MARIA GORETI FERREIRA SALES

LICENCIADA EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS PELA UNIVERSIDADE DO PORTO

DESENVOLVIMENTO DE DETECTORES TUBULARES POTENCIOMÉTRICOS E DE METODOLOGIAS AUTOMÁTICAS DE FLUXO CONTÍNUO COM DETECÇÃO POTENCIOMÉTRICA DESTINADOS AO CONTROLO QUÍMICO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS

UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO • 1999

Desenvolvimento de Detectores Tubulares Potenciométricos e de Metodologias Automáticas de Fluxo Contínuo com Detecção Potenciométrica Destinados ao Controlo Químico de Produtos Farmacêuticos

MARIA GORETI FERREIRA SALES

LICENCIADA EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS PELA UNIVERSIDADE DO PORTO

DESENVOLVIMENTO DE DETECTORES TUBULARES POTENCIOMÉTRICOS E DE METODOLOGIAS AUTOMÁTICAS DE FLUXO CONTÍNUO COM DETECÇÃO POTENCIOMÉTRICA DESTINADOS AO CONTROLO QUÍMICO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO • 1999

Aos meus pais

À Professora Doutora Maria da Conceição Branco da Silva Mendonça Montenegro presto o meu sincero agradecimento à valiosa supervisão de todos os trabalhos descritos na presente dissertação e à sua revisão crítica. Pelo entusiasmo que me incutiu, bem como pela confiança que sempre demonstrou, exprimo também a minha gratidão.

Ao Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima agradeço, agora, a forma como me "persuadiu" a dar início a este trabalho, bem como o modo como me acolheu no Laboratório de Química-Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Pela sua pronta disponibilidade e pelos úteis esclarecimentos, manifesto aqui o meu mais sincero agradecimento.

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto agradeço ter-me aceite como aluna de Doutoramento. À Fundação para a Ciência e Tecnologia (Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica) e ao Gabinete de Gestão do Praxis XXI, agradeço a Bolsa de Doutoramento concedida, sem a qual não seria possível esta dissertação.

Ao Dr. José Leite Machado o meu mais profundo e terno agradecimento pela ajuda prestada, sem a qual esta dissertação nunca teria sido realizada.

A todos os elementos que trabalham (ou trabalhavam) no Laboratório de Química-Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e que, em algum momento, contribuíram com os seus saberes e/ou amizade para levar a bom termo a presente dissertação, o meu muito obrigado.

Ao Professor Doutor Alberto da Nova Araújo o meu sincero obrigado pelo apoio, disponibilidade e auxílio prestado face a algumas lamentações.

À Técnica Belmira Pereira e à Dona Teresa o meu sincero agradecimento pelo apoio contínuo e incansável, ao longo de todos estes anos.

À Professora Doutora Maria do Carmo Vaz e ao Lic. Rui Cerdeira, agradeço a amizade sincera, a confiança e o apoio prestado nos momentos mais difíceis, não esquecendo de manifestar aqui a minha grande admiração pelos valores e pela força interior que possuem. À Professora Doutora Cristina Delerue Matos agradeço a amizade sempre manifestada e o seu apoio desinteressado ao longo deste último ano. Agradeço ainda à Doutora Simone Morais a sua preciosa contribuição "linguística".

À Joana Botelho o meu mais sincero agradecimento (e admiração) pela amizade demonstrada e pela ajuda "cinética" e gramatical, apoio este fundamental e plenamente desinteressado. À Silvia Lima a amizade sempre presente, mesmo quando distante. À Isabel Machado, ao Luís Castro, à Maria Gabriela Dinis, à Manuela Castro, à Paula Gervásio, ao Carlos Miranda, e ao Doutor Boaventura Reis, agradeço a amizade transmitida até à presente data.

Aos meus pais, e restante família, agradeço todo o apoio e compreensão, ilimitados.

Índice de figuras ..... *x*
Índice de tabelas ..... *xiii*
Resumo ..... *xvii*
Abstract ..... *xviii*
Résumé ..... *xix*
Organização geral da dissertação ..... *xx*

CAPÍTULO I ◦ INTRODUÇÃO GERAL

I.1 Considerações Gerais ..... I 1
I.2 O controlo da qualidade de formulações farmacêuticos comerciais ..... I 5
I.2.1 A análise quantitativa de um fármaco incorporado em formulações ..... I 9
I.3 Os eléctrodos selectivos de ião na área farmacêutica ..... I 14
I.3.1 Os eléctrodos de membrana de condutor móvel selectivos a fármacos ..... I 16
I.4 A análise por injecção em fluxo ..... I 25
I.4.1 Eléctrodos de membrana de condutor móvel selectivos a fármacos em sistemas de análise por injecção em fluxo ..... I 29
I.4.1.1 Aplicações analíticas ..... I 40
I.5 Objectivos ..... I 43
I.6 Referências bibliográficas ..... I 45

CAPÍTULO II ◦ ASPECTOS GERAIS DE ORDEM EXPERIMENTAL

II.1 Considerações gerais ..... II 1
II.2 Material e aparelhos utilizados ..... II 3
II.2.1 Material e aparelhos para avaliações convencionais ..... II 3
II.2.2 Elementos constituintes das montagens FIA ..... II 4
II.3 Eléctrodos utilizados ..... II 7
II.4 Reagentes e soluções ..... II 8
II.5 Construção dos eléctrodos convencionais e tubulares ..... II 9
II.5.1 Preparação dos corpos dos eléctrodos ..... II 9
II.5.1.1 Configuração convencional ..... II 9
II.5.1.2 Configuração tubular ..... II 13
II.5.2 Preparação e aplicação das membranas sensoras ..... II 15

II.5.3 Recuperação do corpo dos eléctrodos ..... II 19
II.6 Metodologias de caracterização dos eléctrodos selectivos de ião ..... II 20
II.6.1 Curvas de calibração e seus parâmetros ..... II 21
II.6.1.1 Curvas de calibração ..... II 21
II.6.1.1.1Condições estacionárias ..... II 25
II.6.1.1.2Condições de fluxo ..... II 26
II.6.1.2 Parâmetros das curvas de calibração ..... II 32
II.6.2 Tempo de resposta e frequência de amostragem ..... II 35
II.6.3 Influência do pH na resposta dos eléctrodos (diagramas de Reilley) ..... II 37
II.6.4 Avaliação da selectividade dos eléctrodos ..... II 39
II.7 Análise potenciométrica de formulações farmacêuticas ..... II 44
II.7.1 Preparação das amostras ..... II 44
II.7.2 Ensaios de doseamento ..... II 45
II.7.3 Ensaios para avaliação da qualidade dos resultados obtidos ..... II 46
II.8 Referências bibliográficas ..... II 48

CAPÍTULO III ◦ ELÉCTRODOS SELECTIVOS DE TRIPELENAMINA

III.1 Introdução ..... III 1
III.2 Parte experimental ..... III 6
III.2.1 Aparelhagem e eléctrodos ..... III 6
III.2.2 Reagentes e soluções ..... III 6
III.2.3 Preparação dos sistemas sensores e das membranas ..... III 7
III.2.4 Preparação das amostras para os doseamentos potenciométricos ..... III 9
III.3 Resultados e discussão ..... III 11
III.3.1 Características de funcionamento dos eléctrodos convencionais ..... III 11
III.3.1.1 Parâmetros das curvas de calibração ..... III 11
III.3.1.2 Efeito do pH no valor de potencial dos eléctrodos ..... III 16
III.3.1.3 Determinação de coeficientes de selectividade potenciométrica ..... III 18
III.3.2 Características de funcionamento dos detectores tubulares ..... III 22
III.3.2.1 Condições experimentais do sistema FIA ..... III 22
III.3.2.2 Parâmetros das curvas de calibração ..... III 25
III.3.2.3 Efeito do pH no valor de potencial dos eléctrodos ..... III 27
III.3.2.4 Determinação de coeficientes de selectividade potenciométrica ..... III 28

III.3.3 Análise de formulações farmacêuticas ..... III 30
III.4 Conclusões ..... III 32
III.5 Referências bibliográficas ..... III 34

CAPÍTULO IV ◦ ELÉCTRODOS SELECTIVOS DE PROMETAZINA

IV.1 Introdução ..... IV 1
IV.2 Parte experimental ..... IV 10
IV.2.1 Aparelhagem e eléctrodos ..... IV 10
IV.2.2 Reagentes e soluções ..... IV 10
IV.2.3 Preparação dos sistemas sensores e das membranas ..... IV 11
IV.2.4 Preparação das amostras para os doseamentos potenciométricos ..... IV 13
IV.2.5 Preparação das amostras para os doseamentos da USP ..... IV 14
IV.3 Resultados e discussão ..... IV 18
IV.3.1 Características de funcionamento dos eléctrodos convencionais ..... IV 18
IV.3.1.1 Parâmetros das curvas de calibração ..... IV 19
IV.3.1.2 Efeito do pH no valor de potencial dos eléctrodos ..... IV 22
IV.3.1.3 Determinação de coeficientes de selectividade potenciométrica ..... IV 24
IV.3.2 Características de funcionamento dos detectores tubulares ..... IV 27
IV.3.2.1 Condições experimentais do sistema FIA ..... IV 27
IV.3.2.2 Parâmetros das curvas de calibração ..... IV 30
IV.3.2.3 Efeito do pH no valor de potencial dos eléctrodos ..... IV 32
IV.3.2.4 Determinação de coeficientes de selectividade potenciométrica ..... IV 33
IV.3.3 Análise de formulações farmacêuticas ..... IV 35
IV.4 Conclusões ..... IV 38
IV.5 Referências bibliográficas ..... IV 40

CAPÍTULO V ◦ ELÉCTRODOS SELECTIVOS DE CEFUROXIMA

V.1 Introdução ..... V 1
V.2 Parte experimental ..... V 8
V.2.1 Aparelhagem e eléctrodos ..... V 8
V.2.2 Reagentes e soluções ..... V 8

V.2.3 Determinação do pKa da cefuroxima de sódio ..... V 10
V.2.4 Preparação dos sistemas sensores e das membranas ..... V 10
V.2.5 Preparação das amostras para os doseamentos potenciométricos ..... V 13
V.2.6 Preparação das amostras para os doseamentos da USP ..... V 14
V.3 Resultados e discussão ..... V 15
V.3.1 Características de funcionamento dos eléctrodos convencionais ..... V 15
V.3.1.1 Parâmetros das curvas de calibração ..... V 16
V.3.1.2 Efeito do pH no valor de potencial dos eléctrodos ..... V 21
V.3.1.3 Determinação de coeficientes de selectividade potenciométrica ..... V 23
V.3.2 Características de funcionamento dos detectores tubulares ..... V 27
V.3.2.1 Condições experimentais do sistema FIA ..... V 27
V.3.2.2 Parâmetros das curvas de calibração ..... V 30
V.3.2.3 Efeito do pH no potencial dos detectores tubulares ..... V 32
V.3.2.4 Determinação de coeficientes de selectividade potenciométrica ..... V 33
V.3.3 Análise de formulações farmacêuticas ..... V 36
V.4 Conclusões ..... V 39
V.5 Referências bibliográficas ..... V 41

CAPÍTULO VI ◦ ELÉCTRODOS SELECTIVOS DE TETRACICLINA

VI.1 Introdução ..... VI 1
VI.2 Parte experimental ..... VI 15
VI.2.1 Aparelhagem e eléctrodos ..... VI 15
VI.2.2 Reagentes e soluções ..... VI 15
VI.2.3 Preparação dos sistemas sensores e das membranas ..... VI 16
VI.2.4 Preparação das amostras para os doseamentos potenciométricos ..... VI 18
VI.2.5 Monitorização potenciométrica de ensaios de dissolução *in vitro* ..... VI 19
VI.2.6 Procedimentos para a execução da monografia da USP ..... VI 20
VI.3 Resultados e discussão ..... VI 22
VI.3.1 Características de funcionamento dos eléctrodos convencionais ..... VI 22
VI.3.1.1 Parâmetros das curvas de calibração ..... VI 22
VI.3.1.2 Efeito do pH no valor de potencial dos eléctrodos ..... VI 27
VI.3.1.3 Determinação de coeficientes de selectividade potenciométrica ..... VI 30
VI.3.2 Características de funcionamento dos detectores tubulares ..... VI 33

VI.3.2.1 Condições experimentais do sistema FIA ..... VI 33
VI.3.2.2 Parâmetros das curvas de calibração ..... VI 35
VI.3.2.3 Efeito do pH no potencial dos detectores tubulares ..... VI 37
VI.3.2.4 Determinação de coeficientes de selectividade potenciométrica ..... VI 38
VI.3.3 Análise de formulações farmacêuticas ..... VI 41
VI.4 Conclusões ..... VI 46
VI.5 Referências bibliográficas ..... VI 47

CAPÍTULO VII ◦ DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA

VII.1 Introdução ..... VII 1
VII.2 Parte experimental ..... VII 8
VII.2.1 Aparelhagem e eléctrodos ..... VII 8
VII.2.2 Reagentes e soluções ..... VII 8
VII.2.3 Preparação dos sistemas sensores e das membranas ..... VII 9
VII.2.4 Preparação das amostras para os doseamentos potenciométricos ..... VII 11
VII.2.5 Procedimentos para a execução da monografia da USP ..... VII 11
VII.3 Resultados e discussão ..... VII 13
VII.3.1 Características de funcionamento dos eléctrodos convencionais ..... VII 13
VII.3.1.1 Parâmetros das curvas de calibração ..... VII 14
VII.3.1.2 Efeito do pH no valor de potencial dos eléctrodos ..... VII 15
VII.3.1.3 Determinação de coeficientes de selectividade potenciométrica ..... VII 16
VII.3.2 Estabelecimento do sistema FIA ..... VII 19
VII.3.2.1 Optimização do sistema FIA ..... VII 20
VII.3.2.2 Considerações cinéticas ..... VII 27
VII.3.2.3 Parâmetros das curvas de calibração ..... VII 29
VII.3.2.4 Avaliação da influência de interferências ..... VII 30
VII.3.3 Análise de formulações farmacêuticas ..... VII 31
VII.4 Conclusões ..... VII 34
VII.5 Referências bibliográficas ..... VII 35

CAPÍTULO VIII ◦ CONCLUÕES GERAIS ..... VIII 1

FIGURA **PÁG.**

I.1 Fases decorrentes da administração de uma forma sólida por via oral ..... I 8

I.2 Distribuição percentual da aplicação dos vários métodos instrumentais na determinação de compostos com interesse farmacêutico, na década de 90 ..... I 10

I.3 Distribuição percentual da aplicação dos vários métodos electro-analíticos na determinação de compostos com interesse farmacêutico, na década de 90 ..... I 12

I.4 Construção de eléctrodos de configuração convencional, de membrana polimérica e com solução de referência interna ..... I 22

I.5 Construção de eléctrodos de configuração convencional, de membrana polimérica e sem solução de referência interna ..... I 22

I.6 Construção de eléctrodos de configuração convencional, de membrana polimérica e sem solução de referência interna ..... I 23

I.7 Configuração usual das montagens FIA contendo eléctrodos selectivos de ião ..... I 30

I.8 O arranjo típico em "cascata" ..... I 31

I.9 O arranjo em *flow-through caps* ..... I 31

I.10 O arranjo típico em *Wall-jet* ..... I 32

I.11 O arranjo tipo *Sandwich* ..... I 35

I.12 Arranjos típicos de eléctrodos selectivos de ião com configuração tubular ..... I 36

II.1 Bomba peristáltica ..... II 5

II.2 Módulo de suporte dos eléctrodos com configuração tubular ..... II 6

II.3 Módulo de suporte do eléctrodo de referência ..... II 6

II.4 Preparação de um "eléctrodo de ligação à terra" ..... II 7

II.5 Conjunto de cilindros em Perspex® para a construção dos eléctrodos de configuração convencional ..... II 10

II.6 Fixação da placa de cobre ao cabo eléctrico coaxial blindado ..... II 11

II.7 Fixação do fio blindado à extremidade superior da estrutura de suporte em Perspex® e a adaptação de um terminal BNC ..... II 11

II.8 Aplicação de uma mistura condutora sobre a placa de cobre inserida no módulo de Perspex® ..... II 12

II.9 Cilindro em Perspex® para a construção dos eléctrodos de configuração tubular. ..... II 14

II.10 Preenchimento da cavidade interna do cilindro com mistura condutora e seu polimento ..... II 14

II.11 Superfície dos corpos dos eléctrodos tubulares electricamente isoladas, orifício longitudinal central e adaptação de um terminal BNC ..... II 15

II.12 Aplicação da solução da membrana no suporte condutor dos corpos de configuração convencional ..... II 17

II.13 Aplicação da solução da membrana no suporte condutor dos corpos de configuração tubular ..... II 18

II.14 Adaptação dos eléctrodos tubulares ao módulo de suporte e o condicionamento da sua membrana ..... II 19

II.15 Montagem de fluxo de baixa dispersão ..... II 26

II.16 Sinais analíticos correspondentes a condições equivalentes ao estado estacionário e após injecção de um volume de amostra ..... II 29

II.17 Montagem de fluxo com duplo canal. ..... II 31

II.18 Curva de calibração característica de um eléctrodo selectivo de ião ..... II 33

II.19 Representação gráfica do tempo de resposta de uma célula de eléctrodo selectivo de ião ..... II 35

II.20 Montagem FIA de baixa dispersão adaptada à avaliação da influência do pH no comportamento dos detectores tubulares ..... II 39

III.1 Fosfato de histamina ..... III 2

III.2 Cloridrato de tripelenamina ..... III 3

III.3 Diagramas de Reilley dos eléctrodos selectivos de tripelenamina convencionais ..... III 17

III.4 Diagrama dos log $K^{pot}_{A,B}$ dos eléctrodos selectivos de tripelenamina convencionais ..... III 21

III.5 Repetibilidade do sinal analítico dos detectores tubulares ..... III 26

III.6 Diagrama de Reilley dos detectores tubulares ..... III 28

III.7 Registo da calibração do eléctrodo selectivo de tripelenamina e da análise de uma amostra ..... III 31

IV.1 Cloridrato de prometazina ..... IV 2

IV.2 Diagramas de Reilley dos eléctrodos selectivos de prometazina convencionais ..... IV 23

IV.3 Diagramas de Reilley dos eléctrodos selectivos de prometazina convencionais. ..... IV 24

VI.4 Diagrama dos log $K^{pot}_{A,B}$ dos eléctrodos selectivos de prometazina convencionais ..... IV 26

IV.5 Repetibilidade do sinal analítico dos detectores tubulares ..... IV 31

IV.6 Diagramas de Reilley dos detectores tubulares ..... IV 33

IV.7 Registo da calibração do eléctrodo selectivo de prometazina e da análise de uma amostra ..... IV 36

V.1 Cefuroxima de sódio ..... V 2

V.2 Diagramas de Reilley dos eléctrodos selectivos de cefuroxima convencionais. ..... V 22

V.3 Diagrama dos log $K^{pot}_{A,B}$ dos eléctrodos selectivos de cefuroxima convencionais ..... V 26

V.4 Repetibilidade do sinal analítico dos detectores tubulares. ..... V 31

V.5 Diagrama de Reilley dos detectores tubulares ..... V 33

V.6 Diagrama dos log $K^{pot}_{A,B}$ dos eléctrodos selectivos AC3, de configuração convencional ou tubular ..... V 35

V.7 Registo da calibração do eléctrodo selectivo de cefuroxima e da análise de uma amostra ..... V 37

VI.1 Cloridrato de tetraciclina ..... VI 2

VI.2 Aspecto do vaso de dissolução ..... VI 20

VI.3 Montagem FIA para execução de ensaios de dissolução em fluxo ..... VI 20

VI.4 Diagramas de Reilley dos eléctrodos selectivos de tetraciclina de membranas PVC ..... VI 29

VI.5 Diagramas de Reilley dos eléctrodos selectivos de tetraciclina de membranas EVA ..... VI 29

VI.6 Diagrama dos log $K^{pot}_{A,B}$ dos eléctrodos selectivos de tetraciclina convencionais ..... VI 32

VI.7 Repetibilidade do sinal analítico dos detectores tubulares ..... VI 37

VI.8 Diagrama de Reilley dos detectores tubulares ..... VI 38

VI.9 Diagrama dos log $K^{pot}_{A,B}$ dos eléctrodos selectivos CTC3, de configuração convencional ou tubular ..... VI 40

VI.10 Registo da calibração do eléctrodo selectivo de tetraciclina e da análise de uma amostra ..... VI 41

VI.11 Registo da calibração do eléctrodo selectivo de tetraciclina e do ensaio de dissolução de cápsulas ..... VI 44

VII.1 Cloridrato de dopamina ..... VII 2

VII.2 Diagrama dos log $K^{pot}_{A,B}$ dos eléctrodos selectivos de periodato convencionais ..... VII 18

VII.3 Montagem FIA de duplo canal para a determinação de dopamina ..... VII 19

VII.4 Efeito do volume de injecção ..... VII 24

VII.5 Efeito da velocidade de fluxo ..... VII 25

VII.6 Estudo da concentração do periodato na solução de transporte ..... VII 26

VII.7 Registo de uma calibração no sistema FIA e da análise de uma amostra. ..... VII 32

TABELA **PÁG.**

I.1 Membranas cristalinas e de sensores de gás ou de substracto de enzima, utilizadas na preparação de eléctrodos selectivos às formas iónicas de fármacos.....I 15

I.2 Membranas de condutor móvel em eléctrodos selectivos às formas iónicas de fármacos .....I 17

I.3 Reactores de fase sólida enzimáticos, aplicados à análise de formulações farmacêuticas..... I 26

I.4 Reactores de fase sólida não enzimáticos, aplicados à análise de formulações farmacêuticas.....I 27

I.5 Irradiação de fármacos, ao longo do sistema de análise por injecção em fluxo, para a sua determinação .....I 28

I.6 Eléctrodos selectivos a várias espécies iónicas com interesse farmacêutico de configuração convencional, utilizados em sistemas de análise por injecção em fluxo.....I 33

I.7 Eléctrodos selectivos a espécies iónicas com interesse farmacêutico, construídos com uma configuração tubular e com eléctrodo e solução de referência internos.....I 37

I.8 Eléctrodos selectivos a várias espécies iónicas com interesse farmacêutico, construídos com uma configuração tubular e sem solução de referência interna.....I 39

I.9 Determinação do teor de fármacos em formulações farmacêuticas com eléctrodos selectivos de ião incorporados em sistemas de análise por injecção em fluxo.....I 41

III.1 Correspondência entre os elementos constituintes de cada membrana e a designação atribuída .....III 8

III.2 Composição percentual (p/p) das cinco membranas sensoras preparadas.....III 9

III.3 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de tripelenamina em soluções sem a força iónica ajustada .....III 12

III.4 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de tripelenamina em soluções com a força iónica ajustada .....III 13

III.5 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de tripelenamina em soluções com o pH e a força iónica ajustados.....III 15

III.6 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os eléctrodos selectivos de tripelenamina convencionais.....III 20

III.7 Efeito do volume de amostragem e da velocidade de fluxo com a montagem FIA de baixa dispersão .....III 24

III.8 Efeito do comprimento de reactor com a montagem FIA de duplo canal.....III 25

III.9 Características gerais de funcionamento dos detectores tubulares selectivos de tripelenamina ..... III 26

III.10 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os detectores tubulares selectivos de tripelenamina ..... III 29

III.11 Resultados da determinação de tripelenamina em formulações farmacêuticas ..... III 30

IV.1 Determinações espectrofotométricas de prometazina em formulações farmacêuticas ..... IV 4

IV.2 Determinações espectrofotométricas de prometazina em formulações farmacêuticas que envolvem técnicas de fluxo ..... IV 6

IV.3 Determinações electro-analíticas de prometazina em formulações farmacêuticas que envolvem técnicas convencionais e de fluxo ..... IV 8

IV.4 Correspondência entre os elementos constituintes de cada membrana e a designação atribuída ..... IV 12

IV.5 Composição percentual das membranas sensoras preparadas ..... IV 12

IV.6 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de prometazina em soluções sem a força iónica ajustada ..... IV 20

IV.7 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de prometazina em soluções com a força iónica ajustada ..... IV 20

IV.8 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de prometazina em soluções com o pH e a força iónica ajustados ..... IV 21

IV.9 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os eléctrodos selectivos de prometazina convencionais ..... IV 25

IV.10 Efeito do volume de amostragem e da velocidade de fluxo com a montagem FIA de baixa dispersão ..... IV 29

IV.11 Efeito do comprimento de reactor com a montagem FIA de duplo canal ..... IV 30

IV.12 Características gerais de funcionamento dos detectores tubulares selectivos de prometazina ..... IV 31

IV.13 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os detectores tubulares selectivos de prometazina ..... IV 34

IV.14 Resultados da determinação de prometazina em formulações farmacêuticas ..... IV 35

V.1 Correspondência entre os elementos constituintes de cada membrana e a designação atribuída ..... V 11

V.2 Composição percentual das oito membranas sensoras preparadas ..... V 12

V.3 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de cefuroxima em soluções sem a força iónica ajustada ..... V 16

V.4 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de cefuroxima em soluções com a força iónica ajustada ..... V 17

V.5 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de cefuroxima em soluções com o pH e a força iónica ajustados ..... V 20

V.6 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os eléctrodos selectivos de cefuroxima convencionais ..... V 25

V.7 Efeito do volume de amostragem e da velocidade de fluxo com a montagem FIA de baixa dispersão ..... V 28

V.8 Efeito do comprimento de reactor com a montagem FIA de duplo canal ..... V 30

V.9 Características gerais de funcionamento dos detectores tubulares selectivos de cefuroxima ..... V 31

V.10 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os detectores tubulares selectivos de cefuroxima ..... V 34

V.11 Resultados da determinação de cefuroxima em formulações farmacêuticas ..... V 36

VI.1 Determinações espectrofotométricas de tetraciclina com base na formação de complexos corados com alguns metais ..... VI 4

VI.2 Algumas determinações espectrofotométricas de tetraciclina baseadas na sua reacção química com vários reagentes ..... VI 5

VI.3 Correspondência entre os elementos constituintes de cada membrana e a designação atribuída ..... VI 17

VI.4 Composição percentual das seis membranas sensoras preparadas. ..... VI 18

VI.5 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de tetraciclina em soluções sem a força iónica ajustada ..... VI 23

VI.6 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de tetraciclina em soluções com a força iónica ajustada ..... VI 24

VI.7 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de tetraciclina em soluções com o pH e a força iónica ajustados ..... VI 27

VI.8 Intervalos de pH operacional dos vários eléctrodos selectivos de tetraciclina ..... VI 28

VI.9 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os eléctrodos selectivos de tetraciclina convencionais ..... VI 31

VI.10 Efeito do volume de amostragem e da velocidade de fluxo com a montagem FIA de baixa dispersão ..... VI 34

VI.11 Efeito do comprimento de reactor com a montagem FIA de duplo canal ..... VI 35

VI.12 Características gerais de funcionamento dos detectores tubulares selectivos de tetraciclina ..... VI 36

VI.13 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os detectores tubulares selectivos de tetraciclina ..... VI 39

VI.14 Resultados da determinação de tetraciclina em formulações farmacêuticas ..... VI 42

VI.15 Valor percentual da dissolução de cápsulas de tetraciclina ..... VI 44

VII.1 Determinações discretas de dopamina baseadas em técnicas espectrofotométricas ..... VII 3

VII.2 Determinações espectrofotométricas de dopamina em fluxo ..... VII 4

VII.3 Correspondência entre os elementos constituintes de cada membrana e a designação atribuída ..... VII 10

VII.4 Composição percentual das membranas selectivas de periodato ..... VII 10

VII.5 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de periodato em soluções com a força iónica ajustada ..... VII 14

VII.6 Intervalos de pH operacional dos eléctrodos selectivos de periodato ..... VII 16

VII.7 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os eléctrodos selectivos de periodato convencionais ..... VII 17

VII.8 Efeito do comprimento do reactor ..... VII 22

VII.9 Efeito da velocidade de fluxo e do volume de amostragem ..... VII 23

VII.10 Efeito da concentração de periodato na solução de transporte ..... VII 26

VII.11 Parâmetros das curvas de calibração ..... VII 29

VII.12 Ensaios de recuperação do sinal analítico de soluções de dopamina contendo espécies possivelmente interferentes ..... VII 31

VII.13 Resultados da determinação de dopamina em formulações farmacêuticas ..... VII 33

VIII.1 Composição qualitativa das membranas seleccionadas ..... VIII 2

VIII.2 Características de funcionamento dos vários eléctrodos seleccionados, em condições de ajuste simultâneo dos valores de pH e de força iónica das soluções ..... VIII 3

A presente dissertação tem por objectivo estabelecer a simplificação de alguns procedimentos analíticos envolvidos no controlo de qualidade de produtos farmacêuticos, propondo-se para isso sistemas alternativos, baseados na análise por injecção em fluxo com detecção potenciométrica.

Neste sentido, descrevem-se, de um modo detalhado, eléctrodos selectivos às formas iónicas da tripelenamina, da prometazina, da cefuroxima e da tetraciclina, construídos com membranas poliméricas de condutor móvel. Numa tentativa de encontrar unidades com boas características de resposta, estabelecem-se várias membranas alternativas, aplicadas em eléctrodos com uma configuração convencional. A avaliação do comportamento destes eléctrodos conduz à selecção da membrana mais adequada a cada caso, com a qual se procede posteriormente à construção de detectores potenciométricos com uma configuração tubular. Estes detectores são então incorporados em sistemas de fluxo, simples e económicos, e as suas características de resposta determinadas.

Com as unidades potenciométricas preparadas com a membrana seleccionada, efectuam-se análises discretas e em fluxo de várias especialidades farmacêuticas. Os resultados obtidos são, sempre que possível, comparados com aqueles fornecidos pela execução de metodologias propostas em farmacopeias.

Propõe-se ainda a determinação de dopamina em formulações farmacêuticas, baseada na sua reacção de oxidação pelo periodato e recorrendo a um detector tubular selectivo a esta última espécie química. Este eléctrodo constitui também uma nova proposta na literatura e é avaliado na sua configuração convencional. O sistema de análise por injecção em fluxo estabelecido permite realizar a leitura "directa" da concentração de dopamina e é aplicado à análise de injectáveis. A qualidade dos resultados produzidos é avaliada por comparação com aqueles decorrentes de um procedimento analítico distinto.

The main purpose of the present thesis is to simplify analytical procedures involved in the quality control of pharmaceuticals, by using alternative systems based in the flow injection analysis technique with potentiometric detection.

For achieving this goal, electrodes selective to the ionic forms of tripelennamine, promethazine, cefuroxime and tetracycline, comprising mobile carrier polymeric membranes are described. In order to find units with adequate characteristics of response, several alternative membranes, applied in conventional configuration detectors, are proposed. Evaluation of these electrodes response characteristics defines the more appropriate membrane for each drug, with which tubular potentiometric detectors are further constructed. The working characteristics of these detectors are latter evaluated under simple and low cost flow systems.

Several commercial pharmaceutical formulations are analysed with the potentiometric units comprising the selected membranes. Whenever possible, all of the results are compared with the values obtained by a procedure proposed in the pharmacopoeias.

Furthermore, the dopamine oxidation by periodate is proposed for the determination of this drug in pharmaceuticals, where a tubular detector selective to the oxidising reagent is used. This electrode represents a new proposal in literature and is evaluated under its conventional configuration. The established system of flow injection analysis allows a "direct" reading of dopamine concentration and is applied to the analysis of injection forms. The quality of the obtained results is evaluated by comparison with values attained by a different analytical procedure.

Cette dissertation a comme objectif établir la simplification de quelques procédés analytiques prenant part dans le controle de qualité de produits farmaceutiques; pour cela, on propose des systèmes alternatifs se servant d'analyse par injection en flux avec détection potentiométrique.

Dans ce sens, on décrit, d'une manière détaillé, des électrodes sélectives aux formes ioniques de la tripelennamine, de la prométhazine, de la céfuroxime et de la tétracycline, construites avec des membranes polymériques de conducteur mobile. Dans une tentative de trouver des unités ayant des bonnes caracteristiques de réponse, on a conçu diverses membranes alternatives appliquées aux électrodes de configuration conventionnelle. L'évaluation du comportement de ces électrodes conduit à la selection de la membrane plus adéquate à chaque cas, avec laquelle on procéde postérieurment à la construction de détecteurs potentiométriques ayant une configuration tubulaire. Ces détecteurs sont, alors, incorporés dans des systèmes en flux, simples et économiques, et leurs caracteristiques de réponse déterminées.

Avec les unités potentiométriques de membranes sélectionnées pour avoir des caracteristiques plus adéquates, on a éfectué des analyses discrètes et en flux de diverses spécialités pharmaceutiques. Les résultats obtenus sont, quand c'est possible, comparés avec ceux fournis par l'éxécution de méthodologies proposées par la pharmacopée.

On propose, aussi, la détermination de la dopamine dans des formulations pharmaceutiques basée sur sa reaction d'oxydation par le periodate et se servant d'un détecteur tubulaire sélectif à cette dernière espèce chimique. Cette électrode constitue aussi une nouvelle proposition dans la literature et est évaluée dans sa configuration conventionnelle. Le système d'analyse par injection en flux établi permet de réaliser une lecture "directe" de la dopamine et est appliqué à l'analyse d'injectables. La qualité des résultats produits est evaluée par la comparation avec ceux obtenus par un procédé analytique distinct.

A presente dissertação está organizada em oito capítulos.

O CAPÍTULO I apresenta uma reflexão acerca da necessidade do controlo de qualidade em formulações farmacêuticas e dos métodos analíticos envolvidos na sua concretização. Apresenta também uma abordagem geral acerca da utilização de sistemas FIA acoplados a eléctrodos selectivos no controle de produtos farmacêuticos.

Tendo em vista evitar algumas repetições exaustivas, o CAPÍTULO II refere-se à descrição de material, equipamento e metodologias de avaliação envolvidas nos capítulos que se sucedem.

Os CAPÍTULOS III, IV, V e VI apresentam a construção, caracterização, incorporação em sistemas FIA e aplicação de eléctrodos selectivos a tripelenamina, prometazina, cefuroxima e tetraciclina, respectivamente, e apresentam-se organizados de uma forma similar. Cada uma destes capítulos é iniciado pela abordagem dos diferentes procedimentos analíticos propostos na literatura para a determinação daqueles compostos em formulações farmacêuticas. Após a descrição da parte experimental particular de cada capítulo, descreve-se a construção de vários eléctrodos selectivos com configuração convencional, distintos entre si apenas pela presença de diferentes membranas sensoras. A caracterização das várias unidades conduz à selecção de uma membrana para a construção de eléctrodos com configuração tubular, referindo-se a sua incorporação e caracterização em sistemas FIA. Numa fase final, os ISEs com melhores características de funcionamento são aplicados na análise de especialidades medicamentosas, que apresentam a espécie em avaliação, em ensaios discretos e em fluxo.

O CAPÍTULO VII refere a determinação indirecta de dopamina através da sua oxidação na presença de periodato. Recorrendo a um eléctrodo selectivo a esta espécie inorgânica e incorporando-o numa montagem FIA, cujas condições são devidamente estudadas, descreve-se a leitura directa da dopamina injectada no sistema. A utilidade analítica dos procedimentos estabelecidos é testada pela análise das formulações comerciais disponíveis.

O CAPÍTULO VIII apresenta as conclusões gerais da dissertação, salientado-se a aplicabilidade dos sistemas implementados em análises de rotina na área farmacêutica.

Capítulo I

INTRODUÇÃO

I.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A arte de "curar" surge com a utilização de drogas presentes em produtos naturais, na sua grande maioria plantas. O efeito decorrente da administração de uma determinada droga é contudo variável com a fonte, época, método de recolha e com a sua preparação. Essa variabilidade traduz-se em variações do conteúdo de princípio activo e pode mesmo conduzir a efeitos nefastos, sobretudo quando se trata de drogas com efeito "muito potente". Entre outros, aquele factor determina que a substituição da utilização de produtos naturais íntegros, pelos seus extractos purificados ou por compostos quimicamente preparados seja progressivamente implementada, tendo início sobretudo na primeira metade do século XVI, com Paracelcus (Johnson, 1986).

A aplicação em medicina de drogas que quimicamente simulavam os efeitos produzidos por compostos genuinamente extraídos de plantas desperta então a necessidade do seu controlo analítico. O crescimento desta preocupação torna-se aliás evidente através das várias farmacopeias estabelecidas, em vários países, entre 1900 e 1950. Após este período, assiste-se ao aparecimento impulsivo de uma nova era na análise de drogas, traduzida pela introdução nessas farmacopeias de novas metodologias analíticas. Entre estas, surgem, ao longo da década de 50, a complexometria, a titulação em meio não aquoso, a cromatografia gás-líquido e a cromatografia em camada fina, conjuntamente com a crescente aplicação dos métodos ópticos, sobretudo ultravioleta/visível e infravermelho (Johnson, 1986).

O aparecimento de problemas de saúde decorrentes da administração de fármacos, entre os quais o caso da talidomida é sem dúvida o mais reconhecido, desperta claramente a atenção da população em geral e da classe política em particular, conduzindo a um conceito de controlo da qualidade mais amplo. Neste sentido, o laboratório de química-analítica de uma indústria farmacêutica dá então lugar ao departamento de controlo de qualidade, onde muitos interesses e preocupações se traduzem em conceitos de segurança da qualidade, boas normas de fabrico, inspecção e licença da produção.

Actualmente, o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica pressupõe uma série de etapas, destacando-se:

1. síntese, em pequena escala, de uma série de compostos orgânicos para os quais se espera, teoricamente, o desenvolvimento de actividade biológica;
2. testes farmacológicos dos compostos;
3. selecção de um (ou mais) dos compostos para estudos posteriores;
4. síntese do composto em pequena escala;
5. estudos toxicológicos, desenvolvimento analítico e de pre-formulação;
6. investigação da nova formulação;
7. síntese de um lote, ligeiramente maior, do composto;

8. testes clínicos de fase I (farmacologia clínica);
9. testes clínicos de fase II (avaliação da dose, efeitos laterais e biodisponibilidade);
10. testes clínicos de fase III;
11. primeira produção de lote (completa ou parcial);
12. aplicação da nova formulação;
13. produção de lotes (estudos de estabilidade);
14. produção de rotina (exclusão do lote de estabilidade);
15. possível alteração da fórmula (estudos de estabilidade).

Esta lista varia, em alguns aspectos, de indústria para indústria (Carstensen, em *Drug Stability*, 1990).

Neste sentido, e de um ponto de vista analítico, o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica requer, entre outros, testes biológicos, nomeadamente avaliações de mutagenecidade, carcinogenecidade, toxicidade, farmacodinâmica, farmacocinética, etc.. Estas análises, que decorrem apenas durante as primeiras etapas de desenvolvimento de uma formulação (Johnson, 1986), despertam a procura de novas técnicas analíticas de elevada sensibilidade, selectividade, precisão e exactidão, que permitem a determinação tanto da substância activa como dos seus metabolitos em fluidos biológicos e tecidos.

Além dos testes biológicos, incluem-se também estudos químicos detalhados das matérias primas, de intermediários sintéticos do próprio fármaco e do produto na formulação final. Estes estudos devem identificar tipos e níveis de impurezas, produtos e velocidades de degradação e, ainda, métodos analíticos adequados à monitorização destes factores. As fontes prováveis de problemas de segurança e os procedimentos do controlo da qualidade e especificações do produto ficam assim definidos, tendo sempre como objectivo obedecer aos requisitos impostos pelas devidas agências regulamentares, nacionais ou estrangeiras (Schirmer, em *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*, 1982).

O esforço analítico envolvido no desenvolvimento e comercialização de uma formulação pode ser subdividido numa série de tarefas como:

- determinação da identidade e pureza das matérias primas e intermediários usados na produção do fármaco;
- determinação da identidade e pureza do fármaco;
- isolamento e identificação de impurezas vestigiárias no fármaco;
- determinação de velocidade e produtos de degradação do fármaco;
- determinação da identidade e pureza dos excipientes usados na manufactura dos produtos formulados;
- determinação da identidade do fármaco no produto formulado;
- determinação de velocidade e produtos de degradação do produto formulado;
- estabelecimento de um padrão de referência analítica para o fármaco.

Os requisitos da selectividade, precisão, exactidão e o grau de complexidade do procedimento analítico que é aceitável variam consideravelmente de tarefa para tarefa, pelo que surge a necessidade de recorrer a uma variedade de técnicas analíticas para o seu desempenho (Schirmer, em *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*, 1982).

Uma vez definido e validado um processo de fabrico, existe então a necessidade de um controlo constante para cada lote produzido, no sentido de garantir a qualidade, segurança e eficácia do produto comercial, devendo cada lote encontrar-se devidamente documentado, no que se refere aos vários estágios da produção.

I.2 O CONTROLO DA QUALIDADE DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICOS COMERCIAIS

A implementação do controlo da qualidade numa indústria farmacêutica deve-se à necessidade dos medicamentos para uso humano corresponderem exactamente a padrões relacionados com a sua qualidade, segurança e eficácia (Stenlake *et al.*, em *Practical Pharmaceutical Chemistry*, 1988). De uma forma ampla, o controlo da qualidade é definido como o controlo diário da qualidade dos produtos preparados por uma determinada empresa. Na indústria farmacêutica, o controlo da qualidade envolve uma equipe de cientistas e técnicos, responsáveis por aceitar ou rejeitar as matérias primas e os materiais de embalagem, pelo número indefinido de inspecções e testes ao longo do processo de fabrico, por assegurar o controlo e monitorização dos vários sistemas estabelecidos e, ainda, por aprovar ou rejeitar as formulações farmacêuticas preparadas (Erskine, em *Remington's*, 1990). O controlo da qualidade inclui por isso testes analíticos do produto acabado e a avaliação de todas as operações, começando com a recepção das matérias primas e continuando ao longo da produção, operações de embalagem, testes do produto acabado, documentação e distribuição.

Neste sentido, estabelecem-se genericamente especificações e padrões para as várias formulações farmacêuticas. As especificações são concebidas com o objectivo primordial de assegurar o uso de materiais e de processos de manufactura adequados, enquanto que os padrões surgem como resultado da variabilidade de um determinado processo de fabrico, da estabilidade de um produto e das limitações dos métodos usados nos testes de verificação. Os procedimentos envolvidos na concretização destes objectivos dependem não apenas da forma farmacêutica em questão, mas também de uma mistura complexa de factores que incluem a natureza e propriedades da substância activa, a dosagem e via de administração, os

excipientes usados na manufactura do produto e a estabilidade em condições normais de armazenamento (Watt, em *Practical Pharmaceutical Chemistry*, 1988).

A avaliação da segurança e da eficácia das formulações farmacêuticas, bem como a sua manutenção prática, encontra-se por isso dependente da existência de métodos adequados para o controlo da qualidade do produto. Neste sentido, os métodos analíticos desempenham aqui um papel fundamental (Gorog *et al.*, 1994).

Os procedimentos analíticos desenvolvidos e estabelecidos para o controlo de qualidade de um produto que se definiu como comercial devem incluir métodos qualitativos e quantitativos de forma a assegurar a identidade e a pureza de um produto. Nas especificações de um produto incluem-se, entre outros, testes de identificação, testes de impurezas, *screen* cromatográfico e a determinação da quantidade de um fármaco (Watt, em *Practical Pharmaceutical Chemistry*, 1988).

Os testes de identificação visam confirmar a identidade do componente principal de um lote de material de partida ou formulação e podem incluir testes de cor, ponto de fusão do fármaco ou seu derivado, formação de precipitados, espectro de IV ou RMN, espectro de massa, padrão de raio-X do pó, mobilidade cromatográfica, rotação óptica, índice de refracção, etc. (Schirmer, em *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*, 1982).

Os testes de impurezas específicas visam o controlo da quantidade de impurezas particulares ou de um grupo de impurezas no produto, tais como água, solventes, metais e traços de impurezas orgânicas. Para estes pode recorrer-se a vários métodos quantitativos, quer absolutos, quer relativos, ou então a testes limite semi-quantitativos. Estes últimos podem incluir a comparação do tamanho ou da cor das manchas produzidas em placas de cromatografia em camada fina, etc. (Schirmer, em *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*, 1982).

O *screen* cromatográfico tem por objectivo o exame quantitativo de um produto relativamente a impurezas, incluindo contaminantes não encontrados anteriormente. Para este estudo recorre-se geralmente a cromatografia em papel, camada fina,

gasosa ou líquida de alta pressão, electroforese, etc. (Schirmer, em *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*, 1982).

A análise quantitativa de um fármaco visa determinar a pureza percentual de um fármaco ou o seu conteúdo numa formulação. A importância do controlo analítico deste parâmetro decorre de uma possível alteração química da substância activa durante o seu armazenamento, da existência de um erro de fabrico por incorporação de quantidades diferentes daquelas previstas para o produto final, etc.. Neste sentido, as farmacopeias estabelecem, para cada caso, limites de tolerância. Podem utilizar-se aqui métodos absolutos, como titulações, gravimetrias, calorimetria de varrimento diferencial, coulometria, espectroscopia de RMN, análise de solubilidade de fases, ou métodos relativos, incluindo-se aqui usualmente a cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta pressão (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), espectroscopia de UV/Vis ou de Infravermelho, fluorimetria, polarografia e ensaios microbiológicos (Schirmer, em *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*, 1982).

Além daqueles testes, existem outros que são aplicáveis apenas em situações particulares. A determinação da velocidade de dissolução de uma preparação sólida e a caracterização da uniformidade de teor do fármaco num lote de fabrico constituem exemplos desta situação.

A importância actual dos ensaios de dissolução relaciona-se sobretudo com a biodisponibilidade do fármaco veiculado. Naturalmente, e salvo raras excepções, pressupõe-se que, por exemplo, um comprimido sofra desagregação, i.e., desintegração mais ou menos rápida, quando entra em contacto com líquidos aquosos. Este processo decorre em duas fases: na primeira há a desintegração até aos grânulos que originam o comprimido e na segunda os grânulos desintegram-se, obtendo-se o pó que serviu para os preparar (Figura I.1). O conhecimento da velocidade de desagregação não fornece contudo informações adequadas relativamente à libertação dos princípios activos de baixa solubilidade em solução

aquosa (Prista *et al.*, em *Tecnologia Farmacêutica*, 1995). Efectivamente, neste caso particular, a biodisponibilidade do fármaco encontra-se grandemente associada à velocidade da sua dissolução ao nível dos fluídos biológicos.

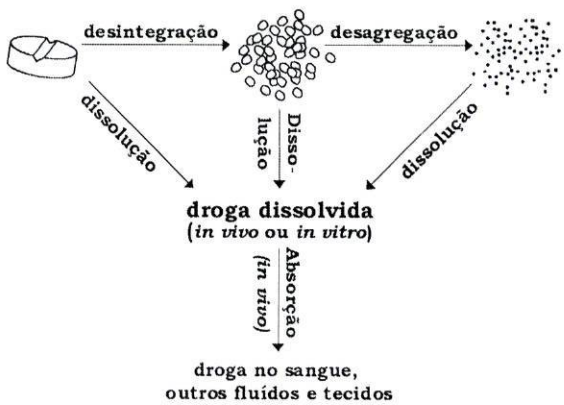


Figura I.1 Fases decorrentes da administração de uma forma sólida por via oral.

Neste sentido, e sobretudo para os fármacos pouco solúveis em solução aquosa, a tendência geral das diferentes farmacopeias consiste em substituir progressivamente o ensaio de desagregação pelo de dissolução. As monografias propostas indicam, genericamente, a quantidade mínima de fármaco a dissolver num período de tempo determinado e perante condições de ensaio particulares. As condições seleccionadas simulam as condições fisiológicas inerentes ao decorrer deste processo, constituindo por isso ensaios *in vitro* (Figura I.1) (Banakar, em *Pharmaceutical Dissolution Testing*, 1992).

No que se refere à uniformidade do teor de fármaco em formulações farmacêuticas, a sua avaliação visa garantir uma distribuição "uniforme" do fármaco pelas várias unidades de um lote de fabrico. Este ensaio, que constitui também um requisito legal especificado em várias farmacopeias, relaciona-se com a uniformidade de massa das formas farmacêuticas sólidas, que se deseja ser mínima dentro de cada lote de fabrico. Em termos práticos, torna-se impossível que todas as unidades do

mesmo lote apresentem pesos rigorosamente iguais, diminuindo essa variação à medida que aumenta o peso da forma farmacêutica. Naturalmente, a realização dos ensaios de uniformidade de teor é de maior importância quanto menor a quantidade de fármaco incorporado na formulação.

A *United States Pharmacopoeia* (USP) aplica-os por isso a comprimidos, drageias e cápsulas que contenham quantidades de fármaco inferiores a 50 mg e define os limites de tolerância para os valores encontrados (Prista *et al.*, em *Tecnologia Farmacêutica*, 1995). Em termos práticos, estes ensaios são realizados para uma amostra de um lote e em nada se distinguem dos ensaios de doseamento do fármaco, com excepção de que cada unidade da amostra é tratada individualmente.

Genericamente, os procedimentos envolvidos nas especificações de um produto devem, então, ser adequados a um uso de rotina laboratorial, pelo que deverão ser escolhidos os mais simples e rápidos. A escolha de um método de análise depende do propósito qualitativo, quantitativo ou semi-quantitativo do ensaio em questão e da complexidade da amostra. A quantidade e a pureza desta, junto com as disponibilidades económicas e de técnicas instrumentais constituem parâmetros determinantes para a escolha de um método de análise (Avendano, em *Introduccion a la Quimica Farmaceutica*, 1993).

I.2.1 A ANÁLISE QUANTITATIVA DE UM FÁRMACO INCORPORADO EM FORMULAÇÕES

Para a análise quantitativa de fármacos veiculados em formulações farmacêuticas, as mais diversas farmacopeias referem frequentemente várias etapas preliminares de preparação das amostras, que incluem sobretudo vários processos extractivos repetidos (Schirmer, em *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*, 1982). Este procedimento visa conseguir a separação do fármaco, a determinar, do veículo ou base da formulação ou, ainda, de eventuais substâncias activas presentes.

Apesar disso, a preparação da amostra conduz, na maioria das situações, a interferências de compostos quimicamente aparentados. O elevado número de manipulações aqui envolvido aumenta também a probabilidade da ocorrência de erros aleatórios. Neste sentido, as determinações daqui decorrentes tornam-se menos exactas e/ou precisas, além de não se adequarem às análises de rotina requeridas no controlo da qualidade de um produto em fabrico.

Não será pois surpreendente que estes métodos clássicos de separação tenham dado lugar, em numerosas monografias apresentadas nas mais recentes edições das farmacopeias, aos métodos instrumentais correspondentes. As técnicas instrumentais separativas são também aquelas que predominam na escolha dos vários investigadores, em trabalhos dedicados à análise de formulações farmacêuticas (Figura I.2).

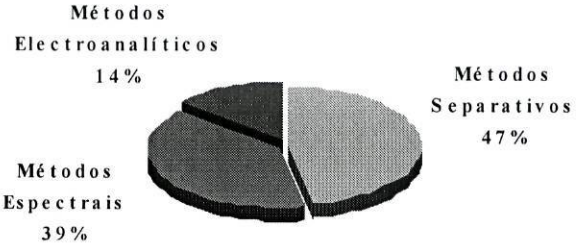


Figura I.2 Distribuição percentual da aplicação dos vários métodos instrumentais na determinação de compostos com interesse farmacêutico, na década de 90.

Por entre as várias técnicas instrumentais separativas destacam-se claramente a cromatografia, com cerca de 94% dos trabalhos realizados. A técnica cromatográfica mais utilizada é baseada em sistemas de HPLC, associados a um detector, mais ou menos, "universal". O sistema de detecção mais frequentemente utilizado é um espectrofotómetro de ultravioleta/visível, sintonizado usualmente a um comprimento de onda da região ultravioleta.

Embora os procedimentos estabelecidos com estes sistemas forneçam resultados de boa precisão e exactidão, podendo ser implementados quer com um objectivo quantitativo, quer com um objectivo qualitativo, eles envolvem algumas manipulações das amostras, particularmente desarejamento e filtração, e longos períodos de condicionamento de uma coluna de separação apropriada. A sua implementação em controlo analítico de rotina poderá não ser a mais adequada, pela impossibilidade de realização de análises expeditas. Adicionalmente, o equipamento aqui envolvido é dispendioso e requer pessoal especializado para o seu funcionamento, o que sugere a procura de técnicas alternativas.

Integrada nos métodos espectrais, a espectrofotometria de absorção na região ultravioleta/visível constitui também uma alternativa frequentemente apresentada, tanto nas monografias das farmacopeias, como nas vários trabalhos publicados na literatura (Figura I.2). Contudo, quando não associada a técnicas instrumentais de separação, o procedimento envolvido pressupõe geralmente um processo preliminar clássico, que conduza ao isolamento do analito dos restantes constituintes da amostra. Este procedimento decorre sobretudo da interferência na leitura analítica, exercida vulgarmente pelos vários compostos veiculados numa formulação farmacêutica. Além disso, o recurso a técnicas baseadas em radiações electromagnéticas deixa antever algumas dificuldades analíticas, inerentes à coloração, turvação, índice de refracção, etc., das amostras.

No que se refere aos métodos electro-analíticos, a sua referência nas monografias das farmacopeias cinge-se habitualmente ao eléctrodo de vidro para a determinação do pH das soluções. Comparativamente aos métodos separativos e espectrais, estes métodos são também os menos referidos na literatura para a análise de formulações farmacêuticas (Figura I.2). Por entre os vários métodos electro-analíticos, as técnicas de menor destaque na literatura são as condutimétricas, coulométricas, amperométricas e voltamétricas (Figura I.3). Talvez a sua falta selectividade, pressupondo usualmente um tratamento prévio da matriz

farmacêutica, e a dificuldade de operação em análises de rotina, sejam aspectos contribuintes para esta situação.

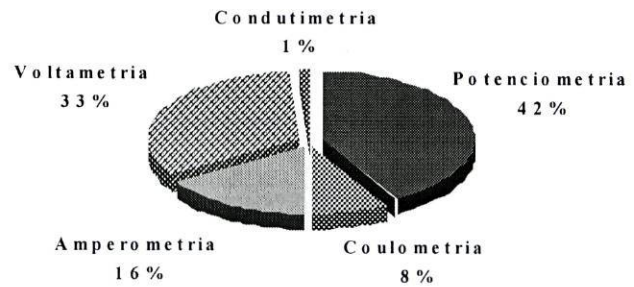


Figura I.3 Distribuição percentual da aplicação dos vários métodos electro-analíticos na determinação de compostos com interesse farmacêutico, na década de 90.

Contrariamente ao exposto, uma técnica electro-analítica que comprovou a possibilidade de estabelecer a determinação directa e selectiva de compostos orgânicos de interesse farmacêutico, sem recorrer, na maioria das vezes, à separação do analito, é a potenciometria quando baseada em eléctrodos selectivos de ião (ISEs, do inglês *Ion Selective Electrodes*) (Cosofret *et al.*, 1993).

Embora não específicos, estes detectores apresentam geralmente uma elevada selectividade para o fármaco a determinar, o que torna possível estabelecer metodologias simples e económicas, fáceis de operar em rotina laboratorial por técnicos não especializados. Recorde-se que estas análises requerem apenas, na maioria dos casos, a diluição da amostra (ex.: injectáveis) e/ou dissolução da mesma (ex.: comprimidos) em solvente adequado, usualmente uma solução tampão ajustadora do valor de pH e de força iónica das soluções.

Os ISEs apresentam também intervalos de resposta analítica alargados, geralmente compreendidos entre 10^{-2} e 10^{-5} mol L^{-1}, com limites de detecção da ordem dos 10^{-6} ou 10^{-7} mol L^{-1}. Quando a metodologia envolvida inclui procedimentos de pré-concentração do analito, torna-se possível alcançar limites de detecção para

os detectores potenciométricos que igualam ou suplantam aqueles fornecidas por técnicas bem mais sofisticadas e dispendiosas.

Com algumas excepções, os ISEs respondem também com grande rapidez, usualmente em períodos de tempo inferiores a 30 segundos, dependendo contudo do tipo de ISE em questão e da concentração do analito. Os eléctrodos de enzimas e aqueles construídos com base em agentes microbianos ou em tecidos de plantas constituem as excepções a esta situação (Raluca *et al.*, 1997).

Muitos dos sensores presentes nas membranas dos ISEs podem ser também aplicados em versões miniaturadas destas unidades potenciométricas, construídas com materiais não tóxicos e estéreis, compatíveis portanto com as condições fisiológicas. Esta situação abre a possibilidade da aplicação dos ISEs *in vivo* em análises biomédicas, constituindo os *ion-selective field effect transistors* um exemplo promissor nesta área analítica (Raluca *et al.*, 1997).

Além das vantagens enunciadas, é de salientar o baixo custo dos detectores e do equipamento por ele requerido. Neste sentido, o tempo e o custo envolvidos numa determinação analítica com eléctrodos selectivos de membrana são francamente reduzidos. Estes aspectos podem ser ainda substancialmente melhorados quando se opta pela incorporação destes detectores em sistemas de análise por injecção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*).

I.3 OS ELÉCTRODOS SELECTIVOS DE IÃO NA ÁREA FARMACÊUTICA

De acordo com as recomendações da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), 1994, o ISE é um sensor electroquímico, baseado num pequeno filme ou numa membrana selectiva como elemento de reconhecimento, o que os torna distintos de outros sistemas que envolvem reacções redox (eléctrodos de ordem 0 e de 1ª, 2ª e 3ª espécie), apesar de muitas vezes conterem um eléctrodo de segunda espécie como eléctrodo de referência "interno". O ISE tem que ser usado conjuntamente com um eléctrodo de referência (i.e., eléctrodo de referência "externo") para formar uma célula electroquímica completa.

As diferenças de potencial medidas (potencial ISE *vs.* potencial de eléctrodo de referência "externo") são linearmente dependentes do logaritmo da actividade de um dado ião em solução, sendo a principal componente desta resposta a Energia Livre de *Gibbs* associada à transferência de massa (por troca-iónica, extracção de solvente ou outro mecanismo) através da interface com uma membrana selectivamente permeável (Morf, em *The Principals of Ion-Selective Electrodes and of Membrane Transport*, 1981).

De acordo com o tipo de membrana que incorporam ou com o mecanismo envolvido no seu funcionamento, os ISEs podem subdividir-se em eléctrodos selectivos de ião primário, de membrana múltipla ou de compostos e de contacto metálico ou *all solid state* (IUPAC, 1994). Dentro da primeira categoria incluem-se os eléctrodos cristalinos, homogéneos ou heterogéneos, e os não cristalinos, de matriz rígida ou de condutor móvel.

No que se refere à preparação de eléctrodos selectivos a espécies orgânicas de interesse farmacêutico, são os ISEs de condutor móvel aqueles que apresentam particular interesse (Cosofret *et al.*, 1993), muito embora sejam também referidos na

literatura da presente década algumas unidades de membrana cristalina e de membrana múltipla ou de compostos, aplicadas à área farmacêutica (tabela I.1). Dentro desta última categoria incluem-se os eléctrodos sensores de gás e os de substracto de enzima.

tabela I.1 Membranas cristalinas e de sensores de gás ou de substracto de enzima, utilizadas na preparação de eléctrodos selectivos às formas iónicas de fármacos veiculados em formulações farmacêuticas.

