dos exames deve obrigatoriamente ser a mais alta possível e todas as ferramentas úteis neste propósito são muito valiosas. Neste estudo abordamos as técnicas exploratórias de Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise Hierárquica de Clusters (AHC) para evidenciar a estrutura, os valores discrepantes entre os dados bem como a formação de grupos de amostras; além do Índice de Similaridade (IS) para expressar numericamente o grau de semelhança entre as amostras analisadas. Uma descrição básica de cada técnica multivariada empregada e referências bibliográficas são apresentadas ao longo dos capítulos, quando da aplicação das mesmas.

Por fim, antes de iniciar a apresentação dos capítulos, é necessário salientar que a codificação das amostras nos diferentes experimentos não é correspondente. Ou seja, as amostras da Apreensão X no experimento Y, não são necessariamente as amostras da apreensão codificada como X no experimento Z. Isto deriva do fato que os experimentos foram realizados em diferentes épocas e não houve um prazo inicial de coleta de todas as amostras, e sim um fluxo contínuo (e incerto) de chegada de amostras para exames periciais.

CAPÍTULO I – PERFIL TECNOLÓGICO

I.1 Introdução

As primeiras medições realizadas em amostras de drogas sintéticas sob a forma de comprimidos são as de suas características físicas, também chamadas características pós-compressão. Propriedades como massa, altura e comprimento geram um perfil físico ou tecnológico para determinado conjunto de comprimidos. Este perfil não destrutivo é obtido de modo rápido, confiável, reproduzível e sem preparo de amostra, com instrumental analítico facilmente acessível a qualquer analista.

Os dados de controle físico de comprimidos não são empregados de modo absoluto para se atestar uma falsificação, mas se agregam aos resultados de demais testes que compõem um protocolo de análise pericial para os casos do Viagra e do Cialis. Com o emprego do Teste de Fisher pode-se testar a hipótese de que amostras suspeitas e padrões sejam provenientes de uma única população – todas autênticas, por exemplo – ou não, conferindo um rigor estatístico à resposta. Além de valiosos, por auxiliar na detecção de falsificações destes medicamentos, tais dados podem ser utilizados numa perspectiva de inteligência forense, quando inseridos em bancos de dados para mapear falsificações e associados às técnicas multivariadas de análise.

Trabalhos de inteligência forense tendo comprimidos como alvo (Marquis *et al.*, 2008; Milliet *et al.*, 2009; Weyermann *et al.*, 2008) empregam com frequência a Análise Hierárquica de Cluster (AHC) na busca por amostras de apreensões diferentes com algum tipo de origem em comum. A AHC é uma ferramenta exploratória dos dados que identifica no espaço experimental multidimensional os objetos mais próximos entre si, que acabam dispostos lado a lado em uma representação gráfica, denominada dendograma, após serem tratadas experimentalmente. Esta proximidade, no caso dos aspectos físicos de comprimidos, pode estar associada a um ciclo de compressão em comum. Não seriam informações a serem apostas em laudos, mas relevantes quando de uso interno em investigações (Marquis *et al.*, 2008; Milliet *et al.*, 2009).

I.2 Artigo

A seguir encontra-se artigo “*Physical profile of counterfeit tablets Viagra and Cialis*” publicado na revista *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science* (v. 48(3), 487-495, 2012). Este artigo propõe o uso do perfil tecnológico (também denominado perfil físico, por alguns autores) gerado com as medidas das características pós-compressão – massa, espessura, comprimento longitudinal e comprimento transversal – de comprimidos autênticos e falsificados de Cialis e de Viagra para detectar contrafações e classificar amostras similares. Para tal foram empregadas no tratamento dos dados representações por histogramas e gráficos de médias e intervalos de confiança (95%), além do Teste de Fisher e Análise Hierárquica de Cluster (AHC). Este é o primeiro trabalho que aborda o uso das propriedades físicas de comprimidos de Cialis e de Viagra com finalidade forense.

Physical profile of counterfeit tablets Viagra® and Cialis®

Rafael Scorsatto Ortiz^{1,2,*}, Kristiane de Cássia Mariotti², Renata Pereira Limberger²,
Paulo Mayorga²

¹Rio Grande do Sul Technical and Scientific Division, Brazilian Federal Police, ²Department of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul

The profile of tablets containing an active pharmacological ingredient can be obtained using different sets of properties, including physical and chemical aspects. The first measurements carried out on tablets are the physical characteristics also called post-tabletting batch (post-TB) characteristics. These data may be valuable to assist in the detection of pharmaceutical product forgery and may also be used in a forensic intelligence perspective when inserted into databases. This work is focused on the physical characteristics of Cialis® and Viagra® tablets seized by the Brazilian Federal Police in the Rio Grande do Sul state. Using the F-test (ANOVA), all samples of counterfeit Viagra® (n = 28) and Cialis® (n = 40) were well distinguished from authentic samples by the following post-TB characteristics: length (major and minor), thickness, and mass. Using the exploratory statistical technique of Hierarchical Cluster Analysis (HCA), tablets with similar physical profiles were grouped. This result may indicate a common illicit production. We observed the validity of using post-TB properties to generate – in a fast and reliable manner and with no sample preparation – a technological profile that joins itself to the other analytical methods assisting in routine forensic detection of counterfeit Viagra® and Cialis®.

Uniterms: Counterfeit drugs. Tablets/physical characteristics. Viagra®. Cialis®.

Perfil para medicamentos na forma farmacêutica comprimidos contendo uma substância ativa pode ser obtido usando diferentes conjuntos de propriedades, incluindo aspectos físicos e químicos. As primeiras medições realizadas em comprimidos são de características físicas, também chamadas características pós-compressão. Tais dados podem ser valiosos para auxiliar na detecção de falsificações de medicamentos e ser utilizados em uma perspectiva de inteligência forense, quando inseridos em bancos de dados. Este trabalho está focado nas características físicas dos comprimidos de Cialis® e Viagra® apreendidos pela Polícia Federal no Estado brasileiro do Rio Grande do Sul. Com o emprego do Teste de Fisher (ANOVA), todas as amostras falsificadas de Viagra® (n = 28) e de Cialis® (n = 40) foram diferenciadas das amostras autênticas pelas seguintes características pós-compressão: comprimento (maior e menor), espessura e massa. Utilizando-se a Análise Hierárquica de Cluster (AHC), os comprimidos com perfis físicos semelhantes foram agrupados, o que pode indicar uma produção ilícita em comum. Observou-se a validade da utilização das características pós-compressão para gerar, de um modo rápido, confiável e sem preparo de amostra, um perfil tecnológico que se une aos demais métodos analíticos utilizados na rotina forense de detecção de falsificações de Cialis® e de Viagra®.

Unitermos: Medicamentos falsificados. Comprimidos/características físicas. Viagra®. Cialis®.

INTRODUCTION

Studies to obtain chemical or physical profiles of illicit drugs intended to materially prove the existence of a crime or to provide the strategic and operational intel-

ligence services with accurate information. A profile can be defined as a series of specific characteristics selected to provide information about certain clandestine production (Weyermann *et al.*, 2008; Marquis, *et al.*, 2008; UNDCP, 2001).

For samples of synthetic drugs in tablet pharmaceutical dosage form, it is generally assumed that seizures with corresponding characteristics come from the same production batch, while tablets that exhibit differing

*Correspondence: R. S. Ortiz. Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga 2752, 90610-000 - Porto Alegre - R.S, Brazil. E-mail: rafaelortiz.rso@dpf.gov.br

CAPÍTULO II – PERFIL INORGÂNICO

II.1 Introdução

Espectrometria de Fluorescência de Raios - X (do inglês *X-Ray Fluorescence*, XRF) é uma técnica adequada para a caracterização da presença de metais (Romão *et al.*, 2010). Esta técnica apresenta como vantagens uma capacidade multielementar, boa detectabilidade, elevada precisão, diminuto tempo de análise (aproximadamente 1,5 minutos) e o fato de ser não destrutiva. Tais características tornam-na adequada à aplicação em uma grande variedade de amostras, que vão desde solos, medicamentos, incluindo fitoterápicos, materiais vegetais, moedas metálicas, algas, documentos, protetores solares, entre outros. Considerando-se os materiais envolvidos neste projeto, constitui excelente metodologia de análise para determinação do ingrediente ativo SLD (que apresenta enxofre, S, na sua estrutura) e de excipientes e agentes de revestimento dos comprimidos, como fosfato de cálcio, óxido de titânio e óxido de ferro (P, Ca, Ti e Fe) que podem ser detectados diretamente na superfície das formulações farmacêuticas.

Frequentemente tem-se associado XRF com técnicas estatísticas multivariadas no estudo de amostras complexas (Romão *et al.*, 2011). Métodos multivariados consideram a correlação entre as múltiplas variáveis simultaneamente, permitindo a extração e visualização de uma quantidade muito maior de informações. Dentre os métodos exploratórios usualmente empregados em estudos de perfil químico encontram-se a Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise Hierárquica de Clusters (AHC).

A ACP é um procedimento matemático que utiliza uma transformação ortogonal ao converter um conjunto de observações de variáveis possivelmente correlacionadas em um conjunto de valores de variáveis não correlacionadas chamadas componentes principais. O número de componentes principais é igual ou inferior ao número de variáveis originais. Esta transformação é definida de tal forma que a primeira componente principal tem uma variação tão alta quanto possível (isto é, representa o máximo da variabilidade dos dados quanto possível), e cada componente sucedendo, por sua vez tem a maior variância possível, sob a restrição de que seja ortogonal a (não correlacionados com) os componentes anteriores (Wuensch, 2009). A ideia da ACP é reduzir o

número de variáveis a um pequeno número de componentes principais, contendo a variação máxima (que é a informação) que caracterizam o conjunto de dados (Baer, 2007), facilitando a análise exploratória. Os resultados de uma ACP são geralmente discutidos em termos de *scores*, ou pontuação dos componentes – os valores da variável transformada correspondentes a um caso particular dos dados – e *loadings*, ou cargas – o peso que cada variável normalizada original deve ser multiplicada para obter a pontuação do componente (Hair *et al.*, 2009). *Scores* e *loadings* têm informação sobre amostras e variáveis: *scores* mostram como as amostras são distribuídas, se há algum padrão específico nos dados, e quais objetos estão próximos uns dos outros; ao passo que *loadings* mostram quais variáveis são importantes e como as variáveis estão correlacionadas.

Conforme já abordado detalhadamente no Capítulo I, a Análise Hierárquica de Cluster (AHC) é uma técnica de classificação com a finalidade básica de dividir um conjunto de objetos em grupos em que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre os grupos.

II.2 Artigo

A seguir encontra-se artigo intitulado *Fingerprinting of sildenafil citrate and tadalafil tablets in pharmaceutical formulations via X-ray fluorescence (XRF) spectrometry*, publicado no periódico Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 58 (2012) 7–11. O perfil inorgânico de 41 amostras comerciais - (Viagra[®], Cialis[®], Lazar[®], Libiden[®], Maxfil[®], Plenovit[®], Potent 75[®], Rigix[®], V-50[®], Vimax[®] e Pramil[®]) – e 56 amostras falsificadas (Viagra e Cialis) foi obtido a partir dos dados de Espectrometria de Fluorescência de Raios - X associada à ACP e à AHC. A metodologia demonstrou excelência na determinação semi-quantitativa do princípio ativo SLD (que apresenta S em sua estrutura) e de adjuvantes tecnológicos como Ca₃(PO₄)₂, TiO₂ e Fe₂O₃ e mostrou habilidade para distinguir entre comprimidos autênticos e falsificados. A matriz de dados foi submetida ao tratamento estatístico multivariado, buscando classificar os comprimidos investigados e permitiu agrupar as amostras em sete grupos: A, B, C, D e E (falsificados) e F e G (autênticos).

Trata-se do primeiro trabalho envolvendo o emprego da XRF aplicada a comprimidos contendo inibidores da PDE-5.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 58 (2012) 7–11



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba



Fingerprinting of sildenafil citrate and tadalafil tablets in pharmaceutical formulations via X-ray fluorescence (XRF) spectrometry

Rafael S. Ortiz^{a,b}, Kristiane C. Mariotti^b, Nicolas V. Schwab^c, Guilherme P. Sabin^c, Werickson F.C. Rocha^d, Eustáquio V.R. de Castro^e, Renata P. Limberger^b, Paulo Mayorga^b, Maria Izabel M.S. Bueno^c, Wanderson Romão^{e,*}

^a Rio Grande do Sul Technical and Scientific Division, Brazilian Federal Police, 901 60-093 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Department of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Institute of Chemistry, State University of Campinas, 13084-971 Campinas, SP, Brazil

^d National Institute of Metrology, Standardization and Industrial Quality, Directorate of Industrial and Scientific Metrology, Division of Chemical Metrology, 25250-020 Duque de Caxias, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e Department of Chemistry, Federal University of Espírito Santo, 29075-910 Vitória, ES, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 July 2011

Received in revised form 5 September 2011

Accepted 5 September 2011

Available online 22 September 2011

Keywords:

Viagra

Cialis

Counterfeiting

XRF

PCA

ABSTRACT

The production of counterfeit drugs is a criminal problem that carries serious risks to public health in the worldwide. In Brazil, Viagra[®] and Cialis[®] are the most counterfeit medicines, being used to inhibit the phosphodiesterase type 5 (PDE-5), treating thus, problems related to erectile dysfunction. X-ray fluorescence (XRF) is a suitable technique to control the quality of new pharmaceutical formulations and distinguish between authentic and counterfeit tablets. XRF has advantageous features like multielemental capability, good detectivity, high precision, short analysis times, and is nondestructive, which makes it suitable to be extended to a great variety of samples. In this work, the inorganic fingerprinting chemical of forty-one commercial samples (Viagra[®], Cialis[®], Lazar[®], Libiden[®], Maxfil[®], Plenovit[®], Potent 75[®], Rigix[®], V-50[®], Vimax[®] and Pramil[®]) and fifty-six counterfeit samples (Viagra and Cialis) were obtained from XRF data. XRF presented an excellent analytical methodology for semi-quantitative determination of active ingredient (in case of sildenafil citrate that presents S in its structure) and excipients such as calcium phosphate, titanium oxide and iron oxide (P, Ca, Ti and Fe). The matrix data were allied to chemometric methods (Principal Component Analysis and Hierarchical Cluster Analysis) to classify the tablets investigated between authentic and counterfeit, grouping the samples into of seven groups: **A, B, C, D** and **E** (counterfeit group) and **F** and **G** (authentic group).

© 2011 Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The production of counterfeit drugs is a criminal problem that carries serious risks to public health in the worldwide. Recent studies suggest that a significant growth of counterfeiting processes in the last decade may be associated with easier access, by the counterfeiters, the technologies needed to copy pharmaceutical products genuine [1]. Moreover, the marketing supplied by the Internet allows the buying of any drug without prescription, easily and anonymously, in fraudulent sites [2,3]. In an attempt to combat this phenomenon, the WHO created in 2006 a global coalition of stakeholders called IMPACT (International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce). The IMPACT has been active in forging international collaboration, finding global solutions to combat this

challenge and in raising awareness of the dangers of counterfeit medical products [4].

By definition, counterfeit medicines are drugs that have “*been deliberately and fraudulently mislabeled with respect to identity and/or source*” [5]. All kinds of medicines are counterfeited [6–9], but the illegal market of most successful is related to three approved phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitors for treating erectile dysfunction, sildenafil citrate (Viagra[®], Pfizer), tadalafil (Cialis[®], Eli Lilly), and vardenafil (Levitra[®], Bayer). These medicines have led to an explosion in counterfeit versions of these drugs [10]. PDE-5 inhibitors are prime target for counterfeiting due to the high cost and the embarrassment associated with the underlying condition leading people and becoming the Internet as main source in buying these medicines [10].

* Corresponding author. Tel.: +55 27 3335 2043.

E-mail address: wandersonromao@gmail.com (W. Romão).

¹ The symbol [®] will be used only in reference to the original medicines.

CAPÍTULO III – PERFIL ORGÂNICO

III.1 Introdução

A Espectrometria de Massas com ionização por *electrospray* após infusão direta (do inglês *direct infusion electrospray ionization mass spectrometry*, ESI-MS) tem demonstrado ser uma técnica rápida e robusta para controle de qualidade de misturas complexas, tais como bebidas, biodiesel, cafés, perfumes, óleos vegetais, própolis e drogas de abuso (De Souza *et al.*, 2009; De Souza *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2005; Møller *et al.*, 2005; Gollücke *et al.*, 2009; Catharino *et al.*, 2007; Amorim *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2006; Catharino *et al.*, 2005; Sawaya *et al.*, 2004; Romão *et al.*, 2011).

A utilização da ESI-MS com infusão direta na caracterização química de amostras forenses de comprimidos contendo inibidores da PDE-5 apresenta-se vantajosa uma vez que elimina a necessidade de isolamento e separação cromatográfica preliminares, minimizando o tempo de análise e interferências. Esta técnica requer mínima preparação de amostra e fornece um controle de qualidade relativamente simples e rápido para caracterização e triagem via perfil químico de comprimidos contendo SLD, TAD e análogos em investigações forenses. Os íons protonados correspondentes aos princípios ativos sildenafil ([SLD + H]⁺, *m/z* 475) e tadalafila ([TAD + H]⁺, *m/z* 390); aos análogos homossildenafil ([HSD + H]⁺, *m/z* 489) e hidróxi-homossildenafil ([OH-HSD + H]⁺, *m/z* 505) bem como o do adjuvante tecnológico lactose ([LAC + H]⁺, *m/z* 343) foram os principais marcadores verificados para os casos em estudo.

Métodos estatísticos multivariados, como a ACP, aplicados aos dados de ESI-MS permitem melhorar a seletividade (Cooper *et al.*, 2001; Sawayaa *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2005; Moller *et al.*, 2005; Møller *et al.*, 2007; De Souza *et al.*, 2009; Biasoto *et al.*, 2010) acrescentando segurança na triagem das falsificações de medicamentos.

III.2 Artigo

A seguir encontra-se disposto o artigo intitulado *Chemical Fingerprinting of Counterfeits of Viagra and Cialis Tablets and Analogues via*

Electrospray Ionization Mass Spectrometry, publicado no *American Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 2, 919-928. O perfil orgânico da fase polar (metanólica) de amostras forenses de comprimidos para disfunção erétil – 41 amostras comerciais (Viagra[®], Cialis[®], Lazar[®], Libiden[®], Maxfil[®], Plenovit[®], Potent 75[®], Rigix[®], V-50[®], Vimax[®], Pramil[®] 75 and Pramil[®]) e 56 amostras falsificadas (Viagra e Cialis) – foi gerado por ESI-MS, no modo positivo, após infusão direta. A técnica mostrou-se rápida (menos do que 1 minuto) e robusta para análises de amostras forenses de inibidores da PDE-5 a partir de pequenas frações — aproximadamente 10 mg — do núcleo de cada comprimido. A ACP foi aplicada aos dados do *fingerprint* por ESI(+)-MS, classificando as amostras de acordo com seu conteúdo de ingredientes ativos e, portanto, as amostras autênticas e falsificadas foram facilmente reconhecidas. Trata-se do primeiro trabalho envolvendo a testagem de comprimidos contendo inibidores da PDE-5 com o uso de ESI-MS após injeção direta.