Espécie farmacêutica	Tipo	membrana	Referência Bibliográfica
Amiodarone	Cristalina, heterogénea	Amiodarone•dipicrilamónio Nitrobenzeno Grafite	Stefan *et al.*, 1996/A
Cilazapril	Cristalina, heterogénea	Derivado de β-ciclodextrina Óleo de parafina Grafite	Stefan *et al.*, 1999
Clorfeniramina	Cristalina, heterogénea	Tetrafenilborato em resina de ureia/formaldeído e prata	Huang *et al.*, 1996
Disopiramida	Cristalina, heterogénea	Disopiramida•dipicrilamónio Nitrobenzeno Grafite	Stefan *et al.*, 1996/B
		Disopiramida•Sulfato de laurilo Nitrobenzeno Grafite	Stefan, 1997/B
Enalapril	Cristalina, heterogénea	Derivado β-ciclodextrina Óleo de parafina Grafite	Enein *et al.*, 1999
Flecainida	Cristalina, heterogénea	Flecainida•Dipicrilamónio Flecainida•sulfato de laurilo Nitrobenzeno Grafite	Stefan *et al.*, 1997/C
Lisina	Substrato de enzima	Lisina oxidase imobilizada em eléctrodo selectivo de amónio	Saurina *et al.*, 1999
Metomidato	Cristalina, heterogénea	Metomidato•dipicrilamónio Nitrobenzeno Grafite	Stefan *et al.*, 1996/C
Mexiletina	Cristalina, heterogénea	Mexiletina•dipicrilamónio Nitrobenzeno Grafite	Stefan *et al.*, 1995
Moclobemida	Cristalina, heterogénea	Moclobemida•sulfato de laurilo Nitrobenzeno Grafite	Stefan, 1997/B
Penicilina	Substrato de enzima	β-Lactamase em eléctrodo selectivo de H^+	Thust *et al.*, 1996
			Koncki *et al.*, 1996
Pentopril	Cristalina, heterogénea	Derivado β-ciclodextrina Óleo de parafina Grafite	Stefan *et al.*, 1999
Tamoxifeno	Cristalina, heterogénea	Tamoxifeno•dipicrilamónio Tamoxifeno•sulfato de laurilo Nitrobenzeno Grafite	Stefan *et al.*, 1997/A
Taxol	Cristalina, heterogénea	Taxol•dipicrilamónio Taxol•sulfato de laurilo Nitrobenzeno Grafite	Stefan *et al.*, 1998
Trandolapril	Cristalina, heterogénea	Derivado β-ciclodextrina Óleo de parafina Grafite	Stefan *et al.*, 1999
Vitamina C	Cristalina, homogénea	Derivado de ftalocianina de cobalto (II)	Li *et al.*, 1995/B
	Substrato de enzima	Ascorbato oxidase imobilizado em co-polímero de etileno-acetato de vinilo, aplicado em suporte condutor de grafite	Fernandes *et al.*, 1999

I.3.1 OS ELÉCTRODOS DE MEMBRANA DE CONDUTOR MÓVEL SELECTIVOS A FÁRMACOS

Os ISEs de condutor móvel apresentam membranas selectivas constituídas geralmente por três componentes: o sensor, o solvente mediador plastificante e um suporte imobilizador (Meyerhoff *et al.*, 1986). De acordo com o sensor presente nas membranas de condutor móvel, os ISEs podem ser positiva (ex.: sais de amónio quaternário) ou negativamente carregados (ex.: tetra-*p*-clorofenilborato), de condutor neutro (ex.: éteres de coroa) ou, ainda, de complexo de par-iónico (ex.: complexo de um composto orgânico catiónico com tetrafenilborato) (IUPAC, 1994).

A preparação de sensores para compostos orgânicos com interesse farmacêutico baseia-se sobretudo na formação de complexos de par-iónico. Existem dois tipos de equilíbrio que afectam o funcionamento destes eléctrodos de membrana: extracção/"re-extração" e complexação/"descomplexação". Este último tipo é o que mais afecta o potencial de membrana, traduzindo-se o seu efeito através das constantes de estabilidade dos complexos de par-iónico (Raluca *et al.*, 1997).

A selectividade dos eléctrodos de membrana é então devida ao equilíbrio competitivo, estabelecido na interface solução/membrana, e às constantes de estabilidade dos complexos de par-iónico entre o contra-ião da membrana e os iões presentes em solução (Raluca *et al.*, 1997). Esta notável característica confere-lhes assim grande utilidade na análise de amostras de elevada complexidade.

O particular interesse das membranas de condutor móvel para a preparação eléctrodos selectivos a espécies de interesse farmacêutico reside também na existência de um grande número de sistemas permutadores disponíveis, que possibilitam a construção de eléctrodos selectivos a quase todas as espécies iónicas (Lima *et al.*, 1987). Justifica-se assim o contínuo aparecimento na literatura de eléctrodos selectivos aos mais variados fármacos, como se demonstra na tabela I.2, cuja elaboração tem por base uma recolha bibliográfica referente à presente década.

tabela I.2 Membranas de condutor móvel em eléctrodos selectivos às formas iónicas de fármacos veiculados em formulações farmacêuticas.

Espécie farmacêutica	Permutador	Solvente mediador	Suporte	Referência Bibliográfica
Ácidos cólicos	Benzilhexadecilmetilamónio	*Bis*(2-etilexil)sebacato	PVC	Campanella *et al.*, 1993
Ácido iopanóico	Tetraoctilamónio	*p*-Nitrocumeno	—	Panagos *et al.*, 1995
Adifenina	Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	Issa *et al.*, 1990
Amitriptilina	Trifenilstilbenzilborato Tetrakis(2-clorofenil)borato	Dinonilftalato *o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Bunaciu *et al.*, 1991
	Reineckato	Nitrobenzeno	—	Elnemma *et al.*, 1993
Ampicilina	Fosfotungstato	Dioctilftalato	PVC	Rizk *et al.*, 1994
Amprolio	Tetrafenilborato Reineckato	Dioctilftalato	PVC	Issa *et al.*, 1998
Anfetamina	Diciclohexen-18-coroa-6	Cloroparafina	PVC	Watanabe *et al.*, 1996
	Trinitrobenzenosulfonato	Dibutilftalato	PVC	Badawy *et al.*, 1996
Aspirina®	Tetraaza[14]anuleno de Cu(II)	*o*-Nitrofeniloctiléter Dioctilsebacato Dioctilftalato	PVC	Ying *et al.*, 1998
	Carboxilato de organotin (IV)	*o*-Nitrofeniloctiléter Dinonilsebacato Dibutilftalato	PVC	Liu *et al.*, 1996
	Ftalocianina•Sn(IV) Tricaprilmetilamónio	Dinonilsebacato Dibutilftalato	PVC	Li *et al.*, 1995/A
	Tricaprilmetilamónio	Dibutilftalato Dibutilfosfato	PVC	Dumkiewicz *et al.*, 1992
	Tetradodecilamónio	Dibutilftalato	PVC	Su *et al.*, 1995
	Tetraoctilamónio	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Lima *et al.*, 1990/A
Atropina	Iodeto de bismuto	Dioctilftalato	PVC	Shesterova *et al.*, 1995
	Tetrakis(4-clorofenil)borato	*o*-Nitrofeniloctiléter Dibutilftalato	PVC	Alçada *et al.*, 1995
Bendazol	12-Fosfomolibdato	Dibutilftalato	PVC HC	Karandeeva *et al.*, 1998
Benzocaína	Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	Satake *et al.*, 1991
Bifonazol	12-Fosfomolibdato	Dibutilftalato	PVC HC	Karandeeva *et al.*, 1998
Buformin	Tetrafenilborato 5-Nitrobarbiturato	Dioctilftalato	PVC	Ahmed *et al.*, 1994
Bupivacaína	Derivado de β-ciclodextrina	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Kataky *et al.*, 1996
	Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	Satake *et al.*, 1991
Carbidopa	Trinitrobenzenosulfonato	Dibutilftalato	PVC	Badawy *et al.*, 1996
Ciclofosfamida	Tetrafenilborato	Dioctilftalato *o*-Nitrofeniloctiléter	PVC PVC-COOH	Hassan *et al.*, 1998/B
Ciclonamina	Batofenantrolina de Fe (II) Batofenantrolina de Ni (II)	Dioctilftalato	PVC	Hassan *et al.*, 1997

tabela I.2 Membranas de condutor móvel em eléctrodos selectivos às formas iónicas de fármacos veiculados em formulações farmacêuticas (continuação).

Espécie farmacêutica	Permutador	Solvente mediador	Suporte	Referência Bibliográfica
Ciprofloxacina	Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	Avsec *et al.*, 1992
Cinarizina	Tetratiocianato de Co (II)	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Hassan *et al.*, 1998/D
	Tetrafenilborato Flavionato Reineckato Dodecamolibdofosfato	Dioctilftalato	PVC	Hassan *et al.*, 1996/B
Cloroquina	Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	Hansen *et al.*, 1991
Clortetraciclina	Aureantia Tetrafenilborato Fosfomolibdato Silicotungstato	Dibutilftalato	PVC	Fuglein *et al.*, 1994
Clotrimazol	Fosfomolibdato	Dibutilftalato	PVC HC	Karandeeva *et al.*, 1998
Cocaína	Tetrakis[3,5-bis(trifluoro-metil)fenil]borato	Tetrakis(2-etilexil)-piromelitato	PVC	Watanabe *et al.*, 1995
	Reineckato	Dibutilsebacato	PVC	Campanella *et al.*, 1995
Codeína	Reineckato	Dioctilftalato Dioctilsebacato	PVC	Elnemma *et al.*, 1997/A
Diamorfina	Tetrafenilborato	Dioctilftalato Dibutilsebacato	PVC	Hassan *et al.*, 1990
Diazepam	Tetrafenilborato Silicotungstato	Dibutilftalato	PVC	Nie *et al.*, 1990
Dibenzepina	Fosfotungstato	Dioctilftalato Nitrobenzeno	PVC	Bouklouze *et al.*, 1991
Dibucaína	Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	Satake *et al.*, 1991
Diclofenac	Batofenantrolina de Ni (II)	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Hassan *et al.*, 1994
Difenidramina	Tetrafenilborato	*Bis*(2-etilexil)-sebacato	PVC	Erdem *et al.*, 1997
Dipiridamol	Fosfotungstato Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	Issa *et al.*, 1997
Doxepina	Tetrafenilborato	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Hopkala *et al.*, 1996
Efedrina	Reineckato	Dioctilftalato	PVC	Zareh *et al.*, 1998
	Tetrakis(4-clorofenil)borato	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Alçada *et al.*, 1992
Enalapril	Tricaprilmetilamónio	*n*-Dodecanol Dinonilftalato	PVC	Enein *et al.*, 1997
Etilefrina	Fosfotungstato Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	Shoukry *et al.*, 1996
Etilmorfina	Tetrafenilborato Tetrakis(4-clorofenil)borato	Dibutilsebacato Dioctilftalato	PVC	Hassan *et al.*, 1999/A
Fenobarbital	Tetraoctilamónio	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Lima *et al.*, 1990/C
Flufenazina	Fosfotungstato	Dioctilftalato Nitrobenzeno	PVC	Bouklouze *et al.*, 1991
Fluorouracilo	Batofenantrolina de Ni(II) Batofenantrolina de Fe(II) Batofenantrolina de Fe(III)	Dioctilftalato	PVC	Hassan *et al.*, 1998/C

tabela I.2 Membranas de condutor móvel em eléctrodos selectivos às formas iónicas de fármacos veiculados em formulações farmacêuticas (continuação).

Espécie farmacêutica	Permutador	Solvente mediador	Suporte	Referência Bibliográfica
Flurbiprofeno	Tricaprilmetilamónio	Dinonilftalato	PVC	Bunaciu *et al.*, 1995
Glafenina	Tetrafenilborato	*o*-Nitrofenilfeniléter	PVC	Ahmed *et al.*, 1995/B
L-Dopa	Trinitrobenzenosulfonato	Dibutilftalato	PVC	Badawy *et al.*, 1996
Ibuprofeno	Ferroína	Dioctilftalato	PVC	Hassan *et al.*, 1998/A
Ifosfamida	Tetrafenilborato	Ciclofosfamida	PVC PVC-COOH	Hassan *et al.*, 1998/B
Imipramina	Reineckato	Nitrobenzeno	—	Elnemma *et al.*, 1993
Iodipamida	Hexadeciltrimetilamóno	diutilftalato	PVC	Yao *et al.*, 1990
Labetalol	Tetrafenilborato	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Voulgaropoulos *et al.*, 1993
Lidocaína	Derivado β-ciclodextrina	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Kataky *et al.*, 1996
	Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	Satake *et al.*, 1991
Mepivacaína	Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	
Metformina	Reineckato Tungstosilicato	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Hassan *et al.*, 1999/B
	Fosfomolibdato	Dioctilftalato	PVC	Rizk *et al.*, 1995
	Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	Rizk *et al.*, 1993
Metildopa	Trinitrobenzenosulfonato	Dibutilftalato	PVC	Badawy *et al.*, 1996
Metixeno	Fosfotungstato	Dioctilftalato Nitrobenzeno	PVC	Bouklouze *et al.*, 1994
Mexiletina	Derivados de *o*-fenantrolina	Di-iso-octilsebacato	PVC	Zhang *et al.*, 1994
Mianserin	Dinonilnaftalenosulfonato	Dinonilftalato	PVC	Bunaciu *et al.*, 1994
Orfenadrina	Reineckato	Nitrobenzeno	—	Elnemma *et al.*, 1993
Papaverina	Iodeto de bismuto	Dioctilftalato	PVC	Shesterova *et al.*, 1995
	Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	Shoukry *et al.*, 1991
Pembutolol	Dinonilnaftalenosulfonato	Dinonilftalato	PVC	Ionescu *et al.*, 1993
Pilocarpina	Tetrakis(4-clorofenil)borato Tetrakis[3,5-bis(trifluoro-metil)fenil]borato	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Alçada *et al.*, 1994
	Reineckato	Tributilfosfato	PVC	Elnemma *et al.*, 1994
Piperazina	Derivado de fenantrolina	2-Nitrotolueno	PVC	Veltsistas *et al.*, 1994

tabela I.2 Membranas de condutor móvel em eléctrodos selectivos às formas iónicas de fármacos veiculados em formulações farmacêuticas (continuação).

Espécie farmacêutica	Permutador	Solvente mediador	Suporte	Referência Bibliográfica
Piricapiron	Molibdofosfato Fosfotungstato	Tricresilfosfato Dioctilftalato Dibutilftalato	PVC	Sagadeeva *et al.*, 1997
Procaína	Flavianato	Dioctilftalato	PVC	Hamada *et al.*, 1993
	Derivado β-ciclodextrina	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Kataky *et al.*, 1996
Prilocaína	Derivado β-ciclodextrina	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	
Propilhexedrina	Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	Zareh *et al.*, 1992
Quinidina	Tetrakis(4-clorofenil)borato	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Alçada *et al.*, 1993
Ramipril	Tricaprilmetilamónio	*n*-Decanol Dinonilftalato	PVC	Enein *et al.*, 1997
Ranitidina	Reineckato Fosfotungstato Silicotungstato	*o*-Nitrofenilfeniléter	PVC	Hassan *et al.*, 1996/A
Salicilato	Tetradodecilamónio	Dibutilftalato	PVC	Su *et al.*, 1995
	Tetraoctilamónio	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Lima *et al.*, 1990/A
Tetracaína	Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	Satake *et al.*, 1991
Tetramisole	Tetrafenilborato Fosfotungstato	Dioctilftalato	PVC	Issa *et al.*, 1994
Tiamulin	Tetrafenilborato Fosfotungstato	Dibutilftalato Dioctilfenilfosfonato Nitrobenzeno Dioctilftalato *o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Marques *et al.*, 1997
Tizanidina	Fosfotungstato Tungstosilicato Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	Bouklouze *et al.*, 1992
Trazodone	Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	Khalil, 1999
Trimetropim	Fosfotungstato	Dioctilftalato	PVC	Aboudan *et al.*, 1996
	Reineckato Tetrafenilborato	Dioctilftalato	PVC	Ahmed *et al.*, 1995/A
Tripelenamina	Reineckato Tetrafenilborato Picrilsulfonato	Tributilfosfato	PVC	Elnemma *et al.*, 1997/B
Valproato	Metiltris(tetradecil)amónio	Decanol	PVC	Suzuki *et al.*, 1991
Vitamina B_1 e Vitamina B_6	Dinonilnaftalenosulfonato Tetrakis(2-clorofenil)borato	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Zhang *et al.*, 1990
	Tetrakis(2-clorofenil)borato	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Lima *et al.*, 1991
Warfarina	Ferroína	Dioctilftalato	PVC	Hassan *et al.*, 1998/A
Zopiclone	Tetrafenilborato Reineckato Fosfotungstato Silicotungstato	*o*-Nitrofeniloctiléter	PVC	Bouklouze *et al.*, 1994

HC: Hidrocelulose; PVC: poli(cloreto de vinilo); PVC-COOH: PVC carboxilado.

Os ISEs indicados na tabela I.2 envolvem cerca de 20 permutadores distintos, sendo os mais frequentemente utilizados os derivados de amónio quaternário e os derivados de fenilborato. É também referida uma ampla diversidade de solventes mediadores, entre os quais os alquilftalatos são claramente os mais utilizados, seguindo-se os derivados de feniléter. No que se refere à matriz polimérica, o poli(cloreto de vinilo) constitui, sem dúvida, o polímero de primeira escolha, muito embora a procura de alternativas constitua objecto de atenção de muitos investigadores (Thomas, 1986).

De um modo geral, a grande parte dos eléctrodos indicados na tabela I.2 apresenta a membrana sensora adaptada a um suporte físico que contém um eléctrodo e uma solução de referência internos (Craggs *et al.*, 1974). Para a sua preparação, a solução da membrana polimérica é depositada numa placa de vidro e a sua secagem é controlada com a ajuda de um papel de filtro preso na montagem (Figura I.4, A). Um círculo desta membrana é cortado e adaptado à extremidade de um tubo de PVC com a ajuda de uma cola constituída por PVC dissolvido em tetrahidrofurano (Figura I.4, B). O eléctrodo de referência interno é formado por um fio de Ag, enrolado, no qual se deposita AgCl electroliticamente (5-10 mA por 30 minutos, mergulhado numa solução de NaCl 0,1 mol L^{-1}, com um valor de pH ajustado a 11-12 unidades com uma solução de NaOH). Este fio encontra-se ligado ao decimilivoltímetro por um cabo eléctrico e um conector adequados. Este eléctrodo de referência "contacta" com a membrana polimérica por meio de uma solução de referência interna (Figura I.4, C).

Embora menos frequente, um outro tipo de construção reporta a eliminação da solução de referência interna, através da imobilização da membrana numa superfície condutora sólida. Dentro deste âmbito, Lima *et al.*, 1986, descreve a utilização de uma resina epoxídica à base de Ag, conectada electricamente ao sistema por meio de um cabo blindado e sobre a qual se aplica a solução da membrana sensora (Figura I.5).

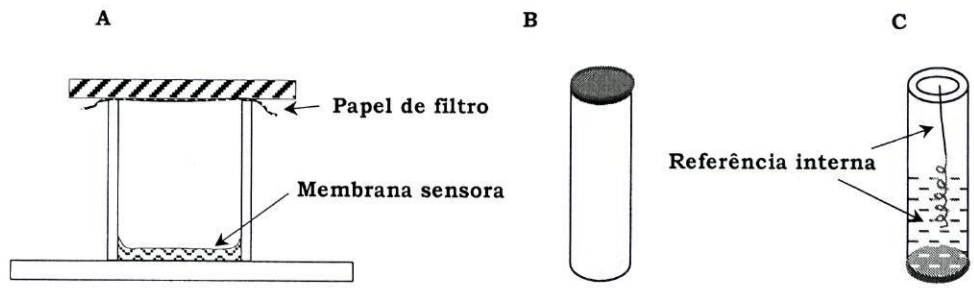


Figura I.4 Construção de eléctrodos de configuração convencional, de membrana polimérica e com solução de referência interna. A: preparação da membrana sensora; B: adaptação da membrana à extremidade do corpo do eléctrodo; C: eléctrodo e solução de referência internos.

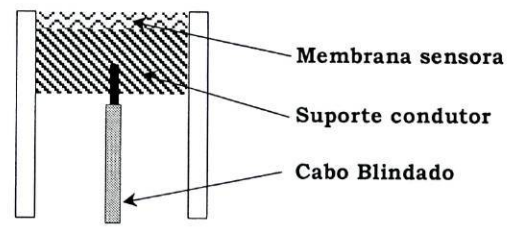


Figura I.5 Construção de eléctrodos de configuração convencional, de membrana polimérica e sem solução de referência interna. A membrana sensora é aplicada directamente num suporte condutor.

Por motivos económicos, este procedimento é posteriormente modificado por Lapa *et al.*, 1990, utilizando um suporte condutor composto por uma mistura de grafite com resina epoxídica não condutora. Este novo suporte apresenta flutuações de resistência eléctrica, mas de baixa magnitude. Aquela mistura é então depositada numa placa de Ag conectada ao cabo blindado (Figura I.6).

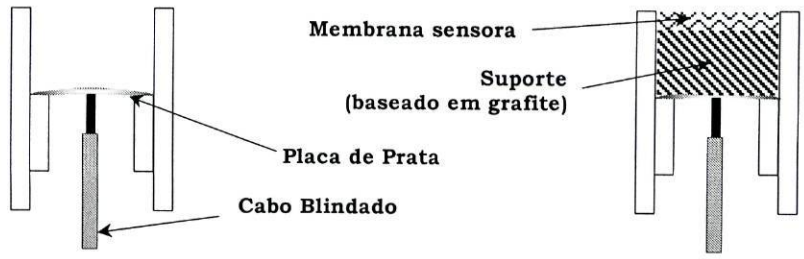


Figura I.6 Construção de eléctrodos de configuração convencional, de membrana polimérica e sem solução de referência interna. A membrana sensora é aplicada directamente num suporte condutor de grafite, em contacto eléctrico com uma placa de prata.

Comparativamente às unidades com solução de referência interna, estes eléctrodos apresentam uma maior estabilidade mecânica e tempos de vida mais longos. Este último parâmetro, frequentemente limitado pela difusão do complexo de par-iónico e do solvente mediador plastificante para a solução aquosa (Oesch *et al.*, 1980), parece ser determinado pelo carácter lipófilo daqueles constituintes e, no caso particular de construções com a solução de referência interna, pela pressão hidrodinâmica exercida por esta solução na membrana sensora (Moody *et al*, 1988). A ausência da solução de referência interna determina também que o manuseamento e a construção das unidades potenciométricas sejam simplificados e permite a recuperação do corpo do eléctrodo para outras aplicações da membrana, após completa remoção da anterior. Adicionalmente, da construção destas unidades resulta uma "economia" na membrana sensora, dado ser necessário apenas a quantidade de solução suficiente para preencher a cavidade deixada pelo suporte sensor.

Aparte das vantagens trazidas pelos eléctrodos de contacto sólido, sem solução de referência interna (Pedreno *et al.*, 1986), a ausência de um par redox termodinamicamente reversível na membrana suscita alguns problemas relacionados com a "transferência" da condução iónica da membrana para a condução eléctrica do

suporte. Essa dúvida é contudo esclarecida por Cattral *et al.*, 1975, e por Hulanicki *et al.*, 1976. Os autores indicam que a referência interna do sistema é estabelecida pelo contacto sólido e o oxigénio, assumindo que o oxigénio se difunde, desde a solução, através da membrana de PVC, até o equilíbrio ser estabelecido. Acima de tudo, o bom funcionamento de ISEs com este tipo de construção está comprovado para várias espécies orgânicas, nomeadamente atropina, efedrina, fenobarbital, pilocarpina, etc. (tabela I.2), através da sua aplicação analítica em amostras reais.

Independentemente da configuração do corpo do eléctrodo e das características intrínsecas a cada uma das unidades indicadas na tabela I.2, os trabalhos referidos estabelecem metodologias alternativas àquelas propostas nas monografias das mais variadas farmacopeias, atractivas pela sua simplicidade, rapidez e baixo custo. De uma forma geral, os ISEs indicados são genericamente aplicados na determinação da quantidade de fármaco presente em várias especialidades e formas farmacêuticas, embora alguns trabalhos pontuais refiram a sua aplicação na avaliação de outros parâmetros fundamentais para a garantida da qualidade dessas formulações. Entre estes, os ensaios de dissolução e de uniformidade de teor são aqueles mais frequentemente indicados, constituindo exemplos desta aplicação os eléctrodos selectivos de amiodarone, amitriptilina, flecainida, mexiletina, mianserin, penbutolol e salicilato indicados na tabela I.2. Os ISEs relativos ao amiodarone e ao taxol são ainda aplicados no controle analítico de matérias primas. Uma outra aplicabilidade analítica reporta-se a estudos de estabilidade de soluções de ciclofosfamida, recorrendo aos ISEs correspondentes.

As vantagens decorrentes das análises potenciométricas de produtos farmacêuticos podem contudo ser melhoradas, através da incorporação dos ISEs em sistemas FIA. A versatilidade e a automatização dos procedimentos analíticos conseguidas através destes sistemas, tornam a técnica FIA adequada a análises de rotina, conferindo-lhe por isso um interesse particular para a área farmacêutica.

I.4 A ANÁLISE POR INJECÇÃO EM FLUXO

A metodologia FIA é genericamente baseada na intercalação de pequenos volumes de amostra, rigorosamente medidos, num fluído transportador que os arrasta ao longo do sistema. Durante este processo, podem ocorrer interacções entre ambos, que vão desde uma simples diluição às reacções químicas mais complexas. Desde a sua implementação, com Ruzicka e Hansen, 1975, a metodologia FIA tem evoluído no sentido de estabelecer sistemas que permitam efectuar alguns procedimentos complexos no interior da montagem (Valcarcel *et al.*, em *Flow Injection Analysis*, 1987). Um exemplo representativo desta situação é a extracção líquido-líquido, conseguida habitualmente através de reactores de extracção e de membranas de separação de fases, colocados ao longo da montagem. Este procedimento é mais rápido e reprodutível que o ensaio discreto correspondente e elimina o contacto directo do operador com solventes tóxicos. Esta estratégia foi explorada em várias trabalhos voltados para a área farmacêutica, sendo um exemplo o trabalho estabelecido por Rychlovsky *et al.*, 1996, onde se determinam derivados fenotiazínicos por quantificação da absorvância originada pelo composto resultante da sua reacção com cromazurol S e posterior extracção para fase orgânica.

A versatilidade, a simplicidade e/ou o baixo custo que caracteriza os sistemas FIA motivou então a sua implementação na área farmacêutica, no sentido de solucionar alguns problemas analíticos aí encontrados. Neste sentido, desenvolvem-se estratégias que passam por explorar o carácter cinético das interacções que decorrem no interior dos sistemas, por incrementar o grau de automatização das análises ou por implementar o controlo em linha de muitas determinações (Castro *et al.*, 1987). Em muitas situações, aqueles objectivos são cumpridos estabelecendo sistemas com as mais variadas configurações e associando-os a um detector adequado.

Por entre as diversas configurações, estabelecidas nos vários trabalhos publicados ao longo da presente década, uma estratégia frequentemente utilizada na análise de produtos de índole farmacêutica relaciona-se com a incorporação nas montagens de reactores de fase sólida. Estes reactores imobilizam ou confinam o(s) reagente(s) num determinado ponto do sistema de fluxo contínuo, permitindo montagens mais simples, maior sensibilidade analítica, menor consumo de reagente, evitar possíveis interferências causadas pelo excesso de reagente a atingir o detector e, ainda, o uso ou a formação de reagentes instáveis em linha. Embora os reactores descritos na literatura compreendam diversos reagentes e envolvam a determinação de uma larga gama de fármacos com recurso a vários tipos de detectores, eles podem ser genericamente divididos em enzimáticos e não enzimáticos. Alguns dos trabalhos que envolvem estes reactores encontram-se indicados nas tabelas I.3 e I.4, respectivamente.

tabela I.3 Reactores de fase sólida enzimáticos, aplicados à análise de formulações farmacêuticas.

Enzima	Espécie Farmacêutica	Detecção	Referência Bibliográfica
Acetilcolinesterase	Galantamina	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Ghous *et al.*, 1998
	Neostigmina	Espectrofotometria ultravioleta/visível	
	Metrifonato	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Ghous *et al.*, 1996
Formato desidrogenase	Formato	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Ortega *et al.*, 1990
Glutamato desidrogenase	Glutamato	Fluorimetria	Stalikas *et al.*, 1994
Glutamato oxidase	Ácido glutâmico	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Stalikas *et al.*, 1993
β-lactamase	Penicilina	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Opstal *et al.*, 1990
Penicilina amidase		Potenciometria	Macca *et al.*, 1995
Penicilinase		Potenciometria	Duarte *et al.*, 1997
		Potenciometria	Li *et al.*, 1992
Salicilato mono-oxigenase	Ácido salicílico	Amperometria	Neumayr *et al.*, 1993
Tirosinase	Dopamina	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Ortega *et al.*, 1996
		Amperometria	

tabela I.4 Reactores de fase sólida não enzimáticos, aplicados à análise de formulações farmacêuticas.

Reagente imobilizado	Espécie Farmacêutica	Detecção	Referência Bibliográfica
Arsenite de cério (IV)	Prometazina	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Calatayud *et al.*, 1992
	Tioridazina	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Alapont *et al.*, 1996
	Flufenazina	Espectrofotometria absorção atómica	Ortiz *et al.*, 1993
Cádmio	Clordiazepóxido	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Montero *et al.*, 1990
Carbonato de cobalto	Cisteína	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Icardo *et al.*, 1998/A
Carbonato de cobre	Ácido salicílico	Espectrofotometria absorção atómica	Rivas *et al.*, 1995
	Glicina	Espectrofotometria absorção atómica	Mateo *et al.*, 1993
		Espectrofotometria absorção atómica	Calatayud *et al.*, 1991
Dióxido de chumbo	Metamizol	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Bautista *et al.*, 1996
	Ondansentron	Espectrofotometria absorção atómica	Zamora *et al.*, 1995
	Tioridazina	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Paz *et al.*, 1997
Dióxido de manganês	Epinefrina	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Kojlo *et al.*, 1990
	Epinefrina	Fluorimetria	Kojlo *et al.*, 1995/A
	Fenotiazinas	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Kojlo *et al.*, 1995/B
Fosfato de cobre	Clorpromazina	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Icardo *et al.*, 1998/B
	Tioridazina	Espectrofotometria ultravioleta/visível	
	Vitamina C	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Pereira *et al.*, 1998
Hexacianoferrato	Noradrenalina	Fluorimetria	Ortiz *et al.*, 1997
	Paracetamol	Fluorimetria	Calatayud *et al.*, 1990/A
	Promazina	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Kojlo *et al.*, 1993
	Vitamina B_1	Fluorimetria	Calatayud *et al.*, 1990/B
Luminol	Vitamina B_{12}	Chemiluminescência	Qin *et al.*, 1997
Zinco	Clordiazepóxido	Espectrofotometria absorção atómica	Montero *et al.*, 1990

Uma outra estratégia, referida na literatura também com uma certa frequência, relaciona-se com a incidência de radiações ao longo do sistema, tendo em vista uma alteração química do composto que permita a sua quantificação posterior (tabela I.5). Esta alternativa diminui, em muitas situações, o tempo envolvido na análise e o consumo de reagentes.

tabela I.5 Irradiação de fármacos ao longo do sistema FIA para a sua determinação.

Radiação	Espécie Farmacêutica	Detecção	Referência Bibliográfica
Microondas	Vitamina A	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Peres *et al.*, 1995
Ultravioleta	Ácido fólico	Fluorimetria	Lapa *et al.*, 1997
	Clorpromazina	Fluorimetria	Chen *et al.*, 1991
	Diazepam	Fluorimetria	Guerrero *et al.*, 1993
	Levomepromazina	Fluorimetria	Laassis *et al.*, 1997
	Prometazina	Fluorimetria	Romero *et al.*, 1992
		Fluorimetria	Chen *et al.*, 1991
	Sulfadiazina	Fluorimetria	Aaron *et al.*, 1995
	Vitamina B_1	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Danet *et al.*, 1994
	Tioproparazina	Fluorimetria	Laassis *et al.*, 1997
	Tioridazina	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Rivas *et al.*, 1996
	Trifluperazina	Fluorimetria	Laassis *et al.*, 1997
	Vitamina C	Espectrofotometria ultravioleta/visível	Leon *et al.*, 1993
		Chemiluminescência	Ruiz *et al.*, 1995
Visível	Epinefrina	Fluorimetria	Ruiz *et al.*, 1993
	Levodopa		

Algumas montagens estabelecidas permitem também a preparação de reagentes em linha, tal como o trabalho proposto por Romero *et al.*, 1995, no qual uma solução de nitrato atravessa uma coluna redutora de cádmio, formando-se assim nitrito, o reagente necessário à reacção de diazotação da sulfadiazina. Outros trabalhos estabelecem a reutilização de solventes tóxicos, como o tetracloreto de carbono (Dasi *et al.*, 1998), ou a recuperação de hipoclorito com base numa célula electroquímica (Zhang *et al.*, 1998).

A versatilidade dos sistemas FIA relaciona-se também com a possibilidade de adaptação a vários tipos de detecção, situação já evidenciada ao longo dos trabalhos indicados nas tabelas I.3, I.4 e I.5. Idealmente, quando se pretende incorporar um detector numa montagem FIA, este deverá apresentar uma resposta rápida (no sentido de atingir frequências analíticas elevadas), uma resposta analítica ao largo de

uma gama de concentrações alargada (o que simplifica a montagem), ser reprodutível (por forma a evitar sucessivas calibrações do sistema analítico), apresentar um baixo ruído eléctrico, uma boa estabilidade e, ainda, ser compatível com sistemas de aquisição de dados (Van Staden, 1986). Os ISEs perfazem estes requisitos, tornando-se por isso vantajosa a sua associação a sistemas FIA.

I.4.1 ELÉCTRODOS DE MEMBRANA DE CONDUTOR MÓVEL SELECTIVOS A FÁRMACOS EM SISTEMAS FIA

A aplicação de detectores potenciométricos a sistemas de fluxo não é de todo recente, apresentando uma importância crescente, dada a necessidade premente de implementar técnicas de análise automáticas e de miniaturar os aparelhos de medida (Shpigun, 1994). Desta combinação decorrem também, em numerosas situações, algumas vantagens para os ISEs (Calatayud, em *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals*, 1996), nomeadamente:

- aumento de precisão da resposta analítica, dado que o eléctrodo é exposto a todas as amostras por um período fixo de tempo;
- aumento de selectividade, resultante da discriminação cinética da membrana selectiva para os iões interferentes (aos quais responde mais lentamente);
- aumento de tempo de vida, dado que a membrana selectiva não é sujeita a um contacto prolongado com substâncias presentes nas amostras que a possam "danificar".

As montagens FIA utilizadas em determinações potenciométricas com eléctrodos selectivos à espécie que se pretende determinar são efectivamente muito simples. Elas são constituídas genericamente por um sistema propulsor (que assegura o movimento das soluções no seu interior), um sistema de injecção (que permite intercalar volumes de amostra, rigorosos e reprodutíveis, no fluxo transportador) e

um sistema de detecção (Figura I.7, A). Quando se pretende efectuar o ajuste do valor de pH e/ou de força iónica das soluções no interior do sistema, existe também uma unidade de reacção, onde a amostra é convenientemente misturada com a solução ajustadora (Figura I.7, B).

Em particular para estes sistemas de detecção, as montagens apresentam ainda um eléctrodo de "terra", constituído por um metal, que permite eliminar a variação de corrente produzida pelo movimento do fluxo (Figura I.7). Este eléctrodo é, de uma forma geral, colocado imediatamente antes do sistema de detecção (Solich *et al.*, 1995).

Uma outra particularidade dos sistemas FIA com ISEs reporta-se à adição à solução de transporte de uma pequena quantidade do ião ao qual o eléctrodo é selectivo. Este procedimento frequente não visa apenas aumentar a estabilidade do potencial fornecido pelo detector, mas também prolongar o tempo de vida das unidades potenciométricas (Moody *et al.*, 1988).

A configuração do detector potenciométrico e sua incorporação no sistemas FIA são também factores de grande importância nestes sistemas, podendo distinguir-se claramente dois grandes grupos: os ISEs que apresentam uma configuração convencional e aqueles cuja configuração foi expressamente construída para a sua adaptação nesses sistemas (Ferreira *et al.*, 1993).

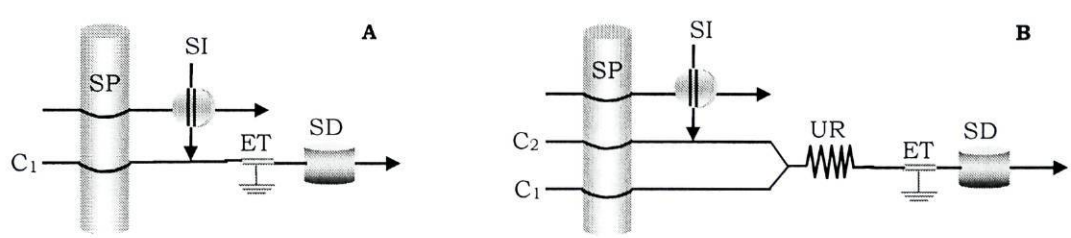


Figura I.7 Configuração usual das montagens FIA contendo ISEs para leitura directa (A) e para o ajuste às condições de leitura no interior do sistema. SP: sistema de propulsão; SI: sistema de injecção; ET: eléctrodo de terra; SD: sistema de detecção; UR: unidade de reacção; C: soluções de transporte (C_1 é geralmente uma solução ajustadora).

No que se refere a ISEs de configuração convencional, a sua incorporação em sistemas FIA pode ser conseguida recorrendo a vários arranjos, sendo os primeiros propostos por Ruzicka *et al.*, 1977, e Hansen *et al.*, 1977, e foram designados por *cascade* (Figura I.8). Estes arranjos em "cascata" são contudo mecanicamente instáveis, além de apresentarem um percurso não constante de solução ao longo da membrana, originando por isso grandes oscilações nos potenciais fornecidos pelo sistema.

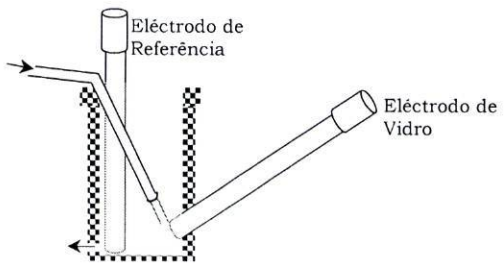


Figura I.8 O arranjo típico em "cascata", utilizado para a adaptação dos ISEs de configuração convencional aos sistemas FIA.

Sem estas limitações, surgem entretanto as cápsulas de fluxo (*flow-through caps*), as quais permitem uma fácil inserção dos detectores na montagem FIA. Contudo, elas motivam o aparecimento de "uma câmara de diluição" para o troço de amostra intercalado no fluxo (Figura I.9), favorecendo uma baixa frequência analítica e um aumento, que poderá ser significativo, da concentração mínima detectada (Ferreira *et al.*, 1993).

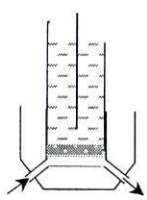


Figura I.9 O arranjo em *flow-through caps*, utilizado para a adaptação dos ISEs de configuração convencional aos sistemas FIA.

Os arranjos em *Wall-jet* constituem também uma das propostas presentes na literatura. Esta construção envolve a projecção uniforme da solução em fluxo ao longo de toda a membrana de um eléctrodo convencional. Uma das suas representações é indicada na Figura I.10, e constitui o arranjo utilizado por Solich *et al.*, 1995, na determinação de diflusinal em produtos farmacêuticos, com um eléctrodo selectivo à forma iónica daquela espécie química (Tabela I.6).

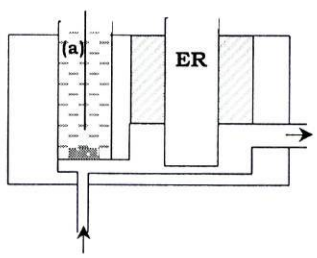


Figura I.10 O arranjo típico em *Wall-jet*, utilizado para a adaptação dos ISEs de configuração convencional aos sistemas FIA. ER: eléctrodo de referência; (a): solução de referência interna do eléctrodo selectivo.

Uma outra construção proposta na literatura é aquela designada por *Sandwich* (Alegret *et al.*, 1985). Ela é geralmente constituída por duas peças, uma contendo uma cavidade preenchida com membrana sensora e a outra que determina o percurso tangencial do fluxo através do sensor (Figura I.11). Uma vez unidas aquelas duas peças, a unidade resultante apresenta uma maior estabilidade mecânica do que as cápsulas de fluxo, mas produz sinais de elevado ruído eléctrico.

Por entre os vários arranjos anteriormente referidos, são as construções de tipo *Wall-jetI* e *Sandwich* aquelas com referência na literatura para a determinação potenciométrica de vários fármacos em sistemas FIA (Tabela I.6). Surgem porém outras propostas na literatura para a inserção de ISEs de configuração convencional naqueles sistemas, mas cuja aplicação no que respeita à construção de unidades selectivas a compostos orgânicos de interesse farmacêutico não tem qualquer significado.

tabela I.6 Eléctrodos selectivos a várias espécies iónicas com interesse farmacêutico de configuração convencional, utilizados em sistemas FIA.

Espécie	Constituintes da membrana	Características de funcionamento dos ISEs	Condições Analíticas	Referência Bibliográfica
Ciclonamina	BFNi.Ciclonamina oNFOE PVC	LIRL: 10^{-4} mol L^{-1} **(b)** LD: $4x10^{-5}$ mol L^{-1} Declive: 53,2±0,5 mV década^{-1} R: 0,998 Repetibilidade: — pH operacional: 1-6 Log K^{POT} > -2,54 Tempo de vida < 1 mês	(Figura I.7, A) C_1: 0,1 mol L^{-1} tampão acetato SI: 100 µL Fluxo: 4 mL min^{-1} SD: *Sandwich* 60 amostras hora^{-1}	Hassan *et al.*, 1997
	BFFe.Ciclonamina oNFOE PVC	LIRL: 10^{-4} mol L^{-1} **(b)** LD: $8x10^{-5}$ mol L^{-1} Declive: 51,1±0,5 mV década^{-1} R: 0,997 Repetibilidade: — pH operacional: 1-5,5 Log K^{POT} > -2,70 Tempo de vida < 1 mês	—	
Cloroquina	TFB.Cloroquina DOF PVC	LIRL: 10^{-5} mol L^{-1} **(b)** LD: $3,0x10^{-6}$ mol L^{-1} Declive: 28,1±0,5 mV década^{-1} R: — Reprodutibilidade: — pH operacional: 1,9-6,1 Log K^{POT} > -3,4 Tempo de vida: 40 dias	(Figura I.7, A) C_1: 10^{-2} mol L^{-1} tampão fosfato SI: 300 µL Fluxo: 5 mL min^{-1} SD: *Sandwich* ≈150 amostras hora^{-1}	Hansen *et al.*, 1991
Codeína	TFB.codeína DOF PVC	LIRL: 10^{-4} mol L^{-1} **(b)** LD: $3,5x10^{-5}$ mol L^{-1} Declive: 56±0,8 mV década^{-1} R: 0,997 Repetibilidade: ±2 mV dia^{-1} pH operacional: 2,5-7 Log K^{POT} > -2,55 Tempo de vida > 3 semanas	(Figura I.7, A) C_1: tampão citrato (pH 5) SI: 100 µL Fluxo: — SD: *Sandwich* ≈42 amostras hora^{-1}	Elnemma *et al.*, 1997/A
	TFB.codeína DBS PVC	LIRL: 10^{-4} mol L^{-1} **(b)** LD: $3,5x10^{-5}$ mol L^{-1} Declive: 53±0,6 mV década^{-1} R: 0,998 Repetibilidade: ±2 mV dia^{-1} pH operacional: 3-7 Log K^{POT} > -2,60 Tempo de vida > 3 semanas	—	
	RK.codeína DOF PVC	LIRL: 10^{-4} mol L^{-1} **(b)** LD: $7,0x10^{-5}$ mol L^{-1} Declive: 51±0,6 mV década^{-1} R: 0,995 Repetibilidade: ±2 mV dia^{-1} pH operacional: 3-6 Log K^{POT} > -2,72 Tempo de vida > 3 semanas	(Figura I.7, A) C_1: tampão citrato (pH 5) SI: 100 µL Fluxo: — SD: *Sandwich* ≈72 amostras hora^{-1}	
	RK.codeína DBS PVC	LIRL: 10^{-4} mol L^{-1} **(b)** LD: $4,5x10^{-5}$ mol L^{-1} Declive: 50±0,8 mV década^{-1} R: 0,995 Repetibilidade: ±2 mV dia^{-1} pH operacional: 3,5-6 Log K^{POT} > -2,30 Tempo de vida > 3 semanas	—	

tabela I.6 Eléctrodos selectivos a várias espécies iónicas com interesse farmacêutico de configuração convencional, utilizados em sistemas FIA (continuação).

Espécie	Constituintes da membrana	Características de funcionamento dos ISEs	Condições Analíticas	Referência Bibliográfica
Diflusinal	THA.diflusinal *o*NFOE PVC	LIRL: $1x10^{-4}$ mol L^{-1} LD: $2,6x10^{-5}$ mol L^{-1} Declive: 57-60 mV década^{-1} R: 0,9996 Precisão: 0,38% pH operacional: 7-10 Log K^{POT}: — Tempo de vida = 3 meses	(Figura I.7, A) C_1: tampão tris (pH 8,0) SI: 85 µL (em hidróxido de sódio 0,01 mol L^{-1}) Fluxo: 4,0 mL min^{-1} SD: *Wall-jet* 40 amostras hora^{-1}	Solich *et al.*, 1995
Pilocarpina	RK.pilocarpina TBF PVC	LIRL: $4x10^{-5}$ mol L^{-1} LD: $1,2x10^{-5}$ mol L^{-1} Declive: 53,4±0,5 mV década^{-1} R: — Reprodutibilidade: ±5 mV dia^{-1} pH operacional: 3,5-6,5 Log K^{POT} > -3,20 Tempo de vida: —	(Figura I.7, A) C_1: 10^{-4} mol L^{-1} KCl SI: 100 µL (em KCl) Fluxo: 10 mL min^{-1} SD: *Sandwich* — amostras hora^{-1}	Elnemma, 1994
Procaína	FL.procaína DOF PVC	LIRL: 10^{-5} mol L^{-1} **(b)** LD: $5,1x10^{-6}$ mol L^{-1} Declive: 56,0±1,1 mV década^{-1} R: — Reprodutibilidade: — pH operacional: 5,8-8,3 Log K^{POT} > -0,8 Tempo de vida = —	(Figura I.7, A) C_1: — SI: — Fluxo: —mL min^{-1} SD: *Sandwich* — amostras hora^{-1}	Hamada *et al.*, 1993
Ranitidina	RK.ranitidina *o*NFFE PVC	LIRL: $1x10^{-4}$ mol L^{-1} LD: $9,4x10^{-5}$ mol L^{-1} Declive: 55,3±0,6 mV década^{-1} R: 0,996 Reprodutibilidade: — pH operacional: 4-7 Log K^{POT} > -1,95 Tempo de vida = 2 meses	(Figura I.7, A) C_1: $5x10^{-3}$ mol L^{-1} NaCl SI: 20 µL; (tampão acetato, pH 4,8) Fluxo: 3,3 mL min^{-1} SD: *Sandwich* 80 amostras hora^{-1}	Hassan *et al.* 1996/A
	ST.ranitidina *o*NFFE PVC	LIRL: $8x10^{-5}$ mol L^{-1} LD: $6x10^{-6}$ mol L^{-1} Declive: 59,4±0,5 mV década^{-1} R: 0,996 Reprodutibilidade: — pH operacional: 5-8 Log K^{POT} > -2,77 Tempo de vida = 2 meses		
	FT.ranitidina *o*NFFE PVC	LIRL: $1x10^{-5}$ mol L^{-1} LD: ≈$5x10^{-6}$ mol L^{-1} Declive: 60,0±0,6 mV década^{-1} R: 0,998 Reprodutibilidade: — pH operacional: 5-8 Log K^{POT} > -2,20 Tempo de vida = 2 meses		

RK: reineckato; ST: silicotungstato; FT: Fosfotungstato; FL: flavianato; THA: tetraheptilamónio; TFB: tetrafenilborato; BFNi: tris(batofenantrolina) de Ni (II); BFFe: tris(batofenantrolina) de Fe (II); *o*NFOE: 2-nitrofeniloctiléter; *o*NFFE: 2-nitrofenilfeniléter; TBF: tetrabutilftalato; DOF: dioctilftalato; DBS: dibutilsebacato; LIRL: Limite inferior de resposta linear; LD: Limite de detecção; R: coeficiente de correlação; K^{POT}: coeficiente de selectividade potenciométrica; (b) resultados relativos a ensaios em condições estacionárias.

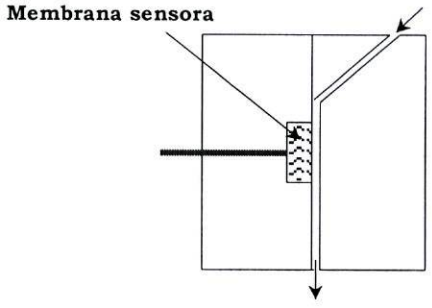


Figura I.11 Detalhe do arranjo tipo *Sandwich*, visualizando o percurso tangencial das soluções pela membrana sensora.

Para os ISEs de configuração convencional indicados na tabela I.6 salientam-se os reduzidos tempos de vida que os caracterizam. A inserção daqueles ISEs em sistema FIA fornece também, de uma forma geral, frequências analíticas bastante reduzidas.

Justifica-se assim o aparecimento de detectores cuja configuração é adaptada aos sistemas FIA, e que constituem na realidade aqueles de maior expressão na análise potenciométrica em sistemas de fluxo. Este tipo de detectores, por possuirem uma configuração tubular, permitem manter as características hidrodinâmicas das soluções que fluem no interior da montagem. Adicionalmente, esta construção envolve volumes internos muito reduzidos, evitando a dispersão da amostra à sua passagem pelo detector. A utilização de ISEs com esta configuração permite assim que a detecção potenciométrica deixe de ser inevitavelmente um processo em fim de linha, podendo proceder-se à sua incorporação em montagens capazes de realizar determinações sequenciais (Lima, 1987), i.e., em que a amostra atravessa o detector onde é realizada a medição e é encaminhada para outro detector, que pode ou não ser potenciométrico.

No que diz respeito às configurações tubulares estabelecidas, os ISEs podem ser novamente divididos em dois grandes grupos (Ferreira *et al.*, 1993): aqueles que empregam eléctrodo e solução de referência internos e aqueles em que a membrana sensora se encontra directamente ligada a um suporte condutor (Figura I.12).

No que se refere à utilização de um detector de configuração tubular com solução de referência interna, o trabalho desenvolvido por Meyerhoff *et al.*, 1983, relativo à construção de detectores potenciométricos selectivos a potássio, constitui uma das primeiras propostas na literatura. A membrana sensora, à base de PVC, é depositada num pequeno orifício feito num tubo de Teflon®. A montagem do eléctrodo consiste em inserir, posteriormente, esse tubo de Teflon® numa câmara que acomoda um eléctrodo de referência de Ag/AgCl e uma solução de referência interna apropriada.

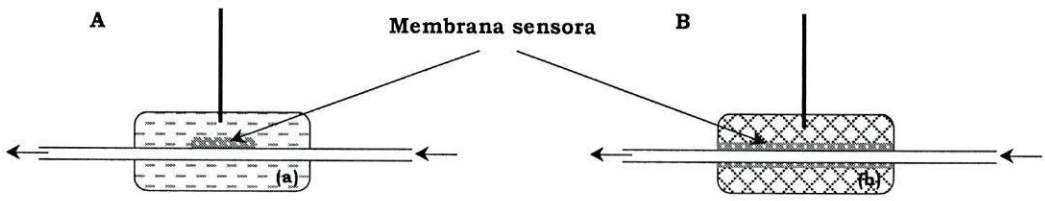


Figura I.12 Arranjos típicos de ISEs de configuração tubular em sistemas FIA. A: com solução de referência interna, (a); B: membrana aplicada directamente num suporte condutor, (b).

Outra proposta com configuração similar surge na mesma época e é descrita por Frend *et al.*, 1983. A construção da unidade tubular passa por mergulhar repetidamente um arame de níquel na solução da membrana sensora. Após secagem, a membrana é retirada cuidadosamente desde o suporte onde é aplicada. Um troço daquela membrana, com 2 cm de comprimento, é ligado aos tubos do sistema com a

ajuda de uma cola constituída por PVC e tetrahidrofurano, e a montagem resultante é posteriormente adaptada a uma câmara de fluxo que comporta o eléctrodo e a solução de referência internos.

Os procedimentos analíticos que envolvem qualquer uma das construções propostas para os detectores tubulares com solução de referência interna são contudo pouco versáteis e de difícil execução laboratorial. O manuseamento destas unidades requer também um certo cuidado, devido à presença dessa solução no interior da construção. Adicionalmente, a velocidade do fluxo das soluções no interior da montagem tem que ser cuidadosamente seleccionada, dada a pressão hidrodinâmica exercida ao nível da membrana. Apesar disso, Hongbo, 1993, sugere este tipo de construção para a inserção em sistemas FIA de detectores selectivos às espécies atropina e escopolamina (tabela I.7).

tabela I.7 Eléctrodos selectivos a espécies iónicas com interesse farmacêutico, construídos com uma configuração tubular e com eléctrodo e solução de referência internos.

Espécie	Constituintes da membrana	Características de funcionamento dos ISEs	Condições Analíticas	Referência Bibliográfica
Atropina	TFB.Atropina DBF PVC	LIRL: $2x10^{-5}$ mol L^{-1} LD: $2x10^{-6}$ mol L^{-1} Declive: 58,8 mV década^{-1} R^2: — Repetibilidade: ±0,1 mV pH operacional: — Log K^{POT} > -5,95 Tempo de vida: —	(montagem similar à da Figura I.7, A) C_1: acetato de magnésio (0,05 mol L^{-1}) SI: 120 µL Fluxo: 1,2 mL min^{-1} 120 amostras hora^{-1}	Hongbo, 1993
Escopolamina	TFB.Escopolamina DBF PVC	LIRL: $2x10^{-5}$ mol L^{-1} LD: $4x10^{-6}$ mol L^{-1} Declive: 57,3 mV década^{-1} R^2: — Repetibilidade: ±0,1 mV pH operacional: — Log K^{POT} > -6,32 Tempo de vida: —	(montagem similar à da Figura I.7, A) C_1: acetato magnésio (0,05 mol L^{-1}) SI: 120 µL Fluxo: 1,2 mL min^{-1} 120 amostras hora^{-1}	

TFB: tetrafenilborato; DBF: dibutilftalato; LIRL: Limite inferior de resposta linear; LD: Limite de detecção; R: coeficiente de correlação; K^{POT}: coeficiente de selectividade potenciométrica.

Efectivamente, quando comparados com as construções convencionais, os detectores tubulares paresentam uma maior sensibilidade e proporcionam uma maior rapidez analítica.

Tendo como objectivo principal melhorar a estabilidade e a resistência mecânica dos ISEs em condições FIA e facilitar a substituição da membrana sensora, surgem entretanto construções que não incluem solução de referência interna, desenvolvidas por Alegret *et al.*, 1987, e por Alonso *et al.*, 1984. Nestes detectores a membrana é aplicada ao longo de um orifício longitudinal, de tal forma que o alinhamento do sistema sensor no interior da montagem é completo e as soluções fluem tangencialmente à membrana sensora (Figura I.12, B) (Lima *et al.*, 1992).

Entre os eléctrodos de configuração tubular sem solução de referência interna, encontram-se na literatura aqueles selectivos às espécies salicilato, fenobarbiturato, vitaminas B_1 e B_6 e 5,5-dietilbarbiturato. A constituição das membranas selectivas, as características de funcionamento dos ISEs correspondentes e as condições utilizadas no sistema FIA para se proceder à análise das amostras encontram-se indicadas na tabela I.8.

Os longos tempos de vida e o baixo custo característicos dos detectores selectivos tubulares sem solução de referência interna, a facilidade do seu manuseamento e as boas características de resposta por eles fornecidas, sugerem que este tipo de construção e configuração sejam os mais adequados para a incorporação de ISEs em sistemas FIA. Destaca-se ainda a elevada frequência analítica proporcionada pelos estes detectores tubulares.

Um outro factor preponderante nos sistemas FIA com detecção potenciométrica prende-se com a inserção do eléctrodo de referência e ao seu posicionamento na montagem. Na maioria dos casos, este eléctrodo é colocado em fim de linha, quer colocando-o num recipiente colector do fluxo, quer adaptando-o a módulos de suporte e inserindo-o directamente no sistema. O recurso actual a eléctrodos de referência comerciais não conduz também a preocupações de maior.

tabela I.8 Eléctrodos selectivos a várias espécies iónicas com interesse farmacêutico, construídos com uma configuração tubular e sem solução de referência interna.

Espécie	Constituintes da membrana	Características de funcionamento dos ISEs	Condições Analíticas	Referência Bibliográfica
Salicilato	Salicilato.AL T4CFB EVA	LIRL: $2,5x10^{-3}$ mol L^{-1} LD: — Declive: 58,3±0,9 mV década^{-1} R^2: 0,9991 Repetibilidade: ±1,4 mV pH operacional: 6-10 Log K^{POT} > -0,57 Tempo de vida > 3 meses	(Figura I.7, A) C_1: tampão tris.HCl (pH 7,5) SI: 50 µL (em tris.HCl; pH 7,5) Fluxo: 1,3 mL min^{-1} 100 amostras hora^{-1}	Rover *et al.*, 1998
	Salicilato.TOA *o*NFOE PVC	LIRL: $1x10^{-4}$ mol L^{-1} LD: $2x10^{-5}$ mol L^{-1} Declive: 60±1 mV década^{-1} R^2: — Reprodutibilidade: ±0,2 mV dia^{-1} pH operacional: 6-9 Log K^{POT} > -3,21 Tempo de vida > 6 meses	(Figura I.7, B) C_1: borax + sulfato de amónio C_2: $5x10^{-5}$ mol L^{-1} salicilato SI: 200 µL UR: 50 cm Fluxo: 11,2 mL min^{-1} 120-200 amostras hora^{-1}	Lima *et al.*, 1990/A
Fenobarbiturato	FB.TOA *o*NFOE PVC	LIRL: $2x10^{-4}$ mol L^{-1} **(a)** LD: $1x10^{-4}$ mol L^{-1} Declive: 58±1 mV década^{-1} R: > 0,9999 Reprodutibilidade: ±0,2 mV dia^{-1} pH operacional: 8,5-11 Log K^{POT} > -2,77 Tempo de vida > 5 meses	(Figura I.7, B) C_1: borax (pH 9,3) + sulfato de sódio C_2: $2x10^{-5}$ mol L^{-1} fenobarbital SI: 200 µL UR: 20 cm Fluxo: 5 mL min^{-1} 60 amostras hora^{-1}	Lima *et al.*, 1992
Vitamina B_1	T2CFB.Vitamina *o*NFOE PVC	LIRL: $8,0x10^{-6}$ mol L^{-1} **(b)** LD: $1,0x10^{-6}$ mol L^{-1} Declive: 32,6±0,9 mV década^{-1} R^2: — Reprodutibilidade: ±0,7 mV dia^{-1} pH operacional: 2-4 Log K^{POT} > -1,32 Tempo de vida > 10 meses	(Figura I.7, B) C_1: tampão ácido fórmico/hidróxido de litio (pH 4) + $1x10^{-4}$ mol L^{-1} vitamina B_1 SI: 200 µL UR: 50 cm Fluxo: 6,3 mL min^{-1} 180 amostras hora^{-1}	Lima *et al.*, 1991
Vitamina B_6	T2CFB.Vitamina *o*NFOE PVC	LIRL: $2,0x10^{-5}$ mol L^{-1} **(b)** LD: $3,9x10^{-6}$ mol L^{-1} Declive: 62,6±0,3 mV década^{-1} R^2: — Reprodutibilidade: ±1,2 mV dia^{-1} pH operacional: 2-4 Log K^{POT} > -2,38 Tempo de vida > 8 meses	(Figura I.7, B) C_1: tampão ácido fórmico/hidróxido de litio (pH 4) + $1x10^{-4}$ mol L^{-1} vitamina B_6 SI: 200 µL UR: 50 cm Fluxo: 6,3 mL min^{-1} 180 amostras hora^{-1}	

tabela I.8 Eléctrodos selectivos a várias espécies iónicas com interesse farmacêutico, construídos com uma configuração tubular e sem solução de referência interna (continuação).

Espécie	Constituintes da membrana	Características de funcionamento dos ISEs	Condições Analíticas	Referência Bibliográfica
5,5-dietil-barbiturato	DEB.TOA *o*NFOE PVC	LIRL: $3x10^{-4}$ mol L^{-1} LD: $1x10^{-4}$ mol L^{-1} Declive: 60 mV década^{-1} R^2: — Reprodutibilidade: ±1 mV dia^{-1} pH operacional: 9-11,5 Log K^{POT} > -1,38 Tempo de vida: —	(Figura I.7, B) C_1: borax C_2: $2x10^{-5}$ mol L^{-1} DEB SI: 200 µL UR: 85 cm Fluxo: — 120 amostras hora^{-1}	Lima *et al.*, 1990/B

AL: Aliquat; T4CFB: tetrakis(4-clorofenil)borato; T2CFB: tetrakis(2-clorofenil)borato; TOA: tetraoctilamónio; *o*NFOE: 2-nitrofeniloctiléter; FB: fenobarbiturato; DEB: dietilbarbiturato; EVA: co-polímero de etileno e acetato de vinilo; LIRL: Limite inferior de resposta linear; LD: Limite de detecção; R: coeficiente de correlação; K^{POT}: coeficiente de selectividade potenciométrica; (a) resultados relativos a condições de ajuste de força iónica obtidos em sistema similar ao da Figura I.3, A; (b) resultados relativos a ensaios em condições estacionárias.

Independentemente das características fornecidas pelos detectores potenciométricos, da sua configuração e do modo da sua inserção nos sistemas FIA, os ISEs indicados nas tabelas I.6, I.7 e I.8 são convenientemente aplicados à análise de amostras reais.

I.4.1.1 APLICAÇÕES ANALÍTICAS

A implementação dos sistemas FIA com eléctrodos selectivos à forma iónica de um fámaco no controlo da qualidade de formulações farmacêuticas reporta-se sobretudo à quantificação desse composto, quando veiculado nas mais diversas formas farmacêuticas (tabela I.9).

A qualidade dos resultados das análises potenciométricas é avaliada por comparação com um método independente, concluído-se, na generalidade dos trabalhos, a exactidão dos resultados potenciométricos.

tabela I.9 Determinação do teor de fármacos em formulações farmacêuticas com ISEs incorporados em sistemas FIA.

Fármaco	Forma Farmacêutica	Tratamento de amostra	Método	Referência Bibliográfica
Aspirina®	Comprimidos	Pulverização + hidrólise alcalina	Curva de calibração	Lima *et al.*, 1990/A
	Comprimidos	Pulverização + NaOH + 100 °C, 30 min + neutralização + solução tampão	Curva de calibração	Rover *et al.*, 1998
Atropina	Comprimidos	Pulverização + dissolução em acetato de magnésio	Curva de calibração	Hongbo *et al.*, 1993
Ciclonamina	Comprimidos	Pulverização + dissolução em tampão	Curva de calibração Método da Adição Padrão	Hassan *et al.*, 1997
	Ampolas	+ diluição em tampão		
Cloroquina	Comprimidos	Pulverização + dissolução em tampão + filtração	Curva de calibração	Hassan *et al.*, 1991
	Injectáveis	+ diluição em tampão		
Codeina	Comprimidos	Pulverização + dissolução em tampão	Curva de calibração	Elnemma *et al.*, 1997/A
	Xarope	+ diluição em tampão		
Diflusinal	Comprimidos	Pulverização + NaOH + agitação e ultrasons + centrifugação	Curva de calibração	Solich *et al.*, 1995
Escopolamina	Injectáveis	+ diluição em acetato de magnésio	Curva de calibração	Hongbo *et al.*, 1993
Fenobarbiturato	Comprimidos	Pulverização + dissolução em tampão	Curva de calibração	Lima *et al.*, 1992
	Injectáveis	—		
Pilocarpina	"soluções"	—	Curva de calibração	Elnemma *et al.*, 1994
Procaína	Injectáveis	—	Curva de calibração	Hamada *et al.*, 1993
Ranitidina	Comprimidos	Pulverização + dissolução em água + filtração + solução tampão	Curva de calibração Método da Adição Padrão	Hassan *et al.*, 1996/A
	Ampolas	+ diluição em tampão		
Salicilato	Comprimidos	Pulverização + dissolução em água	Curva de calibração	Lima *et al.*, 1990/A
Vitamina B_1	Ampolas	+ diluição em água	Curva de calibração	Lima *et al.*, 1991
	Comprimidos	Pulverização + dissolução em água + filtração		
Vitamina B_6	Cápsulas	+ dissolução em água		

O trabalho estabelecido por Solich *et al.*, 1995, refere também a aplicação dos sistemas FIA com detecção potenciométrica a outros parâmetros envolvidos no controlo da qualidade de formulações, particularmente o ensaio de dissolução de formas sólidas e o de uniformidade de teor de substância activa.

Neste trabalho, o ensaio de dissolução de comprimidos de diflusinal é realizado seguindo as especificações da monografia da USP correspondente, e recorrendo a uma adaptação do sistema utilizado no doseamento daquele fármaco (tabela I.6). Para isso, o conteúdo do vaso de dissolução (900 mL) é colocado em circulação através do canal da amostra. Durante um período de 35 minutos, são injectados, repetidamente, em intervalos de 2,5 minutos, 85 μL do meio de dissolução. O perfil de dissolução resultante apresentava por isso 14 leituras, incluindo os valores de concentração nos primeiros estágios de dissolução, obtidas com apenas 1,2 mL do meio de dissolução e sem qualquer envolvimento de um operador, desde o início deste ensaio.

Para a caracterização da uniformidade do teor de fármaco em formulações farmacêuticas, Solich *et al.*, 1995, descreve o doseamento, em triplicado, do conteúdo de diflusinal presente em cada um dos 10 comprimidos ensaiados, em apenas 40 minutos. A única questão nesta determinação relaciona-se com o longo período de tempo envolvido no tratamento dos comprimidos em análise.

O trabalho descrito por Solich *et al.*, 1995, demonstra então que a aplicabilidade ISEs incorporados em sistemas FIA para o controlo da qualidade de formulações farmacêuticas pode ser alargada a outros parâmetros, que não apenas o doseamento do fármaco veiculado nas amostras, confirmando mais uma vez as vantagens decorrentes desta metodologia analítica.

I.5 OBJECTIVOS

Os bons resultados decorrentes da aplicação de ISEs à determinação de fármacos veiculados em formulações farmacêuticas estão efectivamente confirmados, revelando-se uma alternativa vantajosa aos procedimentos vulgarmente propostos nas farmacopeias, sobretudo no que se refere a obviar os pré-tratamentos de amostra, encurtando assim o tempo despendido em cada análise. Consequentemente, os custos envolvidos nas análises de rotina são minorados e a qualidade dos resultados fornecidos é, em certas ocasiões, também aperfeiçoada.

A aplicação dos ISEs nesta área analítica pode ainda ser melhorada quando se procede à incorporação daqueles detectores em sistemas FIA, sobretudo quando se selecciona uma configuração adequada. Neste aspecto, destacam-se claramente as unidades de configuração tubular e sem solução de referência interna, não apenas no que se refere à sua estabilidade mecânica e facilidade de manuseamento, mas especialmente pela sua longevidade e pela frequência analítica fornecida pelos sistemas FIA onde se encontram inseridos. As montagens resultantes caracterizam-se pela sua simplicidade, a sua versatilidade e o seu um baixo custo, podendo ainda originar melhorias nas características de funcionamento dos ISEs.

A situação actual da bibliografia indica contudo que esta área permanece sem uma abordagem concreta e particular por parte dos investigadores, situação que deriva não apenas do tardio aparecimento de ISEs de fácil construção e com configuração adequada à sua inserção em sistemas de fluxo, mas também da dificuldade inerente à preparação de uma membrana sensora que origine unidades potenciométricas com boas características de funcionamento.

A dificuldade na preparação de detectores com boa resposta analítica reside também na escolha ponderada dos vários constituintes da membrana sensora, incluindo-se aqui o contra-ião, para a formação do complexo de par-iónico, e a sua

incorporação numa matriz adequada, quer no que diz respeito ao solvente mediador plastificante, quer no que diz respeito ao polímero imobilizador. Contudo, essa escolha não é de um modo geral simples, já que dados fornecidos por iões de tamanho e estrutura equivalentes podem ser claramente distintos, mesmo quando esses resultados são obtidos em condições experimentais idênticas (Raluca *et al.*, 1997). Assim, embora a escolha dos constituintes para a preparação da membrana selectiva possa ser planeada, a selecção da membrana mais adequada decorre sobretudo dos resultados experimentais fornecidos pelos sistemas estabelecidos.

Neste contexto, a presente dissertação tem por objectivo desenvolver novas unidades potenciométricas que, com boas características de funcionamento, sejam selectivas a fármacos e permitam a análise rápida e simples das várias formas farmacêuticas em que se encontram veiculados, recorrendo para isso a sistemas FIA.

I.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARON J. J., VALENZUELA M. I. A., PENA M. S., SALINAS F., MAHEDERO M. C. (**1995**). Quantitative analysis of sulphadiazine using photochemically induced fluorescence detection in bulk solution and in a flow-injection system. *Anal. Chim. Acta*, 314, 45-50.

ABOUDAN M., SHOUKRY A. F., ISSA Y. M. (**1996**). Trimethoprimium-phosphotungstate ion associate as ion-exchanger for trimethoprinium ion-selective electrode. *Anal. Lett.*, 29, 19-28.

ALAPONT A. G., MATEO J. V. G., BERNT I., CALATAYUD J. M. (**1996**). Spectrophotometric determination of thioridazine with a solid-phase reactor of cerium (IV) in a continuous-flow assembly. *J. Flow Injection Anal.*, 13, 53-60.

ALÇADA M. N. M. P., LIMA J. L. F. C., MONTENEGRO M. C. B. S. M. (**1992**). PVC membrane electrode without inner reference solution for the direct determination of ephedrine in pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 10, 757-761.

ALÇADA M. N. M. P., LIMA J. L. F. C., MONTENEGRO M. C. B. S. M. (**1993**). Quinidine ion-selective electrode for potentiometric determinations in pharmaceutical preparations. *Anal. Chim. Acta*, 283, 657-661.

ALÇADA M. N. M. P., LIMA J. L. F. C., MONTENEGRO M. C. B. S. M. (**1994**). Application of poly(vinyl chloride) pilocarpine membrane electrodes in ophthalmic products. *Analyst*, 119, 2327--2330.

ALÇADA M. N. M. P., LIMA J. L. F. C., MONTENEGRO M. C. B. S. M. (**1995**). Construction and evaluation of atropine-selective electrodes: application to ophthalmic formulations. *Anal. Sci.*, 11, 781-783.

ALEGRET S., ALONSO J., BARTROLI J., LIMA J. L. F. C., MACHADO A. A. S. C., PAULIS J. M. (**1985**). Flow-through sandwich PVC matrix membrane electrode for flow injection analysis. *Anal. Lett.*, 18, 2291-2303.

ALEGRET S., ALONSO J., BARTROLI J., MACHADO A. A. S. C., LIMA J. L. F. C., PAULIS J. M. (**1987**). Construction of equipment for potentiometric determination in flow injection analysis. *Quim. Anal.*, 6, 278-292.

ALONSO J., ALEGRET S., BARTROLI J., PAULIS J. M., MACHADO A. A. S. C., LIMA J. L. F. C. (**1984**). Flow-through tubular PVC matrix membrane electrode without inner reference solution for flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, 164, 147-152.

AHMED M. A. (**1994**). Poly(vinyl chloride) matrix membrane electrodes for the selective determination of buformin. *Analyst*, 119, 1367-1370.

AHMED M. A., ELBESHLAWY M. M. (**1995/A**). Novel polymeric membrane electrodes for selective determination of trimethoprim. *Anal. Lett.*, 28, 2123-2138.

AHMED M. A., ABBAS A. B. (**1995/B**). Construction and evaluation of a novel glafenine ion--selective electrode. *Anal. Lett.*, 28, 13-26.

AVENDANO C. (**1993**). *Introduccion a la Quimica Farmaceutica.* Capítulo 27, *Introducción al Análises Farmacéutico.* LOPEZ M. C. A., editor. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid, España.

AVSEC H., GOMISCEK S. (**1992**). Study of the prospects for a ciprofloxacin PVC-coated wire ion-selective electrode based on quinolin-4-ones. *Anal. Chim. Acta*, 268, 307-309.

BADAWY S. S., ISSA Y. M., ELDIN A. S. T. (**1996**). Potentiometric determination of L-dopa, carbidopa, methyldopa and aspartame using a new trinitrobenzenesulfonate-selective electrode. *Electroanalysis*, 8, 1060-1064.

BANAKAR U. V. (**1992**). *Pharmaceutical Dissolution Testing.* SWARBRICK J., editor. Marcel Dekker Inc., New York, USA.

BAUTISTA J. A. G., ZAMORA L. L., MATEO J. V. G., CALATAYUD J. M. (**1996**). Indirect catalytic spectrophotometric determination of metamizol following oxidation by lead dioxide immobilized in a polyester resin bead. *Anal. Lett.*, 29, 2667-2678.

BOUKLOUZE A. A., EL-JAMMAL A., PATRIARCHE G. J. (**1991**). Polymeric-membrane ion-selective electrodes for certain types of drugs. *Analusis*, 19, 27-30.

BOUKLOUZE A. A., EL-JAMMAL A., VIRE J. C., PATRIARCHE G. J. (**1992**). Comparative study of three polymeric membrane electrodes selective to tizanidine. *Anal. Chim. Acta*, 257, 41-48.

BOUKLOUZE A. A., VIRE J. C., QUARIN G. C., KAUFFMANN J. M. (**1994**). Quantitative analysis of zoplicone in tablets using ion-selective electrode and polarographic methods. *Electroanalysis*, 6, 1045-1050.

BUNACIU A. A., IONESCU M. S., PALIVAN C., COSOFRET V. V. (**1991**). Amitriptyline-selective plastic membrane sensors and their pharmaceutical applications. *Analyst*, 116, 239-243.

BUNACIU A. A., IONESCU M. S., STEFAN R. I., IOAN I., ENEIN H. Y. A. (**1994**). Mianserin ion-selective membrane electrode and its pharmaceutical applications. *Anal. Lett.*, 27, 1647-1658.

BUNACIU A. A., GRASU A., ENEIN H. Y. A. (**1995**). Pharmaceutical applications of flurbiprofen sensor. *Anal. Chim. Acta*, 311, 193-197.

CALATAYUD J. M., BENITO C. G. (**1990/A**). Flow-injection spectrofluorimetric determination of paracetamol. *Anal. Chim. Acta*, 231, 259-264.

CALATAYUD J. M., BENITO C. G., GIMENEZ D. G. (**1990/B**). Flow-injection analysis – fluorimetric determination of thiamine. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8, 667-670.

CALATAYUD J. M., MATEO J. V. G. (**1991**). High pressure flow-injection assembly. Indirect determination of glycine by atomic absorption spectrometry. *Analyst*, 116, 327-329.

CALATAYUD J. M., MATEO J. V. G. (**1992**). Cerium (IV) arsenite as a solid-phase reactor for use in flow-injection analysis. Spectrophotometric determination of promethazine. *Anal. Chim. Acta*, 264, 283-289.

CALATAYUD J. M., MATEO J. V. G. (**1993**). On-line solid-phase reactors for unsegmented continuous-flow drug analysis. *Trends Anal. Chem.*, 12, 428-436.

CALATAYUD M. (**1996**). *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals. Automation in the Laboratory.* Parte 5, *Electroanalytical Methods.* Capítulo 14, *Potentiometry.* Taylor & Francis Limited, London, United Kingdom.

CAMPANELLA L., BATTILOTTI M., BORRACCINO A., COLAPICCHIONI C., SAMMARTINO M. P., TOMASSETTI M. (**1993**). Cholanic acids determined in commercial drugs by means of a new ISFET device. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 11, 1207-1214.

CAMPANELLA L., COLAPICCHIONI C., TOMASSETTI M., BIANCO A., DEZZI S. (**1995**). A new ISFET device for cocaine analysis. *Sens. Actuators*, B24, 188-193.

CARSTENSEN J. T. (**1990**). *Drug. Stability. Principles and practices.* Capítulo 1, *Overview.* SWARBRICK J., editor. Marcel Dekker Inc., New York, USA.

CASTRO M. D. L., VALCÁRCEL M. (**1989**). Flow injection analysis of pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 7, 1291-1300.

CASTRO M. D. L, VALCÁRCEL M. (**1990**). Automation of pharmaceutical dissolution testing by flow injection analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8, 329-336.

CATTRAL R. W., DREW D. M., HAMILTON I. C. (**1975**). Some alkylphosphoric acid esters for use in coated-wire calcium-selective electrodes. Part I. Response characteristics. *Anal. Chim. Acta*, 76, 269-277.

CHEN D., RIOS A., CASTRO M. D. L., VALCARCEL M. (**1991**). Simultaneous flow-injection determination of chlorpromazine and promethazine by photochemical reaction. *Talanta*, 38, 1227-1233.

COSOFRET V. V., BUCK R. P. (**1993**). Recent advances in pharmaceutical analysis with potentiometric membrane sensors. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 24, 1-58.

CRAGGS A., MOODY G. J., THOMAS J. D. R. (**1975**). PVC matrix membrane membrane ion-selective electrodes. *J. Chem. Ed.*, 51, 541-544.

DANET A. F., CALATAYUD J. M. (**1994**). FIA-spectrophotometric determination of thiamine after UV-irradiation. *Talanta*, 41, 2147-2151.

DASI M. J. S., GARRIGUES S., CERVERA M. L., GUARDIA M. (**1998**). Online solvent recycling: a tool for the development of clean analytical chemistry in flow injection Fourier transform infrared spectrometry: determination of Ketoprofen. *Anal. Chim. Acta*, 361, 253-260.

DUARTE M. M. M. B., NETO G. O., KUBOTA L. T. J. L. L., PIMENTEL M. F., LIMA F., LINS V. (**1997**). Application of factorial design to improve a FIA system for penicillin determination. *Anal. Chim. Acta*, 350, 353-357.

DUMKIEWICZ R., SYKUT K., KUSAK A. (**1992**). Application of ion-selective electrode with a pseudoliquid potential creating phase of the salicylate function in the determination of aspirin in complex pharmaceutical preparations. *Chem. Anal.*, 37, 35-42.

ELNEMMA E. M., EL-ZAWAWY F. M., HASSAN S. S. M. (**1993**). Determination of amitriptyline, imipramine and orphenadrine in antidepressant drugs by potentiometry, spectrophotometry and atomic-absorption spectrometry. *Mikrochim. Acta*, 110, 79-88.

ELNEMMA E. M. (**1994**). A new poly(vinyl chloride) matrix membrane electrode for manual and flow injection determination of pilocarpine in some pharmaceutical preparations. *Anal. Lett.*, 27, 1863-1874.

ELNEMMA E. M., HAMADA M. A. (**1997/A**). Plastic membrane electrodes for the potentiometric determination of codeine in pharmaceutical preparations. *Mikrochim. Acta*, 126, 147-151.

ELNEMMA E. M. (**1997/B**). PVC membrane electrodes for the potentiometric determination of tripelennamine. *Mikrochim. Acta*, 127, 259-263.

ENEIN H. Y. A., BUNACIU A. A., BALA C., FLESCHIN S. (**1997**). Enalapril and ramipril selective membranes. *Anal. Lett.*, 30, 1999-2008.

ENEIN H. Y. A., STEFAN R. I., STADEN J. F. V. (**1999**). Potentiometric enantioselective membrane electrode for S-enalapril assay. *Analusis*, 27, 53-56.

ERDEM A., OZSOZ M., KIRILMAZ L., KILINC E., DALBASTI T. (**1997**). Diphenhydramine-selective plastic membrane sensor and its pharmaceutical applications. *Electroanalysis*, 9, 932-935.

ERSKINE C. R. (**1990**). *Remington's; Pharmaceutical Sciences*. Capítulo 82, *Quality Assurance and Control*. GENNARO A. R., editor. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania. 18ª edição.

FERNANDES J. C. B., KUBOTA L. T., NETO G. O. (**1999**). Potentiometric biosensor for L-ascorbic acid based on ascorbate oxidase of natural source immobilized on ethylene-vinylacetate membrane. *Anal. Chim. Acta*, 385, 3-12.

FERREIRA I. M. P. L. O., LIMA J. L. F. C. (**1993**). Tubular electrodes and other devices for potentiometric detection in FIA. *J. Flow Injection Anal.*, 10, 17-32.

FREND A. J., MOODY G. J., THOMAS J. D. R., BIRCH B. J. (**1983**). Flow injection analysis with tubular membrane ion-selective electrodes in the presence of anionic surfactants. *Analyst*, 108, 1357-1364.

FUGLEIN R., BRAUCHLE C., HAMPP N. (**1994**). Ion-selective electrodes for the determination of the antibiotic drug chlortetracycline. *Anal. Sci.*, 10, 959-962.

GHOUS T., TOWNSHEND A. (**1996**). Flow-injection determination of metriphonate by immobilized acetylcholinesterase inhibition. *Anal. Chim. Acta*, 332, 179-185.

GHOUS T., TOWNSHEND A. (**1998**). Flow-injection determination of neostigmine and galanthamine by immobilized acetylcholinesterase. *Anal. Chim. Acta*, 372, 379-386.

GOROG S., GAZDAG M., HERENYI B., HORVATH P., BAKOS P. K., MIHALYFI (**1994**). *Reviews on Analytical Chemistry – Euroanalysis VIII, Edinburg, UK, 1993. The role of analytical methods in drug development.* LITTLEJOHN D., BURNS D. T., editores. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 349-363.

GUERRERO R. S., BENITO C. G., CALATAYUD J. M. (**1993**). Online photo-reaction and fluorimetric determination of diazepam. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 11, 1357-1360.

GUO T., BAASNER J., MCINTOSH S. (**1996**). Determination of highly concentrated sodium, potassium, magnesium and calcium in dialysis solution with flow-injection online dilution and flame atomic-absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 331, 263-270.

HAMADA M. A., MOODY G. J., THOMAS J. D. R. (**1993**). Poly(vinyl chloride) matrix membrane ion-selective electrode for the analysis of procaine drug. *Anal. Proc.*, 30, 146-147.

HANSEN E. H., GHOSE A. K., RUZICKA J. (**1977**). Flow injection analysis of environmental samples for nitrate using an ion-selective electrode. *Analyst*, 102, 705-713.

HANSEN E. H., AHMED M. A. (**1991**). Poly(vinyl chloride) matrix membrane electrodes for manual and flow injection analysis of chloroquine in pharmaceutical preparations. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74, 900-905.

HASSAN S. S. M., HAMADA M. A. (**1990**). Poly(vinyl chloride) matrix membrane electrode for the selective determination of heroin in illicit powders. *Analyst*, 115, 623-625.

HASSAN S. S. M., ELNEMMA E. M., HAMADA M. A. (**1995**). Flow-injection-potentiometric determination of harmine and harmaline hallucinogens. *Electroanalysis*, 7, 656-659.

HASSAN S. S. M., EL-ZAWAAY F. M., MARZOUK A. M. (**1992**). Poly(vinyl chloride) matrix membrane electrodes for manual and flow injection determination of metal azides. *Analyst*, 117, 1683--1689.

HASSAN S. S. M., AZIZ R. M. A., SAMAD M. S. A. (**1994**). Plastic membrane electrode for the selective determination of diclofenac in pharmaceutical preparations. *Analyst*, 119, 1993-1996.

HASSAN S. S. M., MAHMOUD W. H., OTHMAN A. H. (**1996/A**). Determination of ranitidine in pharmaceutical preparations using manual and flow injection potentiometry and spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta*, 332, 39-48.

HASSAN S. S. M., AZIZ R. M. A., ABBAS A. B. (**1996/B**). Potentiometric membrane sensors for the selective determination of cinnarizine in pharmaceutical preparations. *Anal. Chim. Acta*, 321, 47-52.

HASSAN S. S. M., EL-BAHNASAWY R. M., RIZK N. (**1997**). Membrane sensors for batch and flow injection potentiometric determination of ethamsylate (cyclonamine) in pharmaceutical preparations. *Mikrochim. Acta*, 126, 217-222.

HASSAN S. S. M., MAHMOUD W. H., SAMAD M. S. A. (**1998/A**). Direct potentiometry and potentiotitrimetry of warfarin and ibuprofen in pharmaceutical preparations using PVC ferroin-based membrane sensors. *Mikrochim. Acta*, 129, 251-257.

HASSAN S. S., AMER M. M., EL-FATAH S. A. A., EL-KOSASY A. M. (**1998/B**). Microcoated wire sensors for the determination of anticancer drugs cyclophosphamide and ifosphamide in the presence of their degradates. *Talanta*, 46, 1395-1403.

HASSAN S. S., AMER M. M., EL-FATAH S. A. A., EL-KOSASY A. M. (**1998/C**). Membrane sensors for the selective determination of fluorouracil. *Anal. Chim. Acta*, 363, 81-87.

HASSAN S. S. M., ABBAS A. B., ELMOSALLAMY M. A. F. (**1998/D**). Determination of cinnarizine in pharmaceutical preparations by spectrophotometry, atomic absorption spectrometry and potentiometry. *Mikrochim. Acta*, 128, 69-74.

HASSAN S. S. M., ELNEMMA E. M., EL-NABY E. H. (**1999/A**). Solid-state planar microsensors for selective potentiometric determination of ethylmorphine. *Anal. Lett.*, 32, 271-285.

HASSAN S. S. M., MAHMOUD W. H., ELMOSALLAMY M. A. F., OTHMAN A. H. M. (**1999/B**). Determination of metformin in pharmaceutical preparations using potentiometry, spectrofluorimetry and UV-visible spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta*, 378, 299-311.

HONGBO C. (**1993**). Atropinium scopolaminium integrated microconduits in a potentiometric analytical system. *Talanta*, 40, 1445-1448.

HOPKALA H., ZAREBA S. (**1996**). Doxepin ion-selective membrane electrode, preparation and use in pharmaceutical analysis. *Chem. Anal.*, 41, 413-417.

HUANG C. L., REN J. J., XU D. F. (**1996**). Studies of the chlorpheniramine solid-state ion-selective electrode. *Talanta*, 43, 2061-2065.

HULANICKI A., TROJANOWICZ M. (**1976**). Calcium-selective electrodes with PVC membranes and solid internal contacts. *Anal. Chim. Acta*, 87, 411-417.

ICARDO M. C., ZAMORA L. L., CALATAYUD J. M. (**1998/A**). Solid-phase reactors as high stability reagent sources in flow analysis: selective flow-injection spectrophotometric determination of cysteine in pharmaceutical formulations. *Analyst*, 123, 1685-1689.

ICARDO M. C., ZAMORA L. L., CALATAYUD J. M. (**1998/B**). Entrapment of iron (III) phosphate in a polymeric matrix and their application to FIA-spectrophotometric determination of thiorizadine and chlorpromazine in pharmaceutical formulations. *Lab. Rob. Autom.*, 10, 33-37.

IONESCU M. S., STEFAN R. I., BALULESCU G. E., BUNACLU A. A., COSOFRET V. V., ENEIN H. Y. A. (**1993**). Penbutolol-selective membrane sensor. *Anal. Lett.*, 26, 2095-2105.

ISSA Y. M., IBRAHIM H., SHOUKRY A. F., EL-RASHIEDY O. A. (**1990**). Some observations on a new adiphenine-selective plastic membrane electrode based on adipheninium tetraphenylborate. *Microchem. J.*, 42, 267-273.

ISSA Y. M., RIZK M. S., SHOUKRY A. F., AZIZ R. A., FATTAH H. M. A., ATIA E. M. (**1994**). Construction and performance characteristics of new tetramisole-selective plastic membrane electrodes. *Talanta*, 41, 135-141.

ISSA Y. M., RIZK M. S., SHOUKRY A. F., EL-NASHAR R. M. (**1997**). Dipyridamole plastic membrane electrodes based on individual and mixed-ion exchangers of dipyridamolium phosphotungstate and tetraphenylborate. *Electroanalysis*, 9, 74-78.

ISSA Y. M., RIZK M. S., SHOUKRY A. F., ATIA E. M. (**1998**). Plastic membrane electrodes for amprolium. *Mikrochim. Acta*, 129, 195-200.

IUPAC (**1994**). International Union of Pure and Applied Chemistry, Analytical Chemistry Division Commission on Electroanalytical Chemistry, BUCK R. P., LINDNER E., Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes. *Pure Appl. Chem.*, 66, 2527-2536.

JOHNSON C. A. (**1986**). Drug Analysis – Why?. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 4, 689-696.

KARANDEEVA N. I., TKACH V. I., GLUKHOVA O. I., TSYGANOK L. P., MUSHIK O. V. (**1998**). Effects of ion transfer and matrix nature on the response characteristics of ion-selective electrodes reversible to imidazole derivatives. *J. Anal. Chem.*, 53, 544-550.

KATAKY R., PALMER S. (**1996**). Local anaesthetics measured by lipophilic β-cyclodextrin-based ion-selective electrodes. *Electroanalysis*, 8, 585-590.

KHALIL S. (**1999**). Ion-selective electrode for the determination of trazodone in tablets. *Analyst*, 124, 139-142.

KOJLO A., CALATAYUD J. M. (**1990**). Spectrophotometric determination of adrenaline with an oxidative column in a flow-injection analysis assembly. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8, 663-666.

KOJLO A., TARASIEWICZ H. P. (**1993**). Immobilization of hexacyanoferrate (III) for flow-injection--spectrophotometric determination of promazine. *Anal. Lett.*, 26, 593-604.

KOJLO A., CALATAYUD J. M. (**1995/A**). FIA-fluorimetric determination of adrenaline with a solid-phase reactor of manganese dioxide incorporated in polyester resin beads. *Anal. Lett.* , 42, 239-247.

KOJLO A., CALATAYUD J. M. (**1995/B**). FIA-spectrophotometric determination of N-substituted phenothiazine derivatives by oxidation with a solid-phase reactor of manganese dioxide incorporated in polyester resin beads. *Talanta*, 42, 909-913.

KONCKI R., LESZCZYNSKA E., CYBULSKA A., GLAB S. (**1996**). Penicillin enzyme biosensors based on pH membrane electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 321, 27-34.

LAASSIS B., AARON J. J. (**1997**). Flow-injection fluorimetric analysis of several aminophenothiazines based on photo-oxidation. *Analusis*, 25, 183-188.

LAPA R. A. S., LIMA J. L. F. C., SILVA A. M. R. (**1990**). Construction of calcium ion-selective electrodes without inner reference solution: an application to calcium and magnesium determinations in parenteral and haemodialysis solution. *Il Farmaco*, 45, 901-913.

LAPA R. A. S., LIMA J. L. F. C., REIS B. F., SANTOS J. L. M., ZAGATTO E. A. G. (**1997**). Photochemical-fluorimetric determination of folic acid in a multicommutated flow system. *Anal. Chim. Acta*, 351, 223-228.

LEON L. E., CATAPANO J. (**1993**). Indirect flow-injection analysis of ascorbic acid by photochemical reduction of methylene blue. *Anal. Lett.*, 26, 1741-1750.

LI X. M., CHEN M. X., RUAN F. C., NG W. Y. (**1992**). Characteristics and readout correlation of flow-injection analysis for penicillin. *Anal. Chim. Acta*, 269, 35-40.

LI J. J., PANG X. Y., GAO D., YU R. Q. (**1995/A**). Salicylate-selective electrode based on lipophilic tin(IV)phthalocyanine. *Talanta*, 42, 1775-1781.

LI J. H., SHEN G. L., YU R. Q. (**1995/B**). Reversible potentiometric ascorbic acid solid-state membrane sensor based on 4, 4' 4", 4"'-tetra-*tert*-butylphthalocyanine cobalt (II). *Analyst*, 120, 2259-2263.

LIMA J. L. F. C., MACHADO A. A. S. C. . (**1986**). Procedures for the construction of all-solid-state PVC membrane electrodes. *Analyst*, 111, 799-802.

LIMA J. L. F. C. (**1987**). Alguns aspectos da evolução e desenvolvimento de eléctrodos selectivos de ião. *Revista Portuguesa de Farmácia*, XXXVII, 71-77.

LIMA J. L. F. C., MONTENEGRO M. C. B. S. M., SILVA A. M. R. (**1990/A**). FIA potentiometric determination of salycilate in pharmaceutical preparations with a tubular detector. *J. Flow Injection Anal.*, 7, 19-33.

LIMA J. L. F. C., MONTENEGRO M. C. B. S. M. (**1990/B**). 5,5-Diethylbarbiturate tubular electrode for use in flow-injection detection systems. *Anal. Chim. Acta*, 234, 221-225.

LIMA J. L. F. C., MONTENEGRO M. C. B. S. M., SILVA A. M. R. (**1990/C**). Phenobarbital ion--selective electrode without inner reference solution, and its application to pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8, 701-704.

LIMA J. L. F. C., MONTENEGRO M. C. B. S. M., SILVA A. M. R. (**1991**). Vitamins B_1 and B_6 tubular electrodes as FIA detectors; their use in the analysis of pharmaceutical products. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9, 1041-1046.

LIMA J. L. F. C., MONTENEGRO M. C. B. S. M., CHAMARRO J. A., BARTROLI J., RAURICH J. G. (**1992**). Phenobarbiturate flow-through electrode for flow injection analysis of pharmaceutical products. *Anal. Sci.*, 8, 19-23.

LIU D., CHEN W. C., SHEN G. L., YU R. Q. (**1996**). Polymeric membrane salicylate-sensitive electrodes based on organotin(IV) carboxylates. *Analyst*, 121, 1495-1499.

MACCA C., SOLDA L., PALMA G. (**1995**). Potentiometric biosensing of penicilins using a flow-through reactor with penicillinase or penicillin amidase immobilized by gamma-irradiation. *Anal. Lett.*, 28, 1735-1749.

MARQUES M. R. C., NETO G. O. (**1997**). Poly(vinyl chloride) membrane electrodes for the determination of the antibiotic tiamulin. *Anal. Sci.*, 13, 457-461.

MATEO J. V. G., CALATAYUD J. M. (**1993**). Entrapped copper (II) carbonate for indirect determination of glycine by flow-injection atomic-absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 274, 275-281.

MENON S. K., SATHYAPALAN A., AGRAWAL Y. K. (**1977**). Ion selective electrodes in pharmaceutical analysis – a review. *Reviews in Analytical Chemistry*, XVI, 333-353.

MEYERHOFF M. E., KOVACK P. M. (**1983**). An ion-selective electrode/flow-injection analysis experiment. Determination of potassium in serum. *J. Chem. Ed.*, 60, 766-768.

MEYERHOFF M. E., OPDYCKE W. N. (**1986**). Ion-selective electrodes. *Advances in Clin. Chem.*, 25, 1-47.

MONTERO R., GALLEGO M., VALCARCEL M. (**1990**). Determination of chlordiazepoxide by zinc or cadmium reduction in a continuous system followed by atomic-absorption spectrometric. *Analyst*, 115, 943-949.

MOODY G. J., THOMAS J. D. R., LIMA J. L. F. C., MACHADO A. A. S. C. (**1988**). Characterisation of poly(vinyl chloride) barium ion-selective electrodes without inner reference solution. *Analyst*, 113, 1023-1027.

MORF W. E. (**1996**). *The Principals of Ion-Selective Electrodes and of Membrane Transport.* Elsevier Scientific Publishing Company, Budapest, Hungry.

NEUMAYR M., FRIEDRICH O., SONTAG G., PITTNER F. (**1993**). Flow-injection analysis with electrochemical detection for the determination of salicylic acid in pharmaceutical preparations. *Anal. Chim. Acta*, 273, 469-475.

NIE L., LIU D., YAO S. (**1990**). Potentiometric determination of diazepam with a diazepam ion--selecive electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8, 379-383.

OESCH U., SIMON W. (**1980**). Life time of neutral carrier based ion-selective liquid-membrane electrodes. *Anal. Chem.*, 52, 692-700.

OPSTAL M. A. J. V., WOLTERS R., BLAUW J. S., KRIMPEN P. C. V., BENNEKOM W. P. V., BULT A. (**1990**). Determination of penicillin in pharmaceutical formulations by flow-injection analysis using an optimized immobilized penicillinase reactor and iodimetric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8, 49-60.

ORTEGA F., BALLESTEROS M., CENTENERA J. I., DOMINGUEZ E. (**1990**). Enzymic flow-injection method for determination of formate. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8, 991-994.

ORTEGA F., DOMINGUEZ E. (**1996**). Selective catalytic detection of dopamine. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14, 1157-1162.

ORTIZ S. L., RIVAS G. A., CALATAYUD J. M. (**1997**). FIA-fluorimetric assembly for the determination of noradrenaline hydrochloride by a solid-phase reactor with immobilized hexacyanoferrate (III). *Mikrochim. Acta*, 126, 69-72.

PANAGOS D. S., KOUPPARIS M. A. (**1995**). Construction of an iopanoic acid ion-selective electrode and its application to pharmaceutical analysis. *Analyst*, 120, 1643-1646.

PAZ J. L. L., MATEO J. V. G., CALATAYUD J. M. (**1997**). A solid-phase reactor as the catalyst source in a flow-injection assembly. *J. Flow. Injection Anal.*, 14, 15-24.

PEDRENO C. S., ORTUNO J. A., TORRECILLAS M. C. (**1986**). Coated-wire ion-selective electrode for the determination of thallium (III). *Analyst*, 111, 1359-1361.

PEREIRA A. V., FATIBELLO O. (**1998**). Flow-injection spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in pharmaceutical formulations with online solid-phase reactor containing copper (II) phosphate. *Anal. Chim. Acta*, 366, 55-62.

PEREZ E. L., HASWELL S. J. (**1995**). Development of an FIA method with online microwave-assisted saponification of vitamin A to retinol and in-line spectrophotometric determination. *Anal. Proc.*, 32, 85-89.

PRISTA L. N., ALVES A. C., MORGADO R. (**1995**). *Tecnologia Farmacêutica*. I Volume. Capítulo 6, *Formas Farmacêuticas Obtidas por Dispersão Mecânica*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, 5ª edição.

QIN W., ZHANG Z. J., LIU H. J. (**1997**). Chemiluminescence flow sensor for the determination of vitamin B_{12}. *Anal. Chim. Acta*, 357, 127-132.

RALUCA I. S., GEORGE E. B., HASSAN Y. A. E. (**1997**). Ion-selective membrane electrodes in pharmaceutical analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 27, 307-321.

RIVAS G. A., CALATAYUD J. M. (**1995**). FIA-AAS determination of salicylic acid by solid-phase reactor of copper carbonate incorporated in polyester resin beads. *Talanta*, 42, 1285-1289.

RIVAS G. A., ROMERO A. M., CALATAYUD J. M. (**1996**). Photochemical derivatization and spectrophotometric determination of thioridazine by flow injection. *Anal. Chim. Acta*, 326, 23-28.

ROMERO A. M., BENITO C. G., CALATAYUD J. M. (**1992**). Photochemical derivatization and fluorimetric determination of promethazine in a FIA assembly. *Anal. Lett.*, 25, 1289-1308.

ROMERO A. M., BENITO C. G., CALATAYUD J. M. (**1995**). Continuous-flow-spectrophotometric determination of sulphadiazine by diazotization with in situ preparation of nitrite. *Anal. Chim. Acta*, 308, 451-456.

ROVER L., JR., GARCIA C. A. B., NETO G. O., KUBOTA L. T., GALEMBECK F. (**1998**). Acetylsalicylic acid determination in pharmaceutical samples by FIA-potentiometry using a salicylate-sensitive tubular electrode with an ethylene-vinyl acetate membrane. *Anal. Chim. Acta*, 366, 103-109.

RUIZ T. P., LOZANO C. M., TOMAS V., VAL O. (**1993**). Application of photochemical inhibition in flow injection systems: determination of epinephrine and L-dopa. *Talanta*, 40, 1625-1630.

RUIZ T. P., LOZANO C. M., SANZ A. (**1995**). Flow-injection-chemiluminometric determination of ascorbic acid based on its sensitized photo-oxidation. *Anal. Chim. Acta*, 308, 299-307.

RUZICKA J., TJELL J. C. (**1970**). The liquid-state ion-sensitive electrode. Theory and experiments with metal dithizones. *Anal. Chim. Acta*, 51, 1-19.

RUZICKA J., HANSEN E. H., TJELL J. C. (**1973**). Selectrode-The universal ion-selective electrode. Part VI. The calcium (II) selectrode employing a new ion exchanger in a nonporous membrane and a solid-state reference system. *Anal. Chim. Acta*, 67, 155-178.

RUZICKA J., HANSEN E. H. (**1975**). Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Anal. Chim. Acta*, 78, 145-157.

RUZICKA J., HANSEN E. H., ZAGATTO E. A. (**1977**). Flow injection analysis. Part VII. Use of ion--selective electrodes for rapid analysis of soil extracts and blood serum. Determination of potassium, sodium and nitrate. *Anal. Chim. Acta*, 88, 1-16.

RYCHLOVSKY P., NEMCOVA I., MISAROVA H., ZANATOVA M. (**1996**). FIA liquid-Liquid extraction spectrophotmetric determination of phenothiazine derivatives in pharmaceuticals. *Lab. Rob. Autom.*, 8, 213-219.

RYZK M. S., FATTAH H. M. A., ISSA Y. M., ATIA E. M. (**1993**). New metformim-selective plastic membrane electrode based on metformim tetraphenylborate. *Anal. Lett.*, 26, 415-428.

RYZK M. S. (**1994**). New ampicillin-selective plastic membrane and coated metal electrodes based on ampicillinium phosphotungstate ion pair. *Anal. Lett.*, 27, 1055-1065.

RYZK M. S. (**1995**). Metformim-selective poly(vinyl chloride) membrane electrode based on the metforminium phosphomolibdate ion pair. *Electroanalysis*, 7, 687-691.

SAGADEEVA O. O., TKACH V. I., GLUKHOVA O. I., TSYGANOK L. P., IVON T. A. (**1997**). Piricapiron-selective electrode and its response characteristics. *J. Anal. Chem.*, 52, 992-994.

SATAKE H. MIYATA T., KANESHINA S. (**1991**). Coated wire electrodes sensitive to local anaesthetic cations and their application to potentiometric determination. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 64, 3029-3034.

SAURINA J., CASSOU S. H., ALEGRET S., FABREGAS E. (**1999**). Determination of lysine in pharmaceutical samples containing endogenous ammonium ions by using a lysine oxidase biosensor based on an all-solid-state potentiometric ammonium electrode. *Biosens. Bioelectron.*, 14, 67-75.

SCHIRMER D. (**1982**). *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis. Introdução.* SCHIRMER D., editor. CRC, Florida, USA.

SHESTEROVA I. P., KARIBYAN E. E., TURAEVA S. S., PENZINA M. M. (**1995**). Ionometric determination of alkaloids. *Chemistry of Natural Compounds*, 31, 147-148.

SHOUKRY A. F., ISSA Y. M., IBRAHIM H., EL-RASHIEDY O. A. (**1991**). Papaverine-selective plastic membrane electrode based on papaverinium tetraphenylborate. *Anal. Lett.*, 24, 1861-1873.

SHOUKRY A. F., ISSA Y. M., RIZK M. S., EL-NASHAR R. M. (**1996**). Etilefrine plastic membrane electrodes based on individual and mixed ion-exchangers of etilefrinium phosphotungstate and tetraphenylborate. *Anal. Lett.*, 29, 1463-1475.

SHPIGUN I. K. (**1994**). *Reviews on Analytical Chemistry – Euroanalysis VIII, Edinburg, UK, 1993. Flow injection analysis with ion-selective electrodes: recente developments and applications.* LITTLEJOHN D., BURNS D. T., editores. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 246-272.

SOLICH P., MACHERAS P. E., KOUPPARIS M. A. (**1995**). Construction of a diflusinal ion sensor and its use in automated flow-injection methods for assay, content uniformity, and dissolution studies in formulations. *J. Pharm. Sci.*, 84, 889-894.

STALIKAS C. D., KARAYANNIS M. I., KARAYANNI S. M. T. (**1993**). Immobilization of glutamate oxidase on non-porous glass beads. Automated flow-injection system for the assay of glutamic acid in food samples and pharmaceuticals. *Analyst*, 118, 723-726.

STALIKAS C. D., KARAYANNIS M. I., KARAYANNI S. M. T. (**1994**). Immobilization of glutamate dehydrogenase on glass derivatives. A method for the assay of glutamates in real samples with simplex-optimized automated FIA system. *Talanta*, 41, 1561-1567.

STEFAN R. I., ENEIN H. Y. A., BAIULESCU G. E. (**1996/A**). Amiodarone-selective membrane electrode. *Sens. Actuators*, B37, 141-144.

STEFAN R. I., ENEIN H. Y. A. (**1996/B**). Disopyramide-selective membrane electrode. *Anal. Lett.*, 29, 2333-2346.

STEFAN R. I., ENEIN H. Y. A. (**1996/C**). Metomidate-sensing electrode and its pharmaceutical applications. *Anal. Lett.*, 29, 35-42.

STEFAN R. I., BAIULESCU G. E., ENEIN H. Y. A. (**1997/A**). Tamoxifen-selective membrane electrodes. *Pharmazie*, 52, 780-783.

STEFAN R. I. (**1997/B**). Lauryl sulfate as counter ion for construction of ion-selective membrane electrodes for moclobemide and disopyramide. *Anal. Chim. Acta*, 350, 105-108.

STEFAN R. I., BAIULESCU G. E., ENEIN H. Y. A. (**1997/C**). Flecainide-selective membrane electrodes. *Analusis*, 25, 39-42.

STEFAN R. I., ENEIN H. Y. A. (**1998**). Taxol-selective membrane electrodes. *J. Anal. Chem.*, 53, 551-553.

STEFAN R. I., STADEN J. F. V., ENEIN H. Y. A. (**1999**). Determination of S-enantiomers of cilazapril, pentopril and trandolapril using a potentiometric enantioselective membrane electrode. *Electroanalysis*, 11, 192-194.

STENLAKE J. B., WATT D. (**1988**). *Practical Pharmaceutical Chemistry*. Capítulo 1, *Chemical Purity and its Control*. BECKETT A. H., STENLAKE, J. B., editores. The Athalone Press, London.

SU Y., TOMASSETTI M., SAMMARTINO M. P., CRESCENTINI G., CAMPANELLA L. (**1995**). A new salicylate ISFET for the determination of salicylic and acetylsalicylic acid in drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13, 449-457.

SUZUKI H., AKIMOTO K., NAKAGAWA H. (**1991**). Quantitative analysis of sodium valproate in pharmaceutical preparations by a valproate-selective electrode. *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 133-136.

THOMAS J. D. R. (**1986**). Solvent polymeric membrane ion-selective electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 180, 289-297.

THUST M., SCHOENING M. J., VETTER J., KORDOS P., LUETH H. (**1996**). A long-term stable penicillin--sensitive potentiometric biosensor with enzyme immobilized by heterobifunctional cross--linking. *Anal. Chim. Acta*, 323, 115-121.

VALCARCEL M., CASTRO, M. D. L. (**1987**). *Flow Injection Analysis. Principles and Applications*. CHALMERS R. A., MASSON M., MILLER J. N., editores. Ellis Horwood Limited, Chichester, England.

VAN STADEN J. F. (**1986**). A coated tubular solid-state chloride-selective electrode in flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, 179, 407-417.

VELTSISTAS P. G., PRODROMIDIS M. I., KARAYANNIS M. I. (**1994**). Application of a picrolonate ion--selective electrode to the assay of calcium and piperazine in pharmaceuticals and serum. *Analyst*, 119, 1613-1617.

VOULGAROPOULOS A., SOFONIOU M., KAZAKOU E. (**1993**). Performance characteristics of a labetalol-H^+-tetraphenylborate selective electrode. *Electroanalysis*, 5, 525-528.

WATANABE K., OKADA K., ODA H., FURUNO K., GOMITA Y, KATSU T. (**1995**). New cocaine-selective membrane electrode. *Anal. Chim. Acta*, 316, 371-375.

WATANABE K., OKADA K., KATSU T. (**1996**). Development of an amphetamine-selective electrode. *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*, 42, P-33.

WATT D. (**1988**). *Practical Pharmaceutical Chemistry*. Capítulo 11, *Medicaments in formulations*. BECKETT A. H., STENLAKE, J. B., editores. The Athalone Press, London.

YAO S., LIU D., NIE L. (**1990**). Potentiometric determination of iodipamide using an iodipamide ion-selective electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8, 373-377.

YING M., YUAN R., LI Z. Q., SONG Y. Q., SHEN G. L., YU R. Q. (**1998**). Salicylate-sensitive membrane electrode based on copper (II) tetraaza[14]annulene macrocyclic complex. *Anal. Lett.*, 31, 1965-1977.

ZAMORA L. L., CALATAYUD J. M. (**1995**). Continuous flow-injection atomic-absorption spectrometric method for the determination of ondansetron. *Anal. Chim. Acta*, 300, 143--148.

ZAREH M. M., EL-SHEIKH R., ISSA Y. M., SHOUKRY A. F. (**1992**). Plastic membrane and coated-wire ion-selective electrodes for propylhexedrine. *Anal. Lett.*, 25, 663-680.

ZAREH M. M., EL-SHEIKH R., EL-BAHNASAWY R., EL-NAGA D. O. A. (**1998**). Potentiometric and optical measurements for the determination of ephedrine. *Microchem. J.*, 60, 110-121.

ZHANG Z., LI Y., MAO D., COSOFRET V. V. (**1990**). Sensitive membrane electrodes for the determination of vitamin B_1 and vitamin B_6. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8, 385-388.

ZHANG Z. R., YU R. Q. (**1994**). Primary amine drug-sensitive poly(vinyl chloride) membrane electrodes based on synthetic macrocyclic polyether derivatives of *o*-phenanthroline. *Anal. Chim. Acta*, 285, 81-88.

ZHANG C. X., HUANG J. H., ZHANG Z. J., AIZAWA M. (**1998**). Flow injection chemiluminescence determination of cathecolamines with electrogenerated hypochlorite. *Anal. Chim. Acta*, 374, 105-110.

ASPECTOS GERAIS DE ORDEM EXPERIMENTAL

II.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Genericamente, cada trabalho desenvolvido ao longo desta dissertação foi iniciado pela construção e caracterização de vários eléctrodos selectivos com configuração convencional, selectivos a espécies orgânicas com interesse na área farmacêutica. As unidades construídas diferiam na composição química das membranas sensoras. Com a membrana, que conferia aos eléctrodos as melhores características de funcionamento, procedeu-se à construção e caracterização de eléctrodos com configuração tubular. A utilidade analítica dos detectores potenciométricos preparados foi testada efectuando a sua aplicação na análise de formulações farmacêuticas.

No sentido de evitar repetições exaustivas e desnecessárias ao longo desta dissertação, faz-se referência neste capítulo aos aspectos experimentais relativos à construção e avaliação dos eléctrodos convencionais e detectores tubulares e/ou aos materiais e métodos envolvidos nesses procedimentos, reservando-se para a parte experimental de cada capítulo as informações que lhe são particulares.

As metodologias aqui envolvidas, quer na construção, quer na avaliação de eléctrodos de configuração convencional e tubular, foram abordadas, sempre que possível, em paralelo. Ao longo deste capítulo foram também referidos alguns aspectos teóricos que se julgaram importantes para a interpretação de alguns resultados apresentados.

II.2 MATERIAL E APARELHOS UTILIZADOS

Todas as soluções foram preparadas em balões volumétricos de classe A, com diferentes capacidades. Para as medições de volumes rigorosos iguais ou superiores a 5,00 mL foram usadas pipetas volumétricas de vidro, classe A. Para volumes inferiores recorreu-se a pipetas automáticas Gilson, modelos P100, P1000 e P5000, de volume regulável. As pesagens eram realizadas numa balança Mettler, AE 163, com uma precisão igual a 0,00001 g.

Sempre que era necessário promover a dissolução de substâncias sólidas, quer pela sua solubilidade reduzida, quer numa tentativa de reduzir o tempo envolvido na preparação de amostras, nomeadamente as formulações farmacêuticas, foi usado um banho de ultra-sons termostatado, da marca Bandelin, modelo Sonorex RK 100H.

Nos casos em que o sensor iónico das membranas dos eléctrodos era obtido por uma reacção de precipitação, houve necessidade de proceder à filtração do composto sintetizado, recorrendo a um cadinho de porcelana G4. Para facilitar a recolha do filtrado retido na membrana, adaptou-se ao cadinho um círculo de papel de filtro Whatman, n.º 2.

II.2.1 MATERIAL E APARELHOS PARA AVALIAÇÕES CONVENCIONAIS

As diferenças de potencial entre o eléctrodo indicador e o eléctrodo de referência foram medidas com um decimilivoltímetro Crison, μpH 2002 (sensibilidade ± 0,1 mV).

No caso particular dos procedimentos experimentais que decorreram em condições estacionárias, e por forma a que fosse possível a leitura simultânea da diferença de potencial entre cada um de vários eléctrodos indicadores e o eléctrodo de

referência, acoplou-se um comutador de eléctrodos construído de acordo com o descrito em Barros *et al.*, 1983.

Sempre que se pretendia que os ensaios decorressem a uma temperatura constante, as determinações eram efectuadas numa cuba de paredes duplas, Metrohm, EA-876-20. A temperatura era mantida constante através da circulação de água, entre as paredes da referida cuba, proveniente de um banho termostatado, Julabo, EM74. Para uma agitação constante das soluções em estudo utilizou-se um agitador magnético da Crison, modelo 2038.

II.2.2 ELEMENTOS CONSTITUINTES DAS MONTAGENS FIA

Nas determinações em fluxo, que ao longo de todos os trabalhos foi de tipo contínuo, utilizaram-se montagens simples e pouco dispendiosas, que permitiam a introdução reprodutível de um determinado volume de amostra, num fluxo de solução transportadora. Estas montagens eram também caracterizadas por uma grande versatilidade permitindo alterar, com facilidade, algumas das suas características físicas. De um modo geral, as montagens de fluxo eram constituídas por um sistema de propulsão, uma unidade de introdução da amostra, um sistema de transporte da amostra e de reacção e, ainda, uma unidade de detecção e registo dos sinais analíticos.

Como sistema de propulsão utilizou-se uma bomba peristáltica, Gilson, Minipuls 3, de quatro canais, semelhante à indicada na Figura II.1. Os tubos de propulsão das soluções eram Tygon®, com diâmetros internos que variavam de acordo com a velocidade de fluxo pretendida, genericamente entre 2 a 10 mL min^{-1}.

As amostras eram introduzidas em fluxo através de uma válvula de injecção rotatória manual, com quatro vias, da marca Rheodyne, 5020. Este sistema de injecção da amostra permitia a introdução de um volume de amostra fixo, cujo valor

era definido pelo comprimento de um tubo de politetrafluoroetileno, Teflon®, Omnifit, com 0,8 mm de diâmetro interno (d.i.). Ao longo dos vários trabalhos utilizaram-se volumes de amostra iguais a 70, 170, 270, 570 e 1070 μL.

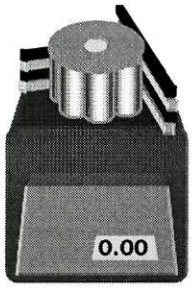


Figura II.1 Bomba peristáltica. Sistema de propulsão utilizado nas montagens de fluxo contínuo.

Os tubos usados para o transporte da amostra ou de outras soluções, bem como para a preparação das unidades de reacção utilizadas para promover a mistura da amostra com uma outra solução, eram também em Teflon® e apresentavam 0,8 mm de d.i.. As unidades de reacção eram constituídas pelo mesmo material de Teflon®, formando um reactor "malha", cuja configuração conduzia a uma mistura adequada entre as duas soluções (Clark *et al.*, 1989). Sempre que necessário, a confluência das soluções foi estabelecida através de um dispositivo de configuração "Y", construído em Perspex®, poli(metacrilato de metilo). A ligação entre os vários elementos da montagem de fluxo era efectuada recorrendo ao mesmo tubo Teflon® com as extremidades *flangeadas*, às quais se adaptavam os terminais correspondentes, Teflon®, Omnifit. Em alternativa, recorreu-se a "luvas", pequenos troços de tubos de impulsão com o diâmetro adequado.

A adaptação do sistema detector à montagem de fluxo era estabelecida através de módulos de suporte adequados, construídos em Perspex®, de acordo com Alegret

et al., 1987. Indicam-se nas Figura II.2 e Figura II.3, respectivamente, os módulos de suporte do eléctrodo indicador de configuração tubular e do eléctrodo de referência.

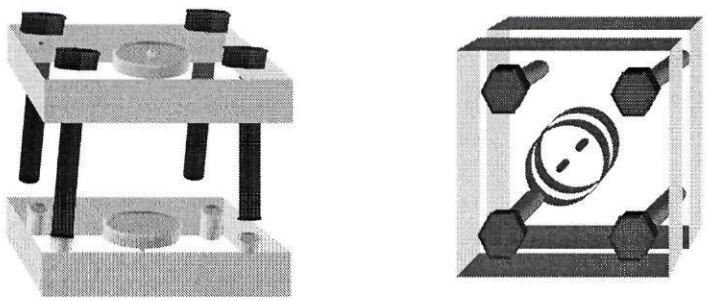


Figura II.2 Módulo de suporte dos eléctrodos com configuração tubular. Vista lateral (lado esquerdo) e vista de topo (lado direito).

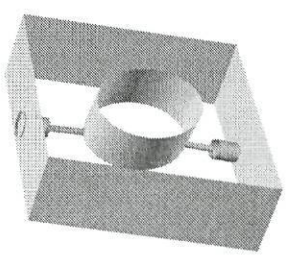


Figura II.3 Módulo de suporte do eléctrodo de referência. Cavidade central para encaixe deste eléctrodo e canais de entrada e saída de solução, aos quais se adaptavam tubos de Teflon® através dos conectores adequados.

As diferenças de potencial indicadas pelo sistema de detecção eram medidas pelo decimilivoltímetro, ao qual se encontrava electricamente ligado, e registadas por um registador Kipp & Zonen, BD 111.

Por forma a eliminar o ruído eléctrico, foi ainda necessário inserir na montagem de fluxo um "eléctrodo de ligação à terra" (Figura II.4). Este eléctrodo consistia num

tubo de aço com cerca de 0,8 mm de diâmetro interno e 12 mm de comprimento, ao qual era soldado um cabo eléctrico (Alegret *et al.*, 1987).

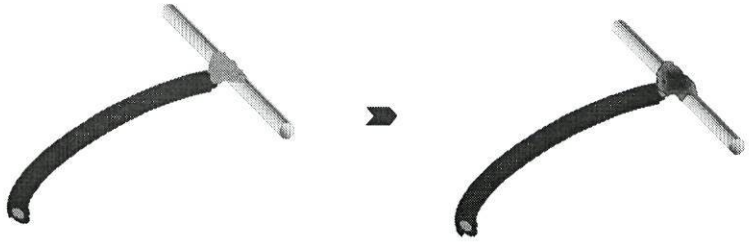


Figura II.4 Preparação de um "eléctrodo de ligação à terra". Adaptação do fio condutor interno de um cabo eléctrico blindado a um tubo de aço com 0,8 mm de d.i. e cerca de 12 mm de comprimento. Fixação do fio condutor ao tubo de aço com solda.