Chemical Fingerprinting of Counterfeits of Viagra and Cialis Tablets and Analogues via Electrospray Ionization Mass Spectrometry

Rafael S. Ortiz^{1,2}, Kristiane de Cássia Mariotti², Wanderson Romão^{3,4*}, Marcos N. Eberlin³,
Renata P. Limberger², Paulo Mayorga²

¹Rio Grande do Sul Technical and Scientific Division, Brazilian Federal Police,
Porto Alegre, Brazil

²Department of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³Thomson Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas -
UNICAMP, Campinas, Brazil

⁴Department of Chemistry, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil.

E-mail: wandersonromao@gmail.com

Received October 18, 2011; revised November 25, 2011; accepted December 13, 2011

Abstract

Direct infusion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) is shown to provide an efficient technique for the investigation of polar composition of forensic tablets for male erectile dysfunction. ESI-MS fingerprinting of 41 commercial sildenafil samples (Viagra[®], Cialis[®], Lazar[®], Libiden[®], Maxfil[®], Plenovit[®], Potent 75[®], Rigix[®], V-50[®], Vimax[®], Pramil 75[®] and Pramil[®]) and 56 counterfeit samples (Viagra and Cialis) were obtained. The spectra for the authentic Viagra[®] tablets showed abundant ions exclusively corresponding to the sildenafil (SLD) molecule: [SLD + H]⁺ of *m/z* 475; [SLD + Na]⁺ of *m/z* 497; and [2SLD + H]⁺ of *m/z* 949. The spectra for commercial sildenafil samples also showed predominant SLD ions. Tablets of authentic Cialis[®] showed mainly ions of *m/z* 343, 365 and 707 from the lactose molecule (the excipient); as well as a minor ion of *m/z* 390 corresponding to the active ingredient tadalafil (TAD) in its protonated form [TAD + H]⁺. For counterfeit Cialis samples, however, normally TAD ions of much high abundances was observed, together with ions corresponding to sildenafil analogues such as those of *m/z* 489 (homosildenafil) and 505 (hydroxyhomosildenafil). Principal component analysis was applied to ESI-MS fingerprint data, placing samples according to their contents of active ingredients hence authentic and counterfeit samples are easily recognized.

Keywords: ESI-MS, Fingerprinting, Counterfeiting, Viagra[®], Cialis[®]

1. Introduction

Sildenafil (SLD) and tadalafil (TAD) are selective inhibitors of phosphodiesterase type-5 (PDE-5) [1] acting therefore as efficient drugs to treat male erectile dysfunction. The two most common commercial formulations containing these active pharmacological ingredients (API) are Viagra[®] (sildenafil citrate, Pfizer) and Cialis[®] (tadalafil, Eli Lilly)¹ and the analysis of their tablets is currently a common practice for many forensic laboratories. Besides the criminal aspect, the illegal trade of these drugs can cause serious health problems due to uncontrolled amounts, low quality and diverse com-

positions. The counterfeiting of inhibitors of PDE-5 has become an important and dangerous problem for pharmaceutical market. Therefore, rapid and secure analytical tools able to control the quality of pharmaceutical formulations are highly desirable.

The identification of SLD or TAD in pure form or in pharmaceutical formulations—including counterfeits have been performed by different analytical techniques such as Raman spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, liquid chromatography, mass spectrometry using electrospray ionization or fast-atom bombardment, and X-ray diffractometry [2-8].

Direct infusion electrospray ionization mass spec-

¹The symbol ® will be used only in reference to the original medicines.

**CAPÍTULO IV – PERFIL DE SUBSTÂNCIAS
FARMACOLOGICAMENTE ATIVAS**

IV.1 Introdução

A Cromatografia Líquida de Ultra eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos acoplada à Espectrometria de Massas com Ionização por *Eletrospray* e Analisador Quadrupolo-Tempo de Voo (*UPLC-DAD-ESI-QToF-MS*, ou simplificada, *UPLC-MS*) concentra em um único instrumento: simplicidade no preparo da amostra e velocidade de execução da análise associadas a uma quantificação reprodutível e identificação confiável dos analitos. Em trabalho anterior, desenvolveu-se e validou-se um método simples empregando cromatografia de ultra eficiência com detecção com arranjo de diodos, no modo isocrático, para a determinação simultânea de SLD e TAD (Ortiz *et al.*, 2010). Agora, com novas amostras e acoplado a espectrometria de massas, a identificação de inibidores de PDE-5 e de seus análogos pode ser feita para cada substância pela comparação dos tempos de retenção dos picos cromatográficos, do espectro de ultravioleta obtido com o fotoarranjo de diodos e do espectro de massa de alta resolução.

A *UPLC-MS* fornece perfis muito informativos sobre comprimidos contendo inibidores de PDE-5. Análises rápidas, sensibilidade e reprodutibilidade são as qualidades mais apreciáveis deste método analítico. Neste trabalho, os resultados mostraram a presença de falsificações de sério risco à saúde pública com a existência de substância farmacologicamente ativa diferente da especificada na embalagem, a ocorrência simultânea de dois princípios ativos no mesmo produto, a existência de outros contaminantes farmacologicamente ativos e concentrações de SLD e de TAD muito mais elevadas do que em comprimidos comerciais originais – até três vezes os valores rotulados.

Métodos multivariados de análise foram empregados e as amostras foram agrupadas com sucesso em função do conteúdo de substância farmacologicamente ativa. Foi possível identificar amostras de apreensões distintas, estreitamente relacionadas em função do teor de ingrediente ativo o que pode estar associado a uma origem ilícita comum, ou seja, advindas de uma única mistura de insumos farmacêuticos ou da repetição de uma fórmula mestra. Além disto, os resultados verificados sugerem que uma única mistura

de insumos farmacêuticos contendo apenas SLD pode ter sido empregada para falsificar tanto comprimidos de Viagra quanto de Cialis.

IV.2 Artigo

A seguir encontra-se artigo intitulado *Profiling Counterfeit Cialis, Viagra and Analogues by UPLC-MS* que se encontra no prelo do periódico *Forensic Science International* (2013). Neste trabalho descreve-se o perfil químico – qualitativo e quantitativo – de amostras forenses reais contendo inibidores da PDE-5 a partir de seus extratos metanólicos. Foram examinadas 110 amostras de diferentes apreensões de produtos de origem estrangeira (Lazar[®], Libiden[®], Maxfil[®], Plenovit[®], Potent 75[®], Rigix[®], Vimax[®], Pramil 75[®] e Pramil[®]) além de Cialis e Viagras falsificados e de seus respectivos padrões comerciais. Com a precisão, seletividade e rapidez – menos que 1,5 minutos para cada análise – da UPLC-MS na geração dos dados experimentais determinou-se o conteúdo de SLD e de TAD nas amostras. A partir disto, foram avaliados aspectos tais como a autenticidade dos produtos, a existência da substância farmacologicamente ativa indicada no rótulo, a estimativa da dose existente em cada comprimido e a existência de contaminantes. Além disso, com o uso de ferramentas multivariadas, buscou-se encontrar possíveis semelhanças entre os perfis químicos de amostras provenientes de apreensões diferentes, a fim de encontrar possíveis origens ilícitas em comum.

PROFILING COUNTERFEIT CIALIS, VIAGRA AND ANALOGUES BY UPLC-MS

Rafael S. Ortiz^{1,2}, *Kristiane de Cássia Mariotti*², *Maribete H. Holzschuh*²,
*Wanderson Romão*³, *Renata P. Limberger*², *Paulo Mayorga*²

¹ Rio Grande do Sul Technical and Scientific Division, Brazilian Federal Police, 90160-093 Porto Alegre, RS, Brazil.

² Department of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Federal Institute of Education, Science and Technology of Espírito Santo, 29106-010, Vila Velha, ES, Brazil.

Abstract

In this work, the chemical profile of 43 commercial samples of tablets for male erectile dysfunction (Viagra[®], Cialis[®], Lazar[®], Libiden[®], Maxfil[®], Plenovit[®], Potent 75[®], Rigix[®], Vimax[®], Pramil[®] 75 and Pramil[®]) and 65 counterfeit samples (Viagra and Cialis) were obtained from UPLC-MS data. Methanol extracts of crushed tablets were investigated by ultra performance liquid chromatography (UPLC) with diode array detection (DAD) coupled with electrospray ionization in the positive ion mode (ESI(+)) quadrupole time-of-flight (Q-ToF) mass spectrometry (MS). A validated method was employed for the simultaneous determination of sildenafil citrate (SLD) and tadalafil (TAD). The ultra-chromatograms obtained with method provide high resolution of MS, and are a quick (less to 1.5 minute) and reliable tool in the distinction between authentic and counterfeit tablets. It was observed in most cases the presence of other active pharmaceutical ingredients (API) than specified on the package (TAD and SLD). Additionally, high concentrations of TAD and SLD were detected in counterfeit samples when compare with observed values for a typical commercial product. Chemometric methods were employed and the samples were grouped in five groups as function of API content.

Keywords: ultra performance liquid chromatography, mass spectrometry, chemical profile, counterfeit medicines, Viagra[®], Cialis[®].

**CAPÍTULO V – PERFIL POR ESPECTROSCOPIA DE
INFRAVERMELHO**

V.1 Introdução

A Refletância Total Atenuada (do inglês, *Attenuad Total Reflection*, ATR) é uma técnica de amostragem para a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) que se tornou muito popular principalmente porque dispensa o pastilhamento ou qualquer outro tratamento prévio da amostra. A medição é feita simplesmente colocando-se a amostra em contato direto com a superfície do cristal para a obtenção de dados espectroscópicos. Desta forma, a ATR-FTIR é aplicada com sucesso em diversos campos, entre os quais, para analisar o conteúdo polimórfico de materiais farmacêuticos a granel, para análise de superfície e de misturas em pó, para avaliar adulteração de pastas de dente e para diferenciar vinhos advindos de vinhas diferentes (Salari e Young, 1998; Planinsek *et al.*, 2006; López-Sánchez *et al.*, 2008; Tarantilis *et al.*, 2008).

Nosso interesse centrou-se na região espectral que vai de 525-1800 cm^{-1} , porque nesta área ocorrem absorções características de grupos funcionais incluindo-se a denominada região da *impressão digital*. Por conseguinte nesta região quaisquer diferenças entre os espectros podem ser detectadas (Tarantilis *et al.*, 2008). Além disso, este intervalo espectral inclui a região entre 1720 e 1150 cm^{-1} a qual engloba todas as principais diferenças observadas em inibidores PDE-5. Segundo Champagne e Emmel (2011), SLD, TAD e vardenafila (bem como os análogos e homólogos tiossildenafil, tihomossildenafil, hidróxi-tihomossildenafil, aidenafila, fentolamina, sulfoildenafil, aminotadalafila e KF31327 – um inibidor da PDE-5 que não compartilha forte semelhança estrutural) mostram bandas de absorção nesta região, tornando este método altamente eficaz para detectar a presença de múltiplos inibidores PDE-5 com um único teste.

A AMD espectroscópica é uma ferramenta poderosa para fins interpretativos em casos periciais nos quais a classificação de amostras é necessária. Como citado por Muehlethaler e colaboradores (2011) "a singularidade dos dados espectroscópicos vem do fato de que eles são multivariados – alguns milhares de variáveis – e altamente correlacionados". A

ACP foi aplicada como técnica exploratória para evidenciar a estruturação dos dados, a existência de *outliers* e de *clusters*, mostrando capacidade de distinguir entre padrões e amostras teste. O Índice de Similaridade (IS) foi empregado em um segundo momento, quando o objetivo passou a ser expressar numericamente o grau de similaridade entre amostras analisadas. Dentre as centenas de publicações recentes (desde 2010) que descrevem aplicação de técnicas multivariadas aos dados de espectroscopia em casos forenses incluem-se a estimativa da idade de manchas de sangue, análises de medicamentos falsificados, a análise comparativa de tintas automotivas, a determinação de genótipos e a diferenciação de papéis questionados (Salari e Young, 1998; Muehlethaler *et al.*, 2011; Beveridge *et al.*, 2011; Been *et al.*, 2011; Dégardin *et al.*, 2011; Olds *et al.*, 2011; McIntee *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2009; Causin *et al.*, 2010).

V.2 Artigo

A seguir encontra-se artigo intitulado *Couterfeits Cialis and Viagra fingerprinting by ATR-FTIR spectroscopy with chemometry: can the same pharmaceutical powder mixture be used to falsify two medicines?*, publicado na *Forensic Science International* 226 (2013), p. 282-289. Neste trabalho, um método direto e muito rápido para a determinação de Cialis e de Viagra falsificados, combinando FTIR-ATR com AMD, foi proposto. Empregando apenas 10 mg do núcleo de cada comprimido, após trituração, em menos de 30 segundos foram obtidos espectros de ATR-FTIR característicos para amostras forenses reais. Os perfis químicos de 53 amostras comerciais (Viagra[®] e Cialis[®]) e 104 amostras falsificadas (Viagra e Cialis) de apreensões distintas foram obtidos a partir dos seus dados de ATR-FTIR. A existência de substâncias farmacologicamente ativas e outros adjuvantes tecnológicos diferentes dos especificados nas embalagens foi detectada em amostras falsificadas. A ACP permitiu agrupar amostras com perfis químicos diferentes em grupos claramente definidos, distinguindo com sucesso amostras autênticas e falsificadas na rotina forense. O Índice de Similaridade (IS) demonstrou que uma única mistura de insumos farmacêuticos pode ter sido

usada para a fabricação ilícita tanto de Cialis quanto de Viagras falsificados, de apreensões distintas. Esta abordagem pode ser aplicada a outros casos forenses em que estudos de classificação de amostras no estado sólido sejam exigidos. Este é o primeiro trabalho em que se submetem à análise multivariada conjuntamente dados espectroscópicos de amostras de Cialis e de Viagra falsificados.

Forensic Science International 226 (2013) 282–289



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forsciint

Counterfeit Cialis and Viagra fingerprinting by ATR-FTIR spectroscopy with chemometry: Can the same pharmaceutical powder mixture be used to falsify two medicines?

Rafael S. Ortiz^{a,b,*}, Kristiane de Cássia Mariotti^b, Bruna Fank^a, Renata P. Limberger^b, Michel J. Anzanello^c, Paulo Mayorga^b

^a Rio Grande do Sul Technical and Scientific Division, Brazilian Federal Police, 90160-093 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Department of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Department of Industrial Engineering, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, CEP 90.035-190, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 September 2012

Received in revised form 9 January 2013

Accepted 27 January 2013

Available online 17 February 2013

Keywords:

Fourier transform infrared spectroscopy

Attenuated total reflectance

Chemical profile

Counterfeit medicines

Viagra[®]

Cialis[®]

ABSTRACT

This paper proposes a direct and efficient method to discriminate between counterfeit and authentic Cialis and Viagra samples by combining attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy with multivariate techniques. The chemical profile of 53 commercial samples (Viagra[®], Cialis[®]) and 104 counterfeit samples (Viagra and Cialis) from distinct seizures were obtained from ATR-FTIR data derived from 10 mg of crushed core tablets. Principal component analysis (PCA) technique was employed to classify samples based on the fingerprint region mid-infrared spectra (1800–525 cm⁻¹) using OMNIC v.7.2 software; PCA enabled categorizing samples in groups with different chemical profiles, successfully distinguishing between authentic and counterfeits samples in forensic routine. The existence of active pharmaceutical ingredients (API) and technological adjuvant others than specified on the medicine package were also detected in counterfeit samples. In addition, we applied the similarity match (SM) method to demonstrate that a mixture of pharmaceutical powders deriving from a common origin may have been used to manufacture both counterfeit Cialis and Viagra tablets from distinct seizures.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The increasing commerce and use of counterfeit medicines offers serious risks to public health worldwide, and the repression to that commerce mobilizes drug manufacturers, health surveillance agents, police and forensic forces. Phosphodiesterase type-5 (PDE-5) inhibitors for treating erectile dysfunction are among the most falsified drugs due to their market success, high cost, and embarrassment associated with the underlying condition. Counterfeit PDE-5 inhibitors are normally purchased from fraudulent websites, making it hard for police to control its commerce [1]. In developed countries, PDE-5 inhibitors like Viagra[®] (sildenafil citrate, Pfizer), Cialis[®] (tadalafil, Eli Lilly), and more recently Levitra[®] (vardenafil hydrochloride, Bayer)¹ are among the most popular counterfeited medicines [2]. In Brazil, Viagra[®] and Cialis[®]

are also deemed the most falsified medicines [3], accounting for nearly 80% of drug counterfeiting analyzed by the Brazilian federal police (BFP) from 2007 to 2010 [4].

Several approaches relying on different analytical techniques have been recently developed to identify unauthentic sildenafil (SLD), tadalafil (TAD) and analogues; such studies aim at elucidating structural aspects of those substances in pure form, dosage forms, and as adulterants in dietary supplements [5–8]. From the analytical point of view, an interesting strategy consists of applying methods that minimize or require no sample preparation. For that matter, spectroscopy methods have proven to be very efficient since they allow characterizing samples by directly measuring substances in solid state; spectroscopy methods also rely on straightforward operational steps, and provide reliable, fast results. Maurin et al. [9] proposed the use of X-ray pattern diffraction focused on two purposes: the discrimination of counterfeit Viagra tablets, and the identification of differences in drug composition. Trefi et al. [10] applied Raman spectroscopy, ¹H NMR, and 2D DOSY (diffusion-ordered spectroscopy) NMR to analyze genuine and illegal formulations of Cialis[®] purchased via internet, while SLD in pure form and Viagra[®] formulations were easily and unequivocally characterized by

* Corresponding author at: Rio Grande do Sul Technical and Scientific Division, Brazilian Federal Police, 90160-093 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 32359079; fax: +55 51 32359066.

E-mail addresses: rafaelortiz.rs@djp.gov.br, ortiz.rs@gmail.com (R.S. Ortiz).

¹ The symbol [®] was used only in reference to authentic products.

DISCUSSÃO GERAL

Amostras forenses reais são objetos de estudo raramente disponíveis para experimentos em pesquisa científica. O pesquisador não tem outra fonte de matéria-prima senão os materiais apreendidos pelas forças policiais e encaminhados para exames periciais. Por muitas vezes o número de amostras consiste no principal fator limitante ao desenvolvimento de trabalhos na área forense.



Legenda: ND, não destrutivo; NC, não consome amostra; (*) não redigido.

Figura 3. Uma visão geral dos experimentos realizados.

Assim sendo, é essencial que haja o adequado planejamento dos experimentos de modo a maximizar a quantidade de informações a serem extraídas de cada amostra. Neste estudo, a obtenção dos diferentes perfis propostos foi idealizada e efetivamente realizada partindo do todo para as partes. Explicitamente, iniciou-se com a avaliação dos aspectos físicos

externos – experimentos não destrutivos – passando, subsequentemente, aos ensaios químicos sobre a composição das misturas constituintes de cada comprimido – sequencialmente dos ensaios que não consomem amostras para os que as consomem. Desta forma sucedem-se os experimentos realizados neste trabalho, como de um modo geral podem ser vistos em sentido horário na representação da Figura 3.

Tabela 1 – Produção bibliográfica – Eixo Principal.