II.3 ELÉCTRODOS UTILIZADOS

Em todas as situações, as diferenças de potencial eram obtidas em relação a um eléctrodo de referência de dupla junção, de cloreto de prata / prata, Orion, 90-02-00. A solução interna era uma solução saturada de cloreto de potássio, à qual haviam sido adicionadas algumas gotas de uma solução aquosa de nitrato de prata com uma concentração igual a 0,1 M. A adição deste sal prevenia a dissolução do cloreto de prata que recobria o fio de prata, evitando assim possíveis alterações do potencial fornecido por este eléctrodo. No compartimento externo do eléctrodo utilizaram-se soluções com a composição que se julgou ser a mais adequada para o eléctrodo selectivo em estudo. Considerando o possível escorrimento desta solução, optou-se, em cada caso, por uma solução cuja composição não representasse uma

interferência significativa no comportamento do eléctrodo. Sendo assim, após a avaliação da influência de alguns iões inorgânicos nos registos de potencial dos eléctrodos, escolhia-se um electrólito que apresentasse na sua constituição um ião cuja interferência não fosse representativa.

Aquando do estudo da influência do pH das soluções nas características de resposta dos eléctrodos preparados, utilizou-se um eléctrodo de vidro Phillips, GAH 110. Esta unidade foi também utilizada no controlo do valor de pH das várias soluções tampão preparadas.

II.4 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados eram de qualidade p.a. ou semelhante, sem terem sido submetidos a qualquer purificação adicional.

A água utilizada para a preparação das soluções aquosas era desionizada, com uma condutividade igual ou inferior a 0,1 $\mu S\ cm^{-1}$. As soluções aquosas mais concentradas foram preparadas por pesagem rigorosa dos sólidos correspondentes e posterior diluição em água ou solução ajustadora dos valores de pH e/ou força iónica. As menos concentradas foram preparadas por diluição rigorosa das anteriores.

As formas farmacêuticas analisadas ao longo deste trabalho, e que se tentou serem todas aquelas disponíveis no mercado português, foram obtidas no comércio local. Em situações particulares recorreu-se a formulações preparadas pelo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

II.5 CONSTRUÇÃO DOS ELÉCTRODOS CONVENCIONAIS E TUBULARES

Para a construção dos eléctrodos selectivos seguiram-se metodologias similares àquelas propostas por Lima *et al.*, 1986, para as unidades de configuração convencional, e por Alegret *et al.*, 1984, para as unidades de configuração tubular.

Independentemente do tipo de configuração, a fase inicial da construção dos eléctrodos passou sempre pela preparação de uma estrutura de suporte à membrana sensora. Descrevem-se de seguida, em pormenor, as várias etapas envolvidas na construção daqueles detectores potenciométricos.

II.5.1 PREPARAÇÃO DOS CORPOS DOS ELÉCTRODOS

II.5.1.1 CONFIGURAÇÃO CONVENCIONAL

Como base da estrutura de suporte dos eléctrodos convencionais utilizaram-se três cilindros de Perspex®, com diâmetros internos e externos tais que permitiam os seus encaixes mútuos (Figura II.5).

O corpo do eléctrodo era definido pelo cilindro de diâmetro intermédio, C_m, ao qual se fixavam com clorofórmio, os restantes cilindros. O de maior diâmetro, C_e, ligado à superfície externa e superior de C_m, tinha como função o suporte de toda a estrutura numa posição vertical, quando os eléctrodos eram inseridos nos orifícios das tampas das cubas usadas nos ensaios de avaliação. O cilindro de menor diâmetro, C_i, ligado à superfície interna e a, aproximadamente, 8 mm da extremidade inferior de C_m, tinha como função o suporte e fixação da parte condutora destas unidades potenciométricas, cuja preparação foi referida mais adiante.

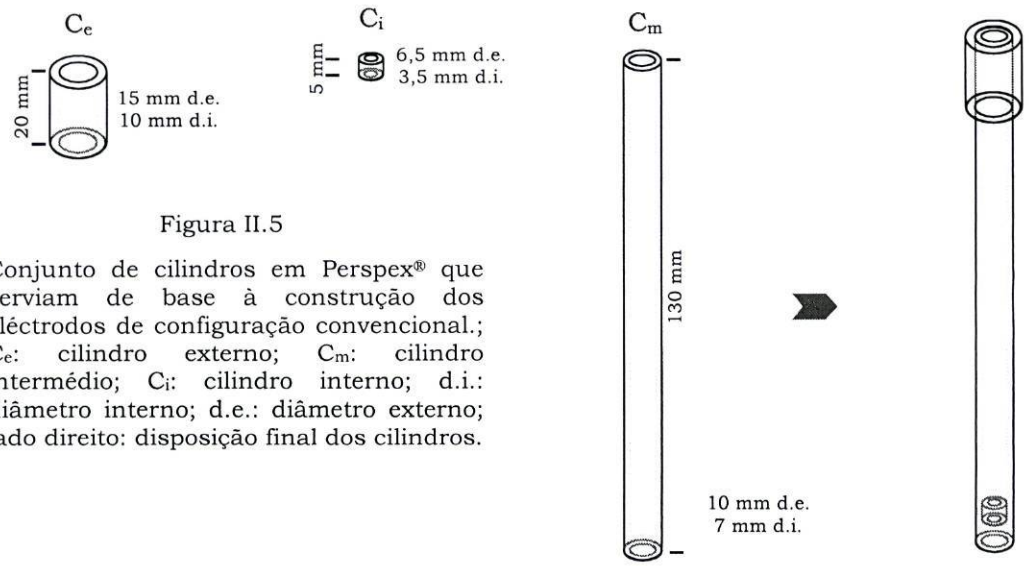


Figura II.5

Conjunto de cilindros em Perspex® que serviam de base à construção dos eléctrodos de configuração convencional.; C_e: cilindro externo; C_m: cilindro intermédio; C_i: cilindro interno; d.i.: diâmetro interno; d.e.: diâmetro externo; lado direito: disposição final dos cilindros.

Uma vez preparada esta estrutura em Perspex®, adaptou-se-lhe uma placa de cobre. Esta placa, de aproximadamente 0,25 mm de espessura, foi cortada, com auxílio de um punção, de modo a ficar com cerca de 7 mm de diâmetro. Ao centro desta placa de metal soldou-se o fio interno de um cabo eléctrico coaxial blindado (Figura II.6). Este conjunto foi introduzido no interior do corpo do eléctrodo de modo a que a placa de cobre ficasse retida em C_i (Figura II.6). Por forma a obter uma estrutura mais robusta optou-se pela fixação do cabo blindado à extremidade superior do corpo do eléctrodo aplicando uma mistura epoxídica (10:4 (g/g) Araldite M/ endurecedor HR, ambos Ciba-Geigy) ou, em alternativa, uma cola de Perspex® preparada pela dissolução deste polímero em clorofórmio (Figura II.7). Na extremidade livre do cabo blindado, era adaptado um terminal, tipo BNC, através do qual foi possível estabelecer o contacto eléctrico com o decimilivoltímetro (Figura II.7).

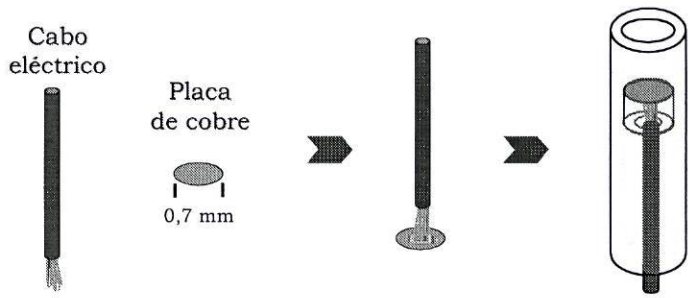


Figura II.6 Fixação da placa de cobre ao cabo eléctrico coaxial blindado. Colocação deste conjunto no interior do estrutura de suporte em Perspex®.

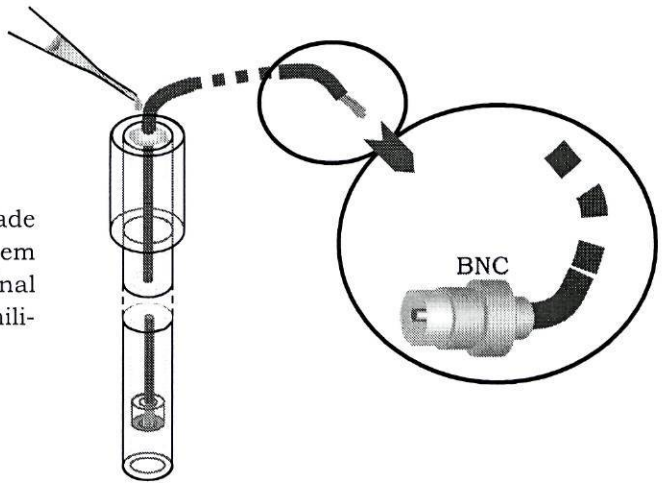


Figura II.7

Fixação do fio blindado à extremidade superior da estrutura de suporte em Perspex e a adaptação de um terminal BNC para ligação eléctrica ao decimili-voltímetro.

A cavidade no corpo do eléctrodo deixada sobre a placa de cobre foi preenchida com uma mistura condutora, constituída por 1,0 g de Araldite M e 0,4 g de endurecedor HR. A uma quantidade equivalente a 0,20 g da mistura anterior incorporaram-se 0,24 g de grafite em pó, de granulometria inferior a 50 μm, Merck

4206 (Lapa *et al.*, 1990). Nesta fase, a homogeneidade da mistura era de extrema importância, já que dela dependiam as propriedades eléctricas do suporte da membrana sensora.

A mistura condutora preparada, em quantidade suficiente para a construção de seis unidades potenciométricas, foi então aplicada sobre a placa de cobre formando uma camada com cerca de 7 mm de altura (Figura II.8). Durante esta aplicação houve o cuidado de evitar o aparecimento de bolhas de ar, compactando-se ao máximo a mistura dentro da cavidade que lhe era destinada.

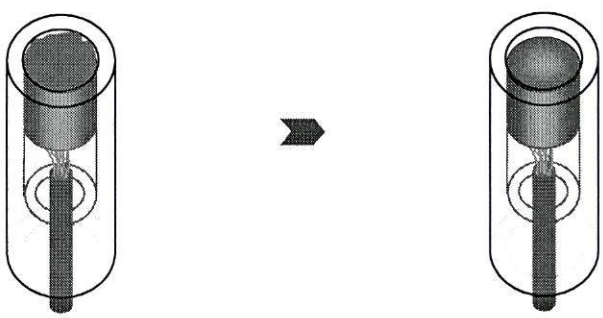


Figura II.8 Aplicação da mistura condutora, composta por resina epoxídica e grafite, sobre a placa de cobre inserida no módulo de Perspex®. Cavidade de aproximadamente 2 mm de profundidade após o polimento da superfície.

Para facilitar a polimerização e endurecimento do polímero não condutor, colocaram-se as unidades em estufa, a cerca de 90°C e durante um período de aproximadamente 24 horas. Tendo em vista a acomodação da membrana sensora no eléctrodo, a superfície condutora foi desgastada e alisada, até ao aparecimento de uma cavidade com cerca de 1 a 2 mm de profundidade (Figura II.8).

II.5.1.2 CONFIGURAÇÃO TUBULAR

Como base do corpo dos eléctrodos de configuração tubular estava um cilindro de Perspex® equivalente ao C_m, utilizado nas construção dos eléctrodos de configuração convencional, embora com apenas 7 mm de comprimento (Figura II.9). Na parede deste cilindro fez-se um orifício lateral que tinha por objectivo a introdução do fio interno de um cabo eléctrico coaxial blindado. Este fio era introduzido de modo a ficar encostado à parede interna do cilindro por forma a prevenir qualquer contacto posterior com a membrana sensora (Figura II.9).

Após adaptação do cabo blindado no interior do cilindro, este foi preenchido com uma mistura condutora à base de grafite (Alegret *et al.*, 1987), de igual composição àquela utilizada nos eléctrodos de configuração convencional. Também aqui houve o cuidado de evitar a formação de bolhas de ar aquando do preenchimento do cilindro com a mistura condutora. Para além disso, houve ainda o cuidado de garantir uma boa fixação do fio condutor central do cabo eléctrico à mistura aplicada, mas mantendo-o sempre com um posicionamento periférico dentro da cavidade (Figura II.10). As unidades foram igualmente colocadas numa estufa, para secagem completa da resina não condutora, mantendo para isso as condições usadas para este efeito aquando da preparação dos eléctrodos de configuração convencional.

Por forma a garantir o ajuste adequado das unidades aos módulos de suporte correspondentes (Figura II.2) foi necessário proceder ao alisamento das superfícies exteriores de grafite (Figura II.10), procedendo-se de seguida ao seu isolamento eléctrico através da aplicação de uma resina epoxídica não condutora. A resina não condutora, com a mesma composição da utilizada na construção dos corpos dos eléctrodos convencionais, foi aplicada com a ajuda de um pequeno pincel de modo a formar uma fina película (Figura II.11). Esta resina foi ainda utilizada para a fixação do cabo blindado à superfície exterior de Perspex® (Figura II.11), garantindo-se,

assim, uma maior robustez da estrutura construída. Tal como para as unidades de configuração convencional, a secagem desta resina foi efectuada em estufa.

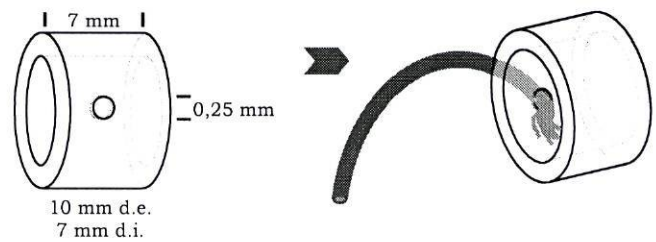


Figura II.9 Cilindro em Perspex® que serviu de base à construção dos eléctrodos de configuração tubular, com um orifício lateral para entrada do cabo eléctrico.

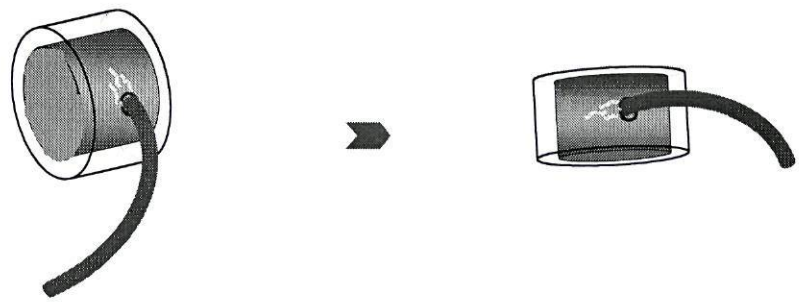


Figura II.10 Preenchimento da cavidade interna do cilindro com mistura condutora. Superfícies exteriores de grafite polidas.

Numa fase final, perfurou-se o centro do módulo tubular com uma broca de 1,3 mm de diâmetro. Resultou assim um orifício longitudinal centrado (Figura II.11), local onde se aplicou posteriormente a membrana sensora. À extremidade do cabo eléctrico foi também adaptado um terminal BNC para a ligação da unidade resultante ao decimilivoltímetro (Figura II.11).

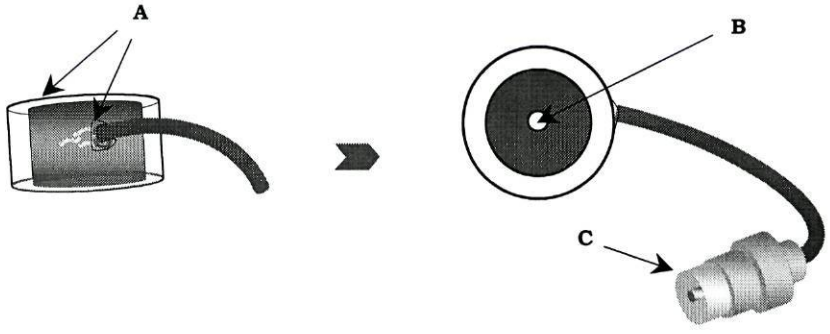


Figura II.11 Superfície dos corpos dos eléctrodos tubulares electricamente isoladas com resina epoxídica não condutora (A). Orifício longitudinal central com aproximadamente 1,3 mm de diâmetro (B) e adaptação de um terminal BNC ao cabo coaxial blindado (C).

Uma vez construídos, os corpos dos eléctrodos encontravam-se prontos para receber a membrana sensora, cuja preparação se descreve de seguida.

II.5.2 PREPARAÇÃO E APLICAÇÃO DAS MEMBRANAS SENSORAS

Para a preparação dos sensores recorreu-se, sempre que possível, à sua síntese através de uma reacção de precipitação. Estas reacções foram efectuadas misturando, em goblé, 50,0 mL de uma solução aquosa do ião para o qual o eléctrodo se pretendia selectivo, com uma concentração habitualmente igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1}, e 100,0 mL de uma solução aquosa de extractor iónico com o mesmo valor de concentração. Quando o crescimento dos cristais era muito lento ou deficiente induziu-se a cristalização. Numa fase posterior, separaram-se os cristais da solução mãe através de uma filtração em cadinho de porcelana. Os cristais retidos neste processo eram então lavados, com 4 porções de 20 mL de água desionizada e,

posteriormente, guardados em frasco de vidro escuro e dentro de um exsicador, no sentido de prevenir possíveis alterações pela luz.

Para a preparação das soluções sensoras dissolveu-se uma quantidade determinada dos cristais preparados num solvente mediador apropriado. Quando se pretendia a presença de um aditivo na membrana, este era dissolvido no solvente mediador conjuntamente com o sensor iónico.

Quando na impossibilidade de preparar uma solução aquosa de extractor com, pelo menos, $1x10^{-2}$ mol L^{-1}, recorria-se a uma extracção em fase orgânica. Para isso, dissolveu-se uma dada quantidade de extractor iónico em solvente mediador plastificante (numa quantidade máxima de cerca de 2 g), ao qual se juntavam cerca de 10 mL de clorofórmio. A adição deste solvente tinha apenas como finalidade aumentar o volume da fase orgânica, facilitando assim a sua manipulação durante o processo extractivo. Procedeu-se então à agitação vigorosa da fase orgânica, com cerca de 20 mL de uma solução aquosa do ião para o qual o eléctrodo se pretendia selectivo, com uma concentração de $1x10^{-2}$ mol L^{-1}. Após separação das duas fases, rejeitou-se a fase aquosa e repetiu-se quatro vezes o procedimento de extracção com nova solução aquosa. Na etapa final, a fase orgânica foi feita passar por um funil, com papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro, para um pequeno frasco de vidro escuro. Em seguida, procedeu-se à evaporação do clorofórmio em corrente de azoto. As soluções sensoras assim preparadas eram armazenadas no mesmo recipiente, e em presença de sulfato de sódio anidro, até serem utilizadas na preparação das membranas. Quando estas se pretendiam com um aditivo, este era adicionado em quantidade apropriada, a 0,4 mL das soluções sensoras.

Procedeu-se entretanto à preparação das membranas sensoras correspondentes através da sua incorporação numa matriz imobilizadora de poli(cloreto de vinilo) (PVC). Para isso, adicionou-se 0,4 mL de solução sensora a uma solução preparada pela dissolução de 0,18 g de PVC em cerca de 6 mL de tetrahidrofurano (THF). Na maioria dos casos optou-se por este tipo de polímero imobilizador, com excepção do

trabalho relativo a eléctrodos selectivos de tetraciclina (capítulo VI), onde se refere a utilização de um co-polímero de etileno e acetato de vinilo. As composições das membranas preparadas encontram-se indicadas detalhadamente em cada capítulo.

As soluções de membrana sensora foram então aplicadas directamente sobre o suporte condutor dos eléctrodos construídos. No caso dos eléctrodos convencionais, a aplicação foi efectuada de acordo com o proposto por Lima *et al.*, 1986, gotejando a solução sensora imobilizada sobre o suporte condutor (Figura II.12). Para cada aplicação efectuada, deixava-se o tetrahidrofurano evaporar totalmente. Este procedimento foi repetido o número de vezes suficiente para que a membrana resultante preenchesse a cavidade do corpo do eléctrodo (Figura II.12). Para a sua completa secagem, os eléctrodos foram mantidos numa posição vertical, ao ar, durante um período de aproximadamente 24 horas. Após este intervalo de tempo, os eléctrodos foram colocados a condicionar numa solução aquosa do ião principal, com uma concentração igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}. Era também nesta solução que os eléctrodos eram mantidos enquanto estavam fora de uso.

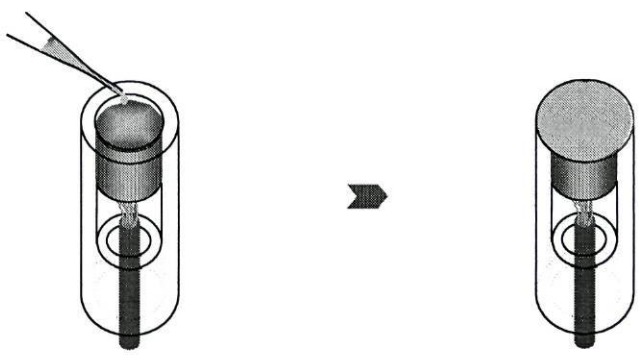


Figura II.12 Aplicação da solução da membrana, no suporte condutor dos corpos de configuração convencional.

Para os eléctrodos tubulares, a solução da membrana sensora era aplicada por escorrimento, gota a gota, ao longo do orifício longitudinal do corpo do módulo tubular (Figura II.13). Este procedimento era repetido o número de vezes suficiente para obter uma fina película de membrana que permitia deixar liberto um orifício interno com um diâmetro de aproximadamente 0,8 mm (Figura II.13), igual ao d.i. dos tubos de fluxo utilizados. Cada aplicação foi efectuada após a película anterior ter evaporado totalmente. Uma vez terminada a deposição, e tal como para os eléctrodos de configuração convencional, os detectores tubulares foram deixados ao ar, durante um período de aproximadamente 24 horas. Após a completa secagem da membrana sensora, efectuava-se o seu condicionamento numa solução aquosa de concentração igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1} em ião principal. Por forma a garantir que esta solução estivesse em contacto permanente com a membrana, houve necessidade de inserir a unidade tubular construída no sistema de fluxo, fazendo-se passar, continuamente, a referida solução, a uma velocidade reduzida, ou, em alternativa, injectando-se a solução de condicionamento, seguindo a configuração indicada na Figura II.14.

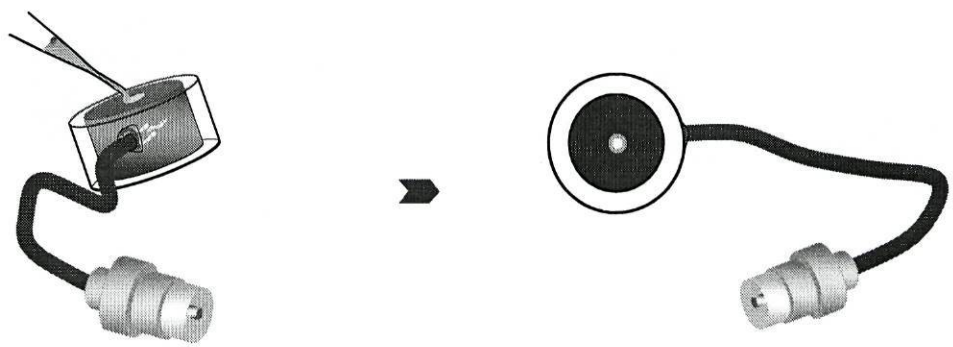


Figura II.13 Aplicação da solução da membrana, gota a gota, directamente sobre o suporte de resina epoxídica condutora nos corpos de configuração tubular. Após secagem, o orifício central era de, aproximadamente, 0,8 mm de diâmetro.

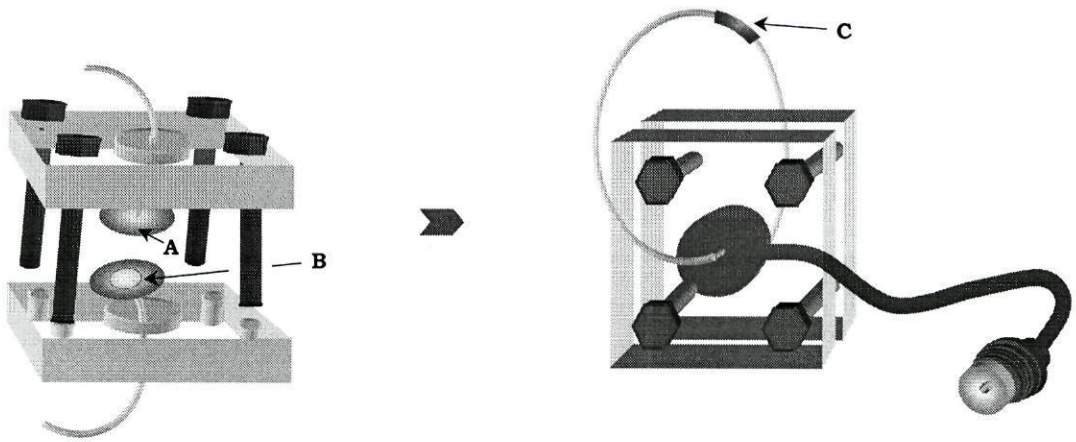


Figura II.14 Adaptação dos eléctrodos tubulares ao módulo de suporte através de duas borrachas (A) fixadas pela ponta flangeada (B) dos tubo de Teflon®. O corpo do eléctrodo inserido no módulo de suporte, em contacto com a solução de condicionamento presente no interior dos tubos de Teflon®, estes em circuito fechado com a ajuda de um pequeno troço de tubo de impulsão (C).

II.5.3 RECUPERAÇÃO DO CORPO DOS ELÉCTRODOS

Tanto para os de configuração convencional como para os de configuração tubular, sempre que a resposta dos eléctrodos se tornava deficiente, recuperou-se o corpo do eléctrodo para que este fosse reutilizado na construção de outras unidades. Para isso, procedeu-se à remoção da membrana presente no suporte condutor.

Relativamente aos eléctrodos de configuração convencional, a membrana plástica foi removida manualmente. Para garantir a sua remoção completa, retirou-se uma camada fina de suporte condutor, com o auxílio de um objecto cortante, até ao aparecimento de uma superfície externa lisa e brilhante. Seguiu-se então o desgaste da superfície de cilindro Perspex® até que a cavidade deixada para futuras aplicações apresentasse uma profundidade de aproximadamente 2 mm. O suporte condutor, ausente de qualquer vestígio de membrana, era então lavado com THF. A

recuperação dos corpos dos eléctrodos era possível enquanto o suporte de resina epoxídica e grafite recobrisse a placa de cobre.

Para a remoção da membrana dos eléctrodos de configuração tubular fez-se passar várias vezes uma broca de 1,3 mm de diâmetro através do orifício central. Posteriormente, lavou-se o orifício com THF para garantir a remoção de qualquer resíduo de membrana. Para este tipo de detectores, a recuperação do corpo de um eléctrodo estava limitada pela dimensão do orifício central. Assim, quando o diâmetro ia além de 1,5 mm, o corpo do eléctrodo era rejeitado.

II.6 METODOLOGIAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS ELÉCTRODOS SELECTIVOS DE IÃO

Para a avaliação de todas as características de funcionamento dos eléctrodos, teve-se sempre por base a medida dos sinais analíticos da célula potenciométrica, cujos valores se relacionavam com os de uma "grandeza conhecida". A partir deste procedimento, efectuado em condições especificadas, e então designado por calibração, foi possível determinar uma série de características de funcionamento das unidades construídas.

Para determinar a zona de operacionalidade das unidades em que a resposta do eléctrodo se mantinha inalterada perante variações do valor de pH da solução, procedeu-se ao traçado de diagramas de *Reilley*. Foi também avaliada a interferência de outros iões, que não aquele para o qual o eléctrodo tinha sido construído, no sinal analítico, através da determinação de coeficientes de selectividade potenciométrica.

As metodologias envolvidas em todas estas determinações, bem como os significados correspondentes, serão clarificadas nos parágrafos que se seguem. Optou-se, sempre que possível, por seguir as normas e recomendações de reconhecimento e aceitação global descritas na *International Union of Pure and*

Applied Chemistry. A escolha destas publicações periódicas baseou-se também na sua actualidade, encontrando-se nelas as recomendações mais actuais a nível mundial, em particular aquelas referentes a nomenclatura, procedimentos de calibração, avaliação das características de selectividade, etc., de eléctrodos selectivos de ião.

II.6.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO E SEUS PARÂMETROS

As características de funcionamento dos eléctrodos selectivos obtidas a partir do traçado experimental das curvas de calibração da célula potenciométrica, foram designadas por parâmetros da curva de calibração. Entre estes encontram-se o limite inferior de resposta linear, o limite de detecção, o declive, a zona de resposta linear do eléctrodo e a repetibilidade do sinal analítico.

A variação dos parâmetros característicos de cada célula de eléctrodo selectivo, ao longo do traçado periódico de curvas de calibração, permitiu ainda estimar a durabilidade das unidades construídas, aqui designada por tempo de vida.

II.6.1.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

De acordo com recomendações internacionais para a nomenclatura de eléctrodos selectivos de ião (IUPAC, 1994/B), a curva de calibração de uma célula potenciométrica, constituída pelo eléctrodo selectivo e o de referência, deve ser representada pela força electromotriz dessa célula em ordenada e pelo valor de logaritmo da actividade (ou concentração) do ião, para o qual o eléctrodo se considera selectivo, em abcissa.

Também de acordo com as mesmas recomendações (IUPAC, 1994/B) a força electromotriz de uma célula de eléctrodo selectivo de ião corresponde à diferença entre o potencial do mesmo e o potencial do eléctrodo de referência. Em termos práticos, regista-se para cada medida potenciométrica uma diferença de potencial. Os sinais analíticos da célula potenciométrica citados ao longo desta dissertação correspondem então a uma diferença de potencial, representada por ΔE, mV.

A utilização de concentração (*c*) em vez de actividade (*a*) pressupunha condições experimentais particulares para as quais a equação de *Nernst-Nicolski* (equação II.1), que representa matematicamente a resposta de uma célula potenciométrica e que refere *a*, continuaria válida. Esta substituição tornou-se implícita dada a dificuldade prática em determinar o factor de actividade (y_i, equação II.2) por desconhecimento de, por exemplo, o "tamanho iónico" dos iões orgânicos estudados (d_i, equação II.3).

$$E = constante + \frac{2,303RT}{z_A F} \log a_A$$

equação II.1 Equação de *Nernst-Nicolski*. *E*: valor experimental de potencial de um eléctrodo selectivo de ião; *R*: constante dos gases perfeitos, 8,3144 J K^{-1} mol^{-1}; *T*: temperatura termodinâmica, K; *F*: constante de Faraday, 9,64846x10^4 C mol^{-1}; a_A: actividade do ião principal, mol l^{-1} ou mol kg^{-1}; *"constante"*: inclui o potencial normal do eléctrodo selectivo, o potencial do eléctrodo de referência e o potencial de junção líquida, mV.

$$a_i = y_i c_i$$

equação II.2 Relação matemática entre actividade e concentração de uma espécie química, designada simbolicamente por "i". *a*: actividade, mol L^{-1}; *y*: factor de actividade; *c*: concentração, mol L^{-1}.

$$-\log y_i = \frac{Az_i^2\sqrt{I}}{1+Bd_i\sqrt{I}}$$

equação II.3 Equação de *Debye-Huckel* para o cálculo do factor de actividade, y, relativamente à espécie "i". A, B: constantes que variam com a constante dieléctrica, a densidade e a temperatura do solvente puro; z_i: carga do ião i; d_i: diâmetro "efectivo" do ião; I: força iónica. Aplicável para soluções de força iónica igual ou inferior a $1x10^{-1}$ mol Kg^{-1} (IUPAC, 1993).

De um ponto de vista teórico, e utilizando soluções puras de ião principal, a utilização de c era possível desde que se garantisse que o valor de a igualasse ou fosse proporcional ao valor de c. Para que se pudesse assumir que a era igual a c, seria necessário recorrer à utilização de soluções cuja concentração fosse inferior a $1x10^{-4}$ mol Kg^{-1} (IUPAC, 1993). Isto limitaria portanto o intervalo de concentrações em que poderia ser feita a avaliação das unidades analíticas construídas e, numa fase posterior, poderia mesmo condicionar a análise das formulações farmacêuticas em questão. Uma segunda possibilidade seria então encontrar uma proporcionalidade entre a e c, possível desde que se garantisse a constância do factor de actividade da equação II.2. Para isso, e considerando que o factor de actividade se encontrava grandemente dependente do valor da força iónica da solução (equação II.3), bastava apenas manter constante e elevado o valor deste último parâmetro.

Neste sentido, e com o objectivo de trabalhar em condições experimentais que permitissem simultaneamente utilizar c, ao longo de uma alargada gama de valores, e validar a equação de *Nernst*, optou-se sempre pelo ajuste da força iónica das soluções de medida. Os cálculos aqui envolvidos seguem a relação matemática indicada na equação II.4.

Para o ajuste do valor de força iónica das soluções utilizou-se, em cada situação, o electrólito que se julgou ser o mais adequado. Esta escolha foi efectuada após definir, dentro de um grupo de iões inorgânicos, aquele que representava uma menor

interferência no comportamento do eléctrodo. Numa fase posterior, e com um objectivo meramente analítico, escolheu-se uma combinação de electrólitos que permitisse, além do ajuste da força iónica, fixar valor de pH da solução de medida.

$$I = \sum_{i=1}^{n} c_i \, z_i^2$$

equação II.4 Cálculo da força iónica (I) de uma solução, que é a medida da intensidade do campo eléctrico devido à presença dos iões em solução. c_i: concentração do ião, mol L^{-1}; z_i: carga do ião.

Após a escolha do electrólito adequado para cada trabalho definiu-se o valor de força iónica pretendido. Ao longo dos trabalhos desenvolvidos utilizaram-se valores de força iónica de $1x10^{-1}$ ou $1x10^{-2}$ mol L^{-1}.

Apesar de parecer contraditório, ao longo desta dissertação foram descritas características de funcionamento de eléctrodos selectivos avaliadas em soluções aquosas de concentração em ião principal superior a $1x10^{-4}$ mol Kg^{-1} e sem qualquer ajuste de força iónica. Nestas condições, a substituição da grandeza a por c na equação de *Nernst* poderia não ser válida, facto mais evidente para valores de c mais elevados. Mesmo apesar destas limitações, estes ensaios serviam para fornecer indicações sobre o funcionamento geral dos eléctrodos, acerca dos quais não existia qualquer conhecimento prévio. Essas informações eram ainda orientadoras de ensaios a efectuar posteriormente com os eléctrodos construídos, nomeadamente estudos de selectividade, e devem ser interpretadas apenas como valores auxiliares desse estudo.

Além dos ensaios com e sem a força iónica ajustada, incluíram-se também aqui aqueles referentes a um ajuste simultâneo dos valores de força iónica e de pH das soluções. O valor de pH foi escolhido de acordo com os ensaios descritos em II.6.3.

O procedimento experimental para calibrar a célula de eléctrodo selectivo de ião com configuração convencional ou configuração tubular diferiu sobretudo com as condições estacionárias ou condições de fluxo, implícitas.

II.6.1.1.1 CONDIÇÕES ESTACIONÁRIAS

O procedimento experimental de calibração de eléctrodos selectivos com configuração convencional foi efectuada usando uma adaptação do *"Liter beaker method"*, um método discreto, recomendado pela IUPAC, 1993, e que tem por base o método da adição da quantidade conhecida. Para o efeito, os eléctrodos selectivos de ião e o eléctrodo de referência, previamente lavados com água desionizada e secos com papel absorvente, foram colocados no seu suporte e mergulhados num volume, rigorosamente conhecido, de solução, que se encontrava em agitação constante num vaso de paredes duplas. De acordo com o ensaio pretendido, esta solução era constituída por ajustador de pH e/ou força iónica ou apenas por água desionizada. A esta solução adicionaram-se volumes crescentes de uma solução padrão de ião principal com elevada concentração. O valor de concentração de ião principal no interior do vaso era calculado tendo em conta o efeito de diluição proveniente das adições efectuadas. Por forma a evitar desajustes de pH e/ou força iónica, a solução padrão era preparada na solução ajustadora respectiva. A leitura do sinal analítico correspondente a cada valor de concentração era efectuada quando ocorria a estabilização do potencial da célula de eléctrodo selectivo, i.e., quando a variação de potencial não ultrapassava ± 0,1 mV.

II.6.1.1.2 CONDIÇÕES DE FLUXO

O procedimento experimental de calibração de eléctrodos selectivos com configuração tubular foi efectuado numa montagem de análise por injecção em fluxo, igual à indicada na Figura II.15. A solução de transporte presente naquele sistema era igual à solução de ajuste de força iónica escolhida para a avaliação dos eléctrodos convencionais. A ausência de um electrólito poderia conduzir à instabilidade do potencial da célula de eléctrodo selectivo de ião e, consequentemente, a valores de sinal analítico de baixa repetibilidade (Van Standen, 1986).

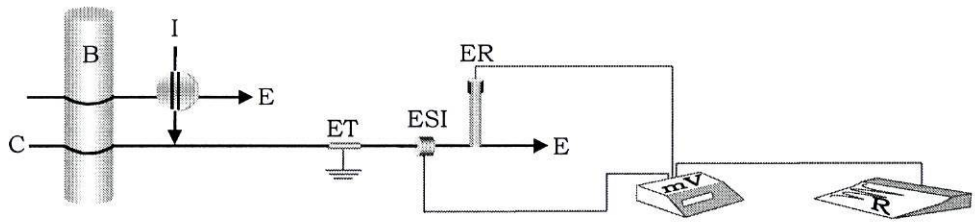


Figura II.15 Montagem de fluxo de baixa dispersão. B: bomba peristáltica; I, válvula de injecção; C: canal de transporte da solução transportadora; ET: eléctrodo de terra; ESI: eléctrodo selectivo de ião; ER: eléctrodo de referência; E: esgoto; mV: decimilivoltímetro; R: registador.

A solução de transporte continha, além de um electrólito ajustador, uma pequena quantidade de ião principal, sempre compreendida entre $1x10^{-7}$ e $1x10^{-6}$ mol L^{-1}. A presença de ião principal visava uma maior estabilização da linha de base

(Alegret *et al.*, 1984), prevenindo também a perda contínua do sensor no fluído transportador. O valor de concentração escolhido era, em cada caso, inferior ao mínimo valor de concentração para o qual os eléctrodos convencionais apresentavam uma resposta analítica.

Cada solução padrão era inserida individualmente num transportador e percorria sempre um mesmo trajecto até ao detector. Porque ao longo deste trajecto não ocorria uma mistura adequada entre elas, as soluções padrão foram preparadas na solução ajustadora que constituía o transportador. A calibração resultou da injecção repetida de soluções padrão com concentrações crescentes.

Sendo o grau de dispersão, um dos aspectos mais importantes na descrição do desempenho de um sistema de fluxo, dado que ele determina, entre outras características, o grau de diluição da amostra e o grau de mistura no interior da montagem (IUPAC, 1994/A), a sua determinação foi então efectuada.

O valor de dispersão no interior de uma montagem de fluxo associava-se a um processo de diluição contínua com a solução de transporte (Calatayud, em *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals,* 1996) e a extensão dessa diluição afectava, de uma forma mais ou menos evidente, o valor de concentração a partir do qual o eléctrodo apresentava uma resposta linear e a sensibilidade dessa resposta analítica. Antes de se efectuar experimentalmente uma calibração em fluxo, definiram-se portanto as condições que originavam uma baixa dispersão das soluções injectadas.

Muito embora existam vários modelos matemáticos para a determinação da dispersão, as variáveis envolvidas nesse cálculo limitam grandemente a sua aplicação (Calatayud, em *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals,* 1996). Assim, e para uma montagem com apenas um canal de transporte e sem reacção química envolvida, optou-se por uma determinação experimental que englobasse todos os factores contribuintes para a dispersão num só bloco. Para o efeito, determinou-se, numa primeira fase, a altura do sinal analítico correspondente a condições de estado estacionário (H_0). Para isso, injectou-se um volume de 1070 µL de uma solução de

ião principal, com uma determinada concentração, na solução de transporte do canal C (Figura II.15), esta ausente de ião principal. Este volume, era bastante superior ao caminho percorrido pela solução desde o ponto da sua injecção até ao detector, que nunca foi superior a 1 m. Com esta condição estava assegurada uma dispersão desprezível no interior da montagem, sendo equivalente às condições experimentais em estado estacionário. Por outro lado, mesmo perante condições de dispersão física desprezíveis, o eléctrodo poderia não usufruir do tempo suficiente para "detectar" o troço de amostra em passagem. O volume amostra de 1070 µL foi, por isso, debitado a um valor de caudal baixo, igual a 2 mL min^{-1}.

Depois de definido o valor do sinal analítico equivalente ao estado estacionário efectuou-se o estudo da influência de parâmetros da montagem de fluxo considerados críticos em termos de dispersão, nomeadamente o volume de injecção e o caudal. Para este estudo utilizou-se um método "multivariado", i.e., para cada valor de volume de amostragem fez-se variar os valores de caudal estudados. Este procedimento deveu-se sobretudo à influência conjunta daqueles parâmetros na sensibilidade, repetibilidade e velocidade analítica do detector.

Para cada um dos valores de cada parâmetro, efectuou-se a injecção de quatro soluções com valores de concentração de ião principal crescentes. O intervalo de concentrações utilizado era escolhido de acordo com o eléctrodo selectivo em questão, de forma a situar-se na região de resposta linear e a incluir o valor de concentração da solução padrão utilizada na determinação do sinal analítico em estado estacionário. Para cada uma das várias condições experimentais estabelecidas, o valor de concentração apresentava, em caso de dispersão, uma altura de sinal analítico (H) inferior àquele correspondente ao estado estacionário (H_0) (Figura II.16).

Para o cálculo da dispersão (D) aplicou-se a equação II.5 (Trojanowicz *et al.*, 1982). Com os valores dos sinais analíticos, fornecidos pelos quatro níveis de concentração, era determinado o declive (S) da resposta do detector potenciométrico. Uma outra alternativa a este tipo de avaliação foi considerar uma baixa dispersão

quando o sinal analítico apresentava uma altura (H) igual a pelo menos 95% do valor correspondente ao estado estacionário (H_0). Ao longo dos vários trabalhos efectuados utilizaram-se ambas as estratégias para definir condições experimentais de baixa dispersão.

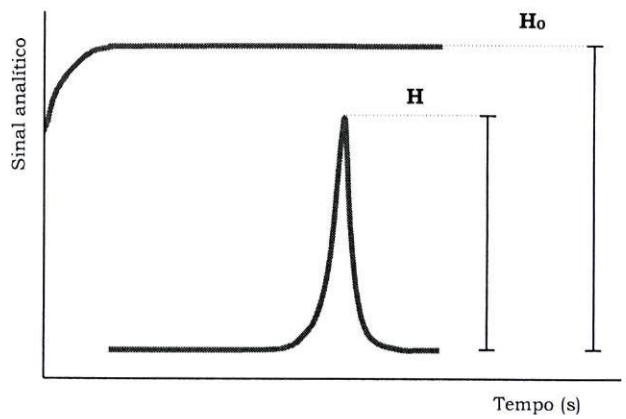


Figura II.16 Sinais analíticos correspondentes a condições equivalentes ao estado estacionário (H_0) e após injecção de um volume de amostra (H).

$$\log D = (H_0 - H) / S$$

equação II.5 Cálculo da dispersão. D: dispersão; H_0: altura do sinal analítico (mV) correspondente ao estado estacionário, para uma determinada concentração de ião principal; H: altura do sinal analítico (mV) em condições experimentais definidas e para uma solução de concentração de ião principal igual àquela envolvida no determinação de H_0; S: declive da resposta linear do detector potenciométrico.

Para os estudos de dispersão indicados foram escolhidos volumes de amostra injectada iguais a 170, 270, 570 e 1070 µL. Os volumes de amostra seleccionados após optimização foram, de um modo geral, 170 ou 270 µL.

Para cada um dos valores de volume de amostra estudados foi avaliada a influência de velocidades de fluxo das soluções de transporte para valores usualmente compreendidos entre 2 e 8 mL min^{-1}. Os valores considerados óptimos, em todos os trabalhos descritos, foram da ordem dos 6 - 7 mL min^{-1}. Genericamente, o aumento da velocidade de fluxo conduziu a um decréscimo da dispersão até um mínimo, valor a partir do qual se verificava uma inversão dessa tendência. Este efeito estaria provavelmente relacionado tanto com a variação da dispersão das soluções no interior do sistema como com o tempo de resposta do detector.

Para quase todos os estudos efectuados, foi possível encontrar vários valores, dentro de cada parâmetro, que satisfaziam as condições de baixa dispersão. Nestas circunstâncias, a escolha do valor mais adequado relacionou-se, sobretudo, com a repetibilidade do sinal analítico, a velocidade analítica e o consumo de reagentes, variáveis importantes para o desenvolvimento de um sistema adequado a análises de rotina. Uma vez definidos os valores óptimos, o volume de injecção e o caudal foram fixados e mantidos ao longo de todos os estudos de caracterização dos detectores tubulares.

Para os ensaios com soluções de pH e força iónica ajustados em simultâneo, substituiu-se a montagem FIA com um único canal por uma outra que apresentava dois canais (Figura II.17). A confluência destes canais originava a mistura de uma solução transportadora da amostra, constituída por água e designada por C_2, e da solução ajustadora de pH e de força iónica, designada por C_1. A solução no canal C_1 apresentava-se com a mesma constituição que a escolhida para efectuar os mesmos ensaios discretos com os eléctrodos convencionais. Contudo, esta solução estava aqui duas vezes mais concentrada, em termos de força iónica e de concentração de ião principal residual, do que aquela utilizada no sistema de baixa dispersão, devido

ao facto de sofrer uma diluição de cerca de 1:1 com o outro canal confluente. Desta forma foi possível preparar as soluções padrão e de amostra em água e, ao mesmo tempo, garantir que os seus ajustes, quer de pH, quer de força iónica, fossem efectuados no interior da montagem de fluxo.

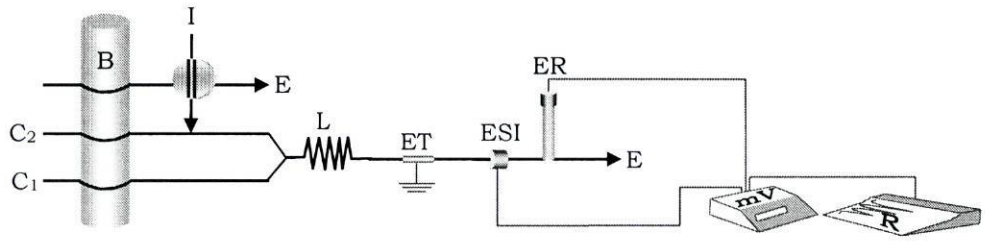


Figura II.17 Montagem de fluxo com duplo canal. B: bomba peristáltica; I, válvula de injecção; C_1: canal de transporte com solução ajustadora de pH e força iónica; C_2: canal de transporte, constituído por água, onde se intercala o troço de amostra; L: reactor; ET: eléctrodo de terra; ESI: eléctrodo selectivo de ião; ER: eléctrodo de referência; E: esgoto; mV: decimilivoltímetro; R: registador.

Após a confluência das soluções no interior do sistema de duplo canal, foi necessário garantir a sua mistura adequada, para o qual se escolheu um reactor com uma configuração em malha (do inglês – *knitted*). Nesta situação, mantiveram-se os valores de volume de injecção e de caudal total anteriormente seleccionados. Recorreu-se, então a um método "univariado", já que apenas se variou o comprimento do reactor (L), deixando fixos os parâmetros previamente definidos. A flutuação da altura do sinal analítico, em termos de dispersão, e a sua repetibilidade contribuíram para a escolha do comprimento de reactor mais adequado.

II.6.1.2 PARÂMETROS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Com os valores obtidos experimentalmente efectuou-se o traçado gráfico das curvas de calibração de acordo com as recomendações da IUPAC, 1994/B. Esse traçado foi realizado em papel semi-logarítmico, ou utilizando um programa de computador, Microsoft Excel 97. Os parâmetros das curvas de calibração avaliados foram, de uma forma geral, o limite inferior de resposta linear (LIRL), o limite de detecção (LD) e o declive. Através do traçado de várias curvas de calibração, obtidas experimentalmente de uma forma consecutiva, foi possível ainda avaliar a repetibilidade dos sinais analíticos.

Nas representações gráficas de curvas de calibração efectuadas num intervalo alargado de valores de concentração do ião principal, podiam encontrar-se, de um modo geral, três regiões distintas (Figura II.18). Ao longo da primeira região (— • • —) verificava-se o registo de um sinal analítico cuja variação, perante o aumento de *c*, era pouco significativa. À medida que se aumentava o valor de *c* iniciava-se uma tendência para um aumento ligeiro do sinal analítico no sentido esperado (•••••), i.e., um aumento do sinal analítico no sentido positivo para os eléctrodos selectivos às espécies catiónicas ou no sentido negativo para os que eram selectivos às espécies aniónicas. Continuando a aumentar o valor de *c*, encontrava-se então uma variação linear, prevista pela equação de *Nernst* (equação II.1), da diferença de potencial da célula com o logaritmo daquele parâmetro (———).

O intervalo de valores de *c* para o qual o potencial da célula de eléctrodo selectivo de ião era linear em função do logaritmo de *c*, era designado por zona de resposta linear desse eléctrodo (em inglês, *range of response* - IUPAC, 1994/B). A resposta do eléctrodo ao longo deste intervalo de concentrações era *Nernstiana* se o declive da representação gráfica de ΔE (mV) em função do logaritmo de concentração (em condições de força iónica ajustada) de uma espécie iónica "A" fosse igual a 2,303

R T z_A^{-1} (ver legenda equação II.1). Em termos práticos, a uma temperatura de 25°C seria de esperar um declive com um valor absoluto igual a 59,16 mV década^{-1} para os iões monovalentes. De acordo com a IUPAC, 1994, ao menor valor de *c* a partir do qual se verifica uma resposta linear atribuiu-se a designação de LIRL.

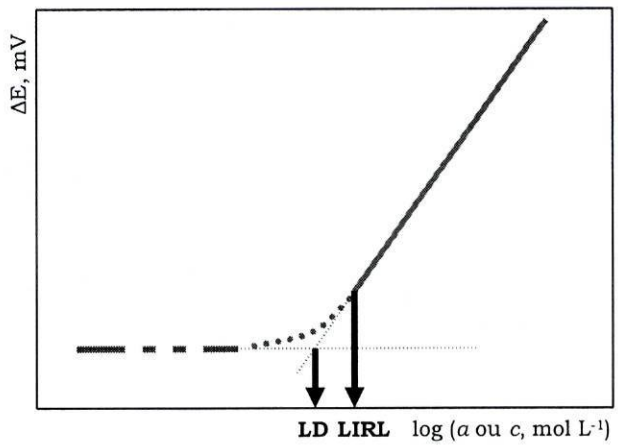


Figura II.18 Curva de calibração característica de um eléctrodo selectivo de ião. (— • • —): sem variação nítida de potencial com a variação da *a* ou *c*; (•••••): variação ligeira de potencial com a variação da *a* ou *c*, sem corresponder ao registo esperado na equação modificada de *Nernst-Nicolski*; (———): variação linear da variação da *a* ou *c*, previsto na equação modificada de *Nernst-Nicolski*; LD: limite de detecção, mol L^{-1}; LIRL: limite inferior de resposta linear, mol L^{-1}.

Para valores de *c* inferiores àqueles incluídos na zona de resposta linear de cada eléctrodo, e de acordo com as recomendações da IUPAC, 1994/B, foi ainda estabelecido um valor para o LD. Este parâmetro foi estimado, de um modo muito particular, por extrapolação gráfica das partes lineares da curva de calibração. Ao valor de *c* correspondente ao ponto de intercepção das rectas extrapoladas dá-se o

nome de LD (Figura II.18). No caso particular dos detectores tubulares não se determinou este parâmetro, uma vez que na solução de transporte, em passagem contínua pelo detector potenciométrico, existia uma concentração residual de ião principal, não fazendo por isso sentido a sua avaliação.

Tanto na determinação do LIRL, como na do LD, a influência de vários factores de ordem experimental não foram ignoradas. São exemplos a velocidade de agitação, para as unidades convencionais, e a velocidade de fluxo, para as unidades tubulares, bem como a influência de espécies interferentes. Além disso, os valores destes parâmetros sofreram alterações, por vezes bem evidentes, ao longo do tempo de vida das unidades. Neste sentido, aos valores descritos em cada um dos capítulos, e que foram o resultado médio de um mínimo de quatro ensaios, deve ser atribuído um significado relativo à sua ordem grandeza.

A estabilidade do sinal analítico fornecido pelas unidades de configuração convencional foi avaliada, para alguns valores de *c*, pelo estudo da sua repetibilidade em, pelo menos, quatro calibrações consecutivas. Para os detectores tubulares o mesmo estudo foi efectuado através de, pelo menos, quinze injecções repetidas de soluções com valores de *c* conhecidos e incluídos na zona de resposta linear do detector. A determinação da repetibilidade foi efectuada pelo cálculo do desvio padrão, em valor absoluto, entre os vários sinais analíticos.

Um último parâmetro em análise foi o tempo de vida estimado para as unidades potenciométricas. Definiu-se por tempo de vida aquele durante o qual o declive característico dos eléctrodos selectivos não variava além ±4 mV década^{-1}. De uma forma genérica, o tempo de vida esperado para um eléctrodo era grandemente influenciado pelo tipo e frequência de desempenhos a que ele era sujeito ao longo desse período. O tempo de vida dependia também da espessura da membrana presente em cada unidade.

II.6.2 TEMPO DE RESPOSTA E FREQUÊNCIA DE AMOSTRAGEM

De acordo com as recomendações da IUPAC, 1994/B, o tempo de resposta era aquele que decorria entre o momento em que os eléctrodos, indicador e selectivo de ião, eram colocados em contacto com uma solução da amostra (ou na qual se variou a actividade ou concentração de ião principal) e o primeiro instante em que o declive $\Delta E/\Delta t$ igualava um valor limite estabelecido (Figura II.18). Este valor limite era definido com base em questões de ordem experimental ou na exactidão pretendida para a leitura potenciométrica.

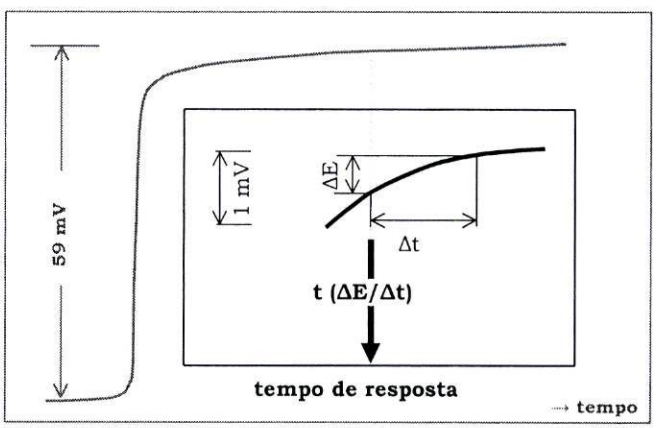


Figura II.19 Representação gráfica do tempo de resposta, t ($\Delta E/\Delta t$), de uma célula de eléctrodo selectivo de ião.

Para os eléctrodos de configuração convencional, o tempo de resposta foi registado para variações da concentração de ião principal em solução produzidas aquando da calibração da célula de eléctrodo selectivo de ião, utilizando-se para o

efeito um cronómetro. As variações de concentração consideradas encontravam-se incluídas na zona de resposta linear de cada eléctrodo. Para tempo de resposta definiu-se o tempo necessário para que o valor de potencial não variasse mais do que ± 0,2 mV ao longo de um período de aproximadamente 10 a 15 s. Ao longo de uma mesma calibração encontraram-se naturalmente valores diferentes de tempo de resposta, inerentes provavelmente ao volume adicionado de ião principal e à correspondente variação de concentração produzida. Assim, os tempos de resposta indicados referem-se sempre ao maior valor de tempo necessário a atingir o valor $\Delta E/\Delta t$ seleccionado.

No caso particular dos detectores tubulares, o tempo de resposta estava relacionado não apenas com as características de resposta dos detectores tubulares mas também com as condições experimentais escolhidas para a montagem FIA, nomeadamente o caudal e o volume de injecção utilizados. Por este motivo, o tempo de resposta foi aqui substituído por frequência de amostragem. Na prática, e de acordo com as normas da IUPAC, 1994/A, determinou-se a frequência com que porções subsequentes de amostra podiam ser injectados sem que a sua leitura fosse afectada por sinais precedentes. Os valores de frequência de amostragem apresentados ao longo desta dissertação correspondiam ao valor médio obtido para soluções padrão e/ou de amostra que podiam ser avaliadas ao longo de uma hora. Esses valores não corresponderam no entanto ao número de amostras que podiam ser analisadas, em laboratório, por unidade de tempo. Para tempo real de uma análise ter-se-ia que considerar também o período de tempo despendido numa série de procedimentos e tarefas que aqui não foram incluídos, nomeadamente a preparação da amostra, a estabilização do potencial de base do eléctrodo e a calibração do sistema. Para além disso, haveria ainda a considerar que a leitura de cada amostra deveria englobar o valor médio de injecções repetidas, pelo menos uma vez, facto também não considerado no cálculo da frequência de amostragem.

II.6.3 INFLUÊNCIA DO pH NA RESPOSTA DOS ELÉCTRODOS (DIAGRAMAS DE *REILLEY*)

A presença de espécies iónicas em solução, diferentes daquela para a qual o eléctrodo foi construído, poderia traduzir-se numa interferência na resposta fornecida pelos detectores potenciométricos. Entre as espécies interferentes, e que dependem da composição química das amostras, incluíam-se o protão e o anião hidroxilo. Por outro lado, a concentração destas espécies condicionava também a concentração iónica nas soluções de medida das espécies orgânicas estudadas. Esta situação determinou ser um requisito fundamental a utilização de soluções padrão e de amostra ajustadas a um mesmo valor de pH, valor esse escolhido de forma a que não representasse um interferência significativa nas leituras potenciométricas. Foi por isso necessário conhecer o intervalo de valores de pH dentro do qual os sinais analíticos das unidades construídas não eram dependentes desse parâmetro.

Esta determinação foi efectuada através do traçado de diagramas de *Reilley* que representavam a variação dos valores de ΔE (mV), fornecidos pelo eléctrodo selectivo de ião em estudo, em função dos valores de pH de uma solução de ião principal. Foi considerado como intervalo operacional do eléctrodo aquele cujos valores de pH correspondiam a variações de sinal analítico que não iam além de ±5 mV.

Na solução de ião principal, preparada no electrólito seleccionado para as curvas de calibração com a força iónica ajustada, procedeu-se geralmente ao aumento dos valores de pH até aproximadamente 12 unidades, seguindo-se um decréscimo até cerca de 2 unidades. Estas variações de pH foram produzidas por adição de pequenos volumes de soluções concentradas de ácido e base fortes a um volume de solução de ião principal igual a 200 mL. Com este procedimento foi possível uma alargada variação de pH sem que a isso correspondesse uma variação significativa da concentração em ião principal. A homogeneização da solução foi garantida por um agitador magnético.

As solução de base e de ácido eram escolhidas de acordo com as características de selectividade dos eléctrodos em estudo. Assim, escolhia-se para contra-ião do protão ou do hidroxilo um ião que causasse uma menor interferência no comportamento dessa célula potenciométrica.

Para o acompanhamento das variações de pH utilizou-se um eléctrodo de vidro simples, previamente calibrado por intermédio de soluções tampão com 9,0; 7,0 e 4,0 unidades de pH, e um eléctrodo de referência, ambos electricamente conectados a um segundo decimilivoltímetro. Com a equação de regressão correspondente à calibração do eléctrodo de vidro (ΔE, mV, *vs.* pH) foi possível converter posteriormente os valores de potencial fornecidos por esta segunda célula de eléctrodo selectivo nos vários valores de pH da solução.

A execução experimental para o traçado dos diagramas de *Reilley* variava de acordo com a configuração dos detectores potenciométricos. Assim, para o caso dos eléctrodos convencionais, tanto o eléctrodo indicador como o eléctrodo de vidro se encontravam mergulhados em simultâneo na solução de ião principal, enquanto que para os tubulares ocorria uma separação física daquelas unidades potenciométricas. Esta separação foi possível através de uma ligeira adaptação na montagem FIA de baixa dispersão (Alegret *et al.*, 1985), cuja representação se faz na Figura II.20. A solução na qual se provocavam variações de pH era feita passar através do detector, intercalando-a numa solução ajustadora de força iónica. Por forma a evitar alterações da concentração por perda de elevados volumes da solução de medida, estabeleceu-se um circuito fechado (Figura II.20). A perda total de volume desta solução correspondia assim à soma dos pequenos volumes intercalados em cada leitura.

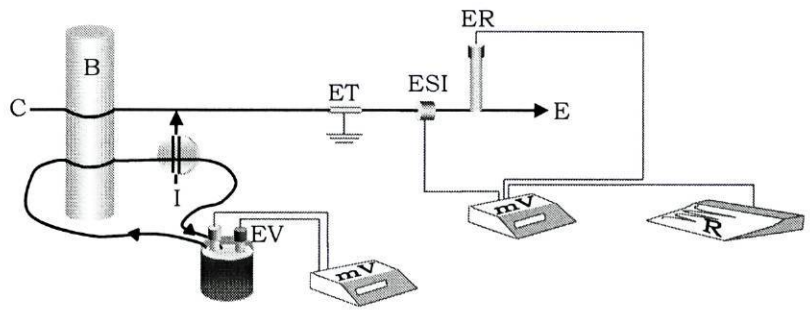


Figura II.20 Montagem FIA de baixa dispersão adaptada à avaliação da influência do pH no comportamento dos detectores tubulares. B: bomba peristáltica; I, válvula de injecção; C: canal de transporte da solução transportadora; ET: eléctrodo de terra; ESI: eléctrodo selectivo de ião; ER: eléctrodo de referência; E: esgoto; mV: decimilivoltímetro; R: registador; EV: eléctrodo de vidro.

II.6.4 AVALIAÇÃO DA SELECTIVIDADE DOS ELÉCTRODOS

Um eléctrodo diz-se selectivo para o ião principal se ele for capaz de distinguir esse ião em maior extensão do que as outras espécies iónicas em solução. Para os eléctrodos construídos, baseados em permutadores iónicos, a selectividade dependia das características de estereo-especificidade e electrostáticas da espécie permutada (Shoukry, 1995). Outro factor contribuinte era a natureza dessa espécie, sendo exemplo a permuta favorecida de uma espécie hidrofóbica se o local de *troca* fosse de igual carácter. A mobilidade da espécie iónica, que afectava a cinética do processo era também um factor importante. A conjugação de todos estes factores determinava

a selectividade de um eléctrodo para o seu ião principal. Por outro lado, quando na solução de medida existiam outras espécies iónicas que, embora não sendo o ião principal a medir, contribuíam para a leitura potenciométrica, o eléctrodo encontrava-se na presença de espécies interferentes.

Dado o objectivo analítico dos vários trabalhos desenvolvidos, tornou-se importante avaliar a selectividade de uma unidade potenciométrica quando o seu ião principal coexistia com outras espécies iónicas. Assim, o potencial de uma célula de eléctrodo selectivo de ião mergulhada numa solução que continha o ião principal, A, e um outro ião, B, era expresso pela equação de *Nicolsky-Eisenmam* (equação II.6). A influência do ião coexistente era assim traduzida pela sua concentração e pelo coeficiente de selectividade potenciométrica, $K_{A,B}^{pot}$.

$$E = constante + \frac{2{,}303RT}{z_A F} log\left[a_A + \sum_{i=1}^{n} K_{A,B_i}^{pot} \left(a_{Bi}\right)^{z_A/z_{Bi}} \right]$$

equação II.6 Equação de *Nicolsky-Eisenman*. E: valor experimental de potencial de um eléctrodo selectivo de ião; R: constante dos gases perfeitos, 8,3144 J K^{-1} mol^{-1}; T: temperatura termodinâmica, K; F: constante de Faraday, 9,64846x10^4 C mol^{-1}; a_A: actividade do ião principal, mol l^{-1} ou mol kg^{-1}; a_B: actividade de espécie iónica interferente; z_A: número inteiro de sinal e magnitude da carga do ião principal; z_B: número inteiro de sinal e magnitude da carga de iões interferentes; *"constante"*: inclui o potencial normal do eléctrodo selectivo, o potencial do eléctrodo de referência e o potencial de junção líquida, mV; $K_{A,B}^{pot}$: coeficiente de selectividade potenciométrica relativamente ao ião interferente.

Os métodos mais reportados na literatura baseiam-se na aplicação da equação II.6 e são o método da interferência fixada e o método das soluções separadas. A frequência de utilização destes métodos justifica-se por eles se apresentarem nas recomendações da IUPAC, até à data de 1994 (IUPAC, 1994/B). Com base no método da interferência fixada, no qual o coeficiente de selectividade é determinado quando os dois iões (principal e interferente) coexistem em solução, os valores determinados

apresentam genericamente uma maior proximidade às condições analíticas. No entanto, os valores calculados apresentam um rigor limitado, decorrentes, por exemplo, da aplicação da equação II.6 a situações em que os iões interferente e principal apresentam cargas diferentes e em que existe comportamento não *Nernstiano* dos iões interferentes. Ficando assim impossibilitada a sua aplicação em correcções de resultados analíticos, o método das soluções separadas surge em alternativa, com uma menor carga laboratorial. O método das soluções separadas foi, por isso, aquele escolhido na determinação de coeficientes de selectividade potenciométrica.

A determinação dos valores de $K_{A,B}^{pot}$ recorrendo ao método das soluções separadas (IUPAC, 1981), baseou-se na comparação dos potenciais de uma célula de eléctrodo selectivo de ião quando imersa numa solução de ião principal (A) e numa solução de ião interferente (B), ambas com o mesmo valor de *a* (ou *c*). A aplicação equação de *Nicolsky-Eisenman* às condições analíticas deu origem às seguintes equações:

$$E_A = constante + \frac{2{,}303RT}{z_A F} log[a_A] \qquad \therefore \qquad (a_B = 0),$$

$$E_B = constante + \frac{2{,}303RT}{z_A F} log\left[K_{A,B}^{pot}(a_B)^{z_A/z_B}\right] \qquad \therefore \qquad (a_A = 0).$$

equação II.7 Os potenciais E_A e E_B de uma célula de eléctrodo selectivo de ião, correspondentes a soluções contendo apenas o ião principal (A) ou o ião interferente (B), respectivamente. Ambas as soluções apresentavam um mesmo valor de actividade ($a_A = a_B$), mol l^{-1} ou mol kg^{-1}. *R*: constante dos gases perfeitos, 8,3144 J K^{-1} mol^{-1}; *T*: temperatura termodinâmica, K; *F*: constante de Faraday, $9{,}64846 \times 10^4$ C mol^{-1}; z_A *e* z_A: números inteiros de sinal e magnitude da carga do ião principal e ião interferente, respectivamente.

O valor de $K^{pot}_{A,B}$ resultou assim da diferença entre as duas leituras de potencial, E_B-E_A. Porque a cada momento os valores de a_A e a_B eram iguais, foi implícita a substituição de a_B por a_A (equação II.8).

No caso particular de um ião interferente com sinal e magnitude de carga iguais aos do ião principal, o segundo membro da equação era simplificado, uma vez que $z_A/z_B=1$, resultando na equação II.9.

$$\log K^{pot}_{A,B} = \frac{(E_B - E_A)z_A F}{2{,}303RT} + \left(1 - \frac{z_A}{z_B}\right)\log[a_A]$$

equação II.8 Fórmula utilizada no cálculo do coeficiente de selectividade pelo método das soluções separadas. (ver significado dos vários símbolos na legenda da equação II.7).

$$\log K^{pot}_{A,B} = \frac{(E_B - E_A)z_A F}{2{,}303RT}$$

equação II.9 Fórmula utilizada no cálculo do coeficiente de selectividade pelo método das soluções separadas, quando A e B eram espécies iónicas com igual magnitude e sinal de carga. (ver significado dos vários símbolos na legenda da equação II.7).

Teoricamente, dir-se-ia que o valor $(z_AF)/(2{,}303RT)$ era correspondente ao inverso do valor do declive teórico de um eléctrodo selectivo de ião. Mediante especificação das condições experimentais, substituiu-se esse parâmetro pelo declive da curva de calibração da célula de eléctrodo selectivo de ião, vulgarmente designado por S.

Para o cálculo de $K^{pot}_{A,B}$ pelo método das soluções separadas, foram utilizados pelo menos três valores de *c*, sempre incluídos na zona de resposta linear de cada unidade potenciométrica, dada a necessidade do valor de declive, S, para aplicação da equação II.8. Além disso, era também importante o cálculo do valor de $K^{pot}_{A,B}$ a vários níveis de concentração. Efectivamente, o coeficiente de selectividade potenciométrica não representa em termos práticos uma constante física, mas sim um valor que varia de acordo com as condições experimentais envolvidas, nomeadamente o valor de *a* (ou *c*) ao qual esse coeficiente foi determinado.

Relativamente aos eléctrodos de configuração convencional, o procedimento experimental seguido foi semelhante àquele utilizado para o traçado experimental de curvas de calibrações (secção II.6.1.1.1), em solução sem a força iónica ajustada. Para isso, efectuaram-se, pelo menos, três adições de volumes crescentes de uma solução de ião principal, produzindo variações de concentração conhecidas. Procedeu-se de igual modo para uma solução do ião possivelmente interferente, de forma a obter os mesmos valores de concentração. A substituição na equação II.8 ou equação II.9 dos valores registados experimentalmente, permitiu o cálculo dos valores de $K^{Pot}_{A,B}$ relativos às concentrações estudadas.

Relativamente aos eléctrodos tubulares, estes ensaios foram efectuados tendo como solução de transporte aquela utilizada em curvas calibrações com força iónica ajustada (II.6.1.1.2) e no sistema FIA de baixa dispersão (Figura II.15). Consequentemente, prepararam-se as soluções de ião principal e interferente no mesmo electrólito ajustador. Ao manter-se o electrólito ajustador teve-se por objectivo estabelecer um potencial estável, correspondente à solução que atravessa continuamente a membrana. Os valores de $K^{pot}_{A,B}$ foram calculados de forma semelhante ao efectuado para os eléctrodos convencionais. Como em cada instante foi necessário passar pela membrana do eléctrodo a solução de electrólito ajustador, não fez sentido o cálculo do valor de $K^{pot}_{A,B}$ referente à espécie iónica que a constituía.

II.7 ANÁLISE POTENCIOMÉTRICA DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Regra geral, a análise potenciométrica das várias formulações foi efectuada por potenciometria directa. Para isso, a determinação de uma amostra era imediatamente precedida de ensaio de curva de calibração, em condições de ajuste simultâneo dos valores de pH e de força iónica. Para que as amostras se encontrassem com uma concentração enquadrada no intervalo de calibração definido, foi sempre necessário proceder-se, pelo menos, à sua diluição.

Todos os resultados analíticos foram sempre submetidos a uma avaliação crítica, quer através de ensaios de recuperação, quer pela execução de um método independente.

Em seguida referem-se alguns dos procedimentos, mais gerais, envolvidos na preparação das várias formulações para a sua análise.

II.7.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Em todos os trabalhos desenvolvidos, a quantidade de composto a determinar encontrava-se indicada na embalagem do produto comercial e na bula informativa contida no seu interior. Contudo, aquelas quantidades não eram sempre expressas na mesma grandeza. Sempre que necessário, e com o objectivo de uniformizar a expressão dos resultados analíticos das várias formulações farmacêuticas para uma mesma grandeza, calculou-se a quantidade de espécie determinada por peso de amostra. Para isso, avaliou-se o peso médio, através da pesagem de várias unidades de uma embalagem comercial ou de um volume de amostra rigorosamente medido.

Sempre que possível preparou-se uma solução *stock* de amostra, por dissolução ou diluição de uma toma definida a um volume final rigoroso, de forma a que esta representasse a composição global média da amostra correspondente. Assim, para as formulações líquidas, a toma adequada era geralmente medida por simples pesagem ou medição de um volume adequado, após homogeneização do conteúdo de, pelo menos, cinco unidades de uma embalagem. Para as amostras sólidas pesou-se rigorosamente uma toma de amostra decorrente da pulverização e homogeneização de, pelo menos, 10 unidades. Para facilitar a dissolução da amostra recorreu-se, sempre que possível, à sua agitação em banho de ultra-sons, durante cerca de 15 minutos. Para os cremes, tomou-se uma determinada quantidade de amostra, proveniente de uma bisnaga, com uma massa rigorosamente avaliada. Procedeu-se a uma separação da fase gorda do creme, para a qual bastava normalmente uma simples centrifugação.

A análise potenciométrica foi efectuada numa solução diluída de solução *stock*, cuja concentração se previa estar incluída no intervalo de concentrações escolhido para a calibração da célula de eléctrodo selectivo de ião. Esta diluição visava também garantir que a análise potenciométrica decorresse em meio equivalente àquele que era utilizado na preparação das soluções padrão usadas na calibração.

II.7.2 ENSAIOS DE DOSEAMENTO

Antes do ensaio de doseamento das amostras preparadas, efectuou-se ainda uma calibração da célula de eléctrodo selectivo de ião. O procedimento experimental envolvido nestas calibrações, bem como as soluções utilizadas, variou de acordo com a configuração da unidade potenciométrica. Assim, para os eléctrodos de configuração convencional, seguiram-se os procedimentos II.6.1.1.1, tendo-se utilizado soluções padrão e de amostras preparadas em solução ajustadora de pH e

de força iónica. Relativamente aos detectores tubulares, o procedimento experimental foi igual ao descrito em II.6.1.1.2, com relação à montagem FIA de duplo cana, e as soluções padrão e de amostras foram neste caso preparadas por diluição em água.

Após calibração, as soluções de amostra diluídas foram submetidas a análise potenciométrica, seguindo o mesmo procedimento experimental executado para a leitura das solução padrão. Através da equação de regressão linear da curva de calibração, foi possível corresponder o potencial da solução problema à quantidade de ião principal presente. Os resultados das análises apresentados corresponderam sempre à média de, pelo menos, oito ensaios. A precisão dos resultados foi também indicada, expressando o desvio padrão correspondente.

II.7.3 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS RESULTADOS OBTIDOS

Para uma avaliação crítica dos resultados obtidos efectuaram-se ensaios de recuperação através de leituras potenciométricas da solução da amostra diluída (C_a) e de uma outra solução, da mesma amostra, à qual se provocou um incremento conhecido na sua concentração em ião principal (C_{ad}). Como resultado, esta solução apresentava uma concentração igual à da solução da amostra diluída acrescida da quantidade ião principal adicionado (C_{a+p}). Para o cálculo dos respectivos valores percentuais de recuperação, foi utilizada a fórmula:

$$\%\,Recuperação = \frac{C_{a+p} - C_a}{C_{ad}} x100.$$

equação II.10 Fórmula utilizada no cálculo percentual da recuperação da análise de uma amostra. Ca: concentração da amostra; Cad: incremento da concentração da amostra provocado pela adição de uma quantidade de ião principal conhecida. Ca+p: concentração final da amostra adicionada desse incremento.

Sempre que possível, os resultados das análises potenciométricas foram ainda avaliados por comparação com resultados provenientes da análise das mesmas amostras através de um método proposto numa farmacopeia. A comparação dos resultados foi efectuada pelo cálculodo valor de *t* do teste *t de Student*, e sua comparação com o valor *t* tabelado, obtido a partir de McCormick *et al.*, em *Measurement, Statistics and Computation*, 1987.

Regra geral, para a escolha de um método independente recorreu-se às monografias descritas na *United States Pharmacopoeia*. A escolha desta farmacopeia internacional permitiu, a qualquer leitor interessado, o acesso fácil ao conteúdo de cada método.

Todos os cálculos foram efectuados através de folhas de cálculo criadas no programa Microsoft Excel 97, num computador PC.

II.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEGRET S., ALONSO J., BARTROLI J., PAULIS J. M., LIMA J. L. F. C., MACHADO A. A. S. C. (**1984**). Flow-through tubular PVC matrix membrane electrode without inner reference solution for flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, 164, 147-152.

ALEGRET S., ALONSO J., BARTROLI J., LIMA J. L. F. C., MACHADO A. A. S. C., PAULIS J. M. (**1985**). Flow-through sandwich PVC matrix membrane electrode for flow injection analysis. *Anal. Lett.*, 18, 2291-2303.

ALEGRET S., ALONSO J., BARTROLI J., MACHADO A. A. S. C., LIMA J. L. F. C., PAULIS J. M. (**1987**). Construction of equipment for potentiometric determinations in flow injection analysis. *Quim. Anal.*, 6, 278-294.

BARROS M. A. R. P., LIMA J. L. F. C., MACHADO A. A. S. C. (**1983**). Construção de equipamento auxiliar para potenciometria com E.S.I.. *Port. Electrochim. Acta*, 1, 277-281.

CALATAYUD M. (**1996**). *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals. Automation in the Laboratory.* RUBINSTEIN M. H., WILSON J. P., editores. Taylor & Francis Limited, London, United Kingdom.

CLARK G. D., HUNGERFORD J. M., CHRISTIAN G. D. (**1989**). Optimization of confluent mixing in flow injection analysis. *Anal. Chem.*, 61, 973-979.

IUPAC (**1981**). International Union of Pure and Applied Chemistry, Analytical Chemistry Division Commission on Analytical Nomenclature. GUILBAULT G. G., Recommendations for publishing manuscripts on Ion-Selective Electrodes. *Pure Appl. Chem.*, 53, 1907-1912.

IUPAC (**1993**). International Union of Pure and Applied Chemistry, Analytical Chemistry Division Commission on Electroanalytical Chemistry and Commission on Equilibrium Data. BUCK R. P., COSOFRET V. V., Recommended procedures for calibration of ion-selective electrodes. *Pure Appl. Chem.*, 65, 1849-1858.

IUPAC (**1994/A**). International Union of Pure and Applied Chemistry, Analytical Chemistry Division Commission on General Aspects of Analytical Chemistry. VAN DER LINDEN W. E., Classification and definition of analytical methods based on flowing media. *Pure Appl. Chem.*, 66, 2493-2500.

IUPAC (**1994/B**). International Union of Pure and Applied Chemistry, Analytical Chemistry Division Commission on Electroanalytical Chemistry. BUCK R. P., LINDNER E., Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes. *Pure Appl. Chem.*, 66, 2527-2536.

IUPAC (**1995**). International Union of Pure and Applied Chemistry, Analytical Chemistry Division Commission on Electroanalytical Chemistry. UMEZAWA Y., UMEZAWA K., SATO H., Selectivity coefficients for ion-selective electrodes: recommended methods for reporting $k^{pot}_{A,B}$ values. *Pure Appl. Chem.*, 67, 507-518.

LAPA R. A. S., LIMA J. L. F. C., SILVA A. M. R. (**1990**). Construction of calcium ion-selective electrodes without inner reference solution: an application to calcium and magnesium determinations in parenteral and haemodialysis solution. *IL Farmaco*, 45, 901-913.

LIMA J. L. F. C., MACHADO A. A. S. C. (**1986**). Procedure for the construction of all-solid-state PVC membrane electrodes. *Analyst*, 111, 799-802.

MACCÀ C. (**1996**). Determination of potentiometric selectivity. *Anal. Chim. Acta*, 321, 1-10.

MCCORMICK D., ROACH A. (**1987**). *Measurement, Statistics and Computation.* CHAPMAN N. B., editor. John Wiley & Sons, Chichester, London, United Kingdom.

SHOUKRY A. F. (**1995**). Use of plastic membrane ion-selective electrodes for the analysis of drug substances. *Series A – Faculty of Chemical Technology, Scientific Papers of the University of Pardubice*, 1, 5-15.

TROJANOWICZ M., MATUSZEWSKI W. (**1982**). Limitation of linear response in flow-injection systems with ion-selective electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 138, 71-79.

VAN STADEN J. F. (**1986**). A coated tubular solid-state chloride-selective electrode in flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, 179, 407-417.

ELÉCTRODOS SELECTIVOS DE TRIPELENAMINA

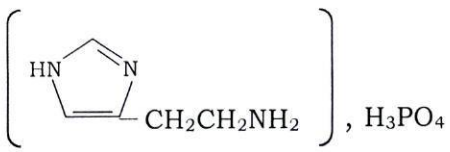
III. 1 INTRODUÇÃO

A histamina é quimicamente uma amina primária de baixo peso molecular, etilo substituída e com um anel aromático (Figura III.1). Sendo um constituinte natural do organismo humano, ela encontra-se armazenada, geralmente, nos mastócitos, ao nível tecidular, e nos basófilos que circulam pelo organismo. A libertação da histamina destes locais desencadeia reacções alérgicas e anafiláticas, através da sua interacção com receptores do tipo H_1 e H_2.

O estabelecimento de uma relação entre a histamina e manifestações alérgicas originou a procura de antagonistas desta actividade. Neste âmbito, Bovet e Bourneu observam, em 1937, o bloqueio desta actividade por um composto que apresenta um

grupo amina e um éter fenólico (Garrison, em *Goodman and Gilman's*, 1992). A descoberta da relação entre a estrutura da histamina e a actividade do anti-histamínico, estimulou na década de 40 a procura de compostos que apresentassem interesse clínico e fossem, em simultâneo, específicos e não tóxicos.

Figura III.1 Fosfato de histamina. $C_5H_9N_3.2H_3PO_4$.



A acção dos anti-histamínicos provém da sua ocupação competitiva e reversível nos receptores da célula alvo. De acordo com o receptor ocupado, os anti-histamínicos são então designados por bloqueadores H_1 ou bloqueadores H_2.

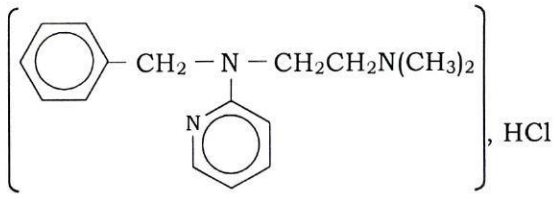
Relativamente à estrutura química da histamina, os bloqueadores H_1 assemelham-se à histamina pela presença de um grupo etilamina substituído e distinguem-se dela pela presença de outros grupos estruturais distintos (*Drug Evaluations*, 1986). De acordo com a natureza química destes grupos, os anti-histamínicos foram divididos em etanolaminas, etilenodiaminas, alquilaminas e fenotiazinas (Garrison, em *Goodman and Gilman's*, 1992).

É no grupo das etilenodiaminas que se enquadra a tripelenamina (TRI), composto que é objecto de estudo neste trabalho. A sua administração pode ser efectuada por via oral ou tópica, sob a sua forma de cloridrato ou de citrato. A TRI encontra-se incorporada em elixires, quando na forma de citrato, ou em pós, cremes ou comprimidos, incluindo os de acção prolongada, quando na forma de cloridrato (*Drug Evaluations*, 1986).

Quando incorporado em comprimidos, a *USP*, 1990, propõe para doseamento do cloridrato de tripelenamina (HCl.TRI, Figura III.2) a sua extracção sob a forma

alcalina, seguida de determinação espectrofotométrica, a 313 nm. Relativamente às outras formas farmacêuticas, nada se refere naquela farmacopeia. Na literatura é contudo possível encontrar-se outras técnicas dedicadas ao doseamento de TRI em formulações farmacêuticas.

Figura III.2 Cloridrato de tripelenamina.
$C_{16}H_{21}N_3.HCl$
291,82 g mol^{-1}.



Neste sentido, Van-de-Vaart *et al.*, 1980, determina a TRI incorporada em cremes recorrendo à espectrofotometria de absorção UV/Vis. Com base na mesma técnica, Ahmed *et. al.*, 1995, determina o HCl.TRI através da formação de um complexo com *reineckate* de amónio (1:1). Esse complexo corado é isolado por filtração e dissolvido numa mistura de acetona/água (1:1) para a sua avaliação quantitativa, a 522 nm. Esta reacção é igualmente monitorizada recorrendo a um espectrofotómetro de absorção atómica, com atomização em chama de ar/acetileno e registo da absorvância do crómio, a 357,9 nm. Genericamente, os gráficos de calibração resultantes apresentam linearidade para um intervalo de concentrações compreendido entre 4 e 32 mg/25 mL.

Outros trabalhos descritos na literatura referem-se à importância da determinação de TRI ao nível veterinário, entre os quais se encontra aquele desenvolvido por Dadgar *et al.*, 1987. Os autores propõem aqui a determinação de TRI em plasma bovino e leite, recorrendo a um sistema de HPLC e ao seu doseamento por espectrofotometria de aborção UV/Vis. Para a determinação de TRI em

alimentação animal, urina humana e águas residuais, Thompson *et al.*, 1983, associa a coluna de separação cromatográfica a um detector de fluorescência.

A associação da TRI à pentazocina, no que respeita ao consumo ilícito de drogas por parte de toxicodependentes (Showalter *et al.*, 1978), constitui também objecto de interesse de alguns investigadores. Noggle, 1983, efectua por isso a análise desta combinação em matrizes biológicas, recorrendo a uma separação dos vários componentes das amostras por HPLC, seguindo-se a sua detecção a três valores diferentes de comprimentos de onda, incluídos na região ultravioleta do espectro. Mackell *et al.*, 1982, recorrendo à cromatografia gás-líquido, efectua posteriormente a mesma determinação em sangue de toxicodependentes tipo.

Da análise global dos trabalhos referidos na literatura é possível definir duas estratégias claramente distintas para a determinação de TRI. Enquanto que alguns investigadores optam por um tratamento químico do analito, visando a sua conversão num composto mensurável, conduzindo a procedimentos com uma frequência analítica muito reduzida, a maioria opta contudo por uma separação do analito antes de proceder à sua detecção, obviando assim problemas de falta selectividade. Embora esta situação seja claramente justificada pela elevada complexidade das matrizes em análise, ela relaciona-se sobretudo com a ausência de um detector específico.

Neste sentido, e considerando as suas características de selectividade, os eléctrodos selectivos de ião constituem uma alternativa adequada às técnicas anteriormente descritas. Esta característica motivou aliás a sua ampla utilização na análise de produtos farmacêuticos (Vytras, 1989), matrizes essas que apresentam geralmente uma grande complexidade. Porém, neste âmbito, não se encontra descrito na literatura qualquer trabalho dedicado à determinação de TRI em produtos farmacêuticos por potenciometria com eléctrodos selectivos de ião.

Foi nesse sentido que se propôs a construção de eléctrodos selectivos à forma catiónica da TRI, que pudessem ser utilizados na determinação desse composto

incorporado em formulações farmacêuticas. Assim, descrevem-se ao longo deste trabalho vários eléctrodos selectivos de TRI, visando encontrar um sistema sensor que, com a adequada selectividade e sensibilidade, permita efectuar análises exactas e precisas em formulações farmacêuticas.

A automatização dos procedimentos analíticos, recorrendo a um sistema FIA, constitui também um objectivo do trabalho desenvolvido. Pretende-se assim associar a rapidez, versatilidade e baixo custo das análises por injecção em fluxo (Calatayud, em *Flow injection analysis of pharmaceuticals*, 1996) com a precisão e selectividade das determinações potenciométricas. Neste sentido, descrevem-se ainda o desenvolvimento de detectores potenciométricos de configuração tubular, selectivos ao catião TRI.

III.2 PARTE EXPERIMENTAL

III.2.1 APARELHAGEM E ELÉCTRODOS

Para todos os ensaios realizados com os eléctrodos construídos, quer para o traçado experimental de curvas de calibração, quer para a determinação de HCl.TRI em formulações farmacêuticas, utilizaram-se os aparelhos indicados nas secções II.2 e II.3 (p. II3 e II7). A solução escolhida para o compartimento exterior do eléctrodo de referência era constituída por K_2SO_4, numa concentração igual a $3{,}3x10^{-2}$ mol L^{-1}, dada a baixa interferência do catião potássio na membrana dos eléctrodos.

III.2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

As soluções de HCl.TRI mais concentradas foram preparadas por pesagem rigorosa dos sólidos correspondentes e sua diluição, a um volume rigoroso, com água desionizada. As de menor concentração obtiveram-se por diluição das anteriores.

Entre outros reagentes vulgarmente presentes num laboratório de química analítica, utilizaram-se HCl.TRI (Sigma), cloridrato de prometazina (Sigma), cloridrato de difenidramina (Sigma), maleato de clorfeniramina (Sigma), dicloridrato de meclizina (Sigma) e cloridrato de pentazocina (Sigma), todos de qualidade p.a. ou semelhante, não tendo sido submetidos a qualquer purificação adicional.

Para a preparação das membranas foram usados tetrafenilborato de sódio (Fluka), tetrakis(4-clorofenil)borato de potássio (Fluka), hexacloroplatinato de potássio (Merck), *o*-nitrofeniloctiléter (*o*NFOE, Fluka), dibutilftalato (DBF, DIFCO, U.

K.), *bis*(2-etilexil)sebacato (*b*EHS, Fluka), poli(cloreto de vinilo) (PVC), de elevado peso molecular (Fluka) e tetrahidrofurano (THF, Riedel-deHaen).

Como ajustador de força iónica utilizou-se uma solução aquosa de K_2SO_4 com uma concentração igual a $3{,}3x10^{-2}$ mol L^{-1}. Para o doseamento potenciométrico da TRI em formulações farmacêuticas, o valor de pH das soluções foi ajustado a 7,0 unidades com uma solução tampão de KH_2PO_4/K_2HPO_4. Para os ensaios discretos, esta solução aquosa foi preparada com um valor de força iónica igual a $1x10^{-1}$ mol L^{-1}, para o qual se misturou 125,0 mL de uma solução de K_2HPO_4 ($1{,}0x10^{-1}$ mol L^{-1}) e 120,0 mL de uma solução KH_2PO_4 ($1{,}0x10^{-1}$ mol L^{-1}) num volume total de 500,0 mL. Relativamente aos ensaios em fluxo, esta solução era preparada medindo os mesmos volumes, mas partindo daquelas soluções de ácido e de base com uma concentração duas vezes superior, dada a sua diluição no interior do sistema (Figura II.17, p. II31).

III.2.3 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS SENSORES E DAS MEMBRANAS

Para a obtenção das diferentes membranas, procedeu-se à preparação do sensor iónico, sua dissolução em solvente mediador e posterior imobilização numa matriz de PVC. Os vários sensores iónicos utilizados ao longo deste trabalho foram obtidos por reacção de precipitação, seguindo os procedimentos indicados em II.5.2 (p. II15). Neste procedimento utilizaram-se soluções de HCl.TRI e soluções de tetrakis(4--clorofenil)borato de potássio, hexacloroplatinato de potássio ou tetrafenilborato de sódio, todas de concentração igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1}.

Os sensores iónicos preparados, tetrakis(4-clorofenil)borato de TRI, hexacloroplatinato de TRI e tetrafenilborato de TRI, foram dissolvidos em *o*NFOE originando, respectivamente, as soluções sensoras tipos CT1, CT2 e CT3 (tabela III.1). Para isso, procedeu-se à dissolução de, cerca de, 0,04 g do sensor iónico correspondente em, aproximadamente, 1,8 g de solvente mediador plastificante. As

soluções sensoras tipo CT4 e CT5 (tabela III.1) foram obtidas por dissolução de 0,04 g tetrafenilborato de TRI em cerca de 9,1 g de DBF e *b*EHS, respectivamente. A utilização de uma quantidade elevada de solvente mediador deveu-se à baixa solubilidade daquele precipitado em solventes de baixa constante dieléctrica (Horvai *et al.*, 1986). Nesta situação, incluem-se o DBF, com uma constante dieléctrica igual 6,4 (Jianhua, *et al.*, 1990) e o *b*EHS, com uma constante igual a 4,6 (Okada *et al.*, 1995), claramente distintos do *o*NFOE, um solvente de maior polaridade, com um valor de constante dieléctrica igual a 23,6 (Okada *et al.*, 1995).

tabela III.1 Correspondência entre os elementos constituintes de cada membrana (assinalados com X) e a designação atribuída.

designação / *constituintes*	CT1	CT2	CT3	CT4	CT5
Tetrakis(4-clorofenil)borato de TRI	x	–	–	–	–
Hexacloroplatinato de TRI	–	x	–	–	–
Tetrafenilborato de TRI	–	–	x	x	x
*o*NFOE	x	x	x	–	–
DBF	–	–	–	x	–
*b*EHS	–	–	–	–	x
PVC	x	x	x	x	x

Todas as membranas foram obtidas pela mistura de 0,4 mL da solução sensora correspondente com, aproximadamente, 0,18 g de PVC previamente dissolvido em cerca de 6 mL de THF.

As cinco membranas preparadas foram, então, aplicadas em corpos de eléctrodos convencionais (II.5.2, p. II15), construídos tal como o descrito em II.5.1.1 (p. II9). Obtiveram-se, assim, cinco tipos de eléctrodos diferentes, reportando-se essa diferença à composição das suas membranas (tabela III.2). Uma das membranas anteriormente descritas, cujas características de funcionamento se salientaram

relativamente às demais, foi ainda aplicada na construção de eléctrodos selectivos de TRI de configuração tubular (II.5.2, p. II15), construídos de acordo com o descrito em II.5.1.2, p. II13.

Uma vez secas as membranas, os eléctrodos foram colocados em condicionamento, numa solução aquosa de HCl.TRI, de concentração igual $1x10^{-3}$ mol L^{-1}. Esta solução apresentava uma composição igual àquela utilizada para o condicionamento das membranas dos eléctrodos quando estes não estavam a ser utilizados.

tabela III.2 Composição percentual (m/m) das cinco membranas sensoras preparadas.

Constituintes / *Tipo*	**Sensor iónico** (%)	**Solvente mediador** (%)	**PVC** (%)
CT1	1,8	67,9	30,3
CT2	1,3	68,3	30,4
CT3	1,6	69,4	29,0
CT4	0,3	68,6	31,1
CT5	0,3	68,4	31,3

III.2.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA OS DOSEAMENTOS POTENCIOMÉTRICOS

A administração de HCl.TRI pode ser efectuada em formas sólidas, por via oral, ou em cremes, para aplicação tópica (*Martindale*, 1993). Embora de acordo com os dados apresentados em *Drug Evaluations*, 1986, se pudessem encontrar formas sólidas de comprimidos e pós, estas formulações não se encontravam disponíveis no mercado nacional. O mesmo se verificou em relação ao creme, embora este se tenha conseguido encontrar em Espanha, sob a designação comercial de Azaron®. Este creme apresentava uma quantidade de HCl.TRI igual a 2,0 % (m/m). Analisaram-se

também um xarope e um gel, cuja concentração em HCl.TRI era, respectivamente, 0,5 e 2,0 % (m/m), e cuja preparação se deve ao laboratório de Tecnologia Farmacêutica da *mui nobre* Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

As amostras foram preparadas para análise potenciométrica seguindo-se o descrito em II.7.1, p. II44, por forma a obter uma solução *stock* de amostra com uma concentração em HCl.TRI que se previa ser igual a $3{,}4\text{x}10^{-3}$ mol L^{-1}. Para isso, dissolveu-se ou diluiu-se uma quantidade de amostra equivalente a 0,02 g de HCl.TRI, para um balão de 20,00 mL.

A partir de cada solução *stock* prepararam-se soluções diluídas de amostra, com uma concentração em HCl.TRI que se previa ser igual a cerca de $1{,}1\text{x}10^{-4}$ mol L^{-1}. Este valor de concentração, incluído na zona de resposta linear dos eléctrodos, foi obtido por diluição de 800,0 μL da solução *stock* correspondente em balão de 25,00 mL. Relativamente às análises discretas, o volume do balão volumétrico foi preenchido com uma solução tampão de KH_2PO_4/K_2HPO_4, com um pH igual a 7,0 unidades e uma força iónica igual a $1\text{x}10^{-1}$ mol L^{-1}. Para as mesmas análises com os detectores tubulares, perfez-se o volume do balão com água desionizada, dado que o ajuste de pH e de força iónica das soluções decorria no interior da montagem de fluxo.

Tal como referido em II.7.3, p. II46, a propósito da avaliação da qualidade dos resultados analíticos obtidos, efectuaram-se também ensaios de recuperação do sinal analítico. Este ensaio foi efectuado com uma outra solução contendo 800,0 μL de solução *stock* e 50,0 μL de uma solução de HCl.TRI ($5{,}0\text{x}10^{-1}$ mol L^{-1}), num volume total de 25,00 mL. A solução resultante apresentava uma concentração prevista de $1{,}1\text{x}10^{-3}$ mol L^{-1} (valor de concentração também incluído na zona de resposta linear dos eléctrodos).

III.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A preparação de cinco membranas distintas teve por objectivo encontrar uma unidade potenciométrica adequada ao doseamento de TRI em formulações farmacêuticas. De seguida, referem-se a avaliação e a discussão das características de funcionamento dos eléctrodos construídos com essas membranas sensoras.

III.3.1 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMENTO DOS ELÉCTRODOS CONVENCIONAIS

As características mais gerais de funcionamento dos vários eléctrodos selectivos de TRI, designadamente os parâmetros das curvas de calibração, a repetibilidade do sinal analítico, o tempo de resposta e o tempo de vida das unidades foram determinadas a partir da execução experimental de traçados de calibração (secção II.6.1.1, p. II21).

A influência do valor de pH das soluções bem como a interferência de algumas espécies catiónicas, traduzida pelos coeficientes de selectividade potenciométrica calculados, foram abordados individualmente.

III.3.1.1 PARÂMETROS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As curvas de calibração foram efectuadas seguindo o procedimento indicado em II.6.1.1.1, p. II25 e para valores de concentração de HCl.TRI compreendidos entre $4x10^{-6}$ e $1x10^{-1}$ mol L^{-1}. Os valores médios dos parâmetros de calibração e a repetibilidade do sinal analítico foram calculados seguindo o que se descreve em

II.6.1.2, p. II32. A partir das mesmas curvas de calibração foi ainda estimado o tempo de resposta das várias unidades construídas (secção II.6.2, p. II35).

Numa fase inicial, os traçados de curva de calibração decorreram em soluções de ião principal sem a força iónica ajustada, tendo-se obtidos os valores indicados na tabela III.3.

tabela III.3 Características gerais de funcionamento dos cinco tipos de eléctrodos selectivos de TRI, obtidas em solução aquosa sem qualquer ajuste de força iónica.

Tipo de eléctrodo características	**CT1**	**CT2**	**CT3**	**CT4**	**CT5**
LD (mol L^{-1})	$1{,}8\times10^{-5}$	$4{,}8\times10^{-5}$	$2{,}6\times10^{-5}$	$2{,}1\times10^{-5}$	$2{,}7\times10^{-5}$
LIRL (mol L^{-1})	$4{,}0\times10^{-5}$	$7{,}1\times10^{-5}$	$4{,}0\times10^{-5}$	$4{,}0\times10^{-5}$	$4{,}0\times10^{-5}$
Declive (mV década^{-1})	+46,5±0,8	+47,1±0,6	+51,8±0,3	+51,8±0,1	+52,0±0,1
Repetibilidade (mV)	±0,4	±0,9	±0,3	±0,2	±0,8
t de resposta (s)	<20	<20	<20	<20	<20
R^2	>0,9996	>0,9985	>0,9996	>0,9997	>0,9997

Os valores médios dos parâmetros de calibração resultantes (tabela III.3) permitiram apenas definir condições experimentais para o estudo da selectividade dos eléctrodos (III.3.1.3). Os resultados destes ensaios sugeriram ainda que o tetrafenilborato de TRI seria o sensor mais adequado à preparação de eléctrodos com boas características de funcionamento, dada a maior sensibilidade da unidade CT3 em comparação com as unidades CT1 e CT2, todas elas preparadas com diferentes sensores iónicos e o mesmo solvente mediador.

Para a determinação dos parâmetros das curvas de calibração em soluções de força iónica ajustada procedeu-se de um modo análogo ao efectuado para os ensaios anteriores, partindo de soluções de ião principal com uma força iónica de 1×10^{-1} mol L^{-1}. Para este ajuste, recorreu-se a uma solução aquosa de K_2SO_4 com uma

concentração igual $3{,}3\times10^{-2}$ mol L^{-1}. A escolha deste electrólito derivou da baixa interferência do catião potássio no comportamento das várias unidades potenciométricas (tabela III.6). Os valores médios dos parâmetros de calibração relativos a estas condições experimentais encontram-se indicados na tabela III.4.

tabela III.4 Características gerais de funcionamento dos cinco tipos de eléctrodos selectivos de TRI, obtidas em solução aquosa de força iónica igual a 1×10^{-1} mol L^{-1}.

Tipo de eléctrodo / *Características*	**CT1**	**CT2**	**CT3**	**CT4**	**CT5**
LD (mol L^{-1})	$2{,}7\times10^{-5}$	$2{,}4\times10^{-5}$	$2{,}4\times10^{-5}$	$2{,}3\times10^{-5}$	$2{,}1\times10^{-5}$
LIRL (mol L^{-1})	$5{,}5\times10^{-5}$	$4{,}0\times10^{-5}$	$4{,}0\times10^{-5}$	$4{,}0\times10^{-5}$	$4{,}0\times10^{-5}$
Declive (mV década^{-1})	+56,6±1,5	+53,6±1,1	+57,8±0,1	+56,8±0,1	+57,4±0,2
Repetibilidade (mV)	±0,5	±0,9	±0,2	±0,2	±0,2
t de resposta (s)	<20	<20	<20	<20	<20
R^2	>0,9990	>0,9993	>0,9996	>0,9995	>0,9996

Em soluções com a força iónica ajustada, os vários eléctrodos selectivos apresentaram características de funcionamento muito similares. Em comparação com os resultados anteriores, verificou-se sobretudo uma melhoria na sensibilidade das várias unidades, tendo-se mantido semelhantes os demais parâmetros.

A influência dos permutadores iónicos nas características gerais de funcionamento dos eléctrodos foi indicada pelas diferenças de comportamento verificadas entre as unidades tipo CT1, CT2, CT3, todas preparadas com base no mesmo solvente mediador, o *o*NFOE. Aqueles eléctrodos apresentaram efectivamente características similares, com excepção dos declives claramente sub-*Nernstenianos* fornecidos pelas unidades tipo CT2. O hexacloroplatinato revelou-se por isso o sensor iónico menos adequado à construção de eléctrodos selectivos de TRI.

O aumento da sensibilidade analítica fornecida pelas unidades tipo CT2 poderia, segundo Ghauri *et al.*, 1994, ter sido conseguido através do aumento da quantidade de hexacloroplatinato na membrana. Contudo, esse aumento estava condicionado quer pela quantidade quer pelo tipo de solvente mediador necessário para promover a sua solubilização.

Relativamente aos extractores presentes nas membranas CT1 e CT3, não seriam esperados valores muito distintos para os parâmetros indicados na tabela III.4. Aqueles compostos são ambos constituídos por quatro aneis fenilo ligados ao borato, distinguido-se apenas pela presença de cloro na posição *para* dos aneis correspondentes ao tetrakis(4-clorofenil)borato, composto este presente nas membranas do tipo CT1. Esta diferença confere apenas uma maior estabilidade a este composto, esperando-se como consequência que as unidades potenciométricas do tipo CT1 apresentassem um tempo de vida mais longo do que as de tipo CT3, estas preparadas com tetrafenilborato (Rosatzin *et al.*, 1993). Aparte deste parâmetro, o carácter electronegativo dos átomos de cloro presentes no derivado clorado não seria provavelmente evidente, dado que ambos os extractores se encontravam incorporados em membranas constituídas por cerca de 30 % de PVC.

A influência do solvente mediador no comportamento dos eléctrodos foi sugerida por comparação das características dos eléctrodos tipos CT3, CT4 e CT5, preparados com um mesmo extractor (tetrafenilborato) e diferentes solventes mediadores. Contudo, os parâmetros indicados na tabela III.4 para estas unidades referem uma semelhança de comportamento, sugerindo que este componente não exerceu qualquer influência a este nível. Por outro lado, dado que quantidade de sensor nas unidades CT4 e CT5 era significativamente inferior, aquela sugestão poderá ser simples especulação.

Considerando a aplicação analítica do trabalho desenvolvido julgou-se importante caracterizar as várias unidades potenciométricas em soluções de ião principal com valores de pH e de força iónica bem definidos. Para este estudo,

recorreu-se a uma solução tampão de KH_2PO_4/K_2HPO_4 com uma força iónica igual a $1x10^{-1}$ mol L^{-1} e um valor de pH igual a 7,0 unidades. Relativamente ao valor de pH desta solução, a sua escolha foi baseada no estudo da influência deste parâmetro no comportamento dos eléctrodos, descrito em III.3.1.2. Os valores registados nestas condições encontram-se indicados na tabela III.5.

tabela III.5 Características gerais de funcionamento dos cinco tipos de eléctrodos selectivos de TRI, obtidas em solução aquosa com pH igual a 7,0 unidades e com força iónica igual a $1x10^{-1}$ mol L^{-1}.

Tipo de eléctrodo / *características*	**CT1**	**CT2**	**CT3**	**CT4**	**CT5**
LD (mol L^{-1})	$2,.0x10^{-5}$	$2,2x10^{-5}$	$2,8x10^{-5}$	$2,3x10^{-5}$	$2,7x10^{-5}$
LIRL (mol L^{-1})	$5,5x10^{-5}$	$4,0x10^{-5}$	$4,0x10^{-5}$	$4,0x10^{-5}$	$5,7x10^{-5}$
Declive (mV década^{-1})	+54,6±0,4	+52,6±1,2	+52,5±0,3	+52,9±1,2	+54,6±1,2
Repetibilidade (mV)	±0,7	±3,2	±0,2	±0,2	±1,0
t de resposta (s)	<20	<30	<20	<20	<20
R^2	>0,9990	>0.9989	>0,9989	>0,9990	>0,9990

Nestas condições, verificou-se um decréscimo no declive, sobretudo para as unidades tipo CT3, CT4 e CT5, e uma diminuição da repetibilidade do sinal analítico fornecido pelas unidades tipo CT1, CT2 e CT5 (tabela III.5). Relativamente às unidades tipo CT5, a baixa de declive esteve mesmo associada a um aumento do limite inferior de resposta linear, sugerindo até algum efeito interferente da solução tampão. Apesar da perda da qualidade das características de resposta dos eléctrodos selectivos de TRI ensaiados em solução tampão, as propriedades ácido/base do HCl.TRI, com valores de p*Ka* iguais a 3,9 e 9,0 (*Clarke's*, 1986), indicavam a necessidade dos procedimentos analíticos decorrerem em soluções com um valor de pH fixo.

Estes ensaios confirmaram mais uma vez piores características para os eléctrodos cujo sensor iónico era o hexacloroplatinato de TRI. Embora nestas condições o valor de declive tenha sido similar às restantes unidades, a repetibilidade do sinal analítico foi de má qualidade, chegando mesmo aos ±3,2 mV. Rejeitou-se por isso o detector tipo CT2, tendo-se prosseguido o trabalho com as unidades, tipos CT1, CT3, CT4 e CT5.

Relativamente aos tempos de resposta, todos os eléctrodos construídos apresentaram, nas várias condições em que foram estudados, valores semelhantes, sempre inferiores a 20 segundos.

O tempo de vida dos eléctrodos selectivos, estimado a partir de vários traçados de curva de calibração (II.6.1.2, p. II32), foi igual a cerca de três meses para as unidades tipo CT2, CT4 e CT5 e superiores a seis meses para aquelas tipo CT1 e CT3. A baixa longevidade das unidades tipo CT2 deveu-se provavelmente à elevada solubilidade, em solução aquosa, do extractor presente, o hexacloroplatinato, Relativamente às unidades tipos CT4 e CT5, o curto tempo de vida poderia ser devido à baixa quantidade de sensor nas membranas. Com os resultados fornecidos pelas unidades CT1 e CT3 ao longo dos seis meses de trabalho, previa-se que a longevidade destas unidades ultrapassaria esse período. Contudo, porque essa observação não foi continuada, tornou-se impossível estabelecer com rigor um valor definido para o tempo de vida desses eléctrodos.

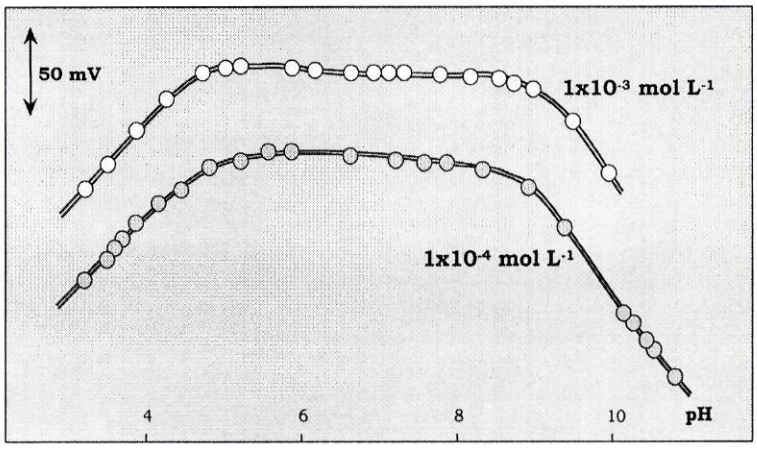
III.3.1.2 EFEITO DO pH NO VALOR DE POTENCIAL DOS ELÉCTRODOS

O efeito do pH nos valores de potencial dos eléctrodos selectivos de TRI foi avaliado de acordo com os procedimentos descritos em II.6.3, p. II37, em soluções aquosas com uma força iónica ajustada a $1x10^{-1}$ mol L^{-1} com K_2SO_4. Este estudo foi

efectuado em soluções de HCl.TRI de concentrações iguais a $1,0x10^{-3}$ mol L^{-1} e a $1,0x10^{-4}$ mol L^{-1}, estando ambos os valores incluídos na zona de resposta linear dos eléctrodos. O valor de pH daquelas soluções foi alterado quer pela adição de ácido sulfúrico concentrado, quer pela adição de uma solução saturada de KOH. A escolha deste último composto permitiu a não introdução de iões estranhos na solução cujo pH se pretendia variar, já que o catião ali presente era igual ao utilizado no ajuste de força iónica da solução.

Através dos diagramas de *Reilley* traçados, definiram-se intervalos de pH compreendidos entre 5 e 9 unidades, região onde o potencial da célula de eléctrodo selectivo de TRI não variou além de ±5 mV. Representam-se na Figura III.3 os diagramas correspondentes aos eléctrodos selectivos de tipo CT3.

Figura III.3 Diagramas de *Reilley* dos eléctrodos selectivos de TRI, tipo CT3. Valores registados em soluções de força iónica igual a $1x10^{-1}$ mol L^{-1} e de concentração, em HCl.TRI igual a $1,0x10^{-4}$ mol L^{-1} (A) e a $1,0x10^{-3}$ mol L^{-1} (B).



Com o aumento do valor de pH além de 9 unidades verificou-se uma baixa acentuada no potencial da célula de eléctrodo selectivo de TRI, supostamente relacionada com o desaparecimento progressivo da forma mono-protonada da TRI.

Esse decréscimo correspondeu mesmo a uma resposta próxima da *Nersteniana*, indicando para a TRI, que nesta gama de valores de pH se apresenta na sua forma básica, com propriedades lipofílicas e capaz de captar iões H^+ na sua superfície, um comportamento de permutador dos aniões HO^- presentes na solução de medida (Shoukry, 1995).

Para valores de pH abaixo de 5 unidades registou-se igualmente um decréscimo do valor de potencial da célula potenciométrica, provavelmente associado à conversão de espécies mono-protonadas em di-protonadas, conduzindo a uma baixa na concentração do catião principal (Shoukry, 1995).

III.3.1.3 DETERMINAÇÃO DE COEFICIENTES DE SELECTIVIDADE POTENCIOMÉTRICA

A extensão da influência de algumas espécies iónicas no comportamento dos detectores foi avaliada através da determinação dos coeficientes de selectividade potenciométrica, $K^{pot}_{A,B}$. Para este estudo seleccionaram-se alguns catiões de carácter inorgânico vulgarmente presentes em formulações, designadamente sódio, potássio, lítio e amónio, e quatro espécies orgânicas com actividade anti-histamínica, designadamente a clorfeniramina, a difenidramina, a prometazina e a meclizina. Estas espécies encontram-se incluídas, sob o ponto de vista químico, nos grupos designados por alquilaminas, etanolaminas, fenotiazinas e piperazinas, respectivamente (Garrison, em *Goodman and Gilman's*, 1992). Embora não associadas à TRI em formulações farmacêuticas, a inclusão destas espécies neste estudo de selectividade teve por objectivo fornecer informações que, de alguma forma, pudessem contribuir para a construção de unidades selectivas às mesmas. A este propósito, os dados aqui fornecidos foram determinantes na escolha da composição da membrana adequada à preparação de unidades selectivas de prometazina, cujos

eléctrodos serão objecto de discussão no capítulo seguinte. Avaliou-se ainda a influência da pentazocina, composto de abuso associado à TRI (*Martindale*, 1993).

Para a determinação dos $K^{pot}_{A,B}$ recorreu-se ao método das soluções separadas (II.6.4, p. II39), tendo-se utilizado soluções com valores de concentração, em ião principal ou interferente, iguais a $1{,}0\text{x}10^{-4}$, $5{,}0\text{x}10^{-4}$, $1{,}0\text{x}10^{-3}$ e $5{,}0\text{x}10^{-3}$ mol L^{-1}. Estes valores de concentração encontram-se incluídos na zona de resposta linear das unidades potenciométricas e no intervalo de concentrações seleccionado para a aplicação dos eléctrodos na análise de amostras reais. Os resultados obtidos foram indicados na tabela III.6.

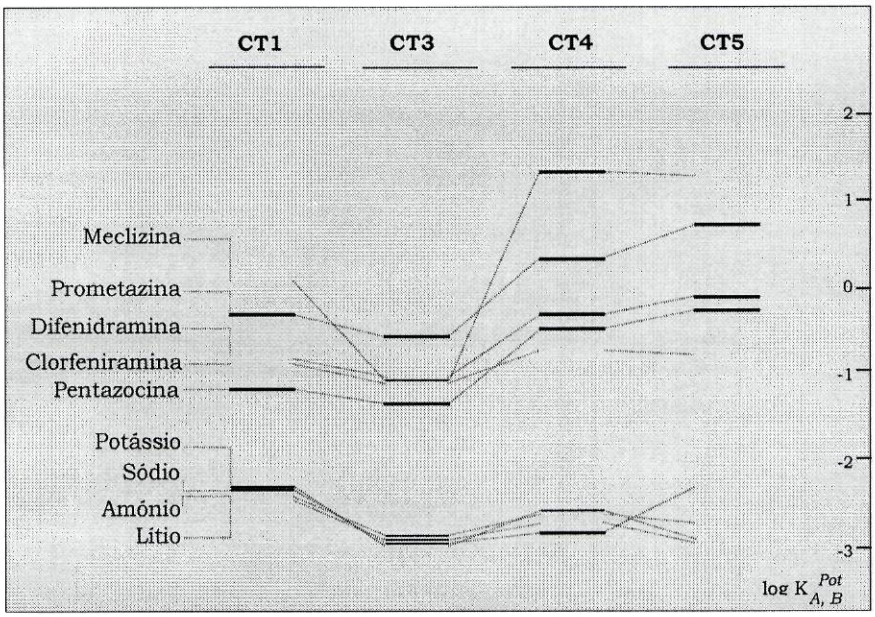
Embora todos os eléctrodos tenham apresentado, para os mesmos interferentes inorgânicos, o mesmo grau de selectividade, foram as unidades tipo CT3 aquelas de forneceram os menores valores de $K^{pot}_{A,B}$ (Figura III.4). Dos resultados deste estudo de selectividade, nada se pode concluir acerca da sequência de interferência dos catiões inorgânicos no comportamento dos eléctrodos selectivos. Aliás, essa ordem variava quer com a concentração do ião em ensaio quer com o eléctrodo em questão. Como exemplo, o ião inorgânico de menor interferência no comportamento das unidades tipos CT1, CT3, CT4 e CT5 era o Li^+, K^+, Na^+ e K^+, respectivamente, para o caso de soluções de concentração igual a $1{,}0\text{x}10^{-3}$ mol L^{-1} ou o Na^+, K^+, Li^+ e K^+, respectivamente, para o caso de soluções de concentração igual a $5{,}0\text{x}10^{-4}$ mol L^{-1}.

Quando se julgou necessário adicionar algum catião ao meio a ensaiar escolheu-se então aquele que representava o menor grau interferência no comportamento da unidade CT3, o eléctrodo que se julgou ser o mais selectivo (Figura III.3). Assim, seleccionou-se genericamente o K_2SO_4 como electrólito ajustador de força iónica e uma solução de KOH saturada para promover a variação positiva dos valores de pH (III.3.1.2).

tabela III.6 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os eléctrodos selectivos de TRI tipos CT1, CT3, CT4 e CT5. Valores obtidos em solução aquosa sem qualquer ajuste de força iónica.