<i>Experimento</i>	<i>Publicação</i>	<i>Status</i>
Perfil Físico	ORTIZ, RS; MARIOTTI, KC; LIMBERGER, RP; MAYORGA, P. Physical profile of counterfeit tablets Viagra and Cialis.	Publicado no Brazilian Journal of Pharmaceutical Science 48 (2012) 487-495.
Perfil de Inorgânicos	ORTIZ, RS; MARIOTTI, KC; SCHWAB, NV; SABIN, G; ROCHA, WFC; CASTRO, EVR; LIMBERGER, RP; MAYORGA, P; BUENO, MIMS; ROMÃO, W. Fingerprinting of sildenafil citrate and tadalafil tablets in pharmaceutical formulations via X-ray fluorescence (XRF) spectrometry.	Publicado no Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 58 (2012) 7–11.
Perfil de Orgânicos	ORTIZ, RS; MARIOTTI, KC; ROMÃO, W; EBERLIN, MN; LIMBERGER, RP; MAYORGA, P. Chemical Fingerprinting of Counterfeits of Viagra and Cialis Tablets and Analogues via Electrospray Ionization Mass Spectrometry.	Publicado no American Journal of Analytical Chemistry, 2 (2011) 919-928.
Perfil de Princípios Ativos	ORTIZ, RS; MARIOTTI, KC; HOLHZSCHUH, MH; ROMÃO, W; LIMBERGER, RP; MAYORGA, P. Profiling Counterfeit Cialis, Viagra and Analogues by UPLC-MS	Aceito para publicação na Forensic Science International (em 14/03/2013)
Perfil por Espectroscopia	ORTIZ, RS; MARIOTTI, KC; FANK, B; LIMBERGER, RP; ANZANELLO, MJ; MAYORGA, P; Counterfeit Cialis and Viagra fingerprinting by ATR-FTIR spectroscopy with chemometry: Can the same pharmaceutical powder mixture be used to falsify two medicines?	Publicado na Forensic Science International 226 (2013) 282-289.

A produção científica originada dos experimentos realizados encontra-se disposta como capítulos e anexos desta tese. Sinteticamente, as publicações em que o doutorando é primeiro autor formam um eixo principal (Tabela 1) e consistem nos capítulos I até V desta tese. Por outro lado, as publicações em que o doutorando não é primeiro autor bem como as apresentações de trabalhos em eventos científicos formam um eixo secundário (Tabela 2) e são

dispostas como anexos adiante. Nesta discussão geral será abordado o eixo principal do projeto.

Tabela 2 – Produção bibliográfica – Eixo Secundário.

<i>Experimento</i>	<i>Publicação</i>	<i>Status</i>
Perfil físico	ORTIZ, RS; MARIOTTI, KC; LIMBERGER, RP; FACHEL, JMG; MAYORGA, P. Utilização de características físicas de comprimidos na detecção de falsificações de medicamentos: os exemplos do Viagra e do Cialis	Apresentado no 2 ^o Encontro Nacional de Química Forense, Ribeirão Preto, Brasil, 2010.
Espectroscopia do revestimento	ORTIZ, RS. MARIOTTI, KC; LIMBERGER, RP; MAYORGA, P. Detection of counterfeit medicines with the video spectral comparator: the examples of Viagra and Cialis	Apresentado na 1 ^a Reunión Internacional de Ciências Farmaceuticas, Córdoba, Argentina, 2010.
Processamento de imagem do revestimento	JUNG, CR; ORTIZ, RS; LIMBERGER, RP; MAYORGA, P. A new methodology for detection of counterfeit Viagra and Cialis tablets by image processing and statistical analysis.	Publicado na Forensic Science International 216 (2012) 92-96.
Perfil por Espectroscopia	ORTIZ, RS; MARIOTTI, KC; FANK, B; LIMBERGER, RP; MAYORGA, P. Obtenção de perfis químicos de medicamentos falsificados com FTIR-ATR associada a métodos quimiométricos e análise: uma única mistura farmacêutica pode ser empregada na falsificação de Cialis e de Viagra?	Apresentado no 3 ^o Encontro Nacional de Química Forense, Ribeirão Preto, Brasil, 2012. Menção Honrosa.
Seleção de variáveis	ANZANELLO, MJ; ORTIZ, RS; LIMBERGER, R.P.; MAYORGA, P. A Multivariate-based Wavelength Selection Method for Classifying Medicines Into Authentic or Counterfeit Classes.	Manuscrito submetido ao Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (reencaminhado após revisão).
Análise de blisters por FTIR	ALVES, J; DOMINGOS E; CASTRO, EVR; ORTIZ, RS; MAYORGA, P; ROMÃO, W. Investigating the Chemical Composition of Viagra and Cialis Packaging (Authentic and Counterfeit) by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Thermal Analysis (TG/DTA).	Apresentado no 10 ^o Encontro da Sociedade Brasileira de Materiais, Gramado, Brasil, 2011.
Análise de blisters por FTIR	ROMÃO, W.; PEREIRA, TM; ALVES, J; ORTIZ, RS; MAYORGA, P; CASTRO, EVR; ROCHA, WF. Blisters Packaging Fingerprinting of Viagra® and Cialis® via Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) allied to Chemometric Methods	Manuscrito submetido ao Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (reencaminhado após revisão).
Perfil de Princípios Ativos	DOUTRELEPONT, RW; DRESCHER, L; ORTIZ, RS. NICHELE, A. Determinação de citrato de sildenafil e tadalafila em apreensões de comprimidos similares de Viagra e falsificados de Cialis.	Apresentado na 35 ^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, Brasil, 2011.

O **Capítulo I** apresenta o artigo “*Physical profile of counterfeit tablets Viagra and Cialis*” publicado na revista *Brazilian Journal of Pharmaceutical*

Science (v.48, n.3, 2012). Seguindo-se modelos desenvolvidos com o intuito de obter o perfil dos aspectos físicos (também denominados tecnológicos) de comprimidos de Ecstasy (Weyermann *et al.*, 2008; Marquis *et al.*, 2008), adotou-se uma abordagem simples, confiável, não destrutiva, sem preparo de amostra no sentido de gerar um perfil tecnológico que se una aos demais métodos analíticos utilizados na rotina forense de detecção de falsificações de Cialis e de Viagra. Tais dados de modo algum podem ser desprezados quando da análise de materiais sob a forma farmacêutica sólida de comprimidos. Sabidamente, apreensões de comprimidos com características correspondentes advêm de um mesmo lote de produção, enquanto que comprimidos que exibem características divergentes têm origem em lotes diferentes. A etapa de compressão de uma mistura pulveréa farmacêutica em comprimidos gera em um conjunto de comprimidos produzidos por uma determinada máquina de comprimir propriedades características as quais definem um estudo denominado pós-compressão do lote (Marquis *et al.*, 2008). Após a compressão, as amostras submetidas à análise não sofrem alterações até o consumo ou apreensão pelas forças policiais (Milliet *et al.*, 2009). Tendo isto como fundamento, este trabalho aprofunda o estudo das características pós-compressão – massa, espessura, comprimento maior e comprimento menor – associadas a ferramentas estatísticas descritivas e multivariadas de análise, em comprimidos autênticos e falsificados de Viagra e de Cialis.

Os comprimidos autênticos de Viagra e de Cialis apresentam baixíssima variação nas propriedades pós-compressão medidas graças à aplicação de tecnologias avançadas no processo de fabricação dos comprimidos bem como de um rígido controle de qualidade que descarta qualquer produto fora de suas especificações (Allen *et al.*, 2007). Já os comprimidos falsificados apresentaram maior dispersão dos resultados observados. Tais valores mostram-se em concordância com publicações da área forense, que associam uma maior variabilidade aos produtos ilícitos devido a peculiaridades dos modos de produção clandestinos, tais como, isenção de controle de qualidade no ciclo produtivo, falta de homogeneidade das misturas de pós (UNODC, 2005; Lociciro *et al.*, 2008; Weyermann *et al.*, 2008; Marquis *et al.*, 2008; Dujourdy *et al.*, 2008; Andersson *et al.*, 2007).

Analisando somente os produtos falsificados, percebe-se que a dispersão de valores observados para as variáveis massa e espessura tem amplitudes relativamente mais elevadas, enquanto que comprimentos maior e menor exibem distribuições de frequências mais estreitas. Tais fatos provavelmente estão associados ao êxito dos falsificadores em obter uma matriz e punções que mimetizem a câmara de compressão que produz comprimidos autênticos. Entretanto, diferenças em ajustes de posição dos punções, força de compressão e, principalmente, da quantidade e composição dos complexos farmacêuticos a serem comprimidos, impede a reprodutibilidade nas características massa e espessura.

Resumidamente, os resultados mostram que alguns dos comprimidos falsificados conseguem imitar um ou outro dos aspectos físicos medidos, no entanto, para as amostras avaliadas, nenhuma das falsificações conseguiu apresentar simultaneamente as medidas de massa, espessura e comprimento maior e comprimento menor dentro das faixas definidas para os medicamentos autênticos (Teste de Fisher). Portanto, neste estudo, a medida das referidas propriedades físicas pós-compressão permite detectar claramente todos os medicamentos falsos ($\alpha = 0,05$).

Utilizando a Análise Hierárquica de Cluster (AHC), representada na forma de dendrogramas, os comprimidos com perfis físicos semelhantes foram agrupados, o que pode indicar uma produção ilícita em comum. As amostras de Viagra foram distribuídas em dois grupos de baixa similaridade entre si: o *cluster 1* com as amostras autênticas e as falsificações de quatro apreensões distintas e o *cluster 2* com as demais falsificações de outras três apreensões distintas. Subdividindo o *cluster 1* podem-se isolar os comprimidos autênticos de Viagra com falsificações de duas apreensões distintas. Mais claramente, para as amostras de Cialis são formados somente dois *clusters*: um com as amostras autênticas e um com as amostras falsificadas de oito apreensões distintas. Paralelamente, a AHC aponta para a variável massa como sendo a variável mais influente na classificação das amostras.

Dendrogramas apenas para amostras falsificadas permitiram a identificação de pares de amostras advindos de apreensões distintas e intimamente ligados. Testes químicos preliminares (UPLC-MS, capítulo IV, e

FTIR-ATR, capítulo V) indicaram que existe uma semelhança química entre algumas destas amostras. Esses resultados indicam que estas amostras têm uma origem comum não apenas de misturas pulveréas farmacêuticas, mas também de ciclo de compressão. Assim, verifica-se que os dados do perfil físico podem ser úteis quando adicionados em conjunto com os resultados da análise química a um banco de dados para mapeamento de falsificação. Tais informações não se prestam a compor relatórios externos, tais como laudos de exame em medicamentos, mas são de interesse interno, com fins de inteligência forense (Marquis *et al.*, 2008; Milliet *et al.*, 2009).

O **Capítulo II** descreve os resultados obtidos para o perfil inorgânico com o experimento de Espectrometria de Fluorescência de Raios - X (XRF), a qual permite a caracterização de metais presentes nas amostras (Romão *et al.*, 2010), associada à ACP e à AHC. O artigo resultante deste estudo foi intitulado “*Fingerprinting of sildenafil citrate and tadalafil tablets in pharmaceutical formulations via X-ray fluorescence (XRF) spectrometry*” e publicado no Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (v. 58, p. 7–11, 2012). A FXR consiste em excelente metodologia para determinação semi-quantitativa do princípio ativo SLD (que apresenta enxofre, S, na sua estrutura) e de excipientes e agentes de revestimento dos comprimidos, como fosfato de cálcio, óxido de titânio e óxido de ferro (P, Ca, Ti e Fe). Tais elementos podem ser detectados diretamente na superfície das formulações farmacêuticas, após trituração, sem que as amostras sejam consumidas nos exames.

A técnica de XRF baseia-se na obtenção de um espectro de emissão fluorescente característico de cada elemento químico a partir de uma fonte de excitação controlada (Redígolo, 2011). Quando um átomo é submetido a um processo de irradiação utilizando-se uma fonte de raios-X, um elétron pode ser ejetado das camadas eletrônicas mais internas (efeito fotoelétrico). Para estabilização desta forma excitada, elétrons das camadas eletrônicas mais externas caem rapidamente para as vacâncias geradas, liberando a diferença de energia existente entre os dois níveis de energia envolvidos. Como este processo envolve níveis de energia que são característicos de cada elemento, a radiação emitida para cada transição é também característica. O espectro de

linhas características de raios X consiste de uma série de comprimentos de onda discretos (linhas espectrais) características do elemento emitido. Desta maneira, a energia da radiação emitida pode ser diretamente utilizada na identificação da espécie em questão (Salvador, 2012). Por outro lado, como a intensidade da radiação emitida é diretamente proporcional à concentração da espécie, a técnica também fornece informações que podem ser utilizadas para fins quantitativos (Nagata *et al.*, 2001).

Empregando a XRF por dispersão de energia (ED-XRF) e o método de (semi) quantificação pelos parâmetros fundamentais, foram obtidos espectros característicos para Viagra[®] e Cialis[®] autênticos. As amostras de Viagra[®] são individualizadas pela presença de linhas características K α de P (1,98 keV); S (3,30 keV); Ca (3,62 keV); Ti (4,48 keV) e Fe (6,38 keV); além de linhas características K β para Ca (4,00 keV) e Ti (4,90 keV). A linha S observada deve-se à presença do átomo de enxofre na estrutura do ingrediente ativo, a SLD. Outros elementos, tais como P, Ca e Ti correspondem aos excipientes: fosfato cálcio dibásico (CaHPO₄) e dióxido de titânio (TiO₂). O Fe é empregado como agente de cobertura. Os espectros de XRF obtidos para Cialis[®] mostram a presença de linhas espectrais K α e K β somente referentes aos elementos Ti (K α = 4,48 keV e K β = 4,90 keV) e Fe (K α = 6,38 keV e K β = 7,02 keV), que correspondem a elementos de dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de ferro (Fe₂O₃), respectivamente. Este resultado é completamente diferente do observado para as amostras de Viagra[®]. Portanto, as amostras de Viagra[®] e de Cialis[®] podem ser facilmente classificadas e diferenciadas utilizando a técnica XRF. Importante mencionar que a composição elementar da TAD consiste basicamente de elementos leves (CHNO). Desta forma, esta composição puramente orgânica está diretamente associada às linhas alocadas em região denominada de espalhamento, em alta energia, de 18 a 25 keV.

Com relação às quatro apreensões de Viagras falsos testadas, duas apreensões apresentaram uma composição semelhante aos resultados de XRF do Viagra[®] autêntico, no entanto, apontando para concentração diversa do elemento enxofre (S) que, provavelmente, encontra-se associado ao princípio ativo SLD. Uma apreensão aponta para menor carga de enxofre e outra para carga muito mais elevada, aproximadamente 400 % maior do que a do padrão.

Diferentemente dessas primeiras, as demais apreensões não apresentaram linhas características ($K\alpha$ ou $K\beta$), apresentando assim, provavelmente uma composição orgânica predominante. Para as três apreensões de Cialis falsos avaliadas, os resultados indicam uma composição similar ao de amostras autênticas de Viagra[®], indicando uma possível substituição de princípio ativo. Destaca-se que no conjunto de amostras falsas de Cialis, a concentração de enxofre (S), em todos os casos é muito mais elevada do que os níveis encontrados para Viagra[®] autêntico. As amostras falsas de Cialis apresentam linhas características para os elementos Ca, Ti e Fe. À exceção do titânio, a concentração elementar nestas amostras é sempre superior às padrões, em todos os casos.

Para a análise quantitativa dos elementos S, Ca, Ti e Fe, o método dos parâmetros fundamentais foi utilizado. Normalmente, para composições de amostras conhecidas, os resultados permitem um cálculo teórico da intensidade de fluorescência de raios-X gerada, usando as condições de medição e constantes físicas dos parâmetros fundamentais. O método dos parâmetros fundamentais utiliza estas características de forma inversa, isto é, tenta obter a composição a partir das intensidades efetivamente medidas (Romão *et al.*, 2010; Marguí *et al.*, 2009; Sherman, 1955; Shiraiwa e Fujino, 1966). Sabidamente, a preparação da amostra é a maior fonte de erros em análises de XRF. Baixos desvios padrões são alcançados principalmente quando o tamanho de partícula é controlado (Romão *et al.*, 2010; Melquiades *et al.*, 2008). Neste aspecto, salienta-se que os comprimidos testados exibiam composição visualmente heterogênea, inclusive no tamanho das partículas, além de significativa variação na massa (de 100 até 500 mg). Tais fatores certamente contribuíram para os altos valores DP observados. Por outro lado, a ED-XRF requer pouquíssimo esforço na preparação da amostra, fornecendo muita informação sobre a composição da mesma, com análise rápida e barata (100 segundos para adquirir um espectro). Estas características tornam a ED-XRF uma técnica atrativa para avaliação de formulações farmacêuticas.

Os dados de XRF foram submetidos a um tratamento por meio da ACP e AHC para avaliar estatisticamente o desempenho destes espectros na classificação das amostras. Os espectros foram utilizados na faixa de 0 até 40

keV) resultando em 2048 pontos (variáveis) e 97 amostras. No gráfico de scores das duas primeiras componentes principais (PC's), as quais representam 94% da variância total, observa-se a separação em dois grandes grupos, correspondendo às amostras comerciais e às amostras falsificadas, de acordo com a região da PC1. Esta separação é principalmente devida aos elementos Ca e Ti, que possuem influência significativa sobre PC1. Os grupos formados pelas amostras falsificadas de Cialis exibem uma carga de Ca e S maior entre todas as amostras analisadas, localizando-se em $PC1 < 0$ e $PC2 > 0$. Quanto aos grupos relacionados com as amostras falsas de Viagra tem-se o único grupo do estudo em $PC1 > 0$, de composição sendo predominantemente orgânica, e outro em $PC1 < 0$ e $PC2 < 0$. Por fim, observa-se a formação de grupos contendo as amostras comerciais autênticas, ambos em $PC1 > 0$ e $PC2 > 0$, característicos para Cialis[®] e Viagra[®]. A avaliação de PC1 versus PC3 aponta para a formação de novos subgrupos, de acordo com a região PC3 (responsável por 2,6% da variância total), principalmente devido à contribuição da variável, Fe, neste caso. O resultado observado com a AHC foi semelhante ao da ACP, classificando amostras falsas em cinco grupos bem definidos e as amostras comerciais em dois grupos distintos.

No **Capítulo III** tem-se o experimento de obtenção do *fingerprinting* orgânico por Espectrometria de Massas com Ionização por *Eletronspray*, após infusão direta (ESI-MS) a partir da fase polar (extrato metanólico) dos núcleos dos comprimidos. O experimento gerou a publicação "*Chemical Fingerprinting of Counterfeits of Viagra and Cialis Tablets and Analogues via Electrospray Ionization Mass Spectrometry*" (*American Journal of Analytical Chemistry*, v. 2, p. 919-928, 2011). A técnica mostrou como vantagens muita facilidade no preparo de amostra bem como rapidez e robustez analíticas, além disto, consome-se mínima quantidade de amostra. Especificamente, cada solução amostral é formada a partir de aproximadamente 10 mg do núcleo de cada comprimido dissolvido em 10 mL de metanol e acidificado com gotas de ácido fórmico (1M). Segue-se a injeção da amostra no cromatógrafo líquido e, subsequente, infusão direta no espectrômetro, cuja resposta é fornecida em 30 segundos.

A ESI(+)-MS forneceu um *fingerprinting* típico do fármaco SLD para as amostras autênticas de Viagra®. Os marcadores principais correspondem à molécula de SLD detectada em diferentes formas, tais como [SLD + H]⁺ em m/z 475; [SLD + Na]⁺ em m/z 497; [2SLD + H]⁺ em m/z 949, e íons dos fragmentos em m/z 377, 311, 283 e 99 (Zou *et al.*, 2006; Blok-Tip *et al.*, 2004). A confirmação da detecção da SLD foi realizada com ESI (+)-MS/MS para os íons em m/z 475 e 949 resultando em fragmentação de acordo com a sua estrutura e exibindo espectros conforme os esperados (Gratza *et al.*, 2009). Nos espectros de amostras falsas de Viagra também predominam íons relacionados à SLD, mas em duas apreensões foram detectados um íon não esperado, em m/z 489, correspondente, provavelmente, a um análogo protonado da SLD. A ESI (+)-MS/MS para este íon apresenta fragmentos semelhantes ou ainda os mesmos que aqueles produzidos para a [SLD + H]⁺: de m/z 58, 70, 84, 99, 254, 283, 297, 313 e 325. Esta molécula pode ser atribuída à homossildenafil (HSD), distinguível de outro isómero possível, a vardenafila (VRD), pela ausência de um íon abundante de m/z 151 (Ahn *et al.*, 2009). A presença de espécies farmacológicas análogas à SLD pode resultar da adição intencional ou de purificação inadequada do princípio ativo principal.

O espectro ESI (+)-MS para Cialis® autêntico revela pouca abundância para o íon diagnóstico [TAD + H]⁺ em m/z de 390. Os íons mais abundantes foram atribuídos ao excipiente lactose, nas formas [lactose + H]⁺ de m/z 343; [lactose + Na]⁺ de m/z 365, e [2lactose + Na]⁺ de m/z 707. Sabe-se que um comprimido autêntico de Cialis® contém 20 mg de TAD e 245 mg de lactose, o que explica tais resultados experimentais. Os íons m/z 365, 390 e 779 quando investigados por ESI (+)-MS/MS fragmentaram-se como o descrito na literatura, confirmando a identidade destas substâncias (Nyadong *et al.*, 2009; Ahn *et al.*, 2009; Sawaya *et al.*, 2010).

As amostras de Cialis falsificados exibiram espectros muito contrastantes e variáveis. Houve uma apreensão que originou íons TAD muito mais abundantes que o esperado, que pode indicar cargas mais elevadas de ingrediente ativo, o que torna tais falsificações potencialmente nocivas. Para três apreensões, em vez de íons relacionados à TAD, foram detectados em abundância íons de SLD, indicando a substituição dos fármacos. Uma

apreensão apresentou íons de TAD e de SLD simultaneamente. Um íon de muito baixa abundância (m/z 505) também foi observado em uma das apreensões. Trata-se da hidróxi-homossildenafilila (OH-HSD) (Singh *et al.*, 2009), outro análogo da SLD, tal como confirmado por ESI (+) -MS/MS (Ahn *et al.*, 2009). O HSD e OH-HSD análogos detectados nas falsificações podem apresentar maior atividade farmacológica do que a SLD (Venhuis *et al.*, 2007).

Os espectros de ESI-MS foram compilados gerando uma matriz de dados de 97 casos (amostras) e 99 variáveis (m/z) com as respectivas intensidades relativas, superiores a 10 %. Efetuando-se o tratamento pela ACP, encontrou-se que as três primeiras componentes principais explicam 91% da variância total. Podem ser observados três grupos, contendo: (1) Viagra[®], autênticos e falsos e algumas amostras de Cialis falsificados (todas com SLD); (2) Cialis falsificados contendo a molécula de TAD; e (3) Cialis[®] autênticos. Os íons que mais influenciam as cargas de PC1, PC2 e PC3, e conseqüentemente são responsáveis pela formação dos clusters, são os m/z 707, 475, 412, 390, 365, 268, 262, e 58. Uma nova ACP incluindo apenas as amostras do grupo 1 - Viagra[®] autênticos e falsos – possibilita a formação de dois subgrupos, um com amostras falsificadas e outro com as amostras originais e comerciais estrangeiras.

O **Capítulo IV** apresenta o perfil de substâncias farmacologicamente ativas, na forma do manuscrito “*Profiling Counterfeit Cialis, Viagra and Analogues by UPLC-MS*” (aceito para publicação do periódico Forensic Science International, em 14/03/2013). Tendo como ponto de partida, um método cromatográfico de ultra eficiência com detecção com arranjo de diodos, simples no preparo de amostras e já validado para a determinação simultânea de SLD e TAD (Ortiz *et al.*, 2010), agregou-se a espectrometria de massas para o estudo de novas amostras. A UPLC-MS concentra em um único instrumento velocidade de execução da análise – menos que 1,5 minutos – associada à quantificação reprodutível e identificação confiável dos analitos. Tais qualificações advêm dos cotejos entre tempos de retenção dos picos cromatográficos, espectros de ultravioleta obtidos com o fotoarranjo de diodos

– inclusive com indicação do percentual de pureza de cada pico – e espectros de massa de alta resolução.

Das figuras de mérito usualmente envolvidas em processos de validação de métodos analíticos, neste experimento, tomou-se a liberdade de avaliar apenas a linearidade e a precisão (intradia e interdia) uma vez que se tomou por base método validado anteriormente (Ortiz *et al.*, 2010). De solução-padrão de AFI em concentração conhecida de SLD (35,44-59,07 ug / mL) e TAD (16,71-27,84 ug / mL) foram obtidos os respectivos picos e áreas foram construindo curvas analíticas para cada fármaco. A linearidade foi satisfatória para estas faixas de concentração, pois os coeficientes de determinação (R^2) foram 0,9980 para o SLD ($y = 0,0068 x + 2,3152$) e de 0,9993 para o TAD ($y = 0,0033 x + 0,365$). As precisões expressas sob a forma de coeficiente de variação percentual (CV%) estavam entre 0,99 a 1,97% para SLD e 0,58 a 0,93% para a TAD, demonstrando a elevada precisão do método. A Figura 4 ilustra o conjunto de informações fornecidas pela UPLC-DAD-MS com a primeira replicata do ponto central do teste de linearidade (47,26 mg/mL de SLD e de 22,28 mg/mL de TAD). Observa-se a geração de dois cromatogramas sequenciais para cada amostra. O analito passa primeiro pelo fotoarranjo de diodos (DAD) e rapidamente chega ao espectrômetro de massa (MS). A SLD tem retenção de 0,48 minutos no cromatograma de DAD, com máximos 223,81 nm e 293,81 nm; associada com retenção de 0,57 minutos no cromatograma de MS, gerando íon molecular característico de $[SLD + H]^+$ em $m/z = 475,43$. Por sua vez, a TAD exibe tempo de retenção de 1,15 minutos no cromatograma de DAD, com máximo em 283,81 nm; relacionada com retenção de 1,22 min no cromatograma de MS, com íon molecular para $[TAD + H]^+$ em $m/z = 390,32$.

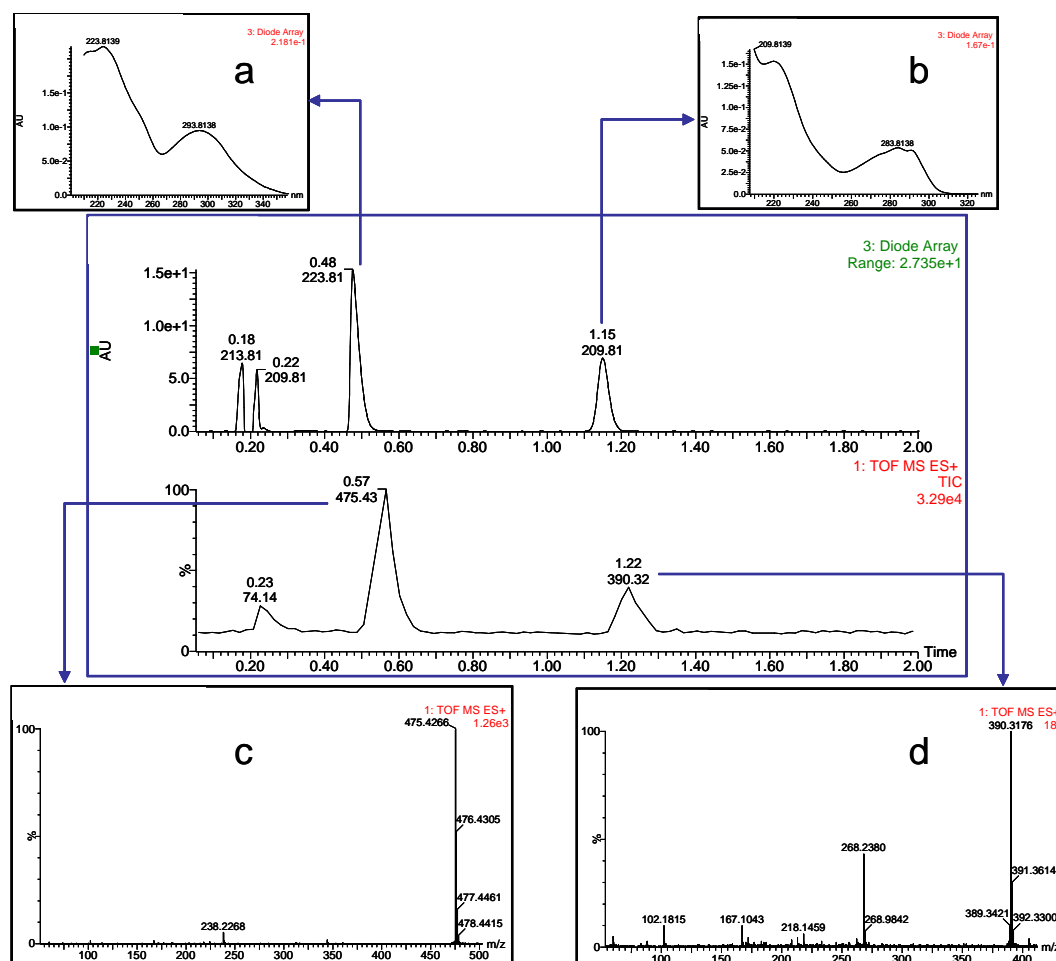


Figura 4. Informações fornecidas pela UPLC-DAD-MS para o ponto central da linearidade. No cromatograma de DAD, na parte superior, visualiza-se a eluição do pico de (a) SLD em 0,48 min (espectro de ultravioleta com máximos 223 nm e 293 nm) e (b) TAD em 1,15 min (com máximo em 283 nm). No cromatograma de MS, na parte inferior, a SLD elui em 0,57 min (espectrograma de massas com íon molecular (c) $[\text{SLD} + \text{H}]^+$ em $m/z = 475,43$) e a TAD elui em 1,22 min ((d) íon molecular para $[\text{TAD} + \text{H}]^+$ em $m/z = 390,32$).

Confirmando a identidade dos fármacos em análise, também foram observadas as séries de fragmentos característicos de cada um conforme relatos da literatura (Inoue *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2006; Blok-Tip *et al.*, 2004) e como visto anteriormente com a ESI(+)-MS/MS (vide capítulo III). Para SLD, o padrão de fragmentação formado pelos íons de m/z 377, 311, 283, 99 e 58; o aduto sodiado $[\text{SLD} + \text{Na}]^+ = 497$) bem como o dímero $[2\text{SLD} + \text{H}]^+ = 949$; e, para a TAD o íon molecular é fragmentado em m/z 268, 262 e 135 além de encontrarmos o aduto de sódio $[\text{TAD} + \text{Na}]^+ = 412$, o dímero da TAD $[2\text{TAD} + \text{H}]^+ = 779$ e um aduto sodiado deste dímero $[2\text{TAD} + \text{Na}]^+ = 801$.

Do ponto de vista qualitativo, verificou-se que todas as amostras de Viagra falsificadas exibiram pico de SLD, não sendo detectado nenhum placebo. Algumas amostras de Viagra falsificadas mostraram um pico desconhecido com tempo de retenção de 0,70 min no cromatograma DAD e 0,77 min no cromatograma MS, simultaneamente aos sinais de SLD. Trata-se do análogo farmacológico HSD, que apresenta íon molecular em m/z 489 com padrão de fragmentação idêntico ao da SLD. Ainda que o espectro de massas, nas condições experimentais testadas, possa sugerir a possibilidade de outro inibidor da PDE-5, como por exemplo, a VRD, o espectro de UV-DAD, neste caso, permite descartar qualquer dúvida. A VRD e a HSD têm a mesma fórmula mínima ($C_{23}H_{32}N_6O_4S$, massa exata 488,22) e apresentam um grupo metileno a mais do que a SLD, ocasionando uma diferença de 14 u.m.a. (CH_2) na massa molecular. Ambas são menos polares do que o SLD e, por isto, eluem em tempo de retenção mais elevado, nas condições deste ensaio. A VRD difere na posição dos átomos de nitrogênio do anel central e, conseqüentemente, no sistema de conjugação quando comparado com a SLD e HSD. Isto acarreta comportamento diferenciado frente à radiação na região visível. Assim, o espectro de UV-DAD da VRD apresenta apenas um absorção máxima em 223 nm (Inoue *et al.*, 2008; Zou *et al.*, 2006; Blok-Tip *et al.*, 2004), enquanto a HSD apresenta espectros UV-DAD idênticos ao da SLD, com dois máximos, 223,81 nm e 294,81 nm, compatíveis com o mostrado na Figura 4. Dentre as amostras de Cialis falsificadas, detectaram-se amostras que continham apenas TAD, amostras que continham TAD e SLD em diferentes proporções, amostras apresentavam apenas SLD e amostras com SLD e HSD.

A partir das curvas analíticas para SLD e para TAD foram calculadas as concentrações dos ingredientes farmacologicamente ativos em cada comprimido testado. Esta medida foi expressa em $\mu\text{g}/\text{mg}$, isto é, a quantidade de fármaco por massa de complexo farmacêutico que dá origem ao comprimido. A fim de estimar a concentração de HSD, assumiu-se que os coeficientes de extinção para a SLD e para a HSD são similares. A concentração SLD medida no Viagra[®] original foi de 196,38 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (CV% = 3,67%). Três apreensões apresentaram concentrações equivalentes: com

191,60 µg/mg, 214,56 µg/mg (CV% = 34,3%)¹ e 192,17 µg/mg (CV% = 3,0%). Duas apreensões apresentaram concentrações muito mais elevadas (até 158% do original) especificamente, 312,35 µg/mg (CV% = 26,1%) e 298,46 µg/mg. Uma apreensão apontou concentrações muito baixas, com 104,00 µg/mg (CV%= 6,1 %). Para as amostra que continham HSD e SLD estimou-se que a concentração de HSD é 5% da concentração de SLD. Considerando-se o peso médio dos comprimidos desta apreensão (327,12 mg, CV% = 2,36%), pode ser estimada em 102 mg de SLD somada a 5 mg de HSD como a dose farmacológica para estes produtos. Neste caso, a dose supera o dobro dos 50 mg de SLD do indicado no rótulo apócrifo. Para o medicamento Cialis[®] original a concentração de TAD foi de 47,26 µg/mg (CV% = 1,47%). Com relação aos produtos falsificados, numa tentativa de individualização por apreensão, pode-se dizer que ocorrem apreensões com: (1) 47,53 µg/mg para TAD e 9,72 µg/mg para SLD; (2) 10,73 µg/mg de TAD e 161,17 µg/mg de SLD; (3) dois subgrupos, cujas amostras contêm somente TAD (53,24 µg/mg, CV% = 8,52%) ou TAD (50,38 µg/mg, CV% = 9,62%) e SLD (11,32 µg/mg, CV% = 67,06%); (4) dois subgrupos, sendo um com TAD (17,46 µg/mg, CV% = 6,46%) e SLD (25,93 µg/mg, CV%= 20,93%) e outro com apenas SLD (93,85 µg/mg, CV%= 3,49%); (5) somente SLD (152,70 µg/mg, % RSD = 6,77); (6) 174,15 µg/mg de SLD mais aproximadamente 5% de HSD. Como mostrado a seguir a aplicação da estatística multivariada facilita a compreensão da distribuição de concentrações de fármacos aqui descrita.

Na aplicação da ACP nota-se que os dois primeiros componentes principais explicam 90,66% da variância total. O gráfico de cargas de PC1 *versus* PC2 divide as amostras autênticas e falsas de Cialis e de Viagra claramente em quatro grupos: (1) Viagra[®] autêntico e falsificações de Viagra e Cialis com exclusividade ou prevalência de SLD no intervalo de 89 a 216 µg/mg; (2) Cialis falsificados com conteúdo de TAD na faixa de 16 a 18 µg/mg e SLD em 22 a 35 µg/mg; (3) Cialis autêntico[®] e falsificações de Cialis com teor de TAD na faixa de 42 a 60 µg/mg; (4) Viagras e Cialis falsificados com HSD

¹ O coeficiente de variação percentual ou desvio padrão relativo é referido quando a apreensão consiste em mais do que uma amostra.

(11 a 18 µg/mg) e SLD em concentração elevada (176-453 µg/mg) simultaneamente. Somente duas amostras não integram nenhum destes grupos referidos acima: Viagra falso com 298 µg/mg de SLD e Cialis falso com 171 µg/mg de SLD e 5,63 µg/mg de HSD). O conteúdo de SLD, TAD e HSD são estatisticamente relevantes pelo agrupamento das amostras. Pela AHC, quanto menor a distância normalizada que separa duas amostras, mais próximas estas amostras dispõem-se no espaço experimental de *n*-variáveis. Para este experimento, isto revela quais as amostras têm o conteúdo de fármaco mais semelhante. De um ponto de vista tecnológico, amostras que apresentem idêntico conteúdo de fármaco advêm de um mesmo lote (mesma mistura farmacêutica e ciclo de compressão) ou da repetição da mesma fórmula padrão em lotes diferentes. Considerando operações unitárias de mistura e de compressão adequadas, a concentração de fármaco (m/m) na mistura farmacêutica pré-compressão e nos comprimidos confeccionados a partir desta mistura deve ser a mesma. Em outras palavras, o núcleo de qualquer comprimido é uma amostra representativa da composição quantitativa da mistura de fármacos e adjuvantes tecnológicos que originou o lote de comprimidos. Nesse sentido, foram identificados alguns pares de amostras de apreensões distintas intimamente ligadas pela AHC (artigo do capítulo III). Pelo Teste de Fisher comprova-se que o teor médio de SLD existente nestes pares de amostras de apreensões distintas é igual, ou melhor, não distinguível num nível de significância $\alpha = 0,05$. Este resultado pode indicar que essas amostras pareadas são originárias de uma única mistura farmacêutica que foi empregada, inclusive, para confeccionar falsificações de Viagra e de Cialis.

No **Capítulo V** apresenta-se o trabalho desenvolvido no sentido de obter o *fingerprinting* com a utilização da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), empregando a amostragem por Refletância Total Atenuada (ATR). Este capítulo é exibido na forma de um manuscrito intitulado “*Counterfeits Cialis and Viagra fingerprinting by ATR-FTIR spectroscopy with chemometry: a same pharmaceutical powder mixture can be used to falsify two medicines?*”, publicado na *Forensic Science International* 226 (2013) p. 282-289. O dispositivo de ATR dispensa o pastilhamento ou

qualquer outro tratamento prévio da amostra. A medição é feita simplesmente colocando-se a amostra em contato direto com a superfície do cristal para a obtenção de dados espectroscópicos. Assim, com apenas 10 mg do núcleo dos comprimidos, em menos de 30 segundos, foram obtidos espectros de FTIR-ATR característicos para amostras forenses analisadas.