Interferente	*Concentração (mol L^{-1})*	log $K^{pot}_{A,B}$ **CT1**	**CT3**	**CT4**	**CT5**
Sódio	1,0x10^{-4}	-1,00 ± 0,02	-1,55 ± 0,06	-1,44 ± 0,06	-0,75 ± 0,14
	5,0x10^{-4}	-1,83 ± 0,04	-2,40 ± 0,14	-2,27 ± 0,09	-1,73 ± 0,10
	1,0x10^{-3}	-2,24 ± 0,05	-2,81 ± 0,15	-2,71 ± 0,11	-2,22 ± 0,16
	5,0x10^{-3}	-3,03 ± 0,05	-3,60 ± 0,16	-3,49 ± 0,06	-3,05 ± 0,18
Potássio	1,0x10^{-4}	-0,92 ± 0,03	-1,80 ± 0,10	-1,23 ± 0,05	-1,48 ± 0,25
	5,0x10^{-4}	-1,77 ± 0,04	-2,55 ± 0,11	-2,07 ± 0,05	-2,34 ± 0,19
	1,0x10^{-3}	-2,18 ± 0,04	-2,93 ± 0,12	-2,51 ± 0,03	-2,77 ± 0,16
	5,0x10^{-3}	-2,99 ± 0,05	-3,83 ± 0,15	-3,28 ± 0,03	-3,51 ± 0,13
Lítio	1,0x10^{-4}	-1,08 ± 0,06	-1,67 ± 0,06	-1,45 ± 0,05	-1,48 ± 0,02
	5,0x10^{-4}	-1,73 ± 0,07	-2,40 ± 0,05	-2,27 ± 0,07	-2,33 ± 0,05
	1,0x10^{-3}	-2,35 ± 0,06	-2,79 ± 0,06	-2,60 ± 0,19	-2,76 ± 0,13
	5,0x10^{-3}	-3,16 ± 0,06	-3,51 ± 0,06	-3,41 ± 0,05	-3,49 ± 0,12
Amónio	1,0x10^{-4}	-0,88 ± 0,04	-1,59 ± 0,09	-1,14 ± 0,11	-1,25 ± 0,11
	5,0x10^{-4}	-1,70 ± 0,04	-2,37 ± 0,07	-2,02 ± 0,10	-2,11 ± 0,09
	1,0x10^{-3}	-2,32 ± 0,06	-2,75 ± 0,08	-2,50 ± 0,10	-2,61 ± 0,01
	5,0x10^{-3}	-3,09 ± 0,05	-3,48 ± 0,07	-3,26 ± 0,11	-3,44 ± 0,01
Clorfeniramina	1,0x10^{-4}	-0,30 ± 0,10	-0,76 ± 0,07	-0,50 ± 0,04	-0,63 ± 0,07
	5,0x10^{-4}	-0,75 ± 0,10	-1,01 ± 0,04	-0,72 ± 0,03	-0,74 ± 0,03
	1,0x10^{-3}	-0,90 ± 0,11	-1,10 ± 0,04	-0,75 ± 0,03	-0,79 ± 0,02
	5,0x10^{-3}	-1,05 ± 0,08	-1,23 ± 0,03	-0,80 ± 0,02	-0,83 ± 0,02
Difenidramina	1,0x10^{-4}	-0,30 ± 0,12	-0,68 ± 0,05	-0,21 ± 0,02	-0,14 ± 0,07
	5,0x10^{-4}	-0,67 ± 0,09	-1,96 ± 0,03	-0,32 ± 0,02	-0,14 ± 0,09
	1,0x10^{-3}	-0,83 ± 0,10	-1,05 ± 0,03	-0,36 ± 0,01	-0,17 ± 0,13
	5,0x10^{-3}	-0,98 ± 0,09	-1,14 ± 0,04	-0,36 ± 0,01	-0,13 ± 0,09
Prometazina	1,0x10^{-4}	-0,14 ± 0,03	-0,36 ± 0,05	+0,13 ± 0,02	+0,46 ± 0,12
	5,0x10^{-4}	-0,29 ± 0,03	-0,41 ± 0,04	+0,14 ± 0,02	+0,51 ± 0,19
	1,0x10^{-3}	-0,36 ± 0,03	-0,62 ± 0,04	+0,25 ± 0,03	+0,61 ± 0,21
	5,0x10^{-3}	-0,41 ± 0,01	-0,73 ± 0,04	+0,17 ± 0,04	+0,51 ± 0,15
Meclizina	1,0x10^{-4}	-1,89 ± 0,19	-1,82 ± 0,26	-0,53 ± 0,13	-0,02 ± 0,24
	5,0x10^{-4}	-0,70 ± 0,20	-1,36 ± 0,15	+0,68 ± 0,04	+0,98 ± 0,22
	1,0x10^{-3}	-0,01 ± 0,21	-1,07 ± 0,26	+1,19 ± 0,09	+1,15 ± 0,21
	5,0x10^{-3}	+1,66 ± 0,34	+0,85 ± 0,31	+2,10 ± 0,11	+2,02 ± 0,14
Pentazocina	1,0x10^{-4}	-0,48 ± 0,05	-0,50 ± 0,14	-0,28 ± 0,07	-0,29 ± 0,03
	5,0x10^{-4}	-0,95 ± 0,12	-1,07 ± 0,11	-0,49 ± 0,04	-0,32 ± 0,03
	1,0x10^{-3}	-1,16 ± 0,10	-1,32 ± 0,07	-0,52 ± 0,04	-0,32 ± 0,03
	5,0x10^{-3}	-1,46 ± 0,08	-1,66 ± 0,03	-0,52 ± 0,03	-0,30 ± 0,03

Figura III.4 Diagrama dos log $K^{pot}_{A,B}$ dos eléctrodos selectivos de TRI, tipos CT1, CT3, CT4 e CT5, de configuração convencional. Determinações correspondentes a soluções de concentração igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}.



De acordo com Baum *et al.*, 1973, a sequência de selectividade de membranas de eléctrodos selectivos de catião baseados em tetra(4-clorofenil)borato, ou iões similares, dissolvido em solventes nitro-aromáticos seria $R^+ > Cs^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$. Em relação às espécies estudadas, as unidades CT1 e CT5 são as únicas que respeitam a previsão destes autores. Contudo, julga-se que qualquer alteração à sequência prevista não era representativa, dado que os valores de logaritmo de $K^{pot}_{A,B}$ calculados se encontravam demasiado próximos.

Relativamente às espécies orgânicas, e com excepção para a prometazina e a meclizina, o comportamento observado para as várias unidades potenciométricas foi genericamente similar, sendo mais uma vez as unidades tipo CT3 aquelas que, sistematicamente, deram origem aos menores valores de $K^{pot}_{A,B}$ (Figura III.4).

Quando comparadas as várias unidades construídas, concluiu-se que os eléctrodos de tipo CT3, com membranas preparadas com base com tetrafenilborato e *o*NFOE, forneceram os menores valores de $K^{pot}_{A,B}$, sendo por isso considerados os mais selectivos. Estas características de selectividade, associadas às boas características de funcionamento anteriormente registadas, contribuíram para a sua aplicação posterior na análise de formulações farmacêuticas e para a preparação de detectores tubulares correspondentes.

III.3.2 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMENTO DOS DETECTORES TUBULARES

Após a construção de detectores tubulares com a membrana tipo CT3, seleccionaram-se as condições experimentais mais adequadas à sua caracterização com ajuste de força iónica e com ajuste simultâneo dos valores de pH e de força iónica. Os parâmetros aqui avaliados foram, tanto quanto possível, os mesmos determinados para as unidades convencionais.

III.3.2.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO SISTEMA FIA

Para a avaliação das características gerais de funcionamento dos detectores tubulares recorreu-se à montagem representada na Figura II.15, p. II26, designada de baixa dispersão. Com o objectivo de reproduzir em FIA as condições utilizadas na avaliação dos eléctrodos de configuração convencional correspondentes, houve necessidade de se efectuar o estudo de algumas variáveis que representavam uma

influência significativa na dispersão global, designadamente, o volume de amostragem e a velocidade de fluxo.

Com o objectivo de reproduzir os ensaios em condições de força iónica ajustada, utilizou-se neste sistema uma solução de transporte constituída por K_2SO_4, com um valor de concentração igual a $3{,}3x10^{-2}$ mol L^{-1}. Esta solução continha, também, ião principal numa concentração igual a $1x10^{-7}$ mol L^{-1} (II.6.1.1.2, p. II26). Ao longo deste estudo a distância entre a válvula de injecção e o eléctrodo selectivo foi mantida em 20 cm, a menor distância permitida em termos físicos pela montagem dos vários elementos do sistema.

Para o estudo da variação da dispersão global do sistema com volumes de amostragem iguais a 170, 270, 570 e 1070 μL e velocidades de fluxo iguais a 2, 3, 4, 5, 6 e 7 mL min^{-1}, seguiu-se o procedimento indicado em II.6.1.1.2, p II26. Esta avaliação foi efectuada em termos de dispersão de uma solução padrão de HCl.TRI com uma concentração igual a $5{,}0x10^{-4}$ mol L^{-1}, valor incluído na zona de resposta linear dos eléctrodos convencionais tipo CT3 (tabela III.5). Para a determinação do declive, necessário ao cálculo da dispersão global no interior da montagem (equação II5, p. II29), utilizaram-se soluções padrão de HCl.TRI com valores de concentração iguais a $1{,}0x10^{-4}$, $5{,}0x10^{-4}$, $1{,}0x10^{-3}$ e $5{,}0x10^{-3}$ mol L^{-1}.

Perante os valores de dispersão obtidos (tabela III.7), o aumento do volume de amostragem indicou uma aproximação ao sinal analítico equivalente ao atingido em condições estacionárias. A mesma situação foi verificada com o aumento do caudal, até um valor mínimo, onde as soluções percorriam o sistema a uma velocidade de 6 mL min^{-1}.

Perante os resultados obtidos seleccionaram-se um volume de amostragem e uma velocidade de fluxo iguais a 170 μL e 6 ml min^{-1}, respectivamente. Embora a selecção de outros valores permitisse obter sinais analíticos de baixa dispersão e com valores iguais a, pelo menos, 95 % do sinal correspondente ao estado estacionário,

com as condições escolhidas foi ainda possível associar uma elevada frequência analítica a um baixo consumo de reagentes.

tabela III.7 Dispersão de uma solução de HCl.TRI, de valor de concentração igual a $5{,}0\times10^{-4}$ mol L^{-1}, relativamente ao volume de amostragem e à velocidade de fluxo usadas na montagem FIA de baixa dispersão.

Velocidade de fluxo / *Volume amostragem*	**2 mL min^{-1}**	**3 mL min^{-1}**	**4 mL min^{-1}**	**5 mL min^{-1}**	**6 mL min^{-1}**	**7 mL min^{-1}**
170 µL	1,33	1,31	1,31	1,29	1,27	1,33
270 µL	1,30	1,27	1,25	1,22	1,14	1,18
570 µL	1,18	1,13	1,13	1,13	1,08	1,08
1070 µL	1,00	1,00	1,00	1,01	1,01	1,01

Para a caracterização dos detectores tubulares em soluções com valores de pH e força iónica fixados, recorreu-se a uma montagem de duplo canal (Figura II.17, p. II31). Nesta montagem, as soluções padrão e de amostra, preparadas em água, foram injectadas numa solução de transporte também constituída por água. Os valores de pH e de força iónica foram ajustados posteriormente por confluência com uma solução tampão constituída por KH_2PO_4/K_2HPO_4 com valor de pH igual a 7,0 unidades. Esta solução apresentava-se duas vezes mais concentrada relativamente aos valores de concentração de HCl.TRI e força iónica, do que aquela utilizada nos ensaios com a montagem de baixa dispersão, dada a sua diluição a aproximadamente metade por confluência com o canal de intercalação da amostra.

A mistura das soluções confluentes foi assegurada por um reactor em malha. Com o objectivo de obter uma mistura adequada, com o mínimo de dispersão, estudaram-se comprimentos para o reactor iguais a 17, 37, 57 e 77 cm, tendo-se mantido os valores de volume de amostragem e de velocidade fluxo total previamente seleccionados. Para aqueles comprimentos, avaliou-se a variação do sinal analítico de

uma solução HCl.TRI com uma concentração igual a $2{,}5x10^{-4}$ mol L^{-1}, relativamente ao sinal registado quando a mesma solução percorria o sistema continuamente, através do canal de transporte de água.

Perante os resultados obtidos (tabela III.8) julgou-se ser suficiente um comprimento de reactor igual a 37 cm. A este comprimento correspondeu, ainda, um sinal analítico igual ao obtido quando a solução de HCl.TRI era misturada continuamente com a solução tampão.

tabela III.8 Variação percentual do sinal analítico de uma solução de HCl.TRI, de valor de concentração igual a $2{,}5x10^{-4}$ mol L^{-1}, com o comprimento de reactor.

Comprimento do reactor / *Condições do sistema*	**17 cm**	**37 cm**	**57 cm**	**77 cm**
170 μL, 6 mL min^{-1}	99,3	100,0	98,5	98,3

III.3.2.2 PARÂMETROS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Para o traçado das curvas de calibração da célula potenciométrica injectaram-se soluções aquosas de HCl.TRI, com concentrações compreendidas entre $1x10^{-6}$ mol L^{-1} e $1x10^{-1}$ mol L^{-1}. Utilizando quer a montagem FIA de baixa dispersão, quer a de canal duplo, e de acordo com o indicado em II.6.1.2, p. II32, determinaram-se o LIRL, o declive, a repetibilidade do sinal analítico e a frequência de amostragem. Os valores médios obtidos, bem como os desvios correspondentes, encontram-se indicados na tabela III.9.

A repetibilidade do sinal analítico dos eléctrodos tubulares foi determinada a partir de, pelo menos, quinze injecções sucessivas de soluções de HCl.TRI com

valores de concentração iguais a $1{,}0x10^{-4}$, $5{,}0x10^{-4}$ e $1{,}0x10^{-3}$ mol L^{-1}. A este propósito representam-se na Figura III.5 dois dos registos obtidos.

tabela III.9 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de TRI, tipo CT3, com configuração tubular. Valores obtidos em condições de ajuste de força iónica (I) e de ajuste, simultâneo, do valor de pH e de força iónica.

Condições analíticas / *Características*	**I=1x10^{-1} mol L^{-1}**	**pH=7,0 I=1x10^{-1} mol L^{-1}**
LIRL (mol L^{-1})	$5{,}0x10^{-6}$	$5{,}0x10^{-6}$
Declive (mV década^{-1})	+59,1±0,2	+58,9±0,2
Repetibilidade (mV)	±0,2	±0,2
Frequência de amostragem (amostra h^{-1})	–	≈145
R^2	>0,9998	>0,9998

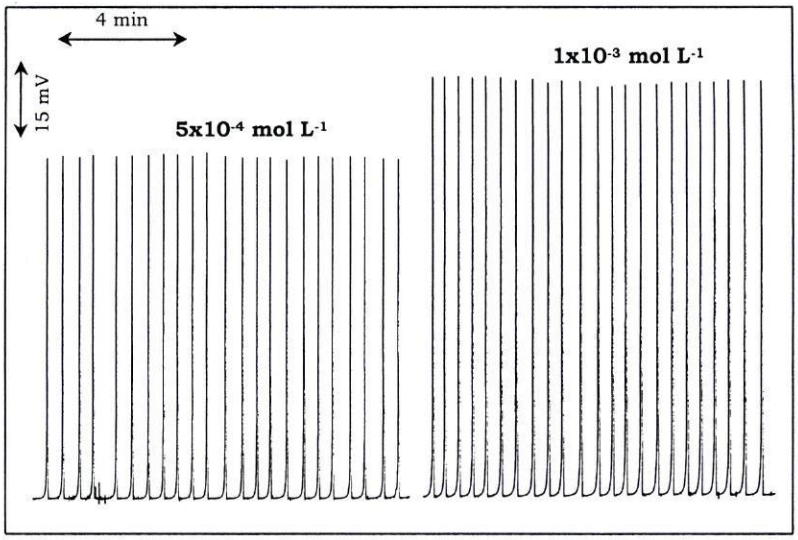


Figura III.5 Repetibilidade do sinal analítico dos detectores tubulares selectivos de TRI no sistema de baixa dispersão. Registo obtido para uma solução daquele ião, com valor de concentração igual a $5{,}0x10^{-4}$ e $1{,}0x10^{-3}$ mol L^{-1}, um reactor de 20 cm e volume de amostragem e velocidade de fluxo iguais a, respectivamente, 170 µL e 6 mL min^{-1}.

Relativamente às características registadas em condições de ajuste de pH e de força iónica, o valor de frequência de amostragem obtido foi igual a aproximadamente 145 amostras por hora.

Os valores obtidos em FIA registaram uma melhoria significativa relativamente aos obtidos com os eléctrodos convencionais quando as condições experimentais eram semelhantes, sobretudo no que diz respeito ao LIRL. No caso particular dos ensaios com ajuste simultâneo dos valores de pH e de força iónica foi ainda possível constatar uma melhoria significativa no declive.

III.3.2.3 EFEITO DO pH NO VALOR DE POTENCIAL DOS ELÉCTRODOS

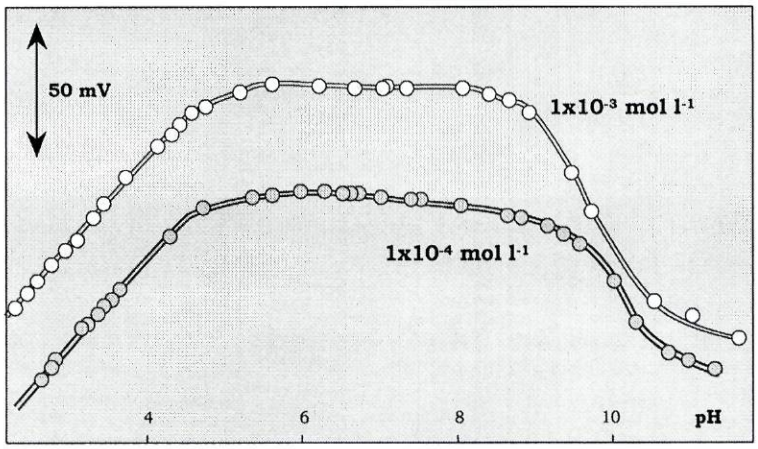
A influência do pH no comportamento dos detectores foi estudada para soluções de HCl.TRI de concentração igual a $1{,}0\times10^{-4}$ e $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, ambas com a força iónica fixada em 1×10^{-1} mol L^{-1}. Para este estudo, seguiram-se os procedimentos indicados em II.6.3, p. II37. As variações de pH no sistema foram efectuadas através das mesmas soluções utilizadas no ensaio equivalente com os eléctrodos de configuração convencional. Para o efeito, recorreu-se a uma montagem FIA de baixa dispersão, adaptada a esta determinação (Figura II.20, p. II39).

O diagrama de *Reilley* obtido (Figura III.6) indicou variações de potencial da célula potenciométrica não superiores a ±5 mV para valores de pH compreendidos entre 4,8 e 8,6 unidades quando se utilizou a solução de concentração igual a $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1} e entre 4,8 e 7,7 undidades para a solução de $1{,}0\times10^{-4}$ mol L^{-1} em HCl.TRI.

Comparativamente aos eléctrodos convencionais tipo CT3, os detectores tubulares apresentaram um comportamento similar, tanto na amplitude do intervalo

de pH encontrado, como no sentido da variação de potencial da célula potenciométrica a valores de pH exteriores a esse intervalo.

Figura III.6 Diagrama de *Reilley* do detector tubular tipo CT3. Variação do potencial da célula de eléctrodo selectivo de TRI com o pH de soluções de HCl.TRI, apresentando um valor de força iónica igual a $1x10^{-1}$ mol L^{-1}.



III.3.2.4 DETERMINAÇÃO DE COEFICIENTES DE SELECTIVIDADE POTENCIOMÉTRICA

A selectividade dos detectores tubulares foi avaliada relativamente às mesmas espécies catiónicas seleccionadas neste estudo para os eléctrodos de configuração convencional. Para isso, procedeu-se à determinação dos coeficientes de selectividade potenciométrica, $K^{pot}_{A,B}$, relativos a valores de concentração iguais a $1,0x10^{-4}$, $5,0x10^{-4}$ e $1,0x10^{-3}$ mol L^{-1}, tendo-se seguido o procedimento experimental descrito na secção II.6.4, p. II39, que constituía uma adaptação do método das soluções separadas às condições de fluxo. As soluções indicadas tinham a força iónica ajustada a $1,0x10^{-1}$ mol L^{-1} com K_2SO_4, pelo que se excluiu o ião potássio deste estudo, continuamente presente na solução de transporte.

Em comparação com os eléctrodos convencionais, as características de selectividade dos detectores tubulares (tabela III.10) foram muito semelhantes, indicando que as características de selectividade dos eléctrodos tipo CT3 não dependiam dos ensaios decorrerem em condições estacionárias ou de fluxo.

tabela III.10 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os detectores tubulares selectivos de TRI, tipo CT3. Valores obtidos em solução aquosa com uma força iónica igual a $1x10^{-1}$ mol L^{-1}, ajustada com uma solução de K_2SO_4 $3,3x10^{-2}$ mol L^{-1}.

	$\log K^{pot}_{A,B}$	**Tubulares, CT3**
Interferente	*Concentração (mol L^{-1})*	
Sódio	$1,0x10^{-4}$	-1,84 ± 0,08
	$5,0x10^{-4}$	-2,55 ± 0,03
	$1,0x10^{-3}$	-2,83 ± 0,10
Lítio	$1,0x10^{-4}$	-1,64 ± 0,06
	$5,0x10^{-4}$	-2,32 ± 0,06
	$1,0x10^{-3}$	-2,63 ± 0,07
Amónio	$1,0x10^{-4}$	-1,71 ± 0,22
	$5,0x10^{-4}$	-2,32 ± 0,06
	$1,0x10^{-3}$	-2,63 ± 0,08
Clorfeniramina	$1,0x10^{-4}$	-0,49 ± 0,19
	$5,0x10^{-4}$	-0,61 ± 0,15
	$1,0x10^{-3}$	-0,71 ± 0,08
Difenidramina	$1,0x10^{-4}$	-0,34 ± 0,04
	$5,0x10^{-4}$	-0,53 ± 0,01
	$1,0x10^{-3}$	-0,62 ± 0,03
Prometazina	$1,0x10^{-4}$	-0,13 ± 0,03
	$5,0x10^{-4}$	-0,40 ± 0,09
	$1,0x10^{-3}$	-0,43 ± 0,08
Meclizina	$1,0x10^{-4}$	-2,62 ± 0,29
	$5,0x10^{-4}$	-1,67 ± 0,20
	$1,0x10^{-3}$	-0,62 ± 0,07
Pentazocina	$1,0x10^{-4}$	-0,74 ± 0,02
	$5,0x10^{-4}$	-0,94 ± 0,04
	$1,0x10^{-3}$	-0,96 ± 0,05

III.3.3 ANÁLISE DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

A determinação teor de HCl.TRI, em formulações farmacêuticas, foi efectuada tanto com os eléctrodos convencionais de tipo CT3, como com os detectores tubulares correspondentes, quando inseridos num sistema FIA.

As análises de soluções diluídas de amostra, preparadas de acordo com o descrito em III.2.4, foram realizadas após calibração da célula de eléctrodo selectivo de ião. Cada calibração foi efectuada numa gama de concentrações compreendida entre $1{,}0\times10^{-4}$ e $5{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}. Os resultados das análises potenciométricas encontram-se indicados na tabela III.11.

tabela III.11 Resultados da determinação potenciométrica de TRI em formulações farmacêuticas em condições discretas, com os eléctrodos convencionais, e em FIA, com os detectores tubulares, recorrendo a membranas selectivas de tipo CT3; os desvios relativos percentuais referem-se ao desvio dos valores das determinações discretas em relação àqueles obtidos por FIA.

Condições analíticas / *Formulações farmacêuticas*	**Discretas**		**FIA**		**DR**
	C (%, m/m)	recuperação (%)	*C* (%, m/m)	recuperação (%)	(%)
Xarope, 0,5 %	0,48 ± 0,03	100,4 ± 0,5	0,49 ± 0,01	100,0 ± 0,4	-2,0
Gel, 2,0 %	2,03 ± 0,17	99,8 ± 0,5	1,96 ± 0,05	100,4 ± 0,4	+3,5
Azaron®, creme, 2,0 %	2,19 ± 0,07	100,6 ± 0,8	2,09 ± 0,08	99,9 ± 0,6	+4,8

Perante a inexistência, nas mais diversas farmacopeias, de monografias dedicadas ao doseamento do teor de HCl.TRI veiculado em formas farmacêuticas, a qualidade dos valores obtidos foi avaliada somente com base em ensaios de

recuperação. Os resultados destes ensaios demonstraram uma boa precisão, tendo-se registado ainda um valor médio de recuperação muito próximo ao valor teórico.

Os desvios relativos entre os resultados obtidos permitiram concluir que existe concordância entre os dois procedimentos analíticos estabelecidos, sugerindo ainda a ausência de desvios sistemáticos para um sentido positivo ou um sentido negativo. Os valores encontrados são também concordantes com os valores teóricos previstos para as amostras analisadas.

As análises efectuadas em FIA, com os detectores tubulares, decorreram com uma frequência analítica elevada, da ordem das 145 amostras por hora (tabela III.9). Um exemplo típico de uma análise, e da calibração precedente, encontra-se representado na Figura III.7.

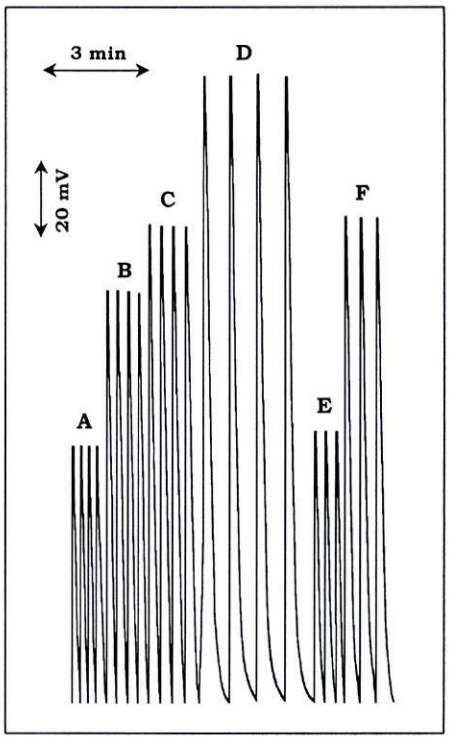


Figura III.7 Registo de uma calibração da célula de eléctrodo selectivo de TRI, apresentando uma configuração tubular e a membrana CT3, recorrendo a soluções padrão de HCl.TRI com valores de concentração:

A: $1,0x10^{-4}$ mol L^{-1};

B: $5,0x10^{-4}$ mol L^{-1};

C: $1,0x10^{-3}$ mol L^{-1};

D: $5,0x10^{-3}$ mol L^{-1};

determinação de TRI numa solução diluída de Azaron®, com um valor de concentração previsto em:

E: $1,1x10^{-4}$ mol L^{-1};

e o ensaio de recuperação, para o qual se esperava uma concentração de:

F: $1,1x10^{-3}$ mol L^{-1}.

III.4 CONCLUSÕES

A utilização de diferentes membranas sensoras na construção de eléctrodos selectivos de TRI com configuração convencional conduziu à preparação de uma unidade potenciométrica com boas características de funcionamento, permitindo ainda avaliar a influência de alguns elementos constituintes da membrana selectiva no comportamento dos detectores potenciométricos.

A membrana que conferia melhores características aos eléctrodos convencionais era constituída por uma solução de tetrafenilborato de TRI em *o*NFOE, incorporada numa matriz polimérica de PVC. Esta membrana foi por isso empregue na construção de unidades com uma configuração tubular, conduzindo à automatização dos procedimentos envolvidos tanto na caracterização dos detectores como na sua aplicação analítica em formulações farmacêuticas. Quando inseridos naquela montagem, os eléctrodos tubulares apresentaram genericamente melhores valores de LIRL e de declive, do que aqueles que eram fornecidos pelos eléctrodos convencionais correspondentes.

A utilidade analítica dos detectores construídos foi explorada com base na análise de três formas farmacêuticas distintas, quer recorrendo a um processo discreto, quer utilizando condições de fluxo. A inexistência de monografias específicas nas diversas farmacopeias não permitiu contudo estabelecer uma comparação dos resultados potenciométricos com os resultantes daquela referência. Embora sem estes dados, os valores encontrados foram próximos aos teoricamente previstos, não diferindo com significado quando se passou da análise discreta para a análise em fluxo. Registou-se ainda, para o sistema FIA, uma frequência analítica aproximadamente igual a 145 amostras por hora.

Pelas razões indicadas, os procedimentos analíticos estabelecidos com os eléctrodos selectivos de TRI aqui propostos constituem uma importante alternativa

aos métodos descritos na literatura, sobretudo pela sua simplicidade e rapidez. Estas características são devidas não apenas à facilidade de construção e manuseamento dos detectores potenciométricos, mas também às boas características de funcionamento por eles fornecidas. Adicionalmente, a incorporação dos detectores em sistemas FIA, ferramentas analíticas de baixo custo e de longo tempo vida, proporciona frequências analíticas elevadas, o que sugere a sua implementação em análises de rotina.

III.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED M. A., ELBESHLAWY M. (**1995**). Colorimetric and atomic-absorption spectrometric determination of some heterocyclic nitrogenous compounds of pharmaceutical interest. *Anal. Lett.*, 28, 2535-2545.

BAUM G., LYNN M. (**1973**). Polymer membrane electrodes. Part II. Potassium ion-selective membrane electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 65, 393-403.

CALATAYUD M. (**1996**). *Flow injection analysis of pharmaceuticals. Automation in the laboratory.* RUBINSTEIN M. H., WILSON J. P., editores. Taylor & Francis Limited, London, United Kingdom. Parte Cinco, *Electroanalytical Methods*, Capítulo 14, *Potentiometry.*

CLARKE´S (**1986**). *Clarke's isolation and identification of drugs.* Parte 2. *Analytical and toxicological data, monographs.* MOFFAT A. C., editor. The Pharmaceutical Press, London, 2ª edição, pp. 1052-1053.

DADGAR D., POWER A. (**1987**). Applications of column-switching techniques in biopharmaceutical analysis. II. High-performance liquid chromatographic determination of tripelennamine in bovine plasma and milk. *J. Chromatogr.*, 421, 216-222.

DRUG EVALUATIONS (**1986**). *Drug Evaluations.* Capítulo 58, *Histamine and Antihistamines.* American Medical Association, Saunders W. B. Company, 6ª edição, pp. 1041-1047.

GARRISON J. C. (**1992**). *Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics.* Secção IV, *Autacoids; Drug therapy of Inflammation.* Capítulo 23, *Histamine, Bradykinin, 5-Hydroxytryptamine, and Their Antagonists.* GILMAN A. F., RALL T. W., NIES A. S. E TAYLOR P., editores. McGraw Hill International Editions, 8ª edição.

GHAURI M. S., THOMAS J. D. R. (**1994**). Evaluation of an Ammomium ionophore for use in poly(vinyl chloride) membrane ion-selective electrodes: solvent mediator effects. *Analyst*, 119, 2323-2326.

HORVAI G., GRÁF E., TÓTH K., PUNGOR E., BUCK R. P. (**1986**). Plasticized poly(vinyl chloride) properties and characteristics of valinomycin electrodes. 1. High-frequency resistances and dielectric porperties. *Anal Chem.*, 58, 2735-2740.

KORFMACHER W. A., GETEK T. A., HANSEN E. B., JR., CERNIGLI C. E. (**1990**). Direct analysis od microbial extracts containing metabolites of ethylenediamine-type antihistaminics via high-performance liquid chromatography – thermospray mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 185, 136-142.

LIU J., MASUDA Y., SEKIDO E. (**1990**). Perchlorate ion-selective electrode coated-wire electrode based on a macrocyclic Schiff's base complex. *Analyst*, 115, 1089-1092.

MACKELL M. A., POKLIS A. (**1982**). Determination of pentazocine and tripelennamine in blood of "t"s and "blues" addicts by gas-liquid chromatography with a nitrogen detector. *J. Chromatogr.*, 235, 445-452.

MARTINDALE (**1993**). *Martindale, The Extra Pharmacopeia.* REYNOLDS J. E. F., editor. The Pharmaceutical Press, London, 30ª edição, p. 947.

NOGGLE F. T., JR. (**1983**). Liquid chromatographic analysis of pentazocine and tripelennamine in combination. *J. Liq. Chromatogr.*, 6, 2005-2017.

OKADA T., SUGIHARA H. E., HIRATANI K. (**1995**). Role of plasticizers on the characteristics of poly(vinyl chloride)-membrane lithium-selective electrodes based on phenanthroline derivatives. *Analyst*, 120, 2381-2386.

REID R. W., GERBECK C. M. (**1981**). Detecton of pentazocine and tripelennamine in urine. *Clin. Chem.*, 27, 10-13.

ROSATZIN T., BAKKER E., SUSUKI K., SIMON W. (**1993**). Lipophilic and immobilized anionic additives in solvent polymeric membranes of cation-selective chemical sensors. *Anal. Chim. Acta*, 280, 197-208.

SHOWALTER C. V. (**1978**). T's and blues: abuse of pentazocine and tripelennamine. *J. Am. Med. Ass.*, 244, 1224-1225.

SHOUKRY A. F. (**1995**). Use of plastic membrane ion-selective electrodes for the analysis of drug substances. *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A, Faculty of Chemical Technology*, 1, 5-15.

SWINYARD E. A. (**1990**). *Remington's. Pharmaceutical Sciences*. Capítulo 59, *Histamine and Antihistamines*. GENNARO A. R., editor. Mack Publishing Company. Easton, Pennsylvania. 18ª edição, p. 1129.

THOMPSON H. C., JÚNIOR., HOLDER C. L., ALTHAUS J. R. (**1983**). Trace determination of the antihistamines tripelennamine hydrochloride, thenyldiamine hydrochloride, and chlorothen citrate in admixture in animal feed, human urine, and wastewater by high-pressure liquid chromatography and use of a fluorescence detector. *Talanta*, 30, 251-260.

USP (**1990**). Tripelennamine hydrochloride tablets official monograph. United states pharmacopoeial convention. *United States Pharmacopoeia XXII*, Rockville, MD, p. 1424.

VAN-DE-VAART J. F., HULFSHOFF A., INDEMANS A. W. M. (**1980**). Analysis of creams. I. Quantitative determination of drugs in creams by u. V. Spectrophotometry. *Pharm. Weekbl., Sci. Ed.*, 2, 1687-1693.

VYTRAS K. (**1989**). The use of ion-selective electrodes in the determination of drug substances. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 7, 789-812.

ELÉCTRODOS SELECTIVOS DE PROMETAZINA

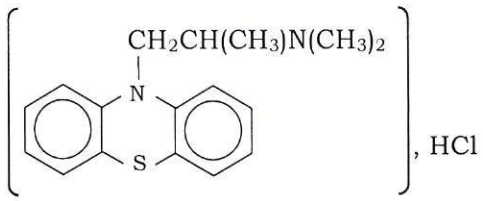
IV.1 INTRODUÇÃO

Tal como a tripelenamina, referida no capítulo anterior, a prometazina (PRO) é utilizada ao nível terapêutico pela sua acção antagonista perante manifestações alérgicas desencadeadas pela histamina. A PRO incluiu-se contudo num grupo distinto da tripelenamina, dado ser, quimicamente, uma fenotiazina (Garrison, em *Goodman and Gilman's*, 1992).

A PRO e os seus sais podem ser administrados por via oral, parenteral ou rectal, ou, ainda, aplicados topicamente (*Martindale*, 1993). No mercado português encontram-se disponíveis várias formas farmacêuticas, todas com a designação comercial de Fenergan®. Para aplicação tópica, a PRO é incorporada na sua forma

base, encontrando-se disponível comercialmente na forma de creme. Para aplicação parenteral ou oral, a PRO é incorporada na forma de cloridrato (HCl.PRO, Figura IV.1), estando disponível na forma de injectáveis, comprimidos e xarope.

Figura IV.1 Cloridrato de prometazina (HCl.PRO).
$C_{17}H_{20}N_2S.HCl$
320,88 g mol^{-1}.



Para o doseamento do HCl.PRO incorporado em formas farmacêuticas, a USP, 1990, propõe uma separação prévia do analito, recorrendo a uma técnica clássica ou a uma técnica instrumental, para a sua posterior quantificação espectrofotométrica. Este procedimento genérico relaciona-se provavelmente com a dificuldade da quantificação de PRO sem um prévio tratamento da amostra que permita o isolamento do analito. Além disso, é genericamente pouco adequado a análises de rotina, dado envolver uma série de manipulações como filtração, extracção, desarejamento, etc.. Relativamente ao caso concreto do doseamento do teor de PRO em creme, nada se refere naquela farmacopeia.

Também dedicados ao doseamento de PRO em formulações farmacêuticas, surgem na literatura uma série de outros trabalhos alternativos. Entre eles encontram-se alguns que recorrem ainda a metodologias clássicas, nomeadamente volumetrias. Neste sentido, e com o propósito de dosear PRO em cremes, Van-de--Vaart *et al.*, 1983, dissolve a amostra em anidrido acético e determina o título desta solução através da adição de $HClO_4$, até ao primeiro ponto final. Após a adição de $Hg(CH_3COO)_2$, prossegue a adição de titulante até ao registo de um segundo ponto final. Na opinião dos autores, os resultados deste procedimento, no qual a

quantidade de PRO é calculada por diferença entre os volumes finais das duas titulações, são contudo irreprodutíveis. Issa *et al.*, 1984, determina os derivados fenotiazínicos, incluindo a PRO, recorrendo a $K_3Fe(CN)_6$ em H_3PO_4 e utilizando o azul de metileno como indicador. Para o doseamento de anticolinérgicos e antipsicóticos, entre os quais se inclui a PRO, Shukla *et al.*, 1990, efectua a sua mistura com cloramina T, em anidrido acético, agitando vigorosamente por 10 minutos. O iodeto libertado com uma solução aquosa de KI é então titulado com tiosulfato de sódio, utilizando amido como indicador. Quando comparadas com os métodos instrumentais, as metodologias referidas são associadas a algumas dificuldades experimentais, nomeadamente no que diz respeito à detecção visual do ponto final, à escolha de indicador com uma zona de viragem adequada, a coloração e/ou a turvação da amostra, etc., podendo mesmo conduzir a resultados erróneos. Estes constituem alguns dos motivos que justificam a sua substituição por técnicas instrumentais e a ampla implementação destas últimas em laboratórios de análise.

Outras volumetrias, nomeadamente as termométricas, foram também utilizadas para a determinação de PRO em formulações farmacêuticas. Entre elas, a determinação de PRO foi efectuada por Burgot, 1979, através de uma precipitação com ácido tungstosilício, e por Abbasi, *et al.*, 1991, que recorre à utilização de N--bromosuccinimida.

Por entre as várias técnicas instrumentais, aquelas baseadas em métodos ópticos são as utilizadas com maior frequência na determinação de PRO em produtos farmacêuticos. Grande parte dos trabalhos descritos (tabela IV.1) requer um longo período de tempo no pré-tratamento das amostras, onde se efectua uma série de procedimentos clássicos, nomeadamente filtrações, extracções, aquecimentos, etc., e onde se utiliza ainda um grande número de reagentes. Embora esta fase do procedimento seja fundamental para que as leituras do analito apresentem a sensibilidade e a selectividade desejadas, a adaptação das técnicas de fluxo a estes procedimentos permite minorar consideravelmente esta limitação.

tabela IV.1 Determinações espectrofotométricas de PRO em formulações farmacêuticas.

	Sensibilidade ($L\ mol^{-1}\ cm^{-1}$)	Linearid. ($\mu g\ mL^{-1}$)	Algumas etapas envolvias	Referência Bibliográfica
Ultravioleta / Visível	21200 (410 nm)	1-10	+ dissolução em meio alcalino (NH_3) + extracção com $CHCl_3$ + lavagem de extractos clorofórmicos + secagem, filtração da fase orgânica + azul de bromofenol + 10 min para leitura	El-Kerdway *et al.*, 1993
	9700 (516 nm)	5-30	+ N-bromoftalimida + ácido acético glacial + metanol/ácido sulfúrico (gelo)	El-Kerdway *et al.*, 1992
	11200 (680 nm)	4-32	+ derivados da hidrazona + reagente oxidante ($FeCl_3$ e $K_2S_2O_8$ ou NaClO)	Sastry *et al.*, 1990
	10000 (515 nm)	2-25	+ 2-iodoxibenzoato + ácido sulfúrico + 15 min de espera	Hassan *et al.*, 1989
	4400 (555 nm)	4-32	+ Cloramina T + haematoxylin + 20 minutos + 70 °C, por 5 minutos +leitura entre 5 e 30 minutos	Sastry *et al.*, 1989
	5500 (560 nm)	5-35	+ formaldeído, H_2SO_4 + arrefecer e diluir	Zarapkar *et al.*, 1988
	76800 (490 nm)	≈1-5	+ H_2SO_4 + 5min	Srivastava *et al.*, 1985
	7200 (662 nm)	0,2-4	+ solução de morfolina + solução de I_2/KI + 100°C, 5 min + diluir com isopropanol + espera de 10 min para leitura	Youssef *et al.*, 1986
	42100 (390 nm)	1,5-65	+ sol. aquosa de sais de nitroso-R + extracção com $CHCl_3$ + leitura da fase orgânica	Jayarama *et al.*, 1986
	≈8513 (515 nm)	8-40	+ dissolver em etanol + evaporar à secura + dissolver com cobaltonitrilo/H_3PO_4 + 100 °C, 15 min + diluir em H_3PO_4	Mahrous *et al.*, 1984
	— (337 nm)	10-55	(método de Davidson) + reagente oxidante de peróxido de hidrogénio em ácido acético glacial	Hackmann *et al.*, 1983
	5930 (565 nm)	12-40	+ H_2SO_4 concentrado + N-bromosuccinimida + arrefecimento + leitura aos 20 min	Taha *et al.*, 1983
	16900 (525 nm)	1,8-42	+ solução de ácido tungstofosfórico + leitura aos 15 min	Ramappa *et al.*, 1983
	19300 (415 nm)	1,2-8,5	+ verde de bromocresol (II) + extracção com $CHCl_3$ (pH=2.7-2.8) + leitura em 30 minutos	Emami-Khoi *et al.*, 1983
	— (305 nm)	—	+ $CH_2Cl_2/H_2O/CH_3CH_2OH$ + diluição em anidrido acético	Van-deVaart *et al.*, 1983

tabela IV.1 Determinações espectrofotométricas de PRO em formulações farmacêuticas (continuação).

	Sensibilidade ($L\ mol^{-1}\ cm^{-1}$)	Linearid. ($\mu g\ mL^{-1}$)	Algumas etapas envolvias	Referência Bibliográfica
Ultravioleta / Visível	28200 (486 nm)	4-70	nitrato de bismuto + KI, H_2SO_4 + 10 min + amostra + $CHCl_3$ + extracção	Nayak *et al.*, 1982
	4780 (428 nm)	2-58	+ vermelho S de Alizarin + HCl, 2 min + $CHCl_3$, 1 min + extracção	Nayak *et al.*, 1981
	8000 (565 nm)	2-14	+ metanol + $NaWO_2$ + HCl, H_2SO_4 + leitura aos 5 min	Sane *et al.*, 1980
Luminescência	— (emissão: 360 nm)	— > 0,005	sulfóxidos de fenotiazinas (espectroscopia de luminescência sincronizada)	Clark *et al.*, 1983

Surgem por isso na literatura, e especial dentro da década de 90, um conjunto alargado de publicações dedicado à determinação de PRO em formulações farmacêuticas, envolvendo sistemas de fluxo, sobretudo FIA, e detecção baseada em métodos ópticos (tabela IV.2).

Os métodos separativos constituem também objecto de atenção dos investigadores. Neste sentido, Faridan *et al.*, 1988, recorrem à separação e identificação por cromatografia em camada fina de manchas de sulfóxido, quantificadas posteriormente por detecção fluorimétrica. No que diz respeito a cromatografia gasosa, Stavchansky *et al.*, 1982, procedem à separação dos vários constituintes da matriz farmacêutica utilizando uma fase estacionária liquida e detecção condutimétrica. Para as técnicas de cromatografia líquida, o maior destaque vai para os trabalhos baseados em sistemas de HPLC, sendo exemplo os procedimentos estabelecidos por Santoro *et al.*, 1988, e por Kountourellis *et al.*, 1986, ambos recorrendo à detecção espectrofotométrica.

tabela IV.2 Determinações espectrofotométricas de PRO em formulações farmacêuticas que envolvem técnicas de fluxo.

	Frequência analítica (amostras h^{-1})	Linearidade ($\mu g\ mL^{-1}$)	Algumas etapas envolvidas	Referência Bibliográfica
Ultravioleta / Visível	40	5-50 (200-526 nm)	◦injecção de 20 µL de amostra em água (3 mL min^{-1}) ◦canal confluente, de HCl ◦reactor de MnO_2 em fase sólida	Kojilo *et al.*, 1995
	>200	40-280 (515 nm)	◦injecção de 110 µL ◦solução transportadora de dicromato de potássio preparado em ácido sulfúrico ◦reactor de 76 cm ◦6,00 mL min^{-1}	Sultan *et al.*, 1993
	200	60-200 (515 nm)	◦injecção de 110 µL de amostra ◦solução de transporte de Ce(IV) ácida ◦reactor de 62 cm ◦4,25 mL min^{-1}	Sultan *et al.*, 1992
	32	25-197 (650 nm)	◦injecção de 137 µL de amostra ◦solução de transporte de azul de bromofenol com pH e força iónica ajustados (HCL e KCl) ◦reactor de 75 cm ◦0,97 mL min^{-1}	Calatayud *et al.*, 1992A
	110	5-400 (514 nm)	◦canal de amostra em água (2,3 mL min^{-1}) confluente com HCl (1,1 mL min^{-1}) ◦injecção de 460 µL para canal de reactor de Ce (IV) em fase sólida com solução acidificada	Calatayud *et al.*, 1992B
	122	10,3-51,3 (514 nm)	◦injecção de 226,1µL de amostra em solução ácida ◦solução de transporte de Ce(IV) ácida (oxidação da PRO) ◦4,0 mL min^{-1}	Calatayud *et al.*, 1992C
	150	160-2100 (515 nm)	◦injecção de 123 µL de amostra dissolvida em água quente ◦solução de transporte de metavanadato preparado em ácido ◦reactor de 45 cm ◦8,6 mL min^{-1}	Sultan, 1991
	120	6-117 (515 nm)	◦injecção de 200 µL de amostra ◦confluência com solução de $Fe(ClO_4)_3$ e $HClO_4$ ◦reactor de 50 cm ◦4,8 mL min^{-1}	Koupparis *et al.*, 1986
Fluorimetria	—	0,8-40 (370 emissão 335 excitação)	reacção de oxidação ao sulfóxido fluorescente em pH ácido pelo oxigénio dissolvido (*stop-flow*) (análise cinética, leitura a ≈3 s)	Gala *et al.*, 1995
	—	0,5-80 (370 emissão 330 excitação)	reacção de oxidação ao sulfóxido fluorescente em pH ácido pelo oxigénio dissolvido (*stop-flow*) (análise cinética, leitura aos 10 s)	De-La-Pena *et al.*, 1993

tabela IV.2 Determinações espectrofotométricas de PRO em formulações farmacêuticas que envolvem técnicas de fluxo (continuação).

	Frequência analítica (amostras h^{-1})	Linearidade ($\mu g\ mL^{-1}$)	Algumas etapas envolvidas	Referência Bibliográfica
Fluorimetria (cont.)	54	0,05-20 (377 emissão	◦733 µL de amostra ◦4,0 mL min^{-1} ◦reactor de 78 cm sob incidência de radiação de 254 nm emitida por um lâmpada de mercúrio	Romero *et al.*, 1992
	30-40	0,05-20 (373 emissão 253 excitação)	◦100 µL de amostra ◦transportador de NaOH ◦2,0 ou 1,0 mL min^{-1} ◦reactor de 2,0 m sob incidência de lâmpada de UV, 254 nm	Chen *et al.*, 1991A
	90	0,05-2,50 (373emissão 295 excitação)	◦65 µL de amostra ◦solução de transporte de NaOH ◦2,0 mL min^{-1} ◦reactor de 100 cm (irradiação de 50 cm a 254 nm)	Chen *et al.*, 1991B
	40	0,05-3,00 (373 emissão 295 excitação)	◦65 µL de amostra ◦solução de transporte de NaOH ◦2,0 mL min^{-1} ◦reactor de 50 cm (irradiação de radiação de 295 nm por 60s) ◦*stop* (60 s) / *flow* (10s + ...+20 s)	
Luminescência	—	0,00032-32 (—)	◦injecção de nitrato de crómio em água numa soluão de luminol em tampão de carbonato. ◦+ 10 cm, confluência com H_2O_2 preparado em tampão carbonato ◦+ 15 cm, confluência com solução de PRO ◦6,3 mL min^{-1} fluxo total ◦[inibição da chemiluminescência de luminol-H_2O_2-Cr(III)]	Alwarthan *et al.*, 1993

As técnicas electro-analíticas, nomeadamente amperometria, voltametria e potenciometria, foram também exploradas no sentido de estabelecer o doseamento de PRO em produtos farmacêuticos (tabela IV.3). Estes trabalhos apresentam, genericamente, intervalos de trabalho limitados ou constituem determinações indirectas, nomeadamente volumetrias. Apesar das vantagens inerentes à implementação de sistemas de fluxo, apenas dois dos trabalhos a referem.

A inexistência da determinação directa de PRO com base num eléctrodo selectivo à forma iónica desta espécie, deve-se sobretudo à falta de unidades com características adequadas. Muito embora no trabalho estabelecido por Cosofret *et al.*, 1984, se descrevam unidades selectivas à PRO, a sua aplicação analítica é contudo limitada à titulação potenciométrica e ao método da adição padrão.

tabela IV.3 Determinações electro-analíticas de PRO em formulações farmacêuticas que envolvem técnicas convencionais e de fluxo.

	Linearidade (Limite detecção)	Algumas etapas envolvidas	Referência Bibliográfica
Voltametria	20-140 nmol L^{-1} (5 nmol L^{-1})	eléctrodo de carbono vítreo modificado com DNA medição cronopotenciométrica potencial inicial = + 0,2 V corrente (constante) = + 6 μA	Wang *et al.*, 1996
	até $2x10^{-4}$ mol L^{-1}	eléctrodo de grafite tubular voltametria anódica FIA	Sharma *et al.*, 1980
	2-20 μg mL^{-1} (1,64 μg mL^{-1})	eléctrodo de carbono vítreo voltametria anódica diferencial de impulsos	Baxter *et al.*, 1984
Potenciometria	$5x10^{-5}$ - $1x10^{-2}$ mol L^{-1} ($1,7x10^{-5}$ mol L^{-1}) 55,6 ± 0,4 mV década^{-1}	Eléctrodo selectivo de PRO (titulação e método da adição padrão)	Cosofret *et al.*, 1984
	(amplitude do potencial em torno do ponto final de 320 a 420 mV)	volumetria de amostras dissolvidas em anidrido acético e tratadas: com oxiacetato de bismuto + agitação para redissolução + titulação com ácido trifluorometilsulfónico	Zakhari *et al.*, 1991
	(amplitude do potencial em torno do ponto final de ≈300 mV)	Titulação potenciométrica, com eléctrodo de quinidrona e ácido metanosulfónico como titulante, ,de extractos de clorofórmio de formulações farmacêuticas	Azar *et al.*, 1994
	(→ amplitude do potencial em torno do ponto final de ≈300 mV) (→ linearidade a concentrações de iodeto entre 0,8-2,0 μg mL^{-1})	hidrólise à forma básica e aquecimento com iodometano, em metanol, em banho de água, por 30 min e monitorização com eléctrodo selectivo de iodo, recorrendo a: → titulação ($AgNO_3$) até ponto final → ou determinação directa, após adição de H_2SO_4 e KNO_3	Hopkala *et al.*, 1990
	(80 mV até ponto final)	Eléctrodo selectivo de tetrafenilborato Adição de titulante a 0,36 mL min^{-1}	Diamandis *et al.*, 1983
Amperometria	80-140 μg mL^{-1}	Reacção de oxidação com hipobromito Volumetria em FIA	Feher *et al.*, 1988

Os eléctrodos referidos (tabela IV.3) apresentam membranas de PVC, com sensor à base de tetrafenilborato ou de dinonilnaftalenosulfonato, e solução de referência interna. A presença desta solução impõe também um maior cuidado no manuseamento da unidade potenciométrica e limita a sua adaptação a um formato adequado à sua inserção em sistemas de fluxo.

Justifica-se assim o trabalho desenvolvido, baseado na construção de eléctrodos selectivos de PRO de membrana plástica, sem solução de referência interna e utilizando um sensor adequado à determinação directa de PRO. Pretende-se ainda a sua implementação em sistemas FIA, tendo como objectivo principal incrementar a frequência analítica e minorar o envolvimento do operador, adequando assim o procedimento analítico a análises de rotina.

IV.2 PARTE EXPERIMENTAL

IV.2.1 APARELHAGEM E ELÉCTRODOS

Para a execução experimental dos ensaios referentes à caracterização das unidades potenciométricas e à determinação de HCl.PRO em formulações farmacêuticas, utilizaram-se os aparelhos indicados nas secções II.2 (p. II3) e II.3 (p. II7). A solução escolhida para o compartimento externo do eléctrodo de referência era constituída por Na_2SO_4, numa concentração igual a $3{,}3 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}. Esta solução foi escolhida de acordo com a baixa interferência do catião sódio na membrana dos eléctrodos.

IV.2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

As soluções de maior concentração em HCl.PRO foram preparadas por pesagem rigorosa do sólido correspondente e sua diluição, a um volume rigoroso, com água desionizada. As de menor concentração obtiveram-se por diluição das anteriores.

Entre outros reagentes vulgarmente presentes num laboratório de química analítica, utilizaram-se HCl.PRO (Sigma), cloridrato de tripelenamina (Sigma), cloridrato de difenidramina (Sigma) e maleato de clorfeniramina (Sigma), todos de qualidade p.a. ou semelhante, não tendo sido submetidos a qualquer purificação adicional.

Para a preparação das membranas foram usados tetrafenilborato de sódio, como extractor, *o*-nitrofeniloctiléter (*o*NFOE, Fluka) ou *bis*(2-etilhexil)sebacato (*b*EHS, Fluka), como solvente mediador, e poli(cloreto de vinilo) (PVC) de elevado peso

molecular (Fluka), previamente dissolvido em tetrahidrofurano (THF, Riedel-deHaen), como suporte imobilizador.

Como ajustador de força iónica utilizou-se uma solução aquosa de Na_2SO_4 com concentração igual a $3{,}3x10^{-3}$ mol L^{-1}. Para o doseamento potenciométrico da PRO em formulações farmacêuticas, o valor de pH das soluções foi ajustado a 6,0 unidades com uma solução tampão de NaH_2PO_4/Na_2HPO_4. Para os ensaios discretos, esta solução aquosa foi preparada com um valor de força iónica igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1}, tendo-se juntado 360,0 mL de uma solução de NaH_2PO_4 ($1{,}0x10^{-2}$ mol L^{-1}) e 50,0 mL de uma solução Na_2HPO_4 ($1{,}0x10^{-2}$ mol L^{-1}), num volume total de 500,0 mL. Relativamente aos eléctrodos de configuração tubular, esta solução era preparada medindo os mesmos volumes, mas partindo daquelas soluções de ácido e de base com uma concentração duas vezes maior. A solução resultante apresentava por isso um valor de força iónica igual a $2x10^{-2}$ mol L^{-1}.

IV.2.3 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS SENSORES E DAS MEMBRANAS

Para a obtenção das diferentes membranas procedeu-se à preparação do sensor iónico, à sua dissolução em solvente mediador e, posteriormente, à imobilização da solução obtida numa matriz de PVC.

O sensor iónico foi obtido por reacção de precipitação, seguindo os procedimentos indicados em II.5.2 (p. II15). Para isso, utilizaram-se soluções de HCl.PRO e de tetrafenilborato de sódio, ambas com um valor de concentração igual a $1{,}0x10^{-2}$ mol L^{-1}. A escolha de um só sensor iónico, à base de tetrafenilborato, deveu-se aos ensaios de avaliação de selectividade realizados ao longo do trabalho descrito no capítulo III (tabela III.6, p. III20).

Para o extractor seleccionado, optou-se por preparar soluções sensoras com base em diferentes solventes mediadores. Estas soluções foram então preparadas por

dissolução de cerca de 0,04 g de sensor iónico em cerca de 2,0 g de *o*NFOE ou de *b*HES. Para as distinguir, foi-lhes atribuída a designação CP1 ou CP3, respectivamente.

As soluções das membranas pretendidas foram obtidas pela mistura de 0,4 mL da solução sensora correspondente com uma solução de, aproximadamente, 0,18 g de PVC em cerca de 6 mL de THF (tabela IV.4).

tabela IV.4 Correspondência entre os elementos constituintes de cada membrana (assinalados com X) e a designação atribuída.

designação / *constituintes*	**CP1**	**CP3**
Tetrafenilborato de PRO	**x**	**x**
*o*NFOE	**x**	–
*B*EHS	–	**x**
PVC	**x**	**x**

Aquelas soluções, com uma composição igual à indicada na tabela IV.5, foram posteriormente aplicadas em corpos de eléctrodos convencionais (II.5.2, p. II15), construídos de acordo com o descrito em II.5.1.1 (p. II9). Uma destas membranas foi ainda aplicada em corpos de configuração tubular (II.5.2, p. II15), cuja construção se encontra referida em II.5.1.2, p. II13.

tabela IV.5 Composição percentual (m/m) das membranas sensoras preparadas.

Constituintes / *Tipo*	**Sensor iónico** (%)	**Solvente mediador** (%)	**PVC** (%)
CP1	1,4	67,6	31,0
CP3	1,4	67,5	31,1

Uma vez secas as membranas, os eléctrodos foram colocados em contacto com uma solução aquosa de HCl.PRO, de concentração igual $1x10^{-3}$ mol L^{-1}, solução igual à utilizada para o condicionamento das membranas dos eléctrodos quando estes não estavam a ser utilizados.

IV.2.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA OS DOSEAMENTOS POTENCIOMÉTRICOS

As formas farmacêuticas contendo PRO, e que se encontravam disponíveis no mercado português, eram comprimidos ou xarope, destinados a administração oral, injectáveis, destinados a administração parenteral, e creme, para aplicação tópica.

As amostras foram preparadas para a análise potenciométrica de acordo com o descrito em II.7.1, p. II44. Com o objectivo de preparar uma solução *stock* de amostra com uma concentração em HCl.PRO igual a cerca de $1,0x10^{-3}$ mol L^{-1}, dissolveu-se ou diluiu-se uma quantidade de amostra que se previa conter 0,016 g de HCl.PRO num volume total de 50,00 mL.

A partir de cada solução *stock* prepararam-se soluções diluídas das amostras, com uma concentração em HCl.PRO que se previa ser igual a cerca de $2,0x10^{-4}$ mol L^{-1}. Este valor de concentração, incluído na zona de resposta linear dos eléctrodos, foi obtido por diluição de 5000,0 μL da solução *stock* correspondente em 25,00 mL. Relativamente às análises discretas, a solução utilizada para perfazer o volume do balão volumétrico foi uma solução tampão de NaH_2PO_4/Na_2HPO_4, com um pH igual a 6,0 unidades e uma força iónica igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1}. Quando estas análises foram realizadas com os detectores tubulares, as mesmas diluições foram efectuadas com água desionizada, dado que o ajuste dos valores de pH e de força iónica das amostras era realizado no interior da montagem FIA.

Tal como referido em II.7.3, p. II46, a propósito da avaliação da qualidade dos resultados obtidos, efectuaram-se também ensaios de recuperação do sinal analítico.

Este ensaio foi efectuado com uma outra solução contendo 5000,0 μL de solução *stock* e 5000,0 μL de uma solução de HCl.PRO ($2,5x10^{-3}$ mol L^{-1}), num volume total de 25,00 mL. A solução resultante apresentava uma concentração que se previa ser igual a $7,0x10^{-4}$ mol L^{-1}, valor este também incluído na zona de resposta linear dos eléctrodos.

No caso particular da preparação da solução *stock* do creme, no qual a PRO se encontrava incorporada sob a forma de base, houve necessidade de proceder a uma extracção prévia do fármaco. Para isso, cerca de 7,11 g de creme, que correspondiam a uma quantidade de PRO igual a 0,142 g, foram vigorosamente misturados em 350,0 mL de $CHCl_3$/HCl (1:1). Separou-se posteriormente a fase clorofórmica e procedeu-se à evaporação do $CHCl_3$. A solução *stock* foi então obtida ao retomar o resíduo com HCl 0,1 mol L^{-1} para um volume final de 100,00 mL, prevendo-se para esta solução uma concentração em HCl.PRO igual a $5,0x10^{-3}$ mol L^{-1}. As leituras potenciométricas foram efectuadas numa solução de concentração igual a $2,0x10^{-4}$ mol L^{-1}, obtida por diluição de 1000,0 μL da mesma num volume de 25,00 mL. Para os ensaios de recuperação do sinal analítico procedeu-se de um modo equivalente ao efectuado para as restantes amostras.

IV.2.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA OS DOSEAMENTOS DA USP

Na USP, 1990, encontram-se descritas as monografias correspondentes ao doseamento do HCl.PRO, quando integrado em formas de comprimidos, xarope e injectáveis.