A parte mais informativa dos espectros de infravermelho, também denominada região da impressão digital ($525\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$), foi o foco central de nosso interesse. Nesta faixa ocorrem absorções características de grupos funcionais e, por conseguinte, quaisquer diferenças entre os espectros podem ser detectadas (Tarantilis *et al.*, 2008). Corroborando este princípio SLD, TAD, HSD, VRD, mais análogos e homólogos (tiossildenafil, tiohomossildenafil, hidróxi-tiossildenafil, aildenafil, sulfoaildenafil, aminotadalafila) mostram bandas entre 1720 e 1150 cm^{-1} que definem todas as principais diferenças observadas em inibidores de PDE-5 (Champagne e Emmel, 2011). Assim, os espectros obtidos para cada replicata amostral foram dispostos em uma matriz de dados de 471 casos (Cialis e Viagras autênticos e falsos) por 661 variáveis (números de onda, cm^{-1}), a qual foi processada com a ACP.

Observa-se que as três primeiras componentes principais, explicam 97,71% da variância experimental (PC1 = 79,44%; PC2 = 10,66%; PC3 = 7,61%). Em uma avaliação preliminar, sem amostras falsificadas, observa-se que a utilização das três primeiras componentes principais possibilita separar claramente, em quatro grupos bem definidos e dispostos em quadrantes distintos de acordo com as regiões dos PC, a SLD (PC1 <0; PC2 <0; PC3 > 0); a TAD (PC1 <0; PC2 > 0; PC3 > 0); as amostras de Viagra[®] autênticas (PC1 <0; PC2 <0; PC3 <0) e as amostras de Cialis[®] autênticas (PC1 <0; PC2 > 0; PC3 <0). A variável mais influente na PC1 refere-se à ligação C-O da TAD (em 1698 cm^{-1}). Esta variável influencia negativamente PC1 (absorbância -0,08), ordenando as amostras em função de suas respectivas concentrações de TAD – e influencia positivamente PC2 (abs +0,05), explicando porque Cialis[®] autêntico situa-se em PC2 > 0. Geralmente, o segundo componente diferencia as variáveis (picos) mais influentes no primeiro componente, atribuindo-lhes valores negativos e positivos, como este caso. Verifica-se que os valores de cargas mais positivos para PC3 ocorrer em comprimentos de onda situados em

1672 cm^{-1} (abs + 0,11), 1643 cm^{-1} (0,14 abs) e 1487 cm^{-1} (0,08 abs). Estes sinais estão presentes no espectro da SLD pura. Na tentativa de elucidar quais as variáveis (cm^{-1}) são mais influentes na separação, é imprescindível ter em mente que para misturas farmacêuticas a discriminação obtida via ACP está relacionada não só com os fármacos existentes nas amostras, mas também aos vários adjuvantes tecnológicos, especialmente, diluentes de carga elevada que comprimidos comerciais podem apresentar. Quando adjuvantes são os componentes em maior quantidade (por exemplo, Cialis[®] autêntico contém 20 mg de TAD e 245 mg de lactose) o espectro da amostra é muito semelhante ao do espectro do adjuvante puro. Como resultado desta influência muito provavelmente podem ser associados em PC1 à significativa influência observada pelas variáveis 1048 cm^{-1} (abs -0,05), 909 cm^{-1} (abs -0,05) e 890 cm^{-1} (abs -0,05), que consistem em picos característicos da lactose.

A identificação das amostras inautênticas foi realizada com facilidade, aplicando-se a ACP à matriz de dados. Para Cialis foram formados seis grupos com Cialis[®] autêntico em um grupo isolado; três grupos com amostras de uma apreensão cada; um grupo com amostras de duas apreensões; e, um grupo com amostras de três apreensões distintas. Analogamente, para as amostras de Viagra foram formados cinco grupos. As amostras autênticas alocam-se em um grupo isolado, havendo a formação de dois grupos com uma apreensão apenas; um grupo com duas apreensões; e, um grupo com três apreensões.

Como o perfil de substâncias farmacologicamente ativas (Capítulo IV) havia demonstrado que alguns Cialis falsificados continham apenas SLD, embora a rotulagem mencionasse TAD, realizou-se uma nova ACP, apenas com espectros de amostras falsificadas, tanto de Cialis quanto de Viagra. O novo arranjo das amostras definiu nove *clusters*. Neste novo ordenamento, a separação em nove grupos parece estar associada principalmente ao conteúdo de SLD e TAD, variáveis com influência significativa sobre os componentes principais. Amostras com os mesmos fármacos, em concentrações semelhantes são colocadas em um mesmo *cluster*. Quatro destes grupos (Grupos 3, 4, 6 e 7) incluem amostras de apreensões distintas cujas datas, locais e fármacos detectados encontram-se dispostos na Tabela 3.

Por princípio, as amostras agrupadas por espectroscopia associada com AMD podem estar associadas a uma origem comum. Neste caso, como já referido anteriormente, podem advir de (1) mesma mistura farmacêutica e mesmo ciclo de compressão ou (2) repetição da mesma fórmula padrão em lotes diferentes. Destaca-se, ainda que, além de detectar a existência de *clusters* formados com amostras de uma especialidade farmacêutica advindas de apreensões diferentes, um dos grupos – Grupo 3, Tabela 3 – foi formado por amostras de Cialis e Viagra de apreensões distintas. O Índice de Similaridade (IS) aplicado às amostras deste Grupo 3 revelou alta correlação entre os espectros, com valores na faixa dos medicamentos autênticos, apontando na direção de que a mesma mistura farmacêutica pode ter sido usada para a fabricação tanto de Cialis falsificados quanto de Viagras falsificados.

Tabela 3. Falsificações de apreensões diferentes classificadas em mesmos grupos segundo a ACP aplicada aos dados de FTIR-ATR.

Cluster	<i>Apreensão</i>			
	<i>Código</i>	<i>Data</i>	<i>Local</i>	<i>Fármaco(s)</i>
Grupo 3	Viagra E	06/out/10	Caxias do Sul/RS	SLD
	Viagra G	21/jun/11	Santo Ângelo/RS	SLD
	Cialis K	02/jun/10	Santa Cruz do Sul/RS	SLD
Grupo 4	Cialis H	06/ago/08	Porto Alegre/RS	SLD/ TAD
	Cialis J	15/abr/10	Gravataí/RS	SLD/ TAD
	Cialis K	02/jun/10	Santa Cruz do Sul/RS	SLD/ TAD
Grupo 6	Viagra B	16/fev/09	Porto Alegre/RS	SLD/HSD
	Viagra D	15/abr/10	Gravataí/RS	SLD/HSD
	Viagra F	05/nov/10	Passo Fundo/RS	SLD/HSD
Grupo 7	Cialis M	26/nov/10	Santo Ângelo/RS	SLD/HSD
	Cialis N	13/jun/11	Santo Ângelo/RS	SLD/HSD

CONCLUSÕES

Foram desenvolvidas e aplicadas de modo inédito ferramentas analíticas que permitem uma triagem relativamente simples e rápida de utilização forense no sentido de caracterizar e classificar comprimidos de Viagra® e Cialis® autênticos e amostras falsificadas destas especialidades farmacêuticas.

Foram obtidos perfis característicos para as amostras comerciais e falsificadas apreendidas pela Polícia Federal a partir de controle físico dos comprimidos, do teor de inorgânicos, do teor de orgânicos, do teor de substâncias farmacologicamente ativas e do perfil por espectroscopia de infravermelho na região da impressão digital.

A aplicação de técnicas de Análise Multivariada de Dados permitiu a representação dos dados experimentais de forma mais clara e conclusiva relativamente às diferenças na composição de amostras testadas.

Verificou-se a formação de grupos de medicamentos falsificados de apreensões distintas o que pode estar associado a uma produção ilícita comum. Inclusive, identificou-se a formação de um *cluster* contendo apreensões de Viagras falsificados e apreensão de Cialis falsificado, com correlação altamente significativa para estas amostras. Isto indica que uma mesma mistura farmacêutica, contendo apenas SLD, foi empregada para confeccionar comprimidos falsificados de Viagra e de Cialis.

Verificou-se a existência de falsificações com sérios riscos à saúde com a existência de: princípio ativo diferente do especificado na embalagem; ocorrência simultânea de dois princípios ativos no mesmo produto; existência de outros contaminantes farmacologicamente ativos; concentrações de SLD e de TAD muito mais elevadas do que em comprimidos comerciais originais – até três vezes os valores rotulados.

No sentido de colaborar com o combate à falsificação destas especialidades farmacêuticas utilizando os conhecimentos erigidos a partir deste trabalho, sugere-se a criação de base de dados, inicialmente nacional, com resultados analíticos obtidos para as amostras falsificadas. Tal sistema poderá informar quanto ao provável número de produtores destas contrafações, quanto aos fornecedores de matérias-primas, quanto às rotas de

distribuição, entre outras informações, o que permitiria direcionar esforços no sentido de combater tais falsificações.

Para esse caso, entendem-se significativamente relevantes, devendo integrar um protocolo de análise: informações sobre a apreensão; aquisição de imagem dos comprimidos – em comparador espectral de vídeo, com ampliação de 20 vezes e ajuste automático de brilho e contraste, na região do visível, no ultravioleta (365 nm) e infravermelho (728 nm); informações de produção (validade, número de lote); valores de massa, espessura, comprimento maior e menor dos comprimidos; teor dos inorgânicos (Ca, Ti, Fe, S); teor dos princípios ativos (SLD, TAD, HSD e possíveis análogos); perfil de espectroscopia de infravermelho na região da impressão digital.

Por fim, conclui-se que a maior contribuição deste trabalho é o estímulo à mudança da atitude profissional do perito criminal, inserindo-o agora numa perspectiva de inteligência forense. Abandona-se uma situação passiva na qual o perito responde ao estritamente necessário, quando lhe é encaminhado um material para exames e finaliza seu trabalho no momento em que assina o laudo pericial. A partir da abordagem proposta nesta tese, a ação pericial torna-se proativa, com o perito consciente de sua *expertise*, de sua posição no encadeamento jurídico-penal e de sua importância no processo investigativo. Desta forma, com o desenvolvimento de tecnologias para melhorar a qualidade das provas materiais produzidas, subsidia-se os sistemas de inteligência estratégica e operacional com informações valiosas, até então indisponíveis.

PERSPECTIVAS

Uma vez que o fluxo de apreensões de Cialis e de Viagra falsificados é contínuo assim como o encaminhamento destes materiais ao Setor Técnico-Científico da Polícia Federal em Porto Alegre/RS, vislumbra-se como sequência deste trabalho, no sentido de pesquisa científica:

(1) a possibilidade de obter o perfil químico dos carboidratos (glicose, lactose, manitol, sorbitol, entre outros) e dos ácidos graxos (esteárico, palmítico, entre outros) empregados comumente como adjuvantes tecnológicos em formulações farmacêuticas de comprimidos, sendo que nestes casos poder-se-á empregar, além da cromatografia líquida, a cromatografia a gás, após derivatização bem como a eletroforese capilar (BAER, 2007);

(2) a possibilidade de montagem de banco de dados com perfis químicos de insumos farmacêuticos regularmente cadastrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para utilização em território brasileiro, e;

(3) o emprego de técnicas estatísticas multivariadas mais avançadas, tais como Regressão *PLS* (*Partial Least Squares*) e *Data Mining*, no processamento dos dados experimentais obtidos (BEEN *et al.* 2011; SACRÉ *et al.*, 2010).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUL-ENEIN, H; ALI., I. Determination of tadalafil in pharmaceutical preparation by HPLC using monolithic silica column. **Talanta**, v. 65, p. 276–280, 2005.

AMES, J.; SOUZA, D.Z. Falsificação de medicamentos no Brasil. **Revista de Saúde Pública** v. 46 (1), p. 1-6 , 2012.

AMORIM, A.C.L.; HOVELL, A.M.C.; PINTO, A.C.; EBERLIN, M.N.; ARRUDA, N.P.; PEREIRA, E.J.; BIZZO, H.R.; CATHARINO, R.R.; FILHO, Z.B.M.; REZENDE, C.M. Green and Roasted Arabica Coffees Differentiated by Ripeness, Process and Cup Quality via Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 313-321, 2009.

ANDERSON, T. Confusion over counterfeit drugs in Uganda. **Lancet**, v. 373, p. 2097-2098, 2009.

ANDERSSON, K.; JALAVA, K; LOCK, E.; FINNON, Y.; HUIZER, H.; KAA, E.; LOPES, A.; VAN DER MEER, A.P.; COLE, M.D.; DAHLÉN, J.; SIPPOLA, E. Development of a harmonised method for the profiling of amphetamines: III. Development of the gas chromatographic method. **Forensic Science International**, v. 169, p. 50–63, 2008.

AHN, S.; HONG, J.Y.; HONG, M.K.; JANG, Y.P.; OH, M.S.; JUNG, J.H.; HONG, J. Structural Determination of Sildenafil and Its Analogues in Dietary Supplements by Fast-atom Bombardment Collision-Induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry. **Rapid Communication Mass Spectrometry**, v. 23 (19), p. 3158-3166, 2009.

ARAÚJO, A.S.; DA ROCHA, L.L.; TOMAZELA, D.M.; SAWAYA, A.C.H.F.; ALMEIDA, R.R.; CATHARINO, R.R.; EBERLIN, M.N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer. **Analyst**, v. 130, p. 884–889, 2005.

BAER, I. **The analysis of excipients in ecstasy tablets and their contribution in a drug profiling context**. 2007. Tese (Doutorado) – Université de Lausanne, Faculté de Droit et des Sciences Criminelles, Institut de Police Scientifique, Lausanne, 2007.

BEEN, F.; ROGGO, Y.; DÉGARDIN, K.; ESSEIVA, P.; MARGOT, P. Profiling of counterfeit medicines by vibrational spectroscopy. **Forensic Science International**, v. 211, p. 83-100, 2011.

BIASOTO, A.C.T.; CATHARINO, R.R.; SANVIDO, G.B.; EBERLIN, M.N.; DA SILVA, M.A.A.P. Flavour characterization of red wines by descriptive analysis and ESI mass spectrometry. **Food Quality and Preference**, v. 21, p. 755-762, 2010.

BLOK-TIP, L.; ZOMER, B.; BAKKER, F.; HARTOG, K.D.; HAMZINK, M.; HOVE, J.T.; VREDENBREGT, M.; DE KASTE, D. Structure Elucidation of Sildenafil Analogues in Herbal Products. **Food Additive and Contamination**, v. 21 (8), p. 737-748, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Medicamentos Falsificados. Acesso em 22/10/2008. Disponível no endereço eletrônico <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/falsificados/index.htm>.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia de validação de métodos analíticos. Acesso em 22/10/2008. Disponível no endereço eletrônico http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm.

CATHARINO, R.R.; HADDAD, R.; CABRINI, L.G.; CUNHA, I.B.S.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N. Characterization of Vegetable Oils by Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting: Classification, Quality, Adulteration and Aging. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 7429-7433, 2005.

CATHARINO, R.R.; MILAGRE, H.M.S.; SARAIVA, S.A.; GARCIA, C.M.; SCHUCHARDT, U.; EBERLIN, M.N. Biodiesel Typification and Quality Control by Direct Infusion Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting. **Energy Fuels**, v. 21, p. 3698–3701, 2007.

CAUSIN, V.; MAREGA, C.; MARIGO, A.; CASAMASSIMA, R.; PELUSO, G.; RIPANI, L. Forensic differentiation of paper by X-ray diffraction and infrared spectroscopy. **Forensic Science International**, v.197, p. 70-74, 2010.

CHAMPAGNE, A.B.; EMMEL, K.V. Rapid screening test for adulteration in raw materials of dietary supplements. **Vibrational Spectroscopy**, v. 55, p. 216–223, 2011.

CHAN, K.L.A.; ELKHIDER, N.; KAZARIAN, S.G. Spectroscopic imaging of compacted pharmaceutical tablets. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 83(A11), p. 1303–1310, 2005.

COOPER, H.J.; MARSHALL, A.G. Electrospray ionization Fourier transform mass spectrometric analysis of wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49 (2001) 5710–5718.

DAMS, R.; BENIJTS, T.; LAMBERT, W.E.; MASSART, D.L.; DE LEENHEER, A.P. Heroin impurity profiling: trends throughout a decade of experimenting. **Forensic Science International**, v. 123, p. 81–88, 2001.

DARAGHMEH, N.; AL-OMARI, M.; BADWAN, A.A.; JABER, A.M.Y. Determination of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablet dosage form using HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, p. 483–492, 2001.

DE PEINDER, P.; VREDENBREGT, M.; VISSER, T.; DE KASTE, D. A comparison of NIR and Raman spectroscopy in combination with chemometrics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 688-694, 2008.

DE SOUZA, P.P.; DE OLIVEIRA, L.C.A.; CATHARINO, R.R.; EBERLIN, M.N.; AUGUSTI, D.V.; SIEBALD, H.G.L.; AUGUSTI, R. Brazilian cachaça: “Single shot” typification of fresh alembic and industrial samples via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1064–1068, 2009.

DE SOUZA, P.P.; SIEBALD, H.G.L. AUGUSTI, D.V.; NETO, W.B.; AMORIM, V.M.; CATHARINO, R.R.; EBERLIN, M.N.; AUGUSTI, R. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting of Brazilian Artisan Cachaça Aged in Different Wood Casks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 55, p. 2094-2102, 2007.

DE VEIJ, M.; DENECKERE, A.; VANDENABEELE, P.; DE KASTE, D.; MOENS, L. Detection of counterfeit Viagra R with raman spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 303–309, 2008.

DÉGARDIN, K.; ROGGO, Y.; BEEN, F.; MARGOT, P. Detection and chemical profiling of medicine counterfeits by Raman spectroscopy and chemometrics, **Analytica Chimica Acta**, In Press, 2011.

DINESH, N.; NAGARAJA, P.; GOWDA, N.M.; RANGAPPA, K.S. Extractive spectrophotometric methods for the assay of sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical formulations. **Talanta**, v. 57, p. 757–764, 2002 (a).

DINESH, N.D.; VISHUKUMAR, B.K.; NAGARAJA, P.; MADE GOWA, N.M.; RANGAPPA, K.S. Stability indicating RP_LC determination of sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, p. 743–748, 2002 (b).

DUJOURDY, L.; BESACIER, F. Headspace profiling of cocaine samples for intelligence purposes. **Forensic Science International**, v. 177, p. 153–161, 2008.

ENSING, J.G.; RACAMY, C.; DEE ZEEW, R.A. A rapid gas chromatographic method for fingerprinting of illicit cocaine samples. **Forensic Science International**, v. 37, p. 446–459, 1992.

FERNANDEZ, F.M.; HOSTETLER, D.; POWELL, K.; KAUR, H.; GREEN, M.D.; MILDENHALL, D.C.; NEWTON, P.N. Poor quality drugs: grand challenges in high throughput detection, countrywide sampling, and forensics in developing countries. **Analyst** v. 136, p. 3073-3082, 2011.