Relativamente aos comprimidos, a USP, 1990, propõe para o doseamento de HCl.PRO a determinação da absorvância a 470 nm de soluções de amostra preparadas em solução tampão de cloreto de paládio. Para a preparação desta solução tampão, dissolveu-se cerca de 500,0 mg de $PdCl_2$ em 5 mL de HCl, com a

ajuda de aquecimento, em banho de água, após o qual se adicionou 200,0 mL de água quente, com agitação constante. A solução obtida foi arrefecida e transferida para balão de 500,00 mL, tendo-se completado o volume com água. Transferiu-se 25,00 mL desta solução para um balão de 500,00 mL, ao qual se adicionou 50,0 mL de uma solução de CH_3COONa, com uma concentração igual a 1,0 mol L^{-1}, e 48,0 mL de uma solução de HCl, com igual valor de concentração. A solução tampão pretendida encontrava-se preparada uma vez completado o volume do balão com água. Para a preparação da amostra, pulverizaram-se 20 comprimidos e pesou-se cerca de 0,039 g do pó obtido, equivalente a 6,25 mg de HCl.PRO. O pó foi misturado com 20,0 mL de uma solução de KCl saturada, 10,0 mL de NaOH (1,0 mol L^{-1}) e 10,0 mL de CH_3OH, tendo-se transferido a mistura para uma ampola de decantação de 125 mL. Procedeu-se em seguida à extracção da forma base da PRO com 3x20 mL de *n*-heptano. Os extractos da fase orgânica foram recolhidos e filtrados com Na_2SO_4 anidro. Procedeu-se novamente a uma extracção ácida com 3x15 mL de HCl ($1,0x10^{-1}$ mol L^{-1}). Os extractos da fase aquosa foram então recolhidos em balão de 50,00 mL, tendo-se completado o volume com uma solução de HCl ($1,0x10^{-1}$ mol L^{-1}). A solução padrão foi preparada rigorosamente por dissolução de cerca de 31 mg de HCl.PRO em HCl ($1,0x10^{-1}$ mol L^{-1}), até um volume final de 50,00 mL. As leituras espectrofotométricas foram efectuadas numa mistura de 2000,0 μL de solução padrão ou de amostra, com 3000,0 μL de tampão de cloreto de paládio. O zero da absorvância foi fixado para uma mistura de 2000,0 μL de solução de HCl ($1,0x10^{-1}$ mol L^{-1}) com 3000,0 μL da solução tampão.

Para o doseamento de HCl.PRO em xarope, misturaram-se 25,00 mL de amostra, quantidade correspondente a 24 mg de HCl.PRO, com 10,0 mL de NH_4OH. Procedeu-se em seguida à extracção da PRO com 6x40 mL de $CHCl_3$. Os extractos clorofórmicos foram recolhidos e lavados com 25,0 mL de HCl/H_2O (1:9). Esta fase aquosa foi também lavada com 25,0 mL de $CHCl_3$, tendo-se juntado esta solução de lavagem aos extractos clorofórmicos anteriores. Levou-se a fase orgânica à secura,

com a ajuda de um evaporador rotativo, e dissolveu-se o resíduo resultante com uma solução de H_2SO_4 (1:100) e aquecimento. Após arrefecimento, a solução obtida foi transferida para um balão de 500,00 mL, sendo o volume total preenchido com uma mesma solução de H_2SO_4. Concluiu-se a preparação da amostra após homogeneização e filtração da solução preparada, com rejeição da primeira metade do filtrado. A solução padrão foi obtida por dissolução de 5 mg de HCl.PRO em solução de H_2SO_4 (1:100), num volume total de 100,00 mL. Para os padrões e amostra preparados leram-se as absorvâncias a 298 nm, tendo-se usado como referência de absorvância nula a solução de H_2SO_4 usada na preparação daquelas soluções.

Para a preparação dos injectáveis, cuja determinação era efectuada por HPLC, diluiu-se em eluente 400,0 μL da solução injectável, contendo uma quantidade de HCl.PRO equivalente a 50 mg até um volume final de 50,00 mL. O eluente era constituído por uma mistura de 500,0 mL de uma solução aquosa de pentanosulfonato de sódio, com uma concentração igual a 2 g L^{-1}, com 500,0 mL de acetonitrilo e 5,0 mL de ácido acético glacial. Previamente à sua utilização, o eluente foi filtrado e desarejado. A solução padrão foi preparada pela dissolução de 0,01 g de HCl.PRO em eluente, até um volume final igual a 100,00 mL. Uma vez injectadas estas soluções, a detecção dos compostos eluidos do sistema cromatográfico foi efectuada por um espectrofotómetro sintonizado a 254 nm.

Considerando que, para as várias farmacopeias consultadas, o creme não se encontrava contemplado com uma monografia de doseamento, optou-se pela execução de um método semelhante ao utilizado nos Laboratórios Vitória® para o controle analítico daquele produto comercial. Para isso, misturaram-se cerca de 7,11 g de creme, contendo o equivalente a 0,14 g de PRO, em 350,0 mL de uma mistura de $CHCl_3/CH_3OH$ (1:1). Recorreu-se nesta fase a um agitador magnético com o objectivo de facilitar a extracção da PRO, incorporada na formulação na sua forma base. Levou-se à secura a fase orgânica em evaporador rotativo e dissolveu-se o

resíduo obtido com uma solução de HCl ($1,0x10^{-1}$ mol L^{-1}). A solução padrão foi preparada por dissolução de 0,10 g de HCl.PRO para 100,00 mL de HCl ($1,0x10^{-1}$ mol L^{-1}) e posterior diluição de 4000,0 μL desta a um volume final de 50,00 mL. As leituras espectrofotométricas foram efectuadas a 470 nm para uma mistura de 2000,0 μL de solução padrão ou de amostra, com 3000,0 μL da solução tampão de cloreto de paládio, igual àquela utilizada na preparação dos comprimidos. O valor zero de absorvância foi fixado para uma mistura preparada de igual modo, na qual se substituiu a solução padrão ou de amostra pela solução de HCl.

IV.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objectivo de desenvolver eléctrodos selectivos de PRO com características adequadas à sua implementação no controle analítico de formulações farmacêuticas, procedeu-se inicialmente à construção de duas unidades de configuração convencional, distintas apenas pela constituição da membrana sensora. A avaliação das suas características de resposta, bem como a discussão dos resultados decorrentes dessa avaliação, constituíram a primeira fase deste trabalho.

IV.3.1 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMENTO DOS ELÉCTRODOS CONVENCIONAIS

As características mais gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de PRO foram avaliadas a partir da execução experimental consecutiva de traçados de calibração (secção II.6.1.1, p. II21). Incluíram-se aqui os parâmetros das curvas de calibração, a repetibilidade do sinal analítico, o tempo de resposta e o tempo de vida das unidades potenciométricas.

A influência do pH, assim como a interferência de algumas espécies catiónicas em solução, esta última traduzida em coeficientes de selectividade potenciométrica, foram abordados individualmente.

IV.3.1.1 PARÂMETROS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As curvas de calibração foram obtidas a partir de soluções aquosas de HCl.PRO com valores de concentração compreendidos entre $4x10^{-6}$ e $1x10^{-2}$ mol L^{-1} e seguindo o procedimento indicado em II.6.1.1.1, p. II25. Os valores médios dos parâmetros de calibração e a repetibilidade do sinal analítico foram calculados com base em oito ensaios e de acordo com a secção II.6.1.2, p. II32. A mesma execução experimental contribuiu ainda para a avaliação do tempo de resposta das várias unidades construídas (secção II.6.2, p. II35).

Numa fase inicial, os traçados de curva de calibração foram obtidos em soluções de ião principal sem a força iónica ajustada. Os valores médios dos parâmetros de calibração obtidos (tabela IV.6) permitiram definir o intervalo de concentrações mais adequado ao estudo das características de selectividade dos eléctrodos (IV.3.1.3). Os resultados destes ensaios indicaram características gerais de funcionamento similares para ambas as unidades.

Para a determinação dos parâmetros das curvas de calibração em soluções com a força iónica ajustada, o procedimento seguido foi análogo ao anterior, mas em soluções padrão que, com igual valor de concentração em HCl.PRO, apresentavam a força iónica ajustada a $1x10^{-2}$ mol L^{-1}. Para isso, as soluções de ião principal foram preparadas em solução aquosa de Na_2SO_4, com uma concentração igual $3,3x10^{-3}$ mol L^{-1}. A escolha deste electrólito deveu-se à baixa interferência do catião sódio no comportamento das várias unidades potenciométricas (tabela IV.9). Os valores médios dos parâmetros de calibração relativos a estas condições experimentais encontram-se indicados na tabela IV.7.

O ajuste da força iónica das soluções de medida não conduziu a diferenças assinaláveis entre o comportamento dos eléctrodos CP1 e CP3, muito embora estas

unidades se distinguissem pela presença de solventes mediadores com características de polaridade bem distintas. Em comparação com os resultados obtidos sem ajuste de força iónica, verificou-se que ambos os eléctrodos apresentavam uma melhoria na sensibilidade analítica.

tabela IV.6 Características gerais de funcionamento dos dois tipos de eléctrodos selectivos de PRO, obtidas em soluções aquosas sem qualquer ajuste de força iónica.

Tipo de eléctrodo / *características*	**CP1**	**CP3**
LD (mol L^{-1})	$2,1x10^{-5}$	$2,6x10^{-5}$
LIRL (mol L^{-1})	$4,0x10^{-5}$	$4,0x10^{-5}$
Declive (mV década^{-1})	+50,6±0,3	+49,8±1,7
Repetibilidade (mV)	±0,5	±0,6
t de resposta (s)	<40	<40
R^2	>0,9993	>0,9991

tabela IV.7 Características gerais de funcionamento dos dois tipos de eléctrodos selectivos de PRO, obtidas em soluções aquosas de força iónica igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1}.

Tipo de eléctrodo / *características*	**CP1**	**CP3**
LD (mol L^{-1})	$2,8x10^{-5}$	$2,7x10^{-5}$
LIRL (mol L^{-1})	$5,8x10^{-5}$	$5,9x10^{-5}$
Declive (mV década^{-1})	+55,1±1,0	+54,3±0,3
Repetibilidade (mV)	±0,2	±0,1
t de resposta (s)	<20	<20
R^2	>0,9998	>0,9996

Considerando a aplicação analítica do trabalho desenvolvido julgou-se importante caracterizar as várias unidades potenciométricas em soluções de ião principal com valores de pH e de força iónica conhecidos. Para isso, recorreu-se a uma solução tampão de NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 cuja força iónica era igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1} e o pH igual a 6,0 unidades. Relativamente ao valor de pH, a escolha desta solução foi baseada no estudo da influência deste parâmetro no potencial dos eléctrodos, descrito em III.3.1.2. Nestas condições, registou-se um ligeiro aumento do declive, muito embora esta característica aparecesse associada a um ligeiro aumento do LIRL (tabela IV.8). A repetibilidade do sinal fornecido pelas unidades tipo CP3, característica importante sob um ponto de vista analítico, foi ligeiramente melhor do que aquela registada para as unidades tipo CP1.

tabela IV.8 Características gerais de funcionamento dos dois tipos de eléctrodos selectivos de PRO, obtidas em soluções aquosas com pH igual a 6,0 unidades e com força iónica igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1}.

Tipo de eléctrodo / *características*	**CP1**	**CP3**
LD (mol L^{-1})	$1,2x10^{-4}$	$4,4x10^{-4}$
LIRL (mol L^{-1})	$2,0x10^{-4}$	$1,7x10^{-4}$
Declive (mV década^{-1})	+56,5±2,0	+56,4±0,7
Repetibilidade (mV)	±0,8	±0,2
t de resposta (s)	<40	<40
R^2	>0,9996	>0,9995

Perante condições de ensaio equivalentes, todos os eléctrodos construídos apresentaram tempos de resposta semelhantes, não se tendo registado valores superiores a 40 segundos.

O tempo de vida das unidades construídas, avaliado a partir dos vários traçados de curva de calibração realizados (II.6.1.2, p. II32), foi estimado em cerca de 6 e 7 meses para as unidades tipo CP3 e CP1, respectivamente.

IV.3.1.2 EFEITO DO pH NO VALOR DE POTENCIAL DOS ELÉCTRODOS

A influência do pH nos valores de potencial dos eléctrodos selectivos de PRO foi estudada de acordo com os procedimentos descritos em II6.3, p. II37, em soluções aquosas com uma força iónica ajustada a $1x10^{-2}$ mol L^{-1}. Realizaram-se ensaios para valores de concentração de HCl.PRO iguais a $1x10^{-3}$ mol L^{-1} e $1x10^{-4}$ mol L^{-1}, ambos incluídos na zona de resposta linear dos eléctrodos. O valor de pH daquelas soluções foi alterado quer pela adição de ácido sulfúrico concentrado, quer pela adição de uma solução saturada de NaOH. A escolha desta última solução permitiu variar o pH da solução a ensaiar sem que houvesse introdução de iões estranhos, dado que o catião sódio se encontrava presente como espécie constituinte do electrólito ajustador da força iónica.

Os diagramas de *Reilley* traçados para a solução de HCl.PRO de concentração igual a $1,0x10^{-3}$ mol L^{-1}, indicaram intervalos de pH compreendidos entre 4,1 e 7,8 e entre 4,0 e 7,8 unidades, para os eléctrodos tipos CP1 e CP3, respectivamente. Naqueles intervalos o potencial da solução de ião principal não variou além de ±5 mV. Representa-se na Figura IV.2 os diagramas correspondentes.

Com o aumento do valor de pH além de 8 unidades verificou-se uma baixa acentuada no potencial da célula de eléctrodo selectivo de PRO, relacionada provavelmente com o desaparecimento progressivo da forma protonada da PRO. Este fenómeno foi aliás sustentado pelo valor de p*Ka* tabelado para o HCl.PRO, igual a 9,1 (*Clarke´s*, 1986).

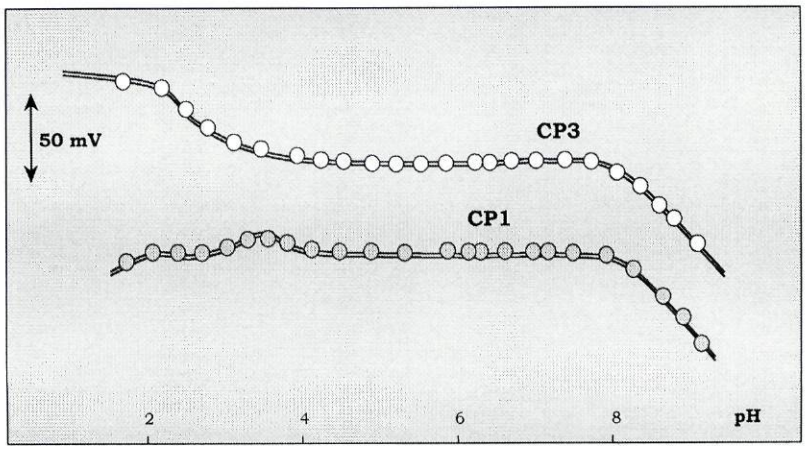


Figura IV.2 Diagramas de *Reilley* dos eléctrodos selectivos de PRO. Valores registados em soluções de força iónica igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1} e de concentração, em HCl.PRO igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}.

O decréscimo dos valores de pH além de 4 unidades conduziu a comportamentos distintos para os dois eléctrodos. Este registo estaria então provavelmente relacionado com a ocorrência simultânea de dois fenómenos: um a interferência do catião H^+ e o outro uma possível alteração química da PRO. Assim, enquanto que as unidades CP3 sofreram predominantemente uma interferência de H^+, as de tipo CP1 revelaram sobretudo essa possível alteração química e, consequentemente, o decréscimo da concentração de ião principal em solução.

Para a solução de HCl.PRO com uma concentração de $1,0x10^{-4}$ mol L^{-1}, valor próximo do LIRL das unidades potenciométricas, verificou-se um comportamento "anómalo" entre aproximadamente 4,0 e 5,5 unidades de pH (Figura IV.3). Este comportamento, reproduzido por uma variação positiva do potencial da célula potenciométrica, foi provavelmente o resultado por uma interferência do catião H^+. Nestas condições, a razão de concentrações entre o catião de PRO e o catião H^+ era dez vezes inferior àquela encontrada para os mesmos valores de pH na solução de HCl.PRO mais concentrada, justificando assim que aquele registo "anómalo" tenha ocorrido apenas neste ensaio.

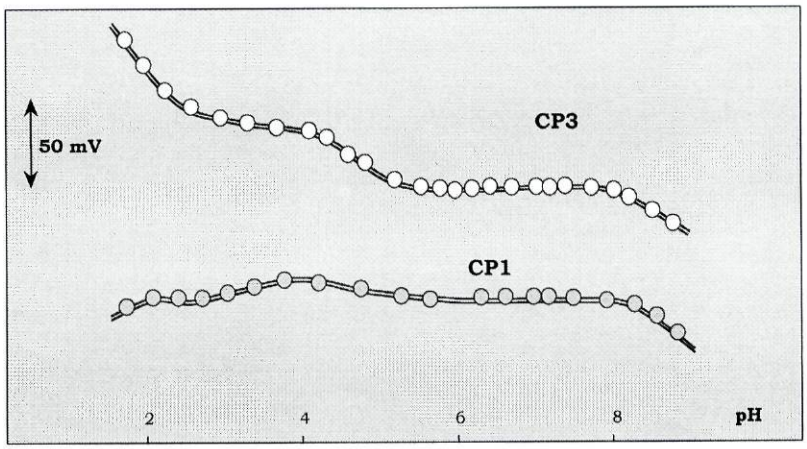


Figura IV.3 Diagramas de *Reilley* dos eléctrodos selectivos de PRO. Valores registados em soluções de força iónica igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1} e de concentração, em HCl.PRO igual a $1x10^{-4}$ mol L^{-1}.

IV.3.1.3 DETERMINAÇÃO DE COEFICIENTES DE SELECTIVIDADE POTENCIOMÉTRICA

A influência de algumas espécies iónicas no comportamento dos eléctrodos selectivos de PRO foi avaliada pelo cálculo de coeficientes de selectividade potenciométrica, $K_{A,B}^{pot}$. Para este estudo seleccionaram-se alguns catiões de carácter inorgânico vulgarmente presentes em formulações, designadamente sódio, potássio, lítio e amónio, e três espécies orgânicas com actividade anti-histamínica. Estas espécies foram a clorfeniramina, a difenidramina e a tripelenamina, anti--histamínicos incluídos nos grupos designados por alquilaminas, etanolaminas e etilenodiaminas, respectivamente (Garrison, em *Goodman and Gilman's*, 1992). Embora não associadas à PRO em produtos farmacêuticos, aquelas espécies orgânicas foram incluídas neste estudo com um objectivo meramente académico.

Para a determinação dos logaritmos de $K_{A,B}^{pot}$ recorreu-se ao método das soluções separadas (II.6.4, p. II39), tendo-se utilizado soluções com valores de concentração, em ião principal ou interferente, iguais a $1,0x10^{-4}$, $5,0x10^{-4}$, $1,0x10^{-3}$ e $5,0x10^{-3}$ mol

L^{-1}, valores incluídos na zona de resposta linear dos eléctrodos selectivos de PRO. Os resultados obtidos foram indicados na tabela IV.9.

tabela IV.9 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os eléctrodos selectivos de PRO, tipos CP1 e CP3. Valores obtidos em soluções aquosas sem qualquer ajuste de força iónica.

Interferente	*Concentração (mol L^{-1})*	log $K^{pot}_{A,B}$ **CP1**	**CP3**
Sódio	$1,0x10^{-4}$	-1,34 ± 0,08	-1,03 ± 0,03
	$5,0x10^{-4}$	-2,13 ± 0,07	-1,81 ± 0,03
	$1,0x10^{-3}$	-2,52 ± 0,05	-2,23 ± 0,05
	$5,0x10^{-3}$	-3,37 ± 0,07	-3,12 ± 0,06
Potássio	$1,0x10^{-4}$	-1,17 ± 0,03	-0,99 ± 0,03
	$5,0x10^{-4}$	-1,99 ± 0,04	-1,764 ± 0,04
	$1,0x10^{-3}$	-2,38 ± 0,05	-2,17 ± 0,04
	$5,0x10^{-3}$	-3,20 ± 0,09	-2,97 ± 0,05
Lítio	$1,0x10^{-4}$	-1,20 ± 0,09	-0,92 ± 0,02
	$5,0x10^{-4}$	-2,03 ± 0,09	-1,69 ± 0,06
	$1,0x10^{-3}$	-2,41 ± 0,07	-2,08 ± 0,09
	$5,0x10^{-3}$	-3,12 ± 0,06	-2,89 ± 0,15
Amónio	$1,0x10^{-4}$	-1,19 ± 0,10	-1,01 ± 0,04
	$5,0x10^{-4}$	-1,83 ± 0,09	-1,77 ± 0,04
	$1,0x10^{-3}$	-2,12 ± 0,07	-2,14 ± 0,04
	$5,0x10^{-3}$	-2,68 ± 0,10	-2,87 ± 0,06
Clorfeniramina	$1,0x10^{-4}$	-0,03 ± 0,07	-0,24 ± 0,08
	$5,0x10^{-4}$	-0,38 ± 0,06	-0,70 ± 0,09
	$1,0x10^{-3}$	-0,56 ± 0,03	-0,89 ± 0,08
	$5,0x10^{-3}$	-0,71 ± 0,02	-1,11 ± 0,04
Difenidramina	$1,0x10^{-4}$	-0,31 ± 0,10	-0,53 ± 0,05
	$5,0x10^{-4}$	-0,51 ± 0,08	-0,64 ± 0,04
	$1,0x10^{-3}$	-0,60 ± 0,09	-0,70 ± 0,03
	$5,0x10^{-3}$	-0,69 ± 0,09	-0,73 ± 0,01
Tripelenamina	$1,0x10^{-4}$	+0,16 ± 0,03	-0,22 ± 0,01
	$5,0x10^{-4}$	+0,25 ± 0,01	-0,26 ± 0,02
	$1,0x10^{-3}$	+0,25 ± 0,01	-0,25 ± 0,02
	$5,0x10^{-3}$	+0,24 ± 0,01	-0,24 ± 0,01

Um dos catiões inorgânicos de menor interferência no comportamento das várias unidades foi o sódio, facto que levou à escolha de uma solução ajustadora de força iónica constituída por Na_2SO_4 e de uma solução de base forte de NaOH para promover a variação positiva dos valores de pH no estudo deste parâmetro (III.3.1.2).

Ambos os eléctrodos construídos apresentaram boas características de selectividade na presença das várias espécies iónicas estudadas. As unidades que forneceram os valores de logaritmos de $K^{pot}_{A,B}$ mais baixos foram as de tipo CP1, quando na presença das espécies inorgânicas ensaiadas, e as de tipo CP3, quando na presença das espécies orgânicas (Figura VI.4).

Assim, o solvente mediador de menor polaridade, o *b*EHS, presente na membrana de tipo CP3, pareceu conduzir às unidades mais selectivas na presença de espécies orgânicas, enquanto que o solvente mais polar, o *o*NFOE, presente nas membranas tipo CP1, pareceu conduzir às unidades mais selectivas face à presença de espécies inorgânicas.

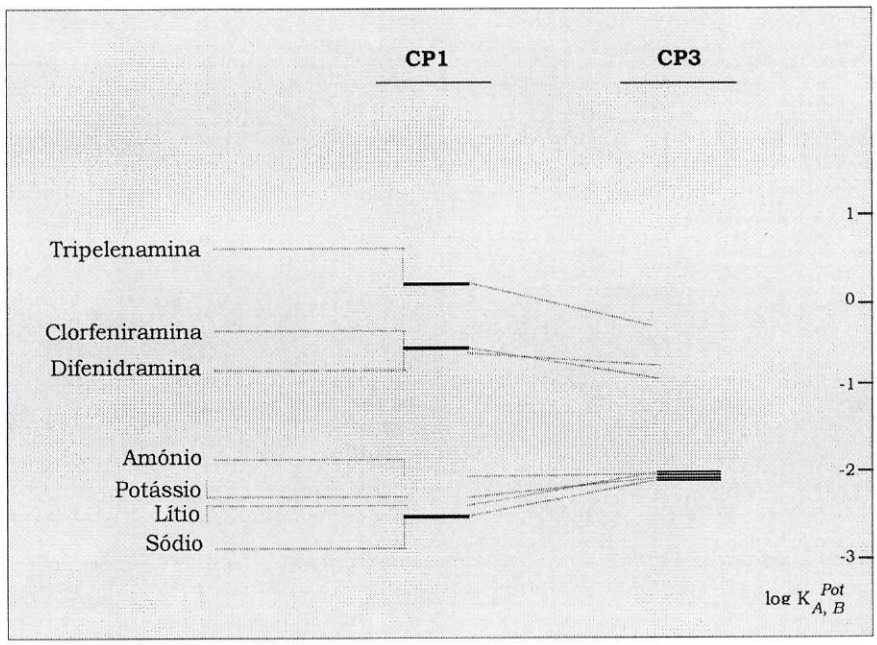


Figura VI.4 Diagrama dos log $K^{pot}_{A,B}$ dos eléctrodos selectivos de PRO, tipos CP1 e CP3, de configuração convencional. Determinações efectuadas em soluções de concentração igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}.

Perante a semelhança entre as várias características registadas para ambas as unidades construídas, parecendo ambas adequadas à análise potenciométrica de formulações farmacêuticas, foi difícil a selecção de apenas uma das membranas. Contudo, visto que a aplicação dos eléctrodos se destinava a amostras cujo teor em espécies orgânicas se esperava ser elevado, optou-se pela selecção da membrana CP3 para a construção de detectores tubulares e sua incorporação em sistemas FIA.

IV.3.2 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMENTO DOS DETECTORES TUBULARES

Após a construção de detectores tubulares com a membrana seleccionada, escolheram-se as condições experimentais mais adequadas à sua caracterização com ajuste de força iónica e com ajuste simultâneo dos valores de pH e de força iónica. Os parâmetros aqui avaliados foram tanto quanto possível os mesmos determinados para as unidades convencionais.

IV.3.2.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO SISTEMA FIA

Numa primeira fase, as características gerais de funcionamento dos detectores tubulares foram avaliadas recorrendo a uma montagem FIA de baixa dispersão, igual àquela representada na Figura II.15, p. II26. As condições experimentais inicialmente escolhidas tiveram como objectivo principal reproduzir o mais possível os ensaios discretos com a força iónica ajustada. A solução de transporte escolhida foi uma solução de Na_2SO_4, com um valor de concentração igual a $3{,}3 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}. Esta

solução continha, também, ião principal numa concentração igual a $1x10^{-7}$ mol L^{-1} (II.6.1.1.2, p. II26).

As condições do sistema FIA que representavam uma influência significativa na dispersão global, designadamente, o volume de amostragem e a velocidade de fluxo da solução de transporte, foram estabelecidas de acordo com o descrito em II.6.1.1.2, p. II26. Ao longo deste estudo a distância entre a válvula de injecção e o eléctrodo selectivo foi fixada em 25 cm.

A influência de volumes de amostragem, iguais a 170, 270 e 570 μL, na dispersão global do sistema foi estudada em conjunto com valores de velocidade de fluxo iguais a 3, 4, 5, 6 e 7 mL min^{-1}. Esta avaliação foi efectuada em termos de dispersão de uma solução padrão de HCl.PRO com uma concentração igual a $1x10^{-4}$ mol L^{-1}, valor incluído na zona de resposta linear dos eléctrodos convencionais tipo CP3 (tabela IV.7). Para a determinação do declive, necessário ao cálculo da dispersão global no interior da montagem (equação II.5, p. II29), utilizaram-se soluções padrão de HCl.PRO com valores de concentração iguais a $1x10^{-4}$, $5x10^{-4}$, $1,0x10^{-3}$ e $5,0x10^{-3}$ mol L^{-1}.

Os valores de dispersão obtidos (tabela IV.10) indicaram que o aumento do volume de amostragem conduziu a uma aproximação ao sinal analítico fornecido pelo sistema em condições equivalentes ao estado estacionário. O valor da dispersão decresceu ainda com o aumento do caudal.

De acordo com os resultados obtidos seleccionaram-se um volume de amostragem e uma velocidade de fluxo iguais a, respectivamente, 270 μL e 6 ml min^{-1}, valores para os quais se registaram sinais analíticos de baixa dispersão, correspondentes a, pelo menos, 95 % do sinal equivalente ao estado estacionário. Nestas condições foi ainda possível obter uma elevada frequência analítica, associada a um baixo consumo de reagentes.

tabela IV.10 Dispersão de uma solução de HCl.PRO, de valor de concentração igual a $1x10^{-4}$ mol L^{-1}, relativamente ao volume de amostragem e à velocidade de fluxo usadas na montagem FIA de baixa dispersão.

Velocidade de fluxo / *Volume amostragem*	**3 mL min^{-1}**	**4 mL min^{-1}**	**5 mL min^{-1}**	**6 mL min^{-1}**	**7 mL min^{-1}**
170 µL	1,82	1,54	1,28	1,21	1,15
270 µL	1,32	1,29	1,24	1,18	1,15
570 µL	1,18	1,12	1,10	1,09	1,09

Para a caracterização dos detectores tubulares em soluções com valores de pH e força iónica fixados recorreu-se a uma montagem de duplo canal, igual àquela indicada na Figura II.17, p. II31. Nesta montagem, as soluções padrão e de amostra, previamente preparadas por diluição em água, foram intercaladas numa solução de transporte constituída também por água. Os valores de pH e de força iónica foram ajustados por confluência com uma solução tampão constituída por NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 e de valor de pH igual a 6,0 unidades. Dada a diluição no interior do sistema, esta solução apresentava-se duas vezes mais concentrada do que aquela utilizada nos ensaios com ajuste de força iónica, relativamente aos valores de concentração de HCl.PRO e de força iónica.

Para garantir a mistura das soluções confluentes, colocou-se um reactor em malha imediatamente após o ponto de confluência. O comprimento deste reactor, estudado para 25, 40, 60 e 80 cm, foi escolhido de acordo com o sinal produzido pela injecção de 270 µL de uma solução com $1,0x10^{-3}$ mol L^{-1} em HCl.PRO, para uma velocidade de fluxo total igual a 6 mL min^{-1}. O sinal analítico de maior intensidade foi registado para o reactor de 40 cm (tabela IV.11), correspondendo mesmo a um valor igual a 98,3% daquele obtido por substituição do canal de transporte de água pela

solução de HCl.PRO. Seleccionou-se por isso um comprimento de reactor igual a 40 cm.

tabela IV.11 Variação percentual do sinal analítico de uma solução de HCl.PRO, de valor de concentração igual a $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, com o comprimento de reactor.

Comprimento do reactor / *Condições do sistema*	**25 cm**	**40 cm**	**60 cm**	**80 cm**
270 μL, 6 mL min^{-1}	95,0	98,3	98,1	95,5

IV.3.2.2 PARÂMETROS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Para o traçado das curvas de calibração da célula potenciométrica injectaram-se soluções aquosas de HCl.PRO, com concentrações compreendidas entre 5×10^{-7} mol L^{-1} e 1×10^{-2} mol L^{-1}. Utilizando quer a montagem FIA de baixa dispersão, quer a montagem de canal duplo, e de acordo com o indicado em II.6.1.1.2, p. II26, determinaram-se o LIRL, o declive, a repetibilidade do sinal analítico e a frequência analítica. Os valores médios obtidos, bem como os desvios padrão correspondentes, encontram-se indicados na tabela IV.12.

A repetibilidade do sinal analítico dos eléctrodos tubulares foi determinada a partir de, pelo menos, quinze injecções sucessivas de soluções de HCl.PRO com valores de concentração iguais a $1{,}0\times10^{-4}$, $5{,}0\times10^{-4}$, $1{,}0\times10^{-3}$ e $5{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}. A este propósito representam-se na Figura IV.5 dois dos registos obtidos.

Relativamente às características fornecidas pelos detectores em condições de ajuste de pH e de força iónica, o valor de frequência analítica obtido foi aproximadamente igual a 130 amostras por hora.

tabela IV.12 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de PRO, tipo CP3, com configuração tubular. Valores obtidos em condições de ajuste de força iónica (I) e de ajuste, simultâneo, do valor de pH e da força iónica.

Condições analíticas / *Características*	**I=1x10^{-2} mol L^{-1}**	**pH=6,0 I=1x10^{-2} mol L^{-1}**
LIRL (mol L^{-1})	1,0x10^{-6}	8,0x10^{-6}
Declive (mV década^{-1})	+57,2±0,7	+58,2±0,8
Repetibilidade (mV)	± 0,3	±0,3
Frequência de amostragem (amostra h^{-1})	–	≈130
R^2	>0,9997	>0,9998

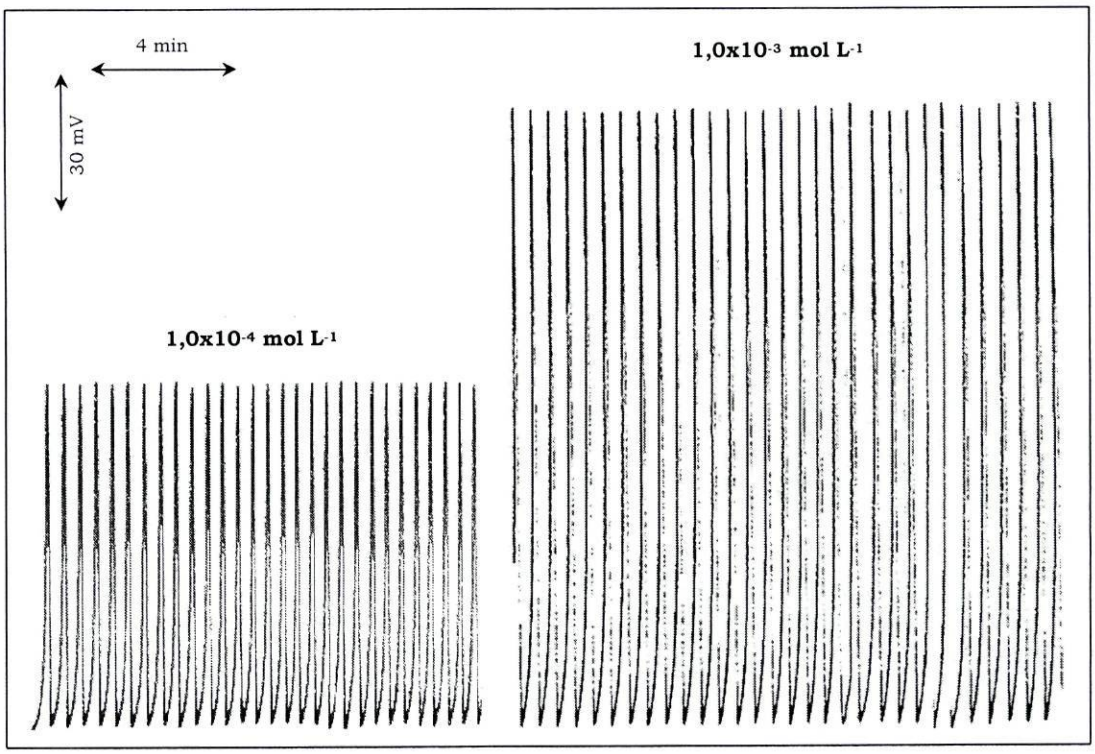


Figura IV.5 Repetibilidade do sinal analítico dos detectores tubulares selectivos de PRO no sistema de baixa dispersão. Registo obtido para uma solução daquele ião, com valor de concentração igual a 1,0x10^{-4} e 1,0x10^{-3} mol L^{-1}, com um reactor de 25 cm e volume de amostragem e velocidade de fluxo iguais a 270 μL e 6 mL min^{-1}, respectivamente.

Quando comparadas com as características encontradas nos ensaios discretos com os eléctrodos convencionais correspondentes, verificou-se para os detectores tubulares uma melhoria genérica nas características de resposta. Esta melhoria, mais evidenciada no que diz respeito ao LIRL e ao declive, já seria esperada (Pungor *et al.*, 1984).

IV.3.2.3 EFEITO DO pH NO VALOR DE POTENCIAL DOS ELÉCTRODOS

A influência do pH no comportamento dos detectores foi estudada para soluções de HCl.PRO, com valores de concentração iguais a $1{,}0\times10^{-4}$ e $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, ambas com a força iónica fixada em 1×10^{-2} mol L^{-1}. Para efectuar as variações de pH, utilizaram-se as soluções já escolhidas para este estudo em condições discretas, tendo-se recorrido ao procedimento descrito em II.6.3, p. II37. Recorreu-se aqui a uma montagem FIA de baixa dispersão, adaptada a esta determinação (Figura II.20, p. II39).

Os diagramas de *Reilley* resultantes (Figura IV.6) indicaram variações de potencial da célula potenciométrica não superiores a ±5 mV para valores de pH compreendidos entre 5,7 e 7,8 ou entre 6,3 e 7,6 unidades, quando se utilizaram soluções de HCl.PRO de concentração igual a $1{,}0\times10^{-3}$ ou a $1{,}0\times10^{-4}$ mol L^{-1}, respectivamente.

Comparativamente aos eléctrodos convencionais tipo CP3, encontrou-se para os detectores tubulares um ligeira diminuição na amplitude do intervalo de pH. Este estreitamento de patamar poderia estar relacionado com a elevada mobilidade do ião H^+ (Lima *et al.*, 1990).

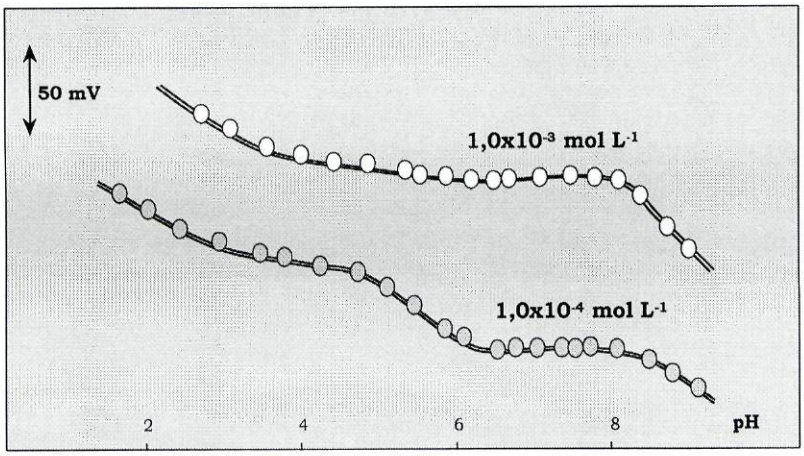


Figura IV.6 Diagramas de *Reilley* do detector tubular tipo CP3. Variação do potencial da célula de eléctrodo selectivo de PRO com o pH de uma solução de HCl.PRO, de força iónica igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1}.

IV.3.2.4 DETERMINAÇÃO DE COEFICIENTES DE SELECTIVIDADE POTENCIOMÉTRICA

A selectividade dos detectores tubulares foi avaliada pela determinação dos coeficientes de selectividade potenciométrica, $K^{pot}_{A,B}$, relativos às mesmas espécies aniónicas envolvidas no mesmo estudo com os eléctrodos convencionais. Dado que as soluções aqui utilizadas foram preparadas em Na_2SO_4, o catião sódio foi excluído deste estudo. O procedimento experimental envolvido, descrito na secção II.6.4, p. II39, constituiu uma adaptação do método das soluções separadas às condições de fluxo.

Em comparação com as unidades convencionais, os valores médios de logaritmo de $K^{pot}_{A,B}$ calculados (tabela IV.13) indicaram uma maior selectividade para as unidades de configuração tubular, sobretudo no que diz respeito ao seu comportamento face à presença de espécies inorgânicas estudadas.

A membrana do tipo CP3 apresentou melhores características de selectividade em condições de fluxo, o que pode ter sido o resultado de um menor tempo de contacto da membrana selectiva com a espécie interferente.

tabela IV.13 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os detectores tubulares selectivos de PRO tipo CP3. Valores obtidos em solução aquosa com uma força iónica igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1}, ajustada com uma solução de Na_2SO_4 $3,3x10^{-3}$ mol L^{-1}.

	$\log K^{pot}_{A,B}$	**CP3**
Interferente	*Concentração (mol L^{-1})*	
Potássio	$1,0x10^{-4}$	-2,55 ± 0,12
	$5,0x10^{-4}$	-3,27 ± 0,12
	$1,0x10^{-3}$	-3,57 ± 0,12
	$5,0x10^{-3}$	-4,29 ± 0,13
Lítio	$1,0x10^{-4}$	-2,04 ± 0,03
	$5,0x10^{-4}$	-2,74 ± 0,04
	$1,0x10^{-3}$	-3,04 ± 0,04
	$5,0x10^{-3}$	-3,179± 0,05
Amónio	$1,0x10^{-4}$	-2,22 ± 0,09
	$5,0x10^{-4}$	-2,94 ± 0,10
	$1,0x10^{-3}$	-3,24 ± 0,10
	$5,0x10^{-3}$	-3,97 ± 0,11
Clorfeniramina	$1,0x10^{-4}$	-0,99 ± 0,16
	$5,0x10^{-4}$	-1,05 ± 0,16
	$1,0x10^{-3}$	-1,09 ± 0,15
	$5,0x10^{-3}$	-0,81 ± 0,07
Difenidramina	$1,0x10^{-4}$	-0,58 ± 0,08
	$5,0x10^{-4}$	-0,62 ± 0,02
	$1,0x10^{-3}$	-0,63 ± 0,02
	$5,0x10^{-3}$	-0,45 ± 0,01
Tripelenamina	$1,0x10^{-4}$	-0,01 ± 0,04
	$5,0x10^{-4}$	-0,01 ± 0,03
	$1,0x10^{-3}$	-0,01 ± 0,08
	$5,0x10^{-3}$	-0,17 ± 0,13

IV.3.3 ANÁLISE DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

As análises potenciométricas de formulações farmacêuticas foram efectuadas tanto com os eléctrodos de configuração convencional, como com os detectores tubulares, ambos com membranas tipo CP3.

As análises de soluções diluídas das amostras, preparadas de acordo com o descrito em IV.2.4, p. V13, foram realizadas após calibração da célula de eléctrodo selectivo de ião. Cada calibração foi efectuada numa gama de concentrações compreendida entre $8{,}0\times10^{-5}$ e $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}. Os resultados das análises potenciométricas foram indicados na tabela IV.14, representando-se na Figura IV.7 um exemplo típico de uma análise, e da calibração precedente, realizada com os detectores tubulares.

tabela IV.14 Resultados da determinação de PRO em formulações farmacêuticas obtidos com os eléctrodos tipo CP3, em condições discretas e de fluxo, e com um método de comparação, e os desvios relativos correspondentes.

Condições analíticas	**Discretas**		**FIA**		
Formulações farmacêuticas	*C* (%, m/m)	recuperação (%)	*C* (%, m/m)	recuperação (%)	**COMP** (%, m/m)
Fenergan®, injectável, 2,5 %	3,2 ± 0,1	100,8 ± 1,6	2,8 ± 0,3	100,3 ± 0,6	2,8 ± 0,1 [a]
Fenergan®, comp., 16,0 %	17,5 ± 0,4	101,0 ± 0,8	16,8 ± 1,5	99,8 ± 0,5	17,0 ± 0,3 [a]
Fenergan®, xarope, 0,08 %	0,18 ± 0,02	107,7 ± 3,7	0,06 ± 0,02	99,2 ± 1,0	0,06 ± 0,01 [a]
Fenergan®, creme, 2,0 %	3,3 ± 0,4	100,2 ± 7,0	1,9 ± 0,1	100,7 ± 1,1	2,2 ± 0,2 [b]

[a] metodologias propostas pela USP, 1990;
[b] adaptação do método utilizado no controlo analítico da formulação comercial.

Os resultados das análises potenciométricas indicaram a boa precisão da metodologia estabelecida, considerando os baixos desvios padrão genericamente registados. Os valores médios dos índices de recuperação sugeriram ainda a exactidão das leituras potenciométricas, embora com excepções.

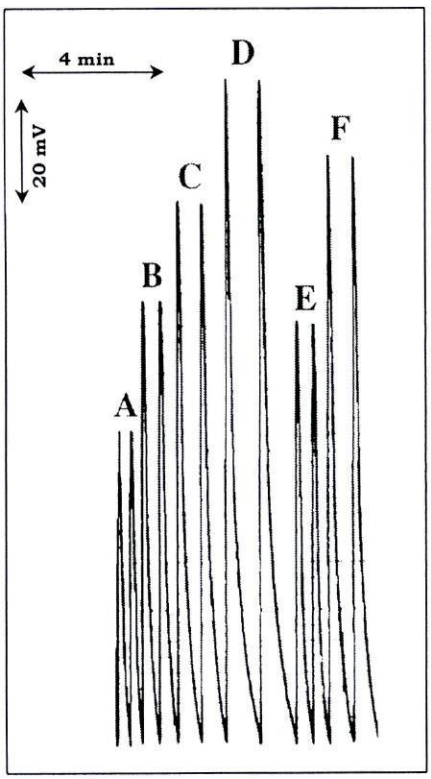


Figura IV.7 Registo de uma calibração da célula de eléctrodo selectivo de PRO tipo CP3 de configuração tubular, recorrendo a soluções padrão de HCl.PRO com valores de concentração:

A: $8{,}0\times10^{-5}$ mol L^{-1}

B: $2{,}0\times10^{-4}$ mol L^{-1}

C: $4{,}0\times10^{-4}$ mol L^{-1}

D: $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1};

determinação de PRO numa solução diluída de Fenergan®, xarope, com um valor de concentração previsto em:

E: $2{,}0\times10^{-4}$ mol L^{-1},

e o ensaio de recuperação, para o qual se esperava uma concentração de:

F: $7{,}0\times10^{-4}$ mol L^{-1}.

Os resultados fornecidos com os eléctrodos convencionais apresentaram desvios relativos anormais, destacando-se aqui um valor de +200% para as análises do xarope. Os valores igualmente anormais de concentração e de índice de recuperação encontrados para esta amostra poderão estar relacionados com a elevada viscosidade da matriz e com a presença de espécies cuja interferência se tornou mais evidente pela baixa concentração de HCl.PRO na formulação.

Aqueles problemas foram contudo obviados através da adaptação dos procedimentos analíticos, estabelecidos para o xarope, aos sistemas FIA com os detectores tubulares. Efectivamente, ficaram aqui atenuados tanto os efeitos da viscosidade da matriz, dado o pequeno volume de amostra injectada e a sua diluição no interior da montagem, como os problemas da deficiente selectividade para o ião principal, devido ao baixo tempo de contacto da amostra com a membrana sensora nas condições de fluxo seleccionadas.

Esta situação foi confirmada por valores de t calculados iguais a 0,733; 0,593; 0,689 e 0,213, para os injectáveis, os comprimidos, o xarope e o creme, respectivamente, quando as análises decorreram em FIA. Estes valores, calculados para um nível de confiança de 95% e um número de ensaios, n, igual a 10, foram sempre inferiores ao valor de t tabelado (2,262). Os desvios relativos destes ensaios apresentaram também um valor máximo de +5% para o creme.

Além dos resultados exactos fornecidos pelos procedimentos extabelecidos em condições de fluxo, a frequência analítica obtida com os detectores tubulares inseridos em sistema FIA foi também elevada, de cerca de 130 amostras por hora (tabela IV.12).

IV.4 CONCLUSÕES

A utilização de duas membranas sensoras na construção de eléctrodos selectivos de PRO com configuração convencional, distintas pela presença de dois solventes mediadores com características físico-químicas diferentes, conduziu a unidades potenciométricas com características gerais de funcionamento semelhantes, excepto no que diz respeito a selectividade. As unidades preparadas com o solvente mediador de maior polaridade eram mais selectivas para as espécies inorgânicas, enquanto que aquelas preparadas com o solvente mediador de menor polaridade indicaram melhores características de selectividade face às espécies orgânicas.

Com a membrana sensora que conduziu a eléctrodos de maior selectividade perante espécies orgânicas, preparada com base num sensor iónico de tetrafenilborato dissolvido em *b*EHS, procedeu-se à construção de detectores tubulares. Uma vez incorporados nos sistemas FIA, estes detectores apresentaram melhores características gerais de funcionamento do que aquelas registadas para os eléctrodos convencionais correspondentes, construídos com base na mesma membrana selectiva. Salientam-se aqui o declive, o LIRL e a selectividade.

A aplicação do sistema discreto na análise de quatro formas farmacêuticas distintas originou, genericamente, bons resultados. A qualidade destes resultados analíticos foi contudo melhorada quando estes eram obtidos a partir dos detectores tubulares inseridos em montagens de FIA. Estes procedimentos em fluxo permitiram, ainda, uma economia substancial de tempo e de reagentes, fornecendo ainda frequências analíticas próximas de 130 amostras por hora.

Pelas razões indicadas, os detectores tubulares selectivos de PRO propostos constituem uma importante alternativa aos métodos descritos na literatura, sobretudo no que se refere a procedimentos analíticos de rotina, não apenas pela sua simplicidade e baixo custo, mas também pela rapidez de resposta. Embora com

limitações, nos casos em que a frequência analítica não constitui um factor preponderante, os eléctrodos convencionais permitem também a execução de uma análise com baixo custo e num período de tempo relativamente curto.

IV.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI U. M., SIDDIQUI M., BHANGAR M. I. (**1991**). Rapid method for direct determination of some phenothiazine drugs using thermometric titrimetry. *J. Chem. Soc. Pak.*, 13, 242-244.

ALWARTHAN A. A., AL-TAMRAH S. A., AKEL A. A. (**1993**). Determination of promethazine by its inibition of the chemiluminescence of the luminol-hydrogen peroxide-chromium (III) system. *Anal. Chim. Acta*, 282, 169-174.

AZAR M. H. P., OUDOUKHANIAN J. (**1994**). Development of a quinhydrone electrode in chloroform. Application to the determination of equilibrium constants of acid-base reactions and potentiometric titration of some amine drugs. *Talanta*, 41, 611-616.

BAXTER R. I., SVEHLA G., KERR B., WOOLFSON A. D. (**1984**). Determination of promethazine by anodic differential pulse voltammetry. *Anal. Chim. Acta*, 164, 171-180.

BURGOT J. L. (**1979**). Dosages thermométriques de quelques phénothiazines à intérêt thérapeutique par réaction de précipitation à l'aide d'une solution d'acide silicotungstique. *Ann. Pharm. Fr.*, 37, 125-130.

CALATAYUD J. M., SARRION S. N., SAMPEDRO A. S., BENITO C. G. (**1992/A**). Determination of promethazine hydrochloride with bromophenol blue by a turbidimetric method and flow-injection analysis. *Microchem. J.*, 45, 129-136.

CALATAYUD J. M., MATEO V. G. (**1992/B**). Cerium (IV) arsenite as a solid-phase reactor for use in flow-injection analysis. Spectrophotometric determination of promethazine. *Anal. Chim. Acta*, 264, 283-289.

CALATAYUD J. M., SANCHO T. G. (**1992/C**). Spectrophotometric determination of promethazine by flow-injection analysis and oxidation by cerium (IV). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 10, 37-42.

CHEN D., RIOS A. CASTRO M. D. L., VALCARCEL M. (**1991/A**). Simultaneous flow-injection determination of chlorpromazine and promethazine by photochemical reaction. *Talanta*, 38, 1227-1233.

CHEN D., RIOS A. CASTRO M. D. L., VALCARCEL M. (**1991/B**). Photochemical-spectrofluorimetric determination of phenothiazine compounds by unsegmented-flow methods. *Analyst*, 116, 171-176.

CLARK J. B., FELL A. F. (**1983**). Analysis of phenothiazines in dosage forms by synchronous luminescence spectroscopy. *J. Pharm. Pharmacol.*, 35 (Suppl.), 22P.

CLARKE'S (**1986**). *Clarke's isolation and identification of drugs.* Parte 2. *Analytical and toxicological data, monographs.* MOFFAT A. C., editor. The Pharmaceutical Press, London, 2ª Edição, p. 932.

COSOFRET V. V., BUCK R. P. (**1984**). Phenothiazine drug poly(vinyl chloride) matrix membrane electrodes and their use in pharmaceutical analysis. *Analyst*, 109, 1321-1325.

DE-LA PENA L., HENS A. G., BENDITO D. P. (**1993**). Kinetic fluorimetric determination of promethazine by a stopped-flow mixing technique. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 11, 893-896.

DIAMANDIS E. P., CHRISTOPOULOS T. K. (**1983**). Potentiometric titration of pharmaceutical compounds in formulations with sodium tetraphenylborate. *Anal. Chim. Acta*, 152, 281-284.

EL-KERDWAY M. M., MOUSTAFA M. A., EL-ASHRY S. M., EL-WAZZI D. R. (**1993**). Spectrophotometric determination of certain phenothiazines and their dosage forms using bromophenol blue. *Anal. Lett.*, 26, 1669-1680.

EL-KERDWAY M. M., HASSAN S. M., EL-ASHRY S. M. (**1992**). Spectrophotometric determination of some N-substituted phenothiazine derivatives using N-bromophthalimide. *Mikrochim. Acta*, 108, 323-328.

EMAMI-KHOI A. A. M. (**1983**). Spectrophotometric promethazine hydrochloride determination using bromcresol green. *J. Pharm. Sci.*, 72, 704-705.

FADIRAN E. O., DAVIDSON A. G. (**1988**). Determination of low levels of phenothiazine sulphoxides in phenothiazine drug substances and formulations by thin-layer chromatography-second-derivative spectrofluorimetry. *J. Chromatogr.*, 442, 363-370.

FEHER Z., KOLBE I., PUNGOR E. (**1988**). Determination of the drug content of pharmaceuticals containing phenothiazine compounds by triangle programmed flow titration. *Frezenius' Z. Anal. Chem.*, 332, 345-350.

GALA B., HENS A. G., BENDITO D. P. (**1995**). Use of a stopped-flow/T-format spectrofluorimeter for simultaneous kinetic analyses. *Anal. Chim. Acta*, 310, 453-459.

GARRISON J. C. (**1992**). *Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics.* Secção IV, *Autacoids; Drug Therapy of Inflammation.* Capítulo 23, *Histamine, Bradykinin, 5-Hydroxytryptamine, and Their Antagonists.* GILMAN A. F., RALL T. W., NIES A. S., TAYLOR P., editores. McGraw Hill International Editions. 8ª edição.

HASSAN S. M., BELAL F., IBRAHIM F., ALY F. A. (**1989**). Colorimetric determination of some N-substituted phenothiazine derivatives using 2-iodoxybenzoate. *Anal. Lett.*, 22, 1485-1498.

HACKMANN E. R. M., MAGALHÃES J. F., SANTORO M. I. R. M., MARTINS J. L. S. (**1983**). Determination of promethazine hydrochloride in medicines. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, 19, 78-91.

HENS A. G., PEREZ D. P. (**1991**). The stopped-flow technique in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta*, 242, 147-177.

HOPKALA H. (**1990**). Preparation and potentiometric determination of quaternary N-methiodides of phenothiazine derivatives. *Anal. Lett.*, 23, 159-167.

ISSA A. S., MAHROUS M. S. (**1984**). Titrimetric determination of some phenothiazine derivatives with ferricyanide. *Talanta*, 31, 287-288.

JAYARAMA M. V. S., YATHIRAJAN H. S., RANGASWAMY (**1986**). Interaction of phenothiazines with nitroso-R salt and extractive spectrophotometric determination of phenothiazine drugs. *Talanta*, 33, 352-354.

KOJILO A., CALATAYUD J. M. (**1995**). FIA-spectrophotometric determination of N-substituted phenothiazine derivatives by oxidation with a solid-phase reactor of manganese dioxide incorporated in polyester resin beads. *Talanta*, 42, 909-913.

KOUNTOURELLIS J. E., RAPTOULI A., GEORGARAKIS M. (**1986**). Simultaneous determination of aminophylline and promethazine in suppositories by high-performance liquid chromatography. *Pharmazie*, 41, 600-601.

KOUPPARIS M. A., BURCHOVA A. (**1986**). Automated flow-injection spectrophotometric determination of some phenothiazines using iron perchlorate: applications in drug assays, content uniformity and dissolution studies. *Analyst*, 111, 313-318.

LIMA J. L. F. C., MONTENEGRO M. C. B. S. M., SILVA A. M. R. (**1990**). Potentiometric determination of salicylate in pharmaceutical preparations with a tubular detector. *J. Flow Inj. Anal.*, 7, 19-33.

MAHROUS M. S., ABDEL-KHALEK M. M. (**1984**). Spectrophotometric determination of phenothiazines, tetracyclines and chloramphenicol with sodium cobaltinitrile. *Talanta*, 31, 289-291.

MARTINDALE (**1993**). *Martindale, The Extra Pharmacopeia.* REYNOLDS J. E. F., editor. The Pharmaceutical Press, London, 30ª Edição, pp. 943-945.

NAYAK A. N., RAMAPPA P. G., YATHIRAJAN H. S. (**1982**). Determination of phenothiazine derivatives of pharmaceutical importance by extraction-spectrophotometric method. *An. Quim., Ser. C*, 78, 86-88.

NAYAK A. N., RAMAPPA P. G., YATHIRAJAN H. S., SUBRAHMANYA U. (**1981**). Extractive spectrophotometric determination of N-substituted phenothiazines in pharmaceutical preparations with Alizarin red S (C. I. Mordant Red 3). *Ann. Chim.*, 71, 721-727.

RAMAPPA P. G., GOWDA H. S., NAYAK A. N. (**1983**). Tungstophosphoric acid as a new reagent for the spectrophotometric determination of phenothiazines. *Microchem. J.*, 28, 586-594.

ROMERO A. M., BENITO C. G., CALATAYUD J. M. (**1992**). Photochemical derivatization and fluorimetric determination of promethazine in a FIA assembly. *Anal. Lett.*, 25, 1289-1308.

SANE R. T., KAMAT S. S., NARKAR V. S., SATHE A. Y., MHALAS J. G. (**1980**). Simple photometric method for determination of phenothiazine derivatives from pharmaceutical preparations. *Indian Drugs*, 18, 19-22.

SANTORO M. I. R. M., HACKMANN E. R. M., STORPIRTIS S. (**1988**). Determination of promethazine and chlorpromazine in injections by high-performance liquid chromatography . *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, 24, 87-94.

SASTRY C. S. P., TIPIRNENI A. S. R. P., SURYANARAYANA M. V. (**1990**). Spectrophotometric determination of some antiallergic agents with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8, 287-292.

SASTRY C. S. P., TIPIRNENI A. S. R. P., SURYANARAYANA M. V. (**1989**). Sensitive spectrophotometric determination of some anti-histamines with haematoxylin and chloramine-T. *Indian Drugs*, 26, 351-353.

SHARMA L. R., BANSAL P. C., KALIA R. K., MANCHANDA A. K. (**1980**). Voltammetric determination of pharmaceuticals at the tubular graphite electrode. *Analyst*, 105, 779-786.

SHUKLA I. C. (**1990**). Titrimetric assay of antipsychotropic and anticholinergic drugs. *J. Inst. Chem. (India)*, 62, 159-160.

SRIVASTAVA M. K., SINGH D., AHMAD S., SHUKLA I. C. (**1985**). Colorimetric method for the determination of phenothiazine derivatives in sulphuric acid medium. *Acta Cienc. Indica (Ser.) Chem.*, 11c, 225-228.

STAVCHANSKY S., WALLACE J. E., CHUE M., WU P. (**1982**). Gas liquid chromatographic determination of promethazine hydrochloride in polyethylene glycol suppositories using Hall's electrolytic conductivity detector. *Anal. Lett.*, 15, 1361-1372.

SULTAN S. M.(**1993**). Computer assisted optimization of a flow-injection method for the assay of promethazine, chlorpromazine and trimeprazine in drug formulations. *Talanta*, 40, 681-686.

SULTAN S. M., SULIMAN F. E. O. (**1992**). Application of super modified simplex optimization to the flow-injection spectrophotometric determination of promethazine hydrochloride in drug formulations. *Anal. Sci.*, 8, 841-843.

SULTAN S. M. (**1991**). Flow injection method for the assay of phenothiazine neuroleptics in pharmaceutical preparations using ammonium metavanadate *Analyst*, 116, 177-181.

TAHA A. M., EL-RABBAT N. A., EL-KOMMOS M. E., REFAT I. H. (**1983**). Rapid spectrophotometric assay of phenothiazine drugs in pharmaceutical preparations. *Analyst*, 108, 1500-1505.

USP (**1990**). Promethazine hydrochloride - tablets, syrup, injection - Official Monographs. United States Pharmacopoeial Convention. *United States Pharmacopoeia XXII*, Rockville, MD, pp. 1158-1161.

VAN-DE-VAART F. J., HULSHOFF A., INDEMANS A. W. M. (**1983**). Analytical control of the composition of creams. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1, 507-515.

YOUSSEF A. F., EL-SHABOURI S. R., MOHAMED F. A., RAGEH A. M. I. (**1986**). Colorimetric determination of certain phenothiazine drugs by using morpholine and iodine-potassium iodide reagents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69, 513-518.