GRATZA, S.R.; ZELLER, M.; MINCEY, D.W.; FLURER, C.L.. Structural Characterization of Sulfoildenafil, an Analog of Sildenafil. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 50 (2), p. 228-231, 2009.

GOLLÜCKE, A.P.B.; CATHARINO, R.R.; DE SOUZA, J.C.; EBERLIN, M.N.; TAVARES, D.Q. Evolution of major phenolic components and radical scavenging activity of grape juices through concentration process and storage, **Food Chemistry**, v. 112, p. 868–873, 2009.

HAIR, J.F.J.; BLACK, W.C.; BABIN, B.J.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L. **Análise Multivariada de Dados**. 6.ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 688p.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman e Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003. 1647p.

HOLZGRABE, U.; MALET-MARTINO, M. Analytical challenges in drug counterfeiting and falsification – the NMR approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 679–687, 2011.

JUNG, C.R.; ORTIZ, R.S.; LIMBERGER, R.P.; MAYORGA, P. A new methodology for detection of counterfeit Viagra and Cialis tablets by image processing and statistical analysis. **Forensic Science International**, In Press, 2011.

KAZARIAN, S.G.; CHAN, K.L.A. Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, p. 858–867, 2006.

LI, B.; BEVERIDGE, P.; O'HARE, W. T.; ISLAM, M. The estimation of the age of a blood stain using reflectance spectroscopy with a microspectrophotometer, spectral pre-processing and linear discriminant analysis. **Forensic Science International**, In Press, 2011.

LOCICIRO, S.; HAYOZ, P.; ESSEIVA, P.; DUJOURDY, L.; BESACIER, F.; MARGOT, P. Cocaine profiling for strategic intelligence purposes, a cross-border project between France and Switzerland : Part I. Optimisation and harmonisation of the profiling method. **Forensic Science International**, v. 167, p. 220–228, 2007.

LOCICIRO, S.; ESSEIVA, P.; HAYOZ, P.; DUJOURDY, L.; BESACIER, F.; MARGOT, P. Cocaine profiling for strategic intelligence, a cross-border project between France and Switzerland. Part II. Validation of the statistical methodology for the profiling of cocaine. **Forensic Science International**, v. 177, p. 199–206, 2008.

LOPES, M.B.; WOLFF, J.-C.; BIOUCAS-DIAS, J.M.; FIGUEIREDO, M.A.T. Determination of the composition of counterfeit HeptodinTM tablets by near-infrared chemical imaging and least squares estimation. **Analytica Chimica Acta**, v. 641, p. 46–51, 2009.

MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; HIDALGO, M. Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 362- 372, 2009.

MARQUES, L.A.R.; CATHARINO, R.R.; BRUNS, R.E.; EBERLIN, M.N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of perfumes: rapid classification and counterfeit detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 3654–3658, 2006.

MARQUIS, R.; WEYERMANN, C.; DELAPORTE, C.; ESSEIVA, P.; AALBERG, L.; BESACIER, F.; BOZENKO JR., J.S.; DAHLENBURG, R.; KOPPER, C.; ZRCEK, F. Drug intelligence based on MDMA tablets data. 2. Physical characteristics profiling. **Forensic Science International**, v. 178, p. 34–39, 2008.

MAURIN, J.; PLUCINSKI, F.; MAZUREK, A.; FIJALEK, Z. The usefulness of simple X-ray powder diffraction analysis for counterfeit control- The Viagra example. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1514–1518, 2007.

McINTEE, E.; VIGLINO, E.; RINKE, C.; KUMOR, S.; NI, L.; SIGMAN, M.E. Comparative analysis of automotive paints by laser induced breakdown spectroscopy and nonparametric permutation tests. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 65, p. 542-548, 2010.

MELNIKOV, P.; CORBI, P.P.; CUIN, A.; CAVICCHIOLI, M.; GUIMARÃES, W.R. Physicochemical properties of sildenafil citrate (Viagra) and sildenafil base. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, p. 2140–2143, 2003.

MELQUIADES, F.L.; FERREIRA, D.D.; APPOLONI, C.R.; LOPES, F.; LONNI, A.G.; OLIVEIRA, F.M.; DUARTE, J.C. Titanium dioxide determination in sunscreen by energy dispersive X-ray fluorescence methodology. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 135–143, 2008.

MILLIET, Q.; WEYERMANN, C.; ESSEIVA, P. The profiling of MDMA tablets: A study of the combination of physical characteristics and organic impurities as sources of information. **Forensic Science International**, v. 187, p. 58–65, 2009.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's Analysis of Drug and Poisons: In Pharmaceutical, Body Fluids and Post Mortem Material**. v. 1. 3.ed. Londres, Estados Unidos: Pharmaceutical Press, 2004. 554p.

MØLLER, J.K.S.; CATHARINO, R.R.; EBERLIN, M.N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of whisky: immediate proof of origin and authenticity. **Analyst**, v. 130, p. 890–897, 2005.

MØLLER, J.K.S.; CATHARINO, R.R.; EBERLIN, M.N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of essential oils: Spices from the Labiatae family. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1283–1288, 2007.

MUEHLETHALER, C.; MASSONNET, G.; ESSEIVA, P. The application of chemometrics on Infrared and Raman spectra as a tool for the forensic analysis of paints. **Forensic Science International**, v. 209, p. 173–182, 2011.

NAGATA, N.; BUENO, M.I.M.S.; PERALTA-ZAMORA, P.G. Métodos matemáticos para correção de interferências espectrais e efeitos

inter elementos na análise quantitativa por fluorescência de Raios – X. **Química Nova**, v. 24 (4), 531-539, 2001.

NEWTON, P.N.; GREEN, M.D.; FERNANDEZ, F.M.; DAY, N.P.J.; WHITE, N.J. Counterfeit antiinfective drugs. **Lancet Infectious Disease**, v. 6, 602-613, 2006.

NYADONG, L.; HARRIS, G.A.; BALAYSSAC, S.; GALHENA, A.S.; MALET-MARTINO, M; MARTINO, R.; PARRY, R.M.; WANG, M.D.; FERNÁNDEZ F.M.; GILARD, V. Combining Two-Dimensional Diffusion-Ordered Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Imaging Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry, and Direct Analysis in Real- Time Mass Spectrometry for the Integral Investigation of Counterfeit Pharmaceuticals. **Analytical Chemistry**, v. 81 (12), p. 4803-4812, 2009.

OLDS, W.J.; JAATINEN, E.; FREDERICKS, P.; CLETUS, B.; PANAYIOTOU, H.; IZAKE, E.L. Spatially offset Raman spectroscopy (SORS) for the analysis and detection of packaged pharmaceuticals and concealed drugs. **Forensic Science International**, In Press, 2011.

ORTIZ, R.S.; ANTUNES, M.V.; LINDEN, R. Determinação de citrato de sildenafil e de tadalafila por cromatografia líquida de ultraeficiência com detecção por arranjo de diodos (CLUE-DAD). **Química Nova**, v. 33, p. 389–393, 2010.

RAJALAHTI, T.; KVALHEIM, O.M. Multivariate data analysis in pharmaceuticals: A tutorial review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, p. 280-290, 2011.

REDÍGOLO, M.M. **Determinação de elementos químicos inorgânicos em amostras de sangue total humano e de animais de experimentação (hamster dourado e cavalo da raça crioula) pela técnica de fluorescência de raios X (EDXRF)**. 2011. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

REEMMEYER, J.C.; WOODRUFF, J.T. Use of liquid chromatography–mass spectrometry and a chemical cleavage reaction for the structure elucidation of a new sildenafil analogue detected as an adulterant in an herbal dietary supplement. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 887–893, 2007.

REN, L.; GAO, Y-Z.; YIN, J-H.; SHI, W-X.; YU, X-W.; XIE, H-P.; WANG, W-P. The determination for the three genotypes of D16S539 locus based on near-infrared spectroscopy and chemical pattern recognition. **Analytica Chimica Acta** v. 638, p. 202-208, 2009.

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

RODOMONTE, A.L.; GAUDIANO, M.C.; ANTONIELLA, E.; LUCENTE, D.; CRUSCO, V.; BARTOLOMEI, M.; BERTOCCHI, P.; MANNA, L.; VALVO, L.; ALHAIQUE, F.; MULERI, N. Counterfeit drugs detection by measurement of tablets and secondary packaging colour. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 215-220, 2010.

ROMÃO, W.; FRANCO, M.F.; BUENO, M.I.M.S.; EBERLIN, M.N.; DE PAOLI, M.-A. Analysing metals in bottle-grade poly(ethylene terephthalate) by X-ray fluorescence spectrometry. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 117, p. 2993-3000, 2010.

ROMÃO, W.; LALLI, P.M.; FRANCO, M.F.; SANVIDO, G.; SCHWAB, N.V.; LANARO, R.; COSTA, J.L.; SABINO, B.D.; BUENO, M.I.M.S.; DE AS, G.F.; DARODA, R.J.; DE SOUZA, V.; EBERLIN, M.N. Chemical profile of meta-chlorophenylpiperazine (m-CPP) in ecstasy tablets by easy ambient sonic-spray ionization, X-ray fluorescence, ion mobility mass spectrometry and NMR. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p. 3083-3064, 2011.

SACRÉ, P.Y.; DECONINCK, E.; DE BEER, T.; COURSELLE, P.; VANCAUWENBERGHE, R.; CHIAP, P.; CROMMEN, J.; DE BEER, J.O. Comparison and combination of spectroscopic techniques for the detection of counterfeit medicines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 53 (2010) 445–453.

SAISHO, K.; SCOTT, K.S.; MORIMOTO, S.; NAKAHARA, Y. Hair Analysis for Pharmaceutical Drugs. II. Effective Extraction and Determination of Sildenafil (Viagra[®]) and Its N-Desmethyl Metabolite in Rat and Human Hair by GC-MS. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, p. 1384-1988, 2001.

SALVADOR, V.L.R., Fluorescência de raios – X, *In*: Branco, R.C.P.O., **Química Forense - Sob Olhares Eletrônicos**, Campinas: Millenium, 1^a ed., 2012, 368p.

SANTAMARIA-FERNANDEZ, R.; HEARN, R.; WOLFF, J.C.; Detection of counterfeit antiviral drug HeptodinTM and classification of counterfeits using isotope amount ratio measurements by multicollector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICPMS) and isotope ratio mass spectrometry (IRMS). **Science & Justice**, v.49, p. 102-106, 2009.

SANTOS, A.C. Panorama Geral sobre Falsificação de Medicamentos. In: I Seminário de Química Forense, Instituto Nacional de Criminalística, Brasília / DF. Palestra apresentada dia 07/10/2008.

SAWAYA, A.C.H.F.; TOMAZELA, D.M.; CUNHA, I.B.S.; BANKOVA, V.S.; MARCUCCI, M.C.; CUSTODIO, A.R.; M.N. EBERLIN, Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of Propolis. **Analyst**, v. 129, p. 739-744, 2004.

SAWAYA, A.C.H.F.; ABDELNUR, P.V.; EBERLIN, M.N.; KUMAZAWA, S.; AHN, M.R.; BANG, K.S.; NAGARAJA, N.; BANKOVA, V.S.; AFROUZAN, H. Fingerprinting of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Talanta**, v. 81, p. 100–108, 2010.

SILVEIRA, F. Reconhecimento de Falsificações do Produto Cialis. In: I Seminário de Química Forense, Instituto Nacional de Criminalística, Brasília / DF. Palestra apresentada em 07/10/2008.

SHERMAN, J. The theoretical derivation of fluorescent X-ray intensities from mixtures. **Spectrochimica Acta**, v. 7, p. 283-306, 1955.

SHIRAIWA, T.; FUJINO, N. Theoretical calculation of fluorescent X-ray intensities in fluorescent X-ray spectrochemical analysis. **Journal of Applied Physics**, v. 5, p. 886-899, 1966.

SINGH, S.; PRASAD, B.; SAVALIYA, A.; SHAH, R.; GOHIL, V.; KAUR, A. Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 13-28, 2009.

TARANTILIS, P.A.; TROIANOU, V.E.; PAPPAS, C.S.; KOTSERIDIS, Y.S.; POLISSIOU, M.G. Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v.111, p. 192–196, 2008.

TREFI, S.; ROUTABOUL, C.; HAMIEH, S.; GILARD, V.; MALET-MARTINO, M.; MARTINO, R. Analysis of illegally manufactured formulations of tadalafil (cialis) by 1H NMR, 2D DOSY 1H NMR and Raman spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 103–113, 2008.

UNDCP. United Nations International Drug Control Programme. **Drug Characterization / Impurity Profiling. Background and Concepts.** United Nations: New York, 2001.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. **Methods for Impurity Profiling of Heroin and Cocaine.** United Nations: New York, 2005.

VAN BEEK, T.; MONTORO, P. Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2002–2032, 2009.

VENHUIS, B.; BAREND, D.M.; ZWAAGSTRA, M.E.; DE KASTE, D. Recent Developments in Counterfeits and Imitations of Viagra, Cialis and Levitra: A 2005-2006 Update. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, 2007.

VENHUIS, B.; ZOMERB, G.; VREDENBREGT, M.; DE KASTE, D. The identification of (+)-trans-tadalafil, tadalafil, and sildenafil in counterfeit Cialis and the optical purity of tadalafil stereoisomers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p.723-727, 2010.

VENHUIS, B.J.; DE KASTE, D. Sildenafil analogs used for adulterating marihuana. **Forensic Science International**, v. 182, p. e22-e23, 2008.

VREDENBREGT, M.J.; BLOK-TIP, L.; HOOGERBRUGGE, R.; BAREND, D.M.; DE KASTE, D. Screening suspected counterfeit Viagra and imitations of Viagra with near-infrared spectroscopy, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 840–849, 2006.

WAWER, I.; PISKLAK, M.; CHILMONCZYK, Z. ¹H, ¹³C, ¹⁵N NMR analysis of sildenafil base and citrate (Viagra) in solution, solid state and pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 865–870, 2005.

WEINERT, P.L.; PEZZA, L.; PEZZA, H.R. Determinação espectrofotométrica de citrate de sildenafil em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, p. 1112–1116, 2008.

WEYERMANN, C.; MARQUIS, R.; DELAPORTE, C.; ESSEIVA, P.; LOCK, E.; AALBERG, L.; BOZENKO JR., J.S.; DIECKMANN, S.; DUJOURDY, L.; ZRCEK, F. Drug intelligence based on MDMA tablets data. I. Organic impurities profiling. **Forensic Science International**, v. 177, p. 11–16, 2008.

WHO. Department of Essential Drugs and Other Medicines. **Conterfeit Drugs: Guidelines for the Development of Measures to Combat Counterfeit Drugs**. World Health Organization: Genebra, 1999.

WHO. **International medical products anti-counterfeiting taskforce (IMPACT)**, Technical report. World Health Organization (2008). Disponível no endereço eletrônico <http://www.WHO.int/entity/impact/FinalBrochureWHA2008a.pdf>.

ZOU, P.; OH, S. S.; HOU, P.; LOW, M.; KOH, H. Simultaneous determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors found in a dietary supplement and pre-mixed bulk powders for dietary supplements using high-performance liquid chromatography with diode array detection and liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1104, p. 113–122, 2006.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forensiint

A new methodology for detection of counterfeit Viagra[®] and Cialis[®] tablets by image processing and statistical analysis

Claudio R. Jung^{a,*}, Rafael S. Ortiz^b, Renata Limberger^c, Paulo Mayorga^c

^a Institute of Informatics - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970 - Setor IV, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Rio Grande do Sul Technical and Scientific Division, Brazilian Federal Police, Avenida Ipiranga 1365, 90160-093, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Department of Pharmacy - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2011

Received in revised form 29 July 2011

Accepted 1 September 2011

Available online 28 September 2011

Keywords:

Counterfeit medicine detection

Image processing

Pattern recognition

ABSTRACT

This paper proposes a new approach for automatic classification of counterfeit Viagra[®] and Cialis[®] tablets using image processing and statistical analysis. A high resolution VSC 5000 is used for image acquisition in a controlled environment, and the combination of a thresholding technique with morphological operators is used to segment the tablet from the background. A statistical model based on the RGB color components of original samples is built, and the detection of counterfeit tablets was performed by checking the adherence of a test sample to the obtained distribution using the Bhattacharyya distance. Our experimental results indicated that counterfeit tablets can be effectively detected using the proposed approach.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The production of counterfeit medicines is a criminal problem that carries serious risks to public health worldwide. Studies suggest that significant growth in the last decade may be associated with easier access by the counterfeiters to the technologies needed to copy genuine pharmaceutical products [1]. Moreover, marketing by the internet allows anyone to buy any medicine without prescription, easily and anonymously, sometimes from fraudulent sites [2,3]. In an attempt to combat this phenomenon, the World Health Organization (WHO) created in 2006 a global coalition of stakeholders called IMPACT (International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce). The taskforce has been active in forging international collaboration to seek global solutions to this global challenge and in raising awareness of the dangers of counterfeit medical products [4].

By definition, counterfeit medicines are pharmaceutical products that have “been deliberately and fraudulently mislabeled with respect to identity and/or source” [5]. All kinds of medicines are counterfeited [6–12], but the market success of the three approved phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitors for treating erectile dysfunction, sildenafil (Viagra[®], Pfizer), tadalafil (Cialis[®],

Eli Lilly), and vardenafil (Levitra[®], Bayer) has led to an explosion in counterfeit versions of these products [13]. PDE-5 inhibitors are a prime target for counterfeiting because of their high cost and the embarrassment associated with the underlying condition leading people to turn to the internet to buy these medicines easily, anonymously and often cheaply [13].

Following this trend, in Brazil, Viagra[®] and Cialis[®] are among the most counterfeited medicines. Routinely, seizures of suspected counterfeit medicines are forwarded to the Brazilian Federal Police (PF) for forensic analysis. The database of the PF show that from January 2007 to September 2010, 371 reports involving counterfeit medicines were issued, and of these, 295 (80%) included counterfeit Cialis[®] and/or Viagra[®]. As with other illegal products seized by the police, these figures should be just a small sample of the real market, i.e., it is the “tip of the iceberg”.


The verification of a counterfeit medicine is based primarily on a comparison between authentic and questioned products, involving detailed analysis of different elements in the existing packaging, drug leaflet and both the exterior and interior of the pharmaceutical dosage form. Regarding the analysis of the package, one could check for the presence of reactive ink on the packaging (that shows a text to be rubbed with metallic object), the existence of holographic security labels on packages, or recognize the print patterns on the package, including size and types of sources and figures. Such analysis is quite subjective, and clearly useless when the package is not available.

Regarding the analysis of the tablet itself, different advanced techniques have been proposed for the detection of counterfeits of

* Corresponding author.

E-mail addresses: cjung@inf.ufgrs.br (C.R. Jung), rafaelortiz.rs@dpf.gov.br (R.S. Ortiz), renata@ufgrs.br (R. Limberger), mayorga@farmaciaufgrs.br (P. Mayorga).

Detection of counterfeit medicines with the video spectral comparator: the examples of Viagra and Cialis, trabalho apresentado na forma de pôster na 1ª Reunião Internacional de Ciências Farmacéuticas, Córdoba, Argentina, 2010.




DETECTION OF COUNTERFEIT MEDICINES WITH THE VIDEO SPECTRAL COMPARATOR: THE EXAMPLES OF VIAGRA® AND CIALIS®

Ortiz, R. S.¹; Mariotti, K. C.²; Limberger, R. P.³; Mayorga, P.⁴

¹ Superintendência of the Federal Police in Rio Grande do Sul
Av. Ipiranga 1365, 90160-003 Porto Alegre - RS, Brazil.
E-mail: rafaelortiz_rso@dpf.gov.br

^{2,3,4} Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul.
Av. Ipiranga, 2752, 91610-000, Porto Alegre - RS, Brazil.



INTRODUCTION

Counterfeit medicines are drugs that have “been deliberately and fraudulently mislabeled with respect to identity and/or source” (1). It is estimated that 10% of the global pharmaceutical market is counterfeit (2). In Brazil, Viagra® and Cialis®, coated tablets of sildenafil and tadalafil, respectively, are the most counterfeited medicines (3). The counterfeit verification of such medicines is carried out by different advanced techniques (4). It is known that the interaction of light with matter is quantized, so a study of the radiation frequencies emitted or absorbed can characterize a material (5). The video spectral comparator – VSC – is equipped with light sources and filters of different wavelengths, being able to acquire and perform a comparison of spectra of electromagnetic radiation. This unit is used in the scientific examination of documents (6-9). Considering this, the present work proposed to develop a new analytical methodology to quickly distinguish fake and genuine coated tablets of Viagra® and Cialis®, using a VSC.

MATERIALS AND METHODS

Fake and authentic tablets (10) were used as sample. A VSC 5000 (Foster & Freeman Ltd., UK), employing optical amplification of 20 times was used. Scans were performed between 400 nm and 1000 nm, at one point for each tablet. Were employed the methods of lighting reflectance, absorption, transmittance, infrared fluorescence and visible fluorescence (after irradiation at 254 nm and 365 nm), in order to test their abilities to differentiate the fake from the authentic tablets. Images were obtained from samples analyzed.

RESULTS

The absorption, reflectance and infrared fluorescence spectra exhibited greater ability to distinguish authentic and fake tablets of Viagra® (Figure 1) and Cialis® (Figure 2). Fluorescence was found in counterfeit tablets and this was not observed in authentic. This divergence in the behavior of the coating opposite the radiation can be easily perceived in the visual comparison of images and spectra obtained under the conditions considered ideal for the detection of counterfeits. The methodology showed reliable in the genuine coated tablets analysis (Figure 3).

Figure 1. Viagra®: fake (A) and authentic (B).

Figure 2. Cialis®: fake (A) and authentic (B).

Figure 3. Absorption spectra of genuine Viagra® and Cialis® (n=9).

DISCUSSION AND CONCLUSION

The coating is responsible for homogeneity, color and brightness peculiar to each coated tablet. The pharmaceutical industry applies high technologies in the coating process plus a rigid quality control that discard any tablet with physical imperfections (11-13). When electromagnetic radiation is emitted or absorbed, there is a fixed transfer of energy between the object and the medium. Spectrochemical measurements of the phenomena of absorption or luminescence emission are dependent on the nature of sample and the concentration of the species involved (5).

REFERENCES

- World Health Organization. Guidelines for development of measures to combat counterfeit drugs. Geneva, Switzerland; 1999.
- World Health Organization Counterfeit Drugs: Report of the International Workshop on Counterfeit Drugs. Geneva, Switzerland; 1997.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos Falsificados [document on the Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2008. Available from: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/falsificados/index.htm>.
- Venhuis BJ, Zomer G, Vredenburg MJ, De Kaste D. The identification of (–)-trans-tadalafil, tadalafil, and sildenafil in counterfeit Cialis® and the optical purity of tadalafil stereoisomers. J. Pharm. Biomed. Anal. 2010; 51: 723–727.
- Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análise instrumental. 5th ed. Porto Alegre: Bookman; 2002.
- Chaudhry R, Pant SK. Identification of authorship using lateral palm print—a new concept. Forensic Sci. Int. 2004; 141: 49–57.
- Adam CD. In situ luminescence spectroscopy with multivariate analysis for the discrimination of black ballpoint pen ink-lines on paper. Forensic Sci. Int. 2009; 182: 27–34.
- Payne G, Wallace C, Reedy B, Lennard C, Schuler R, Exline D, Roux C. Visible and near-infrared chemical imaging methods for the analysis of selected forensic samples. Talanta. 2005; 67: 334–344.
- Gupta S, Masumbara C, Raab, MS, Shoshaic RB. Paradigm shift in document related frauds: Characteristics identification for development of a non-destructive automated system for printed documents. Digital Investigation. 2006; 3: 43–55.
- Ortiz RS, Antunes MV, Linden R. Determinação de citrato de sildenafil e de tadalafil por cromatografia líquida de ultraeficiência com detecção por arranjo de diodos (CLUE-DAD). Quim. Nova. 2010; 33: 2: 389-393.
- Allen J, Lloyd V, Popovich NG, Ansel HC. Formas farmacéuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8th ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.
- Kanagale P, Lohray BB, Mitra A, Davadra P, Kini R. Formulation and Optimization of Porous Osmotic Pump-based Controlled Release System of Oxycodone. AAPS PharmSciTech. 2007; 8: E1-E7.
- Cervera MF, Heilmäki J, Krogers K, Jørgensen AC, Karjalainen M, Colarte AJ, Yliruusi J. Solid-state and mechanical properties of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. AAPS PharmSciTech. 2004; 5: 1-6.

Utilização de características físicas de comprimidos na detecção de falsificações de medicamentos: os exemplos do Viagra e do Cialis, trabalho apresentado na forma de pôster no 2º Encontro Nacional de Química Forense, Ribeirão Preto, Brasil, 2010.



Utilização de características físicas de comprimidos na detecção de falsificações de medicamentos: os exemplos do Viagra® e do Cialis®



Rafael S. Ortiz¹, Kristiane Mariotti², Renata P. Limberger², Jandyra M. G. Fachel³, Paulo Mayorga⁴

¹ Setor Técnico-Científico, Polícia Federal no Rio Grande do Sul, ² Laboratório de Toxicologia, Faculdade de Farmácia, UFRGS, ³ Núcleo de Assessoria Estatística, Instituto de Matemática, UFRGS, ⁴ Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Faculdade de Farmácia, UFRGS.

INTRODUÇÃO

Viagra e Cialis, comprimidos revestidos contendo, respectivamente, sildenafil ou tadalafila, são os medicamentos mais falsificados no Brasil¹. O perfil ("profiling") de comprimidos contendo determinada substância ativa pode ser obtido utilizando diferentes conjuntos de características, incluindo aspectos físicos e químicos². Os diferentes estágios de produção de comprimidos geram um conjunto de características físicas e químicas ao produto final³. Em geral, assume-se que apreensões de comprimidos com características correspondentes advêm de um mesmo lote de produção, enquanto que comprimidos que exibem características divergentes têm origem em lotes diferentes^{2,3}. As primeiras medições efetuadas em comprimidos são dos aspectos físicos, tais como, massa, altura e comprimento, também denominadas características pós-compressão. Tais dados podem ser valiosos no sentido de detectar falsificações.

OBJETIVOS

Este trabalho propõe-se a avaliar a utilidade das características físicas pós-compressão na distinção entre comprimidos autênticos e falsificados de Viagra e de Cialis.

MATERIAIS E MÉTODOS

Comprimidos falsificados de Viagra (n=19) de Cialis (n= 38) bem como respectivos comprimidos autênticos de cada produto (n=6) foram usados como amostras⁴. As características pós-compressão massa (mg), altura (mm), comprimento menor (mm) e comprimento maior (mm) foram empregadas como variáveis no estudo. As medições foram realizadas em balança analítica (Mettler Toledo XP205) e com utilização de micrômetro (Mitutoyo). Os dados obtidos foram tratados pela análise discriminante multivariada (SPSS v.13).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos após o tratamento estatístico encontram-se resumidos nas Tabelas 1 a 6.

Tabela 1 - Estatística dos grupos

Medicamento	Estatística dos Grupos		
	Méda	Desv. Pad.	Max
Viagra 50mg	Massa	317,2435	30,27073
	Altura	4,6423	0,1717
	Compr.	11,4847	0,1112
Cialis 20mg	Massa	618,6528	31,58564
	Altura	5,3142	0,1114
	Compr.	12,4921	0,1023
Cialis padrão	Massa	367,3642	3,96328
	Altura	5,3030	0,0081
	Compr.	12,3215	0,0184
Viagra padrão	Massa	318,0241	2,69328
	Altura	4,4391	0,0477
	Compr.	11,4302	0,0081
Total	Massa	411,0264	50,11178
	Altura	5,0139	0,0881
	Compr.	12,1407	0,1134

Tabela 3 - Coeficientes das funções discriminantes canônicas

	Função		
	1	2	3
Massa	0,051	0,247	-0,306
Altura	-0,223	-0,254	-1,705
Compr.	0,085	0,023	4,290
Compr. (Const.)	-150,106	40,765	3,423
	20,028	-49,385	-46,953

Tabela 4 - Discriminantes canônicas

Medicamento	Discriminante		
	1	2	3
Viagra 50mg	-12,812	406	-042
Cialis 20 mg	7,464	403	-008
Cialis padrão	6,641	-3,085	058
Viagra padrão	-13,341	-132	-133

Funções determinadas com as médias dos grupos

Tabela 2 - Matriz de correlação (variáveis discriminantes e funções canônicas)

	Função		
	1	2	3
Massa	0,186	0,720(*)	-0,810
Altura	-0,365	0,640(*)	0,548
Compr.	0,342	0,277	0,676(*)

Variáveis correlacionadas pelo valor absoluto da correlação com a função. * Maior correlação absoluta entre cada variável e qualquer função discriminante.

Tabela 6 - Predição da classificação

Medicamento	Predição da Classificação				Total
	Viagra 50 mg	Cialis 20 mg	Cialis padrão	Viagra padrão	
Viagra	11	0	0	0	11
Cialis	0	38	0	0	38
Cialis padrão	0	0	6	0	6
Viagra padrão	0	0	0	6	6
Total	11	38	6	6	61
%	18,0	62,3	10,0	10,0	100,0
Viagra 50 mg	0	0	0	0	0
Cialis 20 mg	0	0	0	0	0
Cialis padrão	0	0	0	0	0
Viagra padrão	0	0	0	0	0

98,3 % do caso originalmente classificado como grupo foram corretamente classificados

A análise discriminante ajusta uma função matemática chamada regra de classificação ou discriminação, que permite identificar o perfil geral de cada grupo. Assim, se houver um novo elemento amostral, não pertencente a nenhuma das amostras anteriores, e cuja origem é incerta, pode-se compará-lo de algum modo com o perfil geral dos grupos pré-existent e classificá-lo como pertencente ao grupo cujo perfil geral fosse mais semelhante ao dele⁵. A indústria farmacêutica aplica tecnologias avançadas no processo de fabricação de comprimidos além de um rígido controle de qualidade que descarta qualquer produto fora de suas especificações⁶. O uso de substâncias, concentrações ou métodos de produção que não aqueles padronizados pela indústria na confecção dos seus comprimidos fornece aos produtos falsificados aspectos físicos diferentes dos verificados nos autênticos. A F. Bras. IV preconiza que comprimidos com peso superior a 300mg podem ter variação de peso de 5% e não mais que duas unidades poderão apresentar o dobro desse percentual⁷.

Os resultados obtidos demonstram que massa, espessura e comprimento (maior e menor) mostram-se características confiáveis e relevantes, numa perspectiva pericial, na análise de comprimidos suspeitos de falsificação. Distribuições de amostras de Cialis falsificados (n=38) distinguiram-se muito bem de amostras autênticas. No caso de comprimidos de Viagra falsificados (n=19) houve casos de má classificação. Tais casos podem ser atribuídos às falsificações de melhor qualidade.

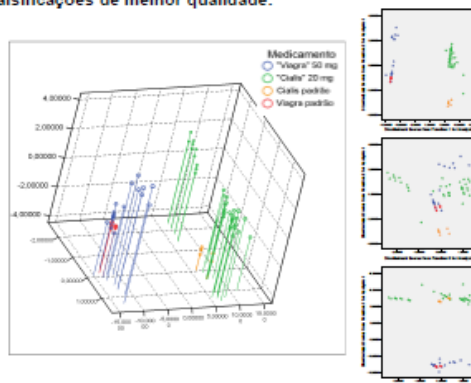


Figura 1 – Distribuição espacial das amostras testadas tratadas pela análise discriminante canônica de Fisher.

CONCLUSÕES

Observou-se a validade do emprego das características físicas pós-compressão em de modo rápido, confiável e sem preparo de amostra, auxiliar na rotina pericial de detecção de falsificações de Cialis e de Viagra.

Referências

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos Falsificados. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/falsificados/index.htm>.
2. MILLIET et al. The profiling of MDMA tablets: A study of the combination of physical characteristics and organic impurities as sources of information. Forensic Science International, v. 187, p. 58-65, 2009.
3. MARQUIS et al. Drug Intelligence based on MDMA tablets data. 2. Physical characteristics profiling. Forensic Science International, v. 178, p. 34-39, 2008.
4. ORTIZ RS et al. Determinação de citrato de sildenafil e de tadalafila por cromatografia líquida de ultraeficiência com detecção por arranjo de diodos (CLUE-DAD). Quim. Nova, 2010; 33: 2: 389-393.
5. MINQIOTI, S.A. Análise de dados através de estatística multivariada: uma abordagem aplicada. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005.
6. REMINGTON, J.P. A ciência e a prática da farmácia. 20ª. ed. Easton: Mack, 2000.
7. F. BRAS. IV. Disponível em: www.anvisa.gov.br/hotline/farmacopeia/publicacoes/4_edicao/parte1/metodos_analise.pdf

Determinação de citrato de sildenafila e tadalafila em apreensões de comprimidos similares de Viagra e falsificados de Cialis, trabalho apresentado na forma de pôster na 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, Brasil, 2011.



DETERMINAÇÃO DE CITRATO DE SILDENAFILA E TADALAFILA EM APREENSÕES DE COMPRIMIDOS SIMILARES DE VIAGRA® E FALSIFICADOS CIALIS®

Rafaella W. Doutheleponi^{1*} (TC), Laura Brescher¹ (TC), Rafael S. Ortiz² (PQ), Aline G. Nichele¹ (PQ)

rafaella.wd@gmail.com

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS - Campus Porto Alegre, Av. Ramiro Barcelos, 2777, Porto Alegre, RS.

²Superintendência de Polícia Federal no Estado do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 1365, Porto Alegre - RS.

Introdução

Dentre os diversos medicamentos comercializados no mercado farmacêutico brasileiro, as especialidades Viagra® e Cialis® são apontadas como as de maior incidência de falsificação no país, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Devido a isso, é de grande importância a análise destes medicamentos, comercializados legalmente e ilicitamente, em função dos problemas de saúde que podem causar. Com isso, busca-se determinar se os similares do medicamento Viagra® e amostras falsificadas de Cialis®, contêm em sua composição citrato de sildenafila (SILD) ou tadalafila (TAD), respectivamente, e na quantidade declarada, conforme a descrição de sua embalagem.



Metodologia

Foram analisados 23 comprimidos - medicamentos similares e falsificados - oriundos de apreensões e encaminhados para exame pericial, suspeitos de conterem em sua formulação SILD ou TAD. Para isto, soluções destas amostras foram submetidas à análise em um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) acoplado a um espectrômetro de massas. Abaixo, segue o esquema das etapas realizadas, desde a pesagem e pulverização dos comprimidos até a análise cromatográfica.



Resultados

A partir da análise via CLUE de comprimidos padrões de SILD (50mg) e de TAD (20mg) determinou-se as respectivas relações área/massa para os picos cromatográficos. Para cada amostra analisada, estas relações foram comparadas com as respectivas áreas dos picos obtidos, conduzindo aos resultados apresentados nas Tabelas 1 e 2. Foram encontradas amostras falsificadas contendo quantidades superiores do fármaco, com mais de que um fármaco e até mesmo com um fármaco diverso do rotulado.

Tabela 1. Comprimidos estrangeiros similares, com aspecto de Viagra®, cor azul, dosagem de 50mg.

Amostra	Especificação	Quantidade de SILD mg(%) / TAD mg(%)
1	Estrangeiro A	45,6 (100%) / 0,0 (0%)
2	Estrangeiro A	52,4 (100%) / 0,0 (0%)
3	Estrangeiro A	53,7 (100%) / 0,0 (0%)
4	Estrangeiro MA	54,3 (100%) / 0,0 (0%)
5	Estrangeiro MA	54,1 (100%) / 0,0 (0%)
6	Estrangeiro B	73,6 (100%) / 0,0 (0%)
7	Estrangeiro D	45,2 (100%) / 0,0 (0%)
8	Estrangeiro E	51,2 (100%) / 0,0 (0%)
9	Estrangeiro E	51,4 (100%) / 0,0 (0%)

Tabela 2. Comprimidos falsificados, com coloração amarela, em embalagens de Cialis® 20mg.

Amostra	Especificação	Quantidade de SILD mg(%) / TAD mg(%)
10	Cialis A	7,3 (46,2%) / 8,5 (53,8%)
11	Cialis A	8,4 (53,5%) / 7,3 (46,5%)
12	Cialis A	6,3 (44,7%) / 7,8 (55,3%)
13	Cialis A	27,1 (97,8%) / 0,6 (2,2%)
14	Cialis A	10,6 (62%) / 6,5 (38%)
15	Cialis A	29,2 (100%) / 0,0 (0%)
16	Cialis B	42,3 (100%) / 0,0 (0%)
17	Cialis B	45,9 (100%) / 0,0 (0%)
18	Cialis B	43,3 (100%) / 0,0 (0%)
19	Cialis B	49,0 (100%) / 0,0 (0%)
20	Cialis C	3,5 (11,5%) / 26,9 (88,5%)
21	Cialis C	0,6 (2,4%) / 24,6 (97,6%)
22	Cialis C	0,0 (0%) / 28,0 (100%)
23	Cialis C	0,0 (0%) / 24,4 (100%)

Referências

ORTIZ, R.; ANTUNES, M. V.; LINDEN, R. Determinação de citrato de sildenafila e de tadalafila por cromatografia líquida de ultra-eficiência com detecção por arranjo de diodos (clue-dad). *Química Nova*, Vol. 33, Nº 2, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n2/28.pdf>. Acesso em 23 mar. 2010.

Investigating the Chemical Composition of Viagra and Cialis Packaging (Authentic and Counterfeit) by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Thermal Analysis (TG/DTA), trabalho apresentado na forma de pôster no 10º Encontro da Sociedade Brasileira de Materiais, Gramado, Brasil, 2011.

Investigating the Chemical Composition of Viagra® and Cialis® Packaging (Authentic and Counterfeit) by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Thermal Analysis (TG/DTA)

J. Alves¹, E. Domingos, G. L. Sena¹, E. V. R. Castro¹, R. S. Ortiz^{2,3}, P. Mayorga², W. Romão¹,

¹*Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brazil*

²*Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil.*

³*Brazilian Federal Police, RS, Brazil.*

The production of counterfeited drugs is a criminal problem that carries serious risks to public health in the worldwide. In Brazil, Viagra® and Cialis® are the most counterfeit medicines, being used to inhibit the phosphodiesterase type 5 (PDE-5), treating thus, problems related to erectile dysfunction. In function of increase of counterfeiting marketing of this drugs, our research group in forensic chemical is investigating the chemical composition of Viagra® and Cialis® blisters (authentic and counterfeit) by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and thermal analysis (thermogravimetry and differential thermal analysis, TG/DTA). The Viagra® and Cialis® packaging were supplied by Brazilian Federal Police (PF), Porto Alegre, RS. The data obtained from the FTIR and TG/DTA measurements were correlated to register of apprehension of PF and the organic composition of tablets. For the Viagra® blisters, FTIR and TG/DTA results show a clear difference between the spectra obtained from the authentic and counterfeit samples mainly in region of 2500 – 3000 cm⁻¹ and 1700-1200 cm⁻¹. FTIR results allow also distinguishing the samples as function of the register of apprehension. However, for Cialis® blisters, identical spectra were observed for all samples, corresponding to a similar chemical composition. In all cases, the polymer used is the poly (ethylene terephthalate), PET. However a variety of co-monomers (diethylene glycol (DEG), isophthalic acid (IA) and cyclohexanedimethylene glycol) can be presents to tailor the PET properties, proving thus, distinct FTIR spectra. Generally, we can conclude that a more diverse chemical composition is utilized in manufacture of Viagra® blisters in related to Cialis® blisters.

Keywords: Viagra, Cialis, FTIR, TGA, PET.

[1] PILCHIK, R. *Pharmaceutical Blister Packaging, Part I: rationale and Materials. Pharmaceutical Technology*, v.24, n.11, p.68-77, 2000.

[2] HOLLAND, B. J., HAY, J. N. *The thermal degradation of PET and analogous polyesters measured by thermal analysis-Fourier transform infrared spectroscopy. Polymer*, v.43, p.1835-1847, 2002.

[3] M. EDGE, R. WILES, N.S. ALLEN. *Characterisation of the species responsible for yellowing in melt degraded aromatic polyesters-I: Yellowing of poly(ethylene terephthalate). Polymer Degradation and Stability*, v.53, p.141-151, 1996.

josuejunior22@yahoo.com.br, Av Fernando Ferrari, 514, Vitória, ES, CEP 29075-910

Manuscrito submetido ao Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of
Pharmaceutical and Biomedical Analysis
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Blisters Packaging Fingerprinting of Viagra® and Cialis® via
Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) allied to Chemometric
Methods

Article Type: Full Length Article

Keywords: Viagra®, Cialis®, FTIR, PCA, HCA, PLS-DA.

Corresponding Author: Dr. Wanderson Romão, Ph.D

Corresponding Author's Institution:

First Author: Wanderson Romão, Ph.D

Order of Authors: Wanderson Romão, Ph.D; Thieres M Pereira, Chemistry
Master Student; Josué Alves, Chemistry Student; Rafael S Ortiz, PhD
student; Paulo Mayorga, Professor; Eustáquio V Castro, Professor;
Werickson F Rocha, PhD

Abstract: The production of counterfeited drugs is a criminal problem that carries serious risks to public health in the worldwide. Herein, it is demonstrated the chemical fingerprinting of blisters packaging via Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR from authentic and counterfeit samples of Viagra® and Cialis®. Fifteen commercial samples (Viagra® and Cialis®) and thirty two counterfeit samples (Viagra and Cialis) were analyzed, and the FTIR data subjected to chemometric treatment via unsupervised pattern recognition methods (principal component analysis, and hierarchical cluster analysis) and supervised pattern recognition method (partial least squares discriminant analysis). Using unsupervised methods, samples were separated into three large groups: counterfeit Viagra (seven samples made from polyvinyl chloride, PVC, additived with some anthraquinone derived where an intense band in 1700 cm⁻¹ region is observed); authentic Viagra® (three samples made from poly (ethylene terephthalate)); and authentic Cialis®, counterfeit Cialis and some samples of authentic Viagra® and counterfeit Viagra; (thirty seven made from PVC additived with stearic acid derivatives, butyl hydroxy toluene or bisphenol A: smaller intensity bands in regions of 1726 cm⁻¹, 1539 cm⁻¹ and 3402 cm⁻¹ are observed). Therefore, this suggests the existence of three suppliers of forming films for blisters packaging production applied to inhibitors of PDE-5 market. Using supervised methods, all samples were correctly classified into their respective classes. However, for the validation samples, only samples correspond to authentic Cialis®, counterfeit Cialis and counterfeit Viagra were correctly classified in their respective classes obtaining misclassification error equals 0 and 10.

Obtenção de perfis químicos de medicamentos falsificados com FTIR-ATR associada a métodos quimiométricos e análise: uma única mistura farmacêutica pode ser empregada na falsificação de Cialis e de Viagra?, trabalho apresentado na forma de pôster no 3º Encontro Nacional de Química Forense, Ribeirão Preto, Brasil, 2012. Menção Honrosa.



Obtenção de perfis químicos de medicamentos falsificados com FTIR-ATR associada a métodos quimiométricos de análise: uma única mistura farmacêutica pode ser empregada na falsificação de Cialis e de Viagra?



Rafael S. Ortiz^{1,2*}, Kristiane Mariotti², Bruna Fank¹, Renata P. Limberger², Paulo Mayorga²

¹ Setor Técnico-Científico, Polícia Federal no Rio Grande do Sul, ² Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacéuticas, Fac. de Farmácia, UFRGS
*rafaelortiz.rs@dpf.gov.br

RESUMO

Propõe-se um método direto e muito rápido para a determinação de falsificações de Cialis e de Viagra combinando espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e métodos quimiométricos de análise. Partindo de apenas 10 mg do núcleo de comprimidos questionados, em menos de 30 segundos, foram obtidos espectros de FTIR-ATR característicos para amostras forenses reais. Neste trabalho, os perfis químicos de 53 amostras comerciais (Viagra®, Cialis®) e de 106 amostras falsificadas (Viagra e Cialis) de apreensões distintas foram obtidos a partir de dados de FTIR-ATR. A existência de ingredientes farmacologicamente ativos e de outros adjuvantes tecnológicos que não os especificados nas embalagens foi detectada em amostras falsificadas. Empregando-se métodos quimiométricos de análise alcançaram-se excelentes resultados na classificação das amostras em função do espectro na região da impressão digital (1800-525 cm⁻¹). A Análise de Componentes Principais (ACP) permitiu o agrupamento das amostras similares em conjuntos claramente definidos e com perfis químicos diferentes entre os grupos. De um ponto de vista de inteligência forense, o Índice de Similaridade (IS) aponta na direção de que a mesma mistura de complexos pulverêneos farmacêuticos pode ter sido usada para a fabricação tanto de Cialis falsificados quanto de Viagras falsificados de apreensões distintas. Esta abordagem pode ser aplicada a outros casos forenses em que estudos de classificação para amostras de estado sólido sejam requeridos.

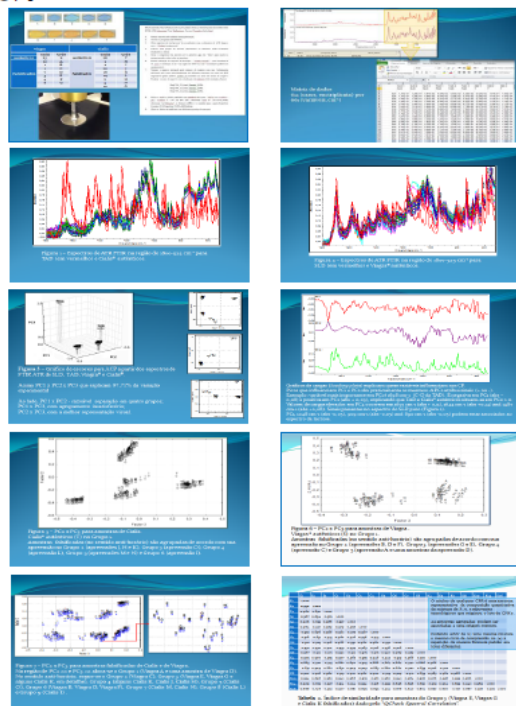
MATERIAIS E MÉTODOS

Citrato de sildenafil (99,9%) e seis Viagra® autênticos contendo 50 mg de SLD foram fornecidos pelo Laboratório Pfizer Ltda. Tadalafila (99, 8%) e oito Cialis® autênticos contendo 20 mg de TAD foram fornecidos pelos Laboratórios Eli Lilly do Brasil Ltda. Vinte Cialis® autênticos (TAD, 20 mg) de oito lotes distintos e dezenove Viagra® autênticos (SLD, 50 mg) de seis lotes diferentes foram adquiridos no comércio farmacêutico local. Cento e quatro comprimidos falsificados enviados para análise pericial da Polícia Federal (Porto Alegre, Rio Grande do Sul) foram analisados por FTIR-ATR.

Tabela 1. Descrição das apreensões e amostras testadas.

Viagra		Cialis	
Unidades	Código	Unidades	Código
Autentico	25	Autentico	25
1	A	1	H
1	B	1	I
1	C	20	J
7	D	15	K
3	E	14	L
4	F	2	M
5	G	4	N
		12	O
Falsificado		Falsificado	

Um espectrômetro Nicolet 380 FTIR (Nicolet Instrument Co., Madison, USA) equipado com detector DTGS (Deuterated Triglycine Sulphate) e acessório de amostragem Smart Orbit ATR (*Attenuad Total Reflection*) foi empregado, no modo absorção. Amostras são frações dos núcleos dos comprimidos, homogeneizadas por trituração. Fração da amostra é colocada no elemento de ATR. Cada mistura foi amostrada 3 vezes criando a triplicata. Espectro compreende a 16 scans medidos com resolução de 4 cm⁻¹ na região de 4000–525 cm⁻¹ (software EZ OMNIC). Após cada medida o cristal foi limpo com acetona e seco ao ambiente. A região da impressão digital de cada espectro, 1800–525cm⁻¹ foi salva no formato CSV, compatível com diferentes softwares. Os espectros geraram uma matriz de dados de 612 (casos, em triplicata) por 661 (variáveis, cm⁻¹).



CONCLUSÕES

Espectros de FTIR-ATR permitem com relativa facilidade e rapidez caracterizar e classificar comprimidos autênticos e falsificações de Cialis e de Viagra. Aplicando-se ferramentas estatísticas multivariadas aos espectros de FTIR-ATR a representação dos dados experimentais torna-se mais clara e conclusiva relativamente às diferenças na composição de amostras testadas. A ACP agrupou as amostras em grupos definidos com perfis químicos diferentes, distinguindo com sucesso amostras autênticas e falsas. Alguns grupos foram formados com falsificações advindas de apreensões diferentes, indicando uma produção ilícita comum de mistura farmacêutica e/ou ciclo de compressão. Houve até mesmo a formação de um cluster contendo duas apreensões de Viagra falsos e uma de Cialis falso. Para este grupo o IS mostrou que existe uma correlação significativa entre estas amostras. Os resultados sugerem a hipótese de uma única mistura de pós farmacêuticos contendo apenas a sildenafil foi empregada para falsificar comprimidos de Viagra e de Cialis.

Manuscript submetido ao Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis
Manuscript Draft

Manuscript Number: JPBA-D-12-01542

Title: A MULTIVARIATE-BASED WAVELENGTH SELECTION METHOD FOR CLASSIFYING MEDICINES INTO AUTHENTIC OR COUNTERFEIT CLASSES

Article Type: Full Length Article

Keywords: Wavelength selection; Counterfeit medicines; PCA; KNN; FTIR-ATR

Corresponding Author: Mr. Michel J Anzanello, PhD

Corresponding Author's Institution: UFRGS

First Author: Michel J Anzanello, PhD

Order of Authors: Michel J Anzanello, PhD; Rafael Ortiz; Paulo Mayorga; Renata Limberger

Abstract: The commerce of counterfeit medicines has grown significantly in the last decade, mostly due to modern technologies for falsifying medicines and customers' easy access to fraudulent websites. Attenuated Total Reflectance (ATR), a sampling technique for Infrared Spectroscopy by Fourier Transform (FTIR) spectroscopy, has been adopted as an analytical tool for detecting fraudulent medicines. The spectrum generated by FTIR-ATR typically relies on hundreds of equally spaced wavelengths which may reduce the performance of techniques tailored to classify samples into classes, i.e., authentic or fraudulent. In this paper, we propose a novel method for selecting subsets of wavelengths (variables) that better classify samples into such classes. For that matter, we integrate Principal Components Analysis (PCA) and the k-Nearest Neighbor (KNN) classification technique. PCA is applied to FTIR-ATR data, and a variable importance index is built on the PCA outputs. We then start an iterative backward variable elimination guided by that index: after each variable removal, we categorize samples into authentic or fraudulent classes using KNN, and measure the classification accuracy. The wavelength subset compromising high accuracy and reduced percent of retained variables is chosen. When applied to Cialis FTIR-ATR data, the proposed approach retained only average 1.84% of the original variables and increased the classification accuracy average 2.1%, to 0.9897 from 0.9689; as for Viagra data, the method increased average classification accuracy 1.56%, from 0.9135 to 0.9278, using only 7.72% of the original variables.

Suggested Reviewers: Roman Balabin
balabin@org.chem.ethz.ch

Zou Xiaobo
zou_xiaobo@ujs.edu.cn

Cyril Muehlethaler
cyril.muehlethaler@unil.ch

Pareceres da banca examinadora

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nível: Doutorado


Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Título: "Perfil químico e tecnológico de medicamentos falsificados: uma abordagem estatística multivariada para os casos do Viagra e do Cialis"

Doutorando: RAFAEL SCORSATTO ORTIZ

PARECER

Trata-se de trabalho focado na abordagem sistemática e plural de falsificação de medicamentos, tendo como produtos-alvo Viagra e Cialis. Para isso, diversas técnicas analíticas por ED, XRF, ESI-MS, UPLC-PDA-MS, FTIR, entre outras, foram aplicadas visando a obtenção de uma matriz de dados passível de ser analisada por técnicas de análise Multivariada. O corpo da Tese contém, na forma de encarte cinco artigos submetidos ou aceitos para publicação, demonstrando uma laboriosa e de elevada relevância científica. Cada um deles refere-se a etapas específicas que, em conjunto, constituem uma estrutura capaz de proporcionar uma visão das modernas possibilidades de abordagem pragmática de assuntos complexos na sua essência. A revisão da literatura é ampla e sustenta os pressupostos colocados ao longo de cada capítulo. A discussão é pertinente e ampla. Face ao acima exposto, sem de parecer favorável a outorga de título de Doutor em Ciências Farmacêuticas a Rafael Scorsatto Ortiz.


Prof. Dr. George Gonzalez Ortega
Porto Alegre, 22 de março de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
 FACULDADE DE FARMÁCIA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nível: Doutorado

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Título: "Perfil químico e tecnológico de medicamentos falsificados: uma abordagem estatística multivariada para os casos do Viagra e do Cialis"

Doutorando: RAFAEL SCORSATTO ORTIZ

PARECER

A tese apresentada para avaliação está completa em termos formais (organização, clareza, formatação, linguagem, etc.).

Além da relevância demonstrada pelo grande número de trabalhos desenvolvidos e já autor para publicação, o tema do trabalho é de grande interesse social e aplicado às várias faixas.

Fica evidente o empenho do doutorando e de seus orientadores em interagir com diferentes grupos de pesquisa com intuito de engrandecer o entendimento da problemática, das opiniões, ideias e papéis alternativos, tecnicamente embasados para abordagem.

Resalta também a elevada importância de apoiar estudos estatísticos e produção de resultados de interesse sempre, pois esta área ainda necessita de muito esforço para que seus limites sejam determinados.

Prof. Dr. Adriano Otávio Maldaner
 Porto Alegre, 22 de março de 2013.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nível: Doutorado

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Título: "Perfil químico e tecnológico de medicamentos falsificados: uma abordagem estatística multivariada para os casos do Viagra e do Cialis"

Doutorando: RAFAEL SCORSATTO ORTIZ

PARECER

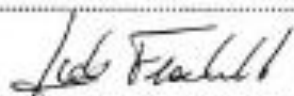
O PRESENTE TRABALHO TRATA DE UM ASSUNTO ATUAL E DE EXTREMA IMPORTÂNCIA, A AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E TECNOLÓGICO DE MEDICAMENTOS FALSIFICADOS.

A PARTE EXPERIMENTAL FOI DIVIDIDA EM CAPÍTULOS, QUE TRATAM DAS DIFERENTES ANÁLISES REALIZADAS, FACILITANDO A LEITURA E COMPREENSÃO.

A UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS ANALÍTICAS COMPLEMENTARES, ASSOCIADAS À UMA AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA ADEQUADA DOS DADOS, PERMITIRAM A IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS FALSIFICADAS.

A RELEVÂNCIA DO TEMA E A QUALIDADE DAS INFORMAÇÕES PRODUZIDAS, FICAM EVIDENTES COM A PUBLICAÇÃO (ACEITE DE 5 (CINCO) MANUSCRITOS A PARTIR DO PRESENTE TRABALHO, ATÉ O MOMENTO.

ASSIM SENDO, SOMOS DE PARECER FAVORÁVEL PELA APROVAÇÃO DA PRESENTE TESE, CONCEDENDO A RAFAEL SCORSATTO ORTIZ O GRAU ACADÊMICO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.



Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich
Porto Alegre, 22 de março de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nível: Doutorado

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Título: "Perfil químico e tecnológico de medicamentos falsificados: uma abordagem estatística multivariada para os casos do Viagra e do Cialis"

Doutorando: RAFAEL SCORSATTO ORTIZ

PARECER

A TOME APRESENTADA PELO RAFAEL S. ORTIZ
UTILIZA FERRAMENTAS ESTADÍSTICAS COM VISÃO
A CATEGORIZAÇÃO DE VIAGRA E CIALIS EM GRUPO
AUTÊNTICOS E FALSOS.

O MATERIAL É BEM ESCRITO E ESTRUTURADO,
TEM APLICAÇÕES RELEVANTES E SIGNIFICATIVAS, E
APLICA O CONHECIMENTO EM ÁREA RELEVANTE E TEM CONCLUSÃO
OPERACIONAL E TÉCNICA. A CONTRIBUIÇÃO DO
TRABALHO É INTÉLEKTUAL, CONFORMANDO O NECESSÁRIO
INVESTIMENTO AO ESTUDO.

CONCLUI O PARECER ~~DE~~ APROVANDO QUE
O CANDIDATO CUMPRU TODOS OS REQUISITOS
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR.



Prof. Dr. Michel José Anzanello
Porto Alegre, 22 de março de 2013.

BIOGRAFIA

Rafael Scorsatto Ortiz

Nascido em 14/08/1974, em Soledade/RS.

Ensino Fundamental

Instituto Estadual Rio Branco, Porto Alegre/RS.

Colégio Franciscano Santíssima Trindade, Cruz Alta/RS.

Ensino Médio

Instituto Estadual Prof. Annes Dias, Cruz Alta/RS.

Graduação

Farmácia (1994 – 1998), UFRGS, Porto Alegre/RS.

Farmácia Industrial (1998 – 2001), UFRGS, Porto Alegre/RS.

Pós – graduação

Mestrado em Ciências Farmacêuticas (2001 – 2003), UFRGS, Porto Alegre/RS.

Curso de Formação Profissional de Perito Criminal Federal (2003), ANP, Brasília/DF.

Especialização em Toxicologia Forense (2008 – 2009), Feevale, Novo Hamburgo/RS.

Doutorado em Ciências Farmacêuticas (2009 – 2013), UFRGS, Porto Alegre/RS.