ZAKHARI N. A., AHMED S. M., KOVAR K. A. (**1991**). Determination of halides of nitrogen bases: potentiometric non-aqueous titration using bismuth oxyacetate and perchloric acid or trifluoromethyl sulphonic acid. *Pharmeuropa*, 3, 269-273.

ZARAPKAR S. S., ATHALYE K. R. (**1988**). New colorimetric method of estimation of promethazine hydrochloride, promethazine theoclate and pentazine. *Indian Drugs*, 26, 32-36.

WANG J., RIVAS G., CAI X., SHIRAISHI H., FARIAS P. A. M., DONTHA N., LUO D. (**1996**). Accumulation and trace measurement of phenothiazine drugs at DNA-modified electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 332, 139-144.

ELÉCTRODOS SELECTIVOS DE CEFUROXIMA

V.1 INTRODUÇÃO

Genericamente, entende-se por antibiótico uma substância que, produzida por microorganismos, destrói ou suprime o crescimento de outros microorganismos (Sande *et al.*, em *Goodman and Gilman's*, 1992). Actualmente, o termo antibiótico generalizou-se também para substâncias de origem sintética.

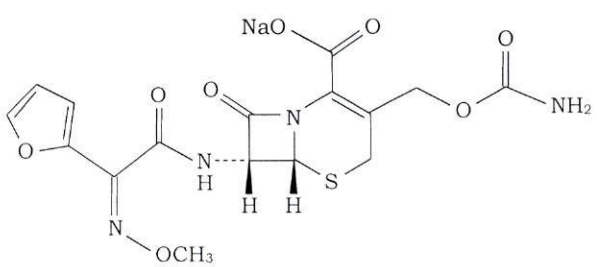
A era moderna da quimioterapia de estados infecciosos surge com o uso clínico da sulfonamida, em 1936, tendo aparecido desde então um elevado número de diferentes antibióticos. Uma contribuição importante para esta evolução deve-se ao aparecimento das penicilinas e, posteriormente, das cefalosporinas. A chave da actividade biológica destes dois grupos de compostos centra-se num núcleo base, que

é, respectivamente, o ácido 6-aminopenicilóico e o ácido 7-aminocefalosporânico. Muitas das características farmacológicas e anti-bacterianas daqueles compostos são contudo da responsabilidade de certas cadeias laterais, ligadas ao núcleo base correspondente. Neste sentido, a modificação ou a adição de novas cadeias laterais conduzem a compostos com susceptibilidades diversas, perante as enzimas inactivantes (β-lactamases), apresentando ainda actividade anti-bacteriana e propriedades farmacológicas claramente distintas. A este processo denomina-se semi-síntese, dado que o núcleo base da estrutura de cada antibiótico continua a ser produzido naturalmente em culturas de, por exemplo, *P. crysogenum* ou *Cephalosporium acremonium*.

Da semi-síntese de cefalosporinas resulta um aparecimento explosivo de novos compostos, surgindo a necessidade de os agrupar de acordo com a sua actividade anti-bacteriana. Assim, as cefalosporinas de grande actividade perante bactérias gram-positivas são designadas de primeira geração e aquelas de grande actividade perante bactérias gram-negativas são designadas de terceira geração.

A cefuroxima de sódio (CEF.Na, Figura V.1), composto que é objecto de estudo ao longo deste capítulo, é uma cefalosporina que resulta de um processo de semi-síntese e é denominada de segunda geração. Esta atribuição decorre de uma actividade antibacteriana intermédia entre as que caracterizam as de primeira e as de terceira geração.

Figura V.1 Cefuroxima de sódio. $C_{16}H_{15}N_4NaO_8S$. 446,38 g mol^{-1}.



Sob a forma de sal sódico, aquela cefalosporina não apresenta a estabilidade suficiente para ultrapassar a barreira gástrica, pelo que a sua administração por via oral é efectuada recorrendo à forma axetil. A administração de CEF.Na está por isso limitada a uso parenteral, não admirando por isso que, no mercado, as formas farmacêuticas à base CEF.Na sejam soluções injectáveis. Em Portugal existe apenas uma única formulação, com a designação comercial de Curoxime®, contendo 750 mg de CEF por unidade. Dado que as soluções aquosas de CEF.Na se mantêm estáveis à temperatura ambiente por apenas 12 horas (15% de degradação, em 48 horas) (Harvey, em *Remington's*, 1990), as formulações são de preparação extemporânea.

Relativamente ao efeito terapêutico pretendido para a CEF.Na, há a necessidade de garantir que a frequência de administração do injectável bem como a dosagem dessa formulação sejam devidamente escolhidos, garantindo, por um lado, o nível de actividade antibacteriana no local da infecção desejado e, por outro, concentrações no plasma e tecidos abaixo dos limites de toxicidade para o ser humano. É por isso importante garantir que o teor de CEF.Na, presente na formulação farmacêutica, se encontra dentro de certos limites. Relativamente ao injectável, ele deverá conter não menos de 90,0 % e não mais de 120,0 % do valor de CEF indicado no produto comercial (USP, 1995).

No sentido de se efectuar o controlo do teor de antibiótico em formulações farmacêuticas, as monografias apresentadas na grande maioria das farmacopeias até ao final da década de 70 propõem um método microbiológico. A falta de exactidão destes métodos conduz ao aparecimento, no início da década de 80, de métodos químicos alternativos, particularmente as titulações iodométricas indicadas na *British Pharmacopoeia*, 1980, para algumas cefalosporinas.

Paralelamente, assiste-se também à difusão da implementação de métodos separativos no controlo de qualidade de produtos com interesse farmacêutico, tanto ao nível das matérias primas, como no produto acabado. Entre outras vantagens, estes métodos permitem que a quantificação de um composto, integrado numa

matriz complexa, decorra apenas após a sua separação. Neste sentido, Quercia *et al.*, 1979, estabelece a separação de várias cefalosporinas através de sistemas de HPLC, quantificando-as posteriormente com base num detector espectrofotométrico. Recorrendo à mesma técnica separativa e ao mesmo tipo de detecção, Coomber *et al.*, 1982, consegue ainda determinar o grau de pureza de amostras de CEF.

Com a crescente popularidade do envolvimento da ténica separativa HPLC no controlo de qualidade torna-se pois inevitável comparar os resultados destes ensaios de cefalosporinas com aqueles obtidos por ensaios microbiológicos (Springolo *et al.*, 1983). Deste estudo, os autores concluem que os procedimentos baseados em sistemas de HPLC conduzem a resultados de maior precisão e maior rapidez, além de contribuírem com novas informações, tais como qualidade e quantidade de impurezas presentes no produto em análise.

Actualmente, a ausência de detectores específicos para a análise de matrizes farmacêuticas impõe ainda o recurso frequente a técnicas separativas. Não é por isso surpreendente que a monografia dedicada à análise de formulações injectáveis de CEF.Na, proposta na USP, 1995, seja baseada na separação dos vários constituintes da formulação por HPLC, com posterior detecção e quantificação do analito por técnica espectrofotométrica. Embora os procedimentos aqui envolvidos sejam rápidos e simples, não se podem contudo ignorar o elevado custo da instrumentação envolvida, a necessidade de diferentes colunas específicas, conforme o produto a analisar, e, ainda, a exigência de filtração e desarejamento das soluções a utilizar. Os eluentes envolvidos são também, muitas vezes, constituídos por solventes orgânicos de grande toxicidade.

O custo inerente às determinações em sistemas de HPLC é, talvez, um dos motivos que justifica o contínuo aparecimento, na literatura, de outras técnicas alternativas para o doseamento de CEF em produtos farmacêuticos. A primeira alternativa, proposta por Sengun *et al.*, 1985, consiste numa técnica electro-analítica, a polarografia. Nesta determinação, as formulações farmacêuticas são

diluídas numa mistura de dimetilformamida e metanol e, novamente, com uma solução tampão. Recorrendo ao método diferencial de impulsos com um eléctrodo de gota de mercúrio, os autores determinam CEF, Ceftriaxone, Cefotaxime ou Ceftizoxime, ao longo de um intervalo de concentrações compreendido entre 5,4 e 26,8 mg L^{-1}. Além do estreito intervalo analítico, esta técnica utiliza implicitamente um elemento de elevada toxicidade, o mercúrio. Posteriormente a este trabalho, surge também na literatura uma determinação de CEF recorrendo a titulação potenciométrica (Pospisilova *et al.*, 1988). Os autores propõem aqui um tratamento prévio da CEF, com hidroxilamina, seguindo-se a determinação do seu titulo com perclorato de mercúrio. Mais uma vez, a determinação de CEF envolve a presença daquele elemento de elevada toxicidade.

Apenas no final da década de 80 surge a primeira referência na literatura à utilização de técnicas espectrais para o doseamento de CEF em formulações farmacêuticas. Issopoulos, 1989, propõe o tratamento das amostras com ácido molibdofosfórico, envolvendo um aquecimento, em banho de água a 98,5 ± 0,8 °C e ao longo de um período de 25 minutos, e leitura do produto corado a um comprimento de onda igual a 700 nm. Embora a demorada e fastidiosa fase pré-analítica contribuísse para que a metodologia proposta apresentasse uma boa sensibilidade para soluções de CEF com concentrações até 60 μg mL^{-1}, ela constitui também uma limitação para a sua implementação prática, sobretudo no que se refere à reduzida frequência analítica.

Corti *et al.*, 1991, propõe uma nova determinação de CEF baseada em reflectância na zona do infravermelho próximo. Na realidade, este trabalho constitui uma tentativa de conferir a esta técnica um prisma quantitativo, quando aplicada ao controlo analítico de produtos farmacêuticos. Para a metodologia proposta registou-se contudo um intervalo de trabalho limitado.

Um último trabalho baseado em técnicas espectrais é estabelecido por Murillo *et al.*, 1994, e recorre à determinação espectrofluorimétrica de CEF. Para a formação do

composto fluorescente descreve-se uma fase pré-analítica bastante longa, que compreende o aquecimento da amostra em meio alcalino a 90 °C, ao longo de 60 minutos. Neste trabalho é possível determinar o conteúdo de CEF num intervalo de 0,050 a 1,70 mg L^{-1}.

De uma forma resumida, os trabalhos descritos na literatura para a determinação de CEF em formulações farmacêuticas são pouco adequados à sua implementação em laboratórios de análise, sobretudo quando se pretende uma frequência analítica elevada. Enquanto que o envolvimento de técnicas electro-analíticas recorre a reagentes de elevada toxicidade, a utilização de técnicas separativas requer um equipamento de elevado custo e uma preparação exaustiva das amostras. Por fim, o recurso a técnicas espectrais reporta uma série de pré-tratamentos das amostras para que as análises decorram com boa sensibilidade, conduzindo contudo a intervalos de trabalhos caracteristicamente estreitos. Estes aspectos seriam ultrapassados se se conseguissem detectores que, com um baixo custo, apresentassem selectividade suficiente para que as análises das amostras pudessem ser realizadas sem tratamentos específicos.

Neste sentido, e por envolverem detectores caracteristicamente selectivos, as análises com os eléctrodos selectivos de ião constituem, frequentemente, uma alternativa vantajosa às técnicas anteriormente indicadas. Estas análises são normalmente rápidas e pouco dispendiosas, e, geralmente, não necessitam recorrer a tratamentos prévios das amostras. O detector potenciométrico responde, ainda, ao longo de um intervalo de concentrações alargado, o que facilita a preparação das amostras para a sua análise.

Apesar das vantagens reconhecidas da potenciometria com eléctrodos selectivos de ião na determinação de várias espécies de interesse farmacêutico (Vytras, 1989), não se encontra qualquer referência na literatura à construção de eléctrodos selectivos de CEF.

Para o presente trabalho, propõe-se a construção de unidades sensíveis a CEF que possam ser utilizadas na análise potenciométrica directa deste composto em especialidades farmacêuticas e, em paralelo, ser inseridas em sistemas automáticos de fluxo contínuo, particularmente os sistemas FIA. Com este procedimento pretende-se adequar o sistema proposto a análises de rotina, dado que o equipamento envolvido representa um baixo custo e fornece resultados analíticos com uma elevada frequência.

V.2 PARTE EXPERIMENTAL

V.2.1 APARELHAGEM E ELÉCTRODOS

Para todos os ensaios realizados com os eléctrodos construídos, quer para o traçado da curva de calibração experimental, quer para a determinação de CEF.Na em formulações farmacêuticas, utilizaram-se os aparelhos indicados nas secções II.2 (p. II3) e II.3 (p. II7). De acordo com o referido nesta última secção, a solução escolhida para o compartimento externo do eléctrodo de referência era constituída por Na_2SO_4 e apresentava uma concentração igual a $3{,}3 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}. A escolha desta decorreu da baixa influência do anião sulfato no comportamento dos eléctrodos selectivos de CEF.

V.2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

As soluções de CEF mais concentradas foram preparadas por pesagem rigorosa do seu sal sódico e diluição, a um volume rigoroso, com água desionizada. As de menor concentração obtiveram-se por diluição das primeiras. Embora a velocidade de decomposição da CEF.Na em solução aquosa fosse de 0,05 % por hora, quando armazenada em frigorífico (Coomber *et al.*, 1982), todas as soluções foram preparadas diariamente. À temperatura ambiente, a sua estabilidade estava limitada a apenas 12 (Harvey, em *Remington's*, 1990) ou 13 horas (*Index Merck*, 1989).

Todos os reagentes utilizados, CEF.Na (Sigma), Cefaclor (Sigma), Cefadroxil (Sigma), Cefazolin de sódio (Sigma) e Cefradine (Sigma) eram de qualidade p.a. ou semelhante, sem terem sido submetidos a qualquer purificação adicional.

Para a preparação das membranas usaram-se brometo de tetraoctilamónio (Fluka) ou cloreto de *bis*(trifenilfosforaniliden)amónio (Aldrich) como extractor, *o*-nitrofeniloctiléter (*o*NFOE, Fluka) ou *bis*(2-etilhexil)sebacato (*b*EHS, Fluka) como solvente mediador, 4-*tert*-octilfenol (Fluka) como aditivo e PVC de elevado peso molecular (Fluka) como suporte imobilizador, dissolvido em tetrahidrofurano (THF, Riedel-deHaen).

Como ajustador da força iónica utilizou-se uma solução aquosa de Na_2SO_4 com uma concentração igual a $3{,}3\times10^{-2}$ mol L^{-1}. Para se efectuar o doseamento potenciométrico da CEF em formulações farmacêuticas ajustaram-se os valores de pH e de força iónica com uma solução de H_3PO_4/NaH_2PO_4, com 3,5 unidades de pH. Para os ensaios com os eléctrodos convencionais esta solução apresentava o valor da força iónica igual a 1×10^{-1} mol L^{-1}. Para a obter, juntaram-se 40,0 mL de uma solução H_3PO_4, de concentração igual a $5{,}0\times10^{-2}$ mol L^{-1}, com 460,0 mL de uma solução de NaH_2PO_4, com concentração igual a $1{,}0\times10^{-1}$ mol L^{-1}. Para os ensaios realizados com os eléctrodos de configuração tubular, esta solução era preparada com o dobro da concentração correspondente, apresentando assim o valor da força iónica igual a $2{,}0\times10^{-1}$ mol L^{-1}. Esta solução era diluída a aproximadamente metade no interior do sistema de fluxo, por confluência com um outro canal (Figura II.17, p. II31).

Para a determinação do p*Ka* da CEF, utilizou-se uma solução aquosa de NaOH de concentração igual a 0,1 mol L^{-1}. Após desarejamento desta solução, por fervura em placa eléctrica ao longo de cerca de 30 minutos, o seu titulo foi determinado por titulação ácido/base, tendo-se utilizado como titulante uma solução de HCl padronizada, de concentração igual a cerca de $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}. O decorrer da titulação foi acompanhado numa célula potenciométrica que continha, entre outros elementos, um eléctrodo de vidro simples.

V.2.3 DETERMINAÇÃO DO pKa DA CEFUROXIMA DE SÓDIO

Dado que em determinada fase do trabalho se julgou importante o conhecimento do valor da constante de acidez da CEF.Na, procedeu-se à sua determinação experimental. Com esta determinação, não se pretendeu obter um valor com o rigor passível de ser tabelado, mas sim ter uma ideia mais concreta acerca do grau de dissociação deste ácido em solução aquosa e à temperatura laboratorial.

Nesse sentido, procedeu-se à titulação potenciométrica de 20,00 mL de uma solução $1{,}0\times10^{-2}$ mol L^{-1} em CEF.Na, contendo ainda 0,1 mol L^{-1} em NaCl e $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1} em HCl, com uma solução de NaOH de concentração aproximadamente igual a $2{,}0\times10^{-2}$ mol L^{-1}. Este procedimento decorreu à temperatura de 25 °C e em atmosfera de azoto, tendo-se utilizado um eléctrodo de vidro simples.

A calibração deste eléctrodo era previamente realizada com 20,00 mL de uma solução de HCl, de concentração igual a $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1} e com a força iónica ajustada a 1×10^{-1} mol L^{-1} com NaCl, recorrendo ao método de Gran, 1952. Este ensaio, no qual se utilizava ainda a solução de NaOH envolvida na determinação do pK*a*, fornecia ainda outros dados necessários, como o titulo da solução de NaOH, o declive do eléctrodo de vidro e o valor de ordenada na origem da equação de calibração.

Os dados resultantes destes ensaios foram analisados através do programa Superquad (Gans *et al.*, 1985).

V.2.4 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS SENSORES E DAS MEMBRANAS

A CEF de tetraoctilamónio, um dos sensores iónicos utilizados nas membranas sensoras, foi obtido por um procedimento de extracção (II.5.2, p. II15). Para isso,

dissolveu-se aproximadamente 0,027 g de brometo de tetraoctilamónio em 2,0 g de solvente mediador, *o*NFOE ou *b*EHS. As membranas correspondentes, às quais se atribuiu a designação AC1 e AC3, respectivamente, foram obtidas por imobilização de 0,4 mL de solução sensora em 0,18 g de PVC, previamente dissolvido em THF (tabela V.1). Paralelamente, preparam-se outras membranas, imobilizando 0,4 mL das referidas soluções sensoras adicionadas de 0,05 g de 4-*tert*-octilfenol, um aditivo, em aproximadamente 0,20 g de PVC dissolvido em THF. As estas membranas, que incluíam na sua constituição o aditivo, atribui-se a designação AC3 e AC4, respectivamente (tabela V.1).

tabela V.1 Correspondência entre os elementos constituintes de cada membrana (assinalados com X) e a designação atribuída.

designação / *constituintes*	**AC1**	**AC2**	**AC3**	**AC4**	**AC5**	**AC6**	**AC7**	**AC8**
CEF de tetraoctilamónio	x	x	x	x	–	–	–	–
CEF de *bis*(trifenilfosforaniliden)amónio	–	–	–	–	x	x	x	x
*o*NFOE	x	–	x	–	x	–	x	–
*b*EHS	–	x	–	x	–	x	–	x
4-*tert*-octilfenol	–	–	x	x	–	–	x	x
PVC	x	x	x	x	x	x	x	x

O sensor iónico de CEF de *bis*(trifenilfosforaniliden)amónio foi preparado por uma reacção de precipitação entre uma solução aquosa de cloreto de *bis*(trifenilfosforaniliden)amónio e uma solução aquosa de CEF.Na, tendo-se seguido o procedimento descrito na secção II.5.2, p. II15. As soluções sensoras, preparadas em *o*NFOE ou *b*EHS, foram obtidas por dissolução de cerca de 0,04 g do precipitado seco em aproximadamente 2,0 g do solvente mediador correspondente. Para a preparação de membranas com aditivo, procedeu-se à adição de cerca de 0,25 g de 4-

-*tert*-octilfenol às soluções sensoras previamente referidas. Todas as membranas foram obtidas pela imobilização de 0,4 mL da solução sensora correspondente em, aproximadamente, 0,18 g de PVC dissolvido em THF. Às membranas preparadas a partir de soluções sensoras de CEF de *bis*(trifenilfosforaniliden)amónio atribuiu-se a designação de AC5 e AC6, quando apresentavam na sua constituição, respectivamente, *o*NFOE e *b*EHS (tabela V.1). Relativamente às membranas contendo aditivo, atribuíram-se as designações AC7 e AC8, respectivamente (tabela V.1).

As membranas preparadas foram aplicadas em corpos de eléctrodos convencionais, construídos tal como o descrito em II.5.1.1, p. II9. Obtiveram-se, assim, oito tipos de eléctrodos diferentes, cujas membranas apresentavam uma constituição igual à indicada na tabela V.2. Da avaliação comparativa das características de resposta dos diferentes eléctrodos construídos, seleccionou-se uma destas membranas para a preparação de unidades construídas com uma configuração tubular (II.5.1.2, p. II13) e sua incorporação em sistemas FIA.

tabela V.2 Composição percentual (p/p) das oito membranas sensoras preparadas.

Constituintes / *Tipo*	**Sensor iónico** (%)	**Solvente mediador** (%)	**Aditivo** (%)	**PVC** (%)
AC1	1,5	67,4	—	31,1
AC2	1,5	67,4	—	31,1
AC3	1,4	62,4	7,4	28,8
AC4	1,4	62,6	7,1	28,9
AC5	1,4	67,4	—	31,2
AC6	1,4	67,4	—	31,2
AC7	1,3	60,9	7,6	30,2
AC8	1,3	60,9	7,5	30,3

Uma vez secas as membranas, tanto os eléctrodos convencionais como os tubulares foram colocados em condicionamento numa solução aquosa de CEF.Na, com uma concentração igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}. Esta solução tinha uma composição igual à utilizada para guardar as unidades quando não estavam a ser avaliadas.

V.2.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA OS DOSEAMENTOS POTENCIOMÉTRICOS

As determinações potenciométricas foram efectuadas em formulações farmacêuticas, contendo CEF.Na, formulações injectáveis com 750 mg de fármaco por unidade e comercializadas sob a designação comercial de Curoxime®. Esta formulação era de preparação extemporânea, para o qual se dissolveu o pó de uma unidade na quantidade de água para injectáveis que acompanhava a formulação. A solução resultante deveria apresentar, aproximadamente, 750 mg em CEF.

Tal como o descrito na secção II.7.1, p. II44, essa solução injectável foi inicialmente diluída, em balão de 25,00 mL, para a preparação de uma solução *stock*. Previa-se para esta uma concentração em CEF.Na igual a cerca de $7,1x10^{-2}$ mol L^{-1}.

A análise potenciométrica foi efectuada numa solução obtida por diluição de 850,0 μL da solução *stock* em balão de 25,00 mL. A solução assim obtida apresentava uma concentração em CEF.Na que se pensava ser aproximadamente igual a $2,4x10^{-3}$ mol L^{-1}, valor incluído na zona de resposta linear dos eléctrodos.

Os ensaios de recuperação do sinal analítico foram efectuados diluindo 850,0 μL da solução *stock* e 1000,0 μL de uma solução de CEF.Na com uma concentração igual a $1,2x10^{-1}$ mol L^{-1}, a um volume final de 25,00 mL (II.7.3, p. II46). A solução resultante apresentava uma concentração que se previa ser igual a $7,2x10^{-3}$ mol L^{-1}, valor este incluído no intervalo de resposta linear dos eléctrodos.

Para a análise potenciométrica com os eléctrodos de configuração convencional, todas as diluições necessárias foram efectuadas em solução tampão de

H_3PO_4/NaH_2PO_4 com um pH igual a 3,5 unidades e uma força iónica de $1x10^{-1}$ mol L^{-1}. Para a análise no sistema FIA as diluições necessárias foram realizadas com água desionizada. Era no interior da montagem estabelecida (Figura II.17, p. II31) que se efectuava o ajuste de pH e de força iónica das soluções injectadas, para os mesmos valores utilizados nas análises discretas com os eléctrodos de configuração convencional.

V.2.6 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA OS DOSEAMENTOS DA USP

Para a comparação dos resultados das análises potenciométricas com aqueles resultantes de um método independente seguiu-se o procedimento indicado na monografia da *USP*, 1995, e que era baseado na separação cromatográfica da CEF.Na, em sistemas de HPLC, com posterior quantificação espectrofotométrica a 254 nm. A fase móvel era constituída por uma mistura de acetonitrilo e tampão de acetato de sódio, com um valor de pH igual a 3,4 unidades. Antes de ser utilizada, a fase móvel foi convenientemente filtrada e desarejada.

As soluções padrão e de amostra foram entretanto preparadas por diluição em fase móvel.

V.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apresentam-se de seguida os resultados da caracterização de funcionamento dos oito tipos de eléctrodos, construídos com uma configuração convencional, distintos pelas membranas sensoras que os constituíam. Em simultâneo, discutem-se os valores obtidos, no sentido de conduzir à escolha de uma das membranas preparadas para a construção de eléctrodos selectivos de configuração tubular e sua incorporação em sistemas FIA.

V.3.1 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMENTO DOS ELÉCTRODOS CONVENCIONAIS

As características gerais de funcionamento dos vários eléctrodos convencionais construídos, nomeadamente os parâmetros das curvas de calibração, a repetibilidade do sinal analítico e o tempo de resposta das unidades foram determinadas a partir da execução experimental consecutiva de traçados de calibração para cada célula de eléctrodo selectivo de CEF (II.6.1.1, p. II21). Foi também com base em curvas de calibração que se estimou o tempo de vida das unidades potenciométricas, parâmetro aqui também incluído.

A influência do pH das soluções de medida e de algumas espécies aniónicas, esta última traduzida por coeficientes de selectividade potenciométrica, foram abordados de seguida.

V.3.1.1 PARÂMETROS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As curvas de calibração foram efectuadas de acordo com o indicado na secção II.6.1.1.1, p. II25, para soluções aquosas de CEF.Na com valores de concentração compreendidos entre $1x10^{-5}$ e $1x10^{-1}$ mol L^{-1}. Os valores médios dos parâmetros de calibração e a repetibilidade do sinal analítico foram calculados a partir de oito ensaios e de acordo com II.6.1.2, p. II32. A partir das mesmas curvas de calibração foi ainda possível estimar o tempo de resposta das várias unidades construídas (secção II.6.2, p. II35).

Para a realização destes ensaios, utilizaram-se inicialmente soluções de ião principal preparadas em água desionizada, i.e., sem ajuste da força iónica. Os valores médios dos parâmetros de calibração, indicados na tabela V.3, contribuíram para estabelecer as condições experimentais adequadas ao estudo da selectividade dos eléctrodos (V.3.1.3). Os resultados obtidos sugeriram ainda que as unidades preparadas com membranas que apresentavam aditivo (tipos AC3, AC4, AC7 e AC8) eram as que produziam as melhores características gerais de funcionamento, já que apresentavam, simultaneamente, os melhores valores de declive e de estabilidade do sinal analítico.

tabela V.3 Características gerais de funcionamento dos oito tipos de eléctrodos selectivos de CEF, obtidas em solução aquosa sem qualquer ajuste de força iónica.

Tipo de eléctrodo / *Características*	**AC1**	**AC2**	**AC3**	**AC4**	**AC5**	**AC6**	**AC7**	**AC8**
LD (mol L^{-1})	$2,2x10^{-4}$	$4,0x10^{-4}$	$3,0x10^{-4}$	$3,4x10^{-4}$	$1,1x10^{-4}$	$2,4x10^{-4}$	$1,7x10^{-4}$	$1,7x10^{-4}$
LIRL (mol L^{-1})	$2,8x10^{-4}$	$8,0x10^{-4}$	$3,6x10^{-4}$	$6,7x10^{-4}$	$4,5x10^{-4}$	$1,0x10^{-4}$	$5,5x10^{-4}$	$4,4x10^{-4}$
Declive (mV década^{-1})	-48,9±2,5	-66,8±4,3	-63,6±0,9	-58,5±2,1	-36,6±4,2	-26,8±1,4	-63,8±1,1	-40,2±1,0
Repetibilidade (mV)	±1,1	±5,4	±0,6	±1,0	±1,3	±4,3	±1,3	±1,0
t de resposta (s)	<30	<30	<20	<20	<30	<30	<20	<20
R^2	> 0,9950	> 0,9950	> 0,9989	> 0,9957	> 0,9950	> 0,9955	> 0,9981	> 0,9960

Para a determinação dos parâmetros das curvas de calibração com ajuste da força iónica, procedeu-se de igual modo ao anteriormente referido, tendo-se utilizado neste caso soluções de CEF.Na com força iónica igual a $1x10^{-1}$ mol L^{-1}, obtida por meio de uma solução de sulfato de sódio com concentração igual a $3,3x10^{-2}$ mol L^{-1}. O anião que a constituía foi escolhido de acordo com os coeficientes de selectividade potenciométrica (tabela V.6). Os valores médios dos parâmetros de calibração, também calculados a partir de 8 determinações, foram indicados na tabela V.4.

tabela V.4 Características gerais de funcionamento dos oito tipos de eléctrodos selectivos de CEF, obtidas em solução aquosa de força iónica igual a $1x10^{-1}$ mol L^{-1}.

tipo de eléctrodo / *características*	**AC1**	**AC2**	**AC3**	**AC4**	**AC5**	**AC6**	**AC7**	**AC8**
LD (mol L^{-1})	$8,5x10^{-4}$	$2,4x10^{-3}$	$1,5x10^{-3}$	$1,5x10^{-3}$	$2,1x10^{-3}$	$2,4x10^{-3}$	$1,2x10^{-3}$	$9,5x10^{-4}$
LIRL (mol L^{-1})	$2,3x10^{-3}$	$5,1x10^{-3}$	$2,0x10^{-3}$	$4,3x10^{-3}$	$5,4x10^{-3}$	$3,0x10^{-3}$	$1,7x10^{-3}$	$2,9x10^{-3}$
Declive (mV/década)	-25,6±1,4	-17,3±0,8	-38,5±1,3	-26,5±1,5	-25,4±1,5	-14,4±0,1	-36,2±1,3	-23,0±1,5
Repetibilidade (mV)	±0,4	±1,6	±0,3	±0,5	±2,8	±10,5	±0,6	±1,9
t de resposta (s)	<30	<30	<20	<20	<30	<30	<30	<30
R^2	>0,9955	>0,9951	>0,9990	> 0,9960	>0,9950	>0,9949	>0,9979	>0,9959

As avaliações em soluções com a força iónica ajustada indicaram, de um modo geral, características de funcionamento deficientes, relativamente às obtidas nos ensaios sem a força iónica ajustada. Os vários tipos de eléctrodos apresentavam declives muito abaixo dos valores teóricos e LIRL elevados. Este aspecto estaria provavelmente relacionado com alguma interferência do electrólito ajustador. Com a excepção dos eléctrodos tipo AC3 e AC7, as várias unidades potenciométricas apresentavam ainda uma certa instabilidade nos sinais analíticos.

Apesar de tudo, dos estudos até aqui efectuados foi possível concluir que os sistemas sensores que originavam unidades com melhores características de

funcionamento eram aqueles que estavam presentes nos eléctrodos tipo AC3 e AC7. A característica comum entre estes era a presença de *o*NFOE, como solvente mediador, e de aditivo. Quer por um efeito individual ou por um efeito de associação, a presença destes constituintes na membrana selectiva parecia assim favorecer as características dos eléctrodos.

Relativamente ao aditivo, 4-*tert*-octilfenol, a sua influência pôde mesmo ser constatada quando se compararam os pares de eléctrodos tipo AC1/AC3, AC2/AC4, AC5/AC7 e AC6/AC8, distintos pela ausência ou presença daquele composto, respectivamente. Aos eléctrodos construídos com aditivo corresponderam sempre melhores valores de LIRL, declive e repetibilidade, do que os seus correspondentes sem aquele constituinte. Este efeito estava provavelmente relacionado com uma melhoria nas características de selectividade, produzida pela presença do aditivo na membrana sensora, tal como foi anteriormente registado por Lima *et al.*, 1996. Neste trabalho, a influência do mesmo aditivo no comportamento de eléctrodos selectivos ao anião benzoato, e que é quimicamente um carboxilato, traduziu-se por um aumento de selectividade dos eléctrodos. Este facto deveu-se sobretudo à afinidade do aditivo para estabelecer ligações de hidrogénio com o anião carboxilato (Hara *et al.*, 1980).

A influência do solvente mediador foi constatada através da análise comparativa das características dos pares de eléctrodos tipo AC1/AC2, AC3/AC4, AC5/AC6 e AC7/AC8, nos quais o primeiro elemento apresentava *o*NFOE e o segundo *b*EHS. Mais uma vez se verificou uma tendência sistemática para melhores valores de LIRL, declive e repetibilidade, nas membranas preparadas com *o*NFOE. Este efeito estaria eventualmente associado à tendência que este solvente apresenta para doar protões, reforçando assim o efeito do aditivo. Neste sentido, o *o*NFOE foi anteriormente utilizado como aditivo na preparação eléctrodos selectivos de nitrato, provocando também alterações nas suas características de selectividade (Hara *et al.*, 1993). Naturalmente, este efeito estaria também associado às características físico-químicas

deste solvente, especialmente no que se refere à sua constante dieléctrica, com um valor igual a 23,6, consideravelmente diferente do valor de 4,6 para o *b*EHS (Okada *et al.*, 1995).

Relativamente ao permutador iónico presente nas diferentes membranas, tetraoctilamónio ou *bis*(trifenilfosforaniliden)amónio, a sua influência fez-se sentir na sensibilidade dos eléctrodos selectivos, embora de forma pouco pronunciada. Da comparação das características dos pares de eléctrodos tipos AC1/AC5, AC2/AC6, AC3/AC7 e AC4/AC8 encontraram-se, de uma forma geral, declives ligeiramente superiores para as unidades que continham permutadores iónicos à base de tetraoctilamónio.

Muito embora a comparação entre as características de resposta de eléctrodos selectivos cuja diferença se reportava a apenas um dos constituintes na membrana tenha permitido ter uma ideia acerca da influência de cada um desses constituintes, a sua coexistência na membrana com outros compostos deixava antever também a possibilidade de que cada efeito observado pudesse ter alguma influência do meio envolvente. Neste sentido, e como mero exemplo, Amstrong *et al.*, 1989, relatou o abaixamento da constante dieléctrica do *o*NFOE, de 23,6 (no estado de solvente puro) para ±12, quando incorporado em 33 % de PVC. Este fenómeno encontrava-se simplesmente associado à restrição da rotação livre das moléculas de solvente mediador.

Dos resultados obtidos podemos por isso concluir que as membranas de PVC que ofereciam melhores características, particularmente uma maior sensibilidade e um menor LIRL, foram aqueles constituídas por *o*NFOE e 4-*tert*-octilfenol. Para a continuidade do trabalho descrito, seleccionaram-se então os eléctrodos tipos AC3 e AC7, que se distinguiam por incorporarem na membrana permutadores iónicos diferentes.

Dada a aplicação analítica pretendida para as unidades seleccionadas, julgou-se importante caracteriza-las, também, em condições de ajuste simultâneo dos valores

de pH e de força iónica. Este ajuste foi estabelecido por meio de uma solução tampão de H_3PO_4/NaH_2PO_4, com valor de força iónica igual a $1x10^{-1}$ mol L^{-1} e um valor de pH igual a 3,5 unidades. A escolha desta solução, concretamente no que diz respeito ao seu valor de pH, resultou do estudo da influência deste parâmetro no comportamento dos eléctrodos (na secção V.3.1.2).

Em comparação com os resultados decorrentes dos ensaios realizados em soluções com a força iónica ajustada, os parâmetros agora calculados indicaram melhorias significativas no comportamento de ambas as unidades (tabela V.5). Deste registo, evidenciou-se um alargamento da zona de resposta linear, originado pelo decréscimo, em aproximadamente dez vezes, do valor de LIRL, e, ainda, um aumento considerável da sensibilidade.

tabela V.5 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de CEF, obtidas em solução aquosa com valor de pH igual a 3,5 unidades e com força iónica igual a $1x10^{-1}$ mol L^{-1}.

Tipo de eléctrodo / *Características*	**AC3**	**AC7**
LD (mol L^{-1})	$1,3x10^{-4}$	$3,0x10^{-4}$
LIRL (mol L^{-1})	$2,8x10^{-4}$	$4,5x10^{-4}$
Declive (mV década^{-1})	-50,4±1,4	-44,4±0,8
Repetibilidade (mV)	±0,6	±0,7
t de resposta (s)	<20	<20
R^2	>0,9996	>0,9969

A diferença de comportamento entre os eléctrodos AC3 e AC7, os primeiros preparados com tetraoctilamónio e os segundos com *bis*(trifenilfosforaniliden)amónio, registou-se sobretudo ao nível da sensibilidade analítica e decorreu provavelmente da influência do permutador iónico presente na membrana sensora. A maior

sensibilidade fornecida pelas unidades AC3 foi mesmo concordante com os estudos de Nielsen *et al.*, 1976, acerca da interdependência entre a sensibilidade e a solubilidade do permutador iónico. Neste caso particular, ao permutador de menor solubilidade aquosa, o tetraoctilamónio, correspondeu uma maior sensibilidade.

No que diz respeito à repetibilidade do sinal analítico originado pelas várias unidades selectivas, verificou-se que, com excepção das de tipo AC5 e AC6, não se observaram variações de potencial além de ±1,9 mV, quando os ensaios eram realizados em soluções com a força iónica ajustada, ou de ±0,8 mV, quando as soluções apresentavam a força iónica e o pH ajustados.

Todos os eléctrodos construídos apresentaram, perante as várias condições em que foram estudados, tempos de resposta semelhantes, registando-se para este parâmetro valores sempre inferiores a 30 segundos.

O tempo de vida das unidades AC3 e AC7 foi estimado a partir de vários traçados de curva de calibração, efectuados ao longo dos vários procedimentos analíticos (secção II.6.1.2, p. II32). Verificou-se que, pelo menos durante o período em que decorreu a avaliação e utilização destas unidades, não se observaram alterações significativas das características gerais de funcionamento destes eléctrodos. Supôs-se assim que a sua durabilidade seria superior a 5 meses.

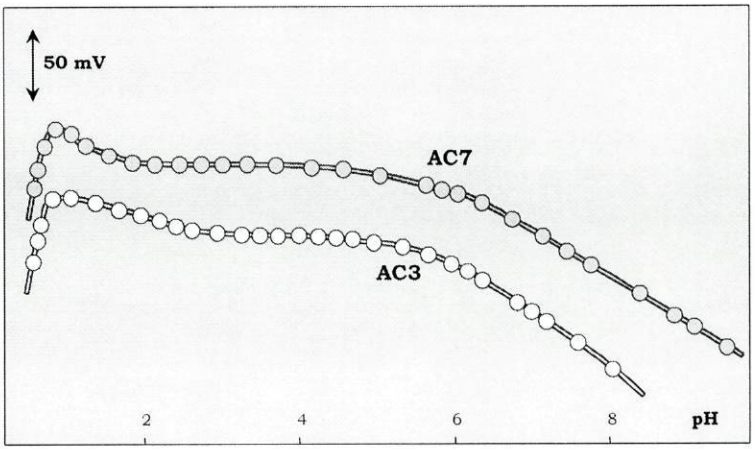
V.3.1.2 EFEITO DO pH NO VALOR DE POTENCIAL DOS ELÉCTRODOS

O efeito do pH nos valores de potencial dos eléctrodos de tipo AC3 e AC7 foi avaliado seguindo os procedimentos descritos na secção II6.3, p. II37. Utilizaram-se soluções aquosas com uma concentração em CEF.Na igual a $5x10^{-3}$ mol L^{-1}, valor incluído na zona de resposta linear dos eléctrodos. Esta solução apresentava ainda um valor de força iónica igual a $1x10^{-1}$ mol L^{-1}, ajustado com Na_2SO_4. O valor de pH

da solução foi alterado pela adição de uma solução de NaOH saturada e de uma solução de ácido sulfúrico concentrada. A escolha desta última permitiu não introduzir aniões estranhos na solução cujo pH se pretendia variar, já que o anião que a constituía estava presente como ajustador da força iónica.

Os diagramas de *Reilley* traçados indicaram variações de potencial inferiores a ± 5 mV nos intervalos de pH compreendidos entre 3,0 e 4,0 e entre 2,3 e 4,9 unidades, para os eléctrodos tipos AC3 e AC7, respectivamente (Figura V.2). Os estreitos patamares de pH operacional que estes eléctrodos apresentaram relacionam-se, muito provavelmente, com a presença do 4-*tert*-octilfenol na membrana. A dissociação deste aditivo na membrana teria como consequência o aparecimento do anião fenolato (Hara *et al.*, 1990), um permutador do protão.

Figura V.2 Diagramas de *Reilley* dos eléctrodos tipos AC3 e AC7, obtido em solução de força iónica igual a $1x10^{-1}$ mol L^{-1} e de concentração, em CEF.Na, igual a $5x10^{-3}$ mol L^{-1}.



Nas regiões exteriores aos intervalos indicados, o comportamento de ambos os tipos de eléctrodos foi similar, i.e., a subida dos valores de pH originou um decréscimo nos valores de potencial e a descida originou um aumento, seguido de um decréscimo, nos valores de potencial da célula de eléctrodo selectivo. Essa a diminuição deveu-se provavelmente a uma interferência do anião hidróxido,

enquanto que o aumento do potencial esteve supostamente relacionado com o aumento da fracção não ionizada de CEF em solução. Este fenómeno era também concordante com o valor de pK*a* encontrado a partir dos ensaios indicados em V.2.3, que era aproximadamente igual a 2,28 ± 0,3. Quando o valor de pH da solução baixou além de 1 unidade, verificou-se uma alteração no sentido da variação do potencial. Esta alteração esteve provavelmente associada à presença de HSO_4^- em solução, que competia para a membrana com a fracção da CEF ainda ionizada, sobrepondo-se por isso ao efeito produzido pela CEF não ionizada.

V.3.1.3 DETERMINAÇÃO DE COEFICIENTES DE SELECTIVIDADE POTENCIOMÉTRICA

Para a avaliação da extensão da interferência de algumas espécies iónicas, presentes ou não em formulações, procedeu-se à determinação dos respectivos coeficientes de selectividade potenciométrica, $K_{A,B}^{pot}$. Para esta avaliação escolheram-se algumas espécies químicas de carácter inorgânico, designadamente sulfato, cloreto, nitrato e iodeto, espécies que poderiam integrar as formulações, particularmente o cloreto nas formas injectáveis. Escolheram-se também algumas espécies de carácter orgânico, nomeadamente cefaclor, cefadroxil, cefazolin e cefradine, espécies incluídas no grupo das cefalosporinas e apresentando, por isso, uma estrutura base comum com a da CEF. A inclusão destas espécies, ausentes nas formulações farmacêuticas de CEF, teve um intuito meramente académico, podendo servir de orientação para a construção de eléctrodos selectivos àquelas espécies.

Para a determinação dos valores de $K_{A,B}^{pot}$ recorreu-se ao método das soluções separadas, de acordo com o indicado na secção II.6.4, p. II39. Escolheram-se concentrações de ião principal e interferente iguais a $1{,}0\times10^{-3}$, $5{,}0\times10^{-3}$ e $1{,}0\times10^{-2}$ mol L^{-1}, valores incluídos na zona de resposta linear dos eléctrodos quando em

soluções de CEF sem qualquer ajuste da força iónica (tabela V.3), sendo também os previstos para as análises a efectuar às formulações farmacêuticas. Perante as condições experimentais estabelecidas, os valores de $K^{Pot}_{A,B}$ encontrados para os eléctrodos do tipo AC3 e AC7 foram aqueles indicados na tabela V.6.

O anião inorgânico de menor interferência no comportamento de ambos os tipos de eléctrodos foi o sulfato. Justificou-se assim a utilização de Na_2SO_4 no ajuste de força iónica das soluções e a escolha de H_2SO_4 para efectuar os ensaios necessários ao traçado dos diagramas de *Reilley*.

De uma forma genérica, a interferência das várias espécies estudadas no comportamento dos eléctrodos tipos AC3 e AC7 foi similar no que diz respeito à sua ordem relativa, i.e., cefaclor < sulfato, cefadroxil < cefradine < cloreto < cefazolin < nitrato < iodeto (Figura V.3). Esta semelhança foi mesmo concordante com os estudos de Baum *et al.*, 1973, onde os autores concluíram que a natureza química do solvente mediador plastificante representa uma influência dominante nas características de selectividade dos eléctrodos.

Com referência aos aniões inorgânicos, verificou-se uma ordem de preferência da membrana selectiva de I^- > NO_3^-> Cl^- (Figura V.3), indicando que o aumento dessa preferência corresponde ao aumento do carácter lipofílico desses iões. De acordo com o mecanismo clássico de funcionamento de permuta iónica dos sensores à base de sais de amónio quaternário, onde os contra-iões na membrana seriam dissociados dos locais lipofílicos, móveis e de carga positiva, a selectividade resultava da solubilidade relativa dos aniões individuais no solvente da membrana (Morf, em *The Principals of Ion-Selective Electrodes and of Membrane Transport*, 1981). Sendo assim, dadas as características lipófilas das membranas selectivas, existiria uma preferência pelos iões mais lipofílicos, seguindo-se a chamada série de Hofmeister. Desta sequência excluiu-se o sulfato, anião com valor de carga diferente da do ião principal.

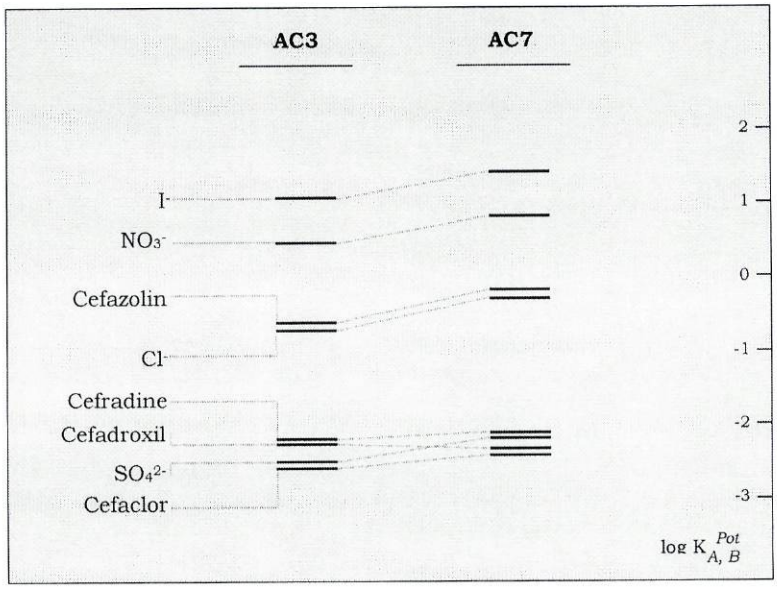
tabela V.6 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os eléctrodos selectivos de CEF tipos AC3 e AC7. Valores obtidos em solução aquosa sem qualquer ajuste da força iónica.

		log $K^{pot}_{A,B}$	AC3	AC7
Interferente	*Concentração (mol L^{-1})*			
Sulfato	1,0x10^{-3}		-2,02 ± 0,09	-1,94 ± 0,05
	5,0x10^{-3}		-2,23 ± 0,09	-2,07 ± 0,03
	1,0x10^{-2}		-2,38 ± 0,09	-2,16 ± 0,03
Cloreto	1,0x10^{-3}		-0,32 ± 0,14	-0,02 ± 0,04
	5,0x10^{-3}		-0,57 ± 0,13	-0,10 ± 0,04
	1,0x10^{-2}		-0,93 ± 0,24	-0,14 ± 0,04
Nitrato	1,0x10^{-3}		+0,63 ± 0,15	+0,86 ± 0,16
	5,0x10^{-3}		+0,65 ± 0,19	+1,00 ± 0,14
	1,0x10^{-2}		+0,67 ± 0,15	+1,01 ± 0,14
Iodeto	1,0x10^{-3}		+1,08 ± 0,18	+1,48 ± 0,05
	5,0x10^{-3}		+1,19 ± 0,18	+1,50 ± 0,01
	1,0x10^{-2}		+1,32 ± 0,24	+1,49 ± 0,02
Cefaclor	1,0x10^{-3}		-1,43 ± 0,09	-1,84 ± 0,09
	5,0x10^{-3}		-2,26 ± 0,22	-2,16 ± 0,08
	1,0x10^{-2}		-2,54 ± 0,31	-2,02 ± 0,0,7
Cefadroxil	1,0x10^{-3}		-1,32 ± 0,07	-1,63 ± 0,13
	5,0x10^{-3}		-2,00 ± 0,11	-2,15 ± 0,12
	1,0x10^{-2}		-2,24 ± 0,12	-2,21 ± 0,11
Cefazolin	1,0x10^{-3}		-0,25 ± 0,10	-0,02 ± 0,08
	5,0x10^{-3}		-0,48 ± 0,28	-0,02 ± 0,04
	1,0x10^{-2}		-0,58 ± 0,36	0,00 ± 0,03
Cefradine	1,0x10^{-3}		-1,18 ± 0,12	-1,49 ± 0,11
	5,0x10^{-3}		-2,01 ± 0,06	-2,02 ± 0,08
	1,0x10^{-2}		-2,18 ± 0,11	-2,07 ± 0,08

No caso particular das membranas estudadas (AC3 e AC7), que apresentavam um aditivo com capacidade de ceder protões, haveria ainda a considerar a afinidade de cada ião para o protão, i.e., a interferência de um ião aumentaria com a sua afinidade para o protão. Esta afinidade estaria mais evidenciada para os iões orgânicos estudados e a sua intensidade poderia ser avaliada em função dos valores de p*Ka* de cada espécie, já que a diminuição do p*Ka* de um composto indica um decréscimo nessa sua tendência para aceitar um protão. Neste âmbito, e dedicado a monocarboxilatos alifáticos, Hara *et al.*, 1980, estabeleceu uma relação linear entre o valor de $K^{pot}_{A,B}$ e o valor de p*Ka* correspondente.

Contudo, para as cefalosporinas estudadas, em que as estruturas envolvidas apresentavam uma elevada complexidade estrutural e em que havia um desconhecimento dos seus valores de p*Ka*, nada se pôde concluir acerca da sequência da interferência daquelas espécies orgânicas no comportamento dos eléctrodos tipos AC3 e AC7.

Figura V.3 Diagrama dos log $K^{pot}_{A,B}$ dos eléctrodos selectivos de CEF, tipo AC3 e AC7, de configuração convencional. Determinações relativas a soluções de concentração igual a $5x10^{-3}$ mol L^{-1}.



Embora os dois tipos de membranas estudadas apresentassem um comportamento semelhante, relativamente aos interferentes escolhidos, o eléctrodo que incluía a membrana tipo AC3 originou valores de logaritmo de $K^{Pot}_{A,B}$ que, em termos absolutos, eram inferiores àqueles fornecidos pelo eléctrodo AC7.

Esta razão, associada às melhores características de funcionamento das unidades tipo AC3, conduziu à selecção desta membrana para a preparação de eléctrodos selectivos de configuração tubular.

V.3.2 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMENTO DOS DETECTORES TUBULARES

Após a selecção da membrana mais adequada para ser utilizada em condições de fluxo, avaliaram-se as características gerais de funcionamento dos detectores tubulares construídos, tanto em condições de ajuste da força iónica como para condições de ajuste simultâneo de pH e força iónica. Para essa caracterização procedeu-se inicialmente à selecção das condições experimentais adequadas.

V.3.2.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO SISTEMA FIA

As condições que, para os eléctrodos convencionais, correspondiam aos ensaios com ajuste da força iónica foram estabelecidas numa montagem de fluxo de baixa dispersão (Figura II.15, p. II26). Para transportador da amostra utilizou-se uma solução de Na_2SO_4, com concentração igual a $3{,}3 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}, que apresentava ainda uma concentração em ião principal igual a 1×10^{-7} mol L^{-1} (II.6.1.1.2, p. II26).

A selecção do volume de amostragem e da velocidade de fluxo da solução de transporte, ambos com uma influência significativa na dispersão global da amostra, foi efectuada de acordo com o descrito em II.6.1.1.2, p. II26. Ao longo deste estudo a distância entre a válvula de injecção e o eléctrodo selectivo foi mantida em 20 cm. Esta era a menor distância que fisicamente se podia estabelecer entre os vários elementos constituintes da montagem.

Para esse estudo utilizaram-se volumes de amostragem iguais a 170, 270, 570 e 1070 μL e valores de velocidade de fluxo iguais a 2, 4, 6 e 8 mL min^{-1}. Para a determinação do declive, necessário ao cálculo da dispersão (equação II.5, p. II29) injectaram-se no sistema soluções padrão de CEF.Na com concentrações iguais a $5x10^{-4}$, $1,0x10^{-3}$ e $5,0x10^{-3}$ mol L^{-1}. Os cálculos de dispersão das soluções no interior da montagem foram efectuados em relação à solução de concentração igual a $5x10^{-4}$ mol L^{-1}.

A partir dos resultados obtidos (tabela V.7), e tal como já era esperado, verificou-se um decréscimo da dispersão para o aumento do volume de amostragem.

tabela V.7 Dispersão de uma solução de CEF.Na, com valor de concentração igual a $5x10^{-4}$ mol L^{-1}, relativamente ao volume de amostragem e à velocidade de fluxo usadas na montagem FIA de baixa dispersão.

Velocidade de fluxo / *Volume amostragem*	**2 mL min^{-1}**	**4 mL min^{-1}**	**6 mL min^{-1}**	**8 mL min^{-1}**
170 μL	2,19	1,89	2,13	2,10
270 μL	1,34	1,50	1,72	1,62
570 μL	1,02	1,05	1,12	1,22
1070 μL	1,00	1,00	1,01	1,02

A associação entre volumes de amostragem iguais ou superiores a 570 μL e velocidades de fluxo iguais ou inferiores a 6 ml min^{-1} garantia uma baixa dispersão, sendo o sinal registado praticamente independente do volume de amostra injectado e correspondente a um valor superior a 95% do sinal obtido em estado estacionário. Escolheu-se, então, um volume de amostra de 570 μL e uma velocidade para solução de transporte, à sua passagem pelo detector, igual a 6 ml min^{-1}. Nestas condições foi possível obter uma elevada frequência analítica para o menor consumo de amostra, sem que se verificasse um decréscimo perceptível da sensibilidade.

Para a caracterização dos detectores tubulares em condições de ajuste simultâneo de pH e de força iónica utilizou-se uma montagem de duplo canal (Figura II.17, p. II31), tendo-se intercalado 570 μL de solução padrão, previamente preparada por diluição em água, numa solução de transporte também composta por água. Os valores de pH e de força iónica foram ajustados posteriormente, por confluência com uma solução tampão constituída por H_3PO_4/NaH_2PO_4 com um pH igual a 3,5 unidades. Esta última solução, que apresentava o dobro dos valores da força iónica e de concentração em CEF.Na presentes na solução de transporte do sistema de baixa dispersão, era diluída a aproximadamente metade, por confluência com o canal de água.

Após a confluência das referidas soluções no interior do sistema, a sua mistura foi assegurada por um reactor em malha de 20 cm, comprimento suficiente para assegurar uma boa mistura. A escolha deste comprimento decorreu do estudo da variação do sinal analítico fornecido pela passagem de 570 μL de uma solução CEF.Na, $1x10^{-3}$ mol L^{-1}, através de reactores de 20, 40 e 60 cm (tabela V.8), com uma velocidade de fluxo total igual a 6 mL min^{-1}. A variação do sinal foi calculada em termos do valor percentual do sinal produzido quando a mesma solução de CEF.Na era introduzida no sistema pelo canal de transporte de água.

tabela V.8 Variação percentual do sinal analítico de uma solução de CEF.Na, de valor de concentração igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}, com o comprimento de reactor.

Comprimento do reactor / *Condições do sistema*	**20 cm**	**40 cm**	**60 cm**
570 μL, 6 mL min^{-1}	100,0	96,8	96,4

Uma vez seleccionadas as condições de trabalho para as montagens FIA procedeu-se à caracterização dos detectores, iniciando-se esse estudo pelo traçado de curvas de calibração.

V.3.2.2 PARÂMETROS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Para a execução experimental de curvas de calibração em condições de fluxo, procedeu-se à injecção de soluções padrão de CEF.Na (II.6.1.1.2, p. II26), com concentrações compreendidas entre $1x10^{-4}$ mol L^{-1} e $1x10^{-2}$ mol L^{-1}. A partir de curvas de calibração produzidas quer com a montagem de baixa dispersão (Figura II15, p. II26), quer com a montagem de duplo canal (Figura II17, p. II31), calcularam-se o LIRL e o declive da resposta analítica (II.6.1.2, p. II32). Os valores médios, bem como os desvios correspondentes foram indicados na tabela V.9.

A repetibilidade do sinal analítico dos eléctrodos tubulares foi determinada a partir de, pelo menos, quinze injecções sucessivas de soluções de CEF.Na com valores de concentração iguais a $5x10^{-4}$, $1x10^{-3}$ e $5x10^{-3}$ mol L^{-1} (II.6.1.2, p. II32). Os registos obtidos, para dois destes níveis de concentração, encontram-se representados na Figura V.4.

tabela V.9 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de CEF, tipo AC3, com configuração tubular. Valores obtidos em condições de ajuste de força iónica (I) e de ajuste simultâneo do valor de pH e da força iónica.

Condições analíticas / *Características*	**I=1x10^{-1} mol L^{-1}**	**pH=3,5 I=1x10^{-1} mol L^{-1}**
LIRL (mol L^{-1})	2,0x10^{-3}	4,0x10^{-4}
Declive (mV/década)	-42,3±0,3	-54,6±0,4
Repetibilidade (mV)	±0,2	±0,2
Frequência de amostragem (amostra h^{-1})	–	≈ 130
R^2	>0,9981	>0,9991

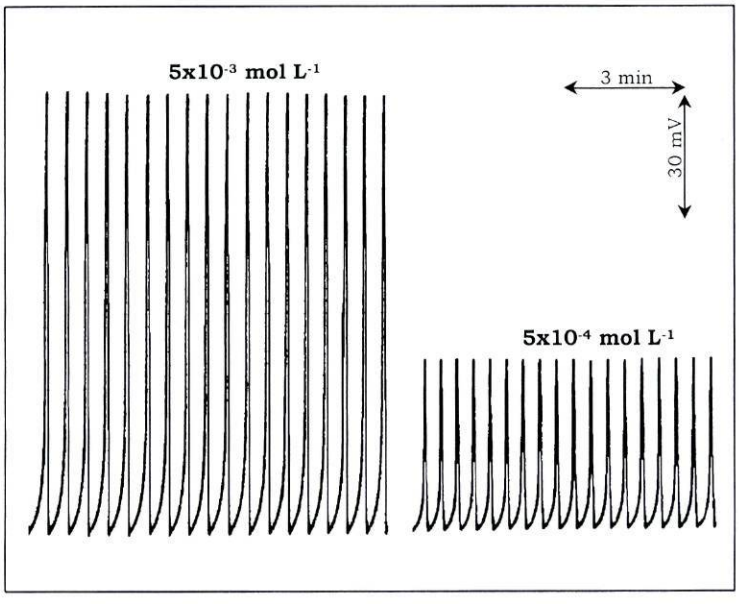


Figura V.4 Repetibilidade do sinal analítico dos detectores tubulares selectivos de CEF. Registos obtidos a dois níveis de concentração, no sistema de baixa dispersão com um reactor de 20 cm, um volume de amostragem de 570 µL e uma velocidade de fluxo de 6 mL min^{-1}.

O tempo de resposta dos detectores tubulares foi calculado em termos de frequência de amostragem (II.6.2, p. II35), dada a grande influência das condições experimentais do sistema FIA. Em condições de ajuste simultâneo de pH e de força iónica a frequência de amostragem era igual a aproximadamente 130 amostras por hora.

Quando comparados os resultados de ensaios equivalentes para as duas configurações dos eléctrodos construídos com a membrana AC3, verificou-se uma melhoria na resposta fornecida pelos detectores tubulares, nomeadamente no que diz respeito a sensibilidade e repetibilidade do sinal analítico.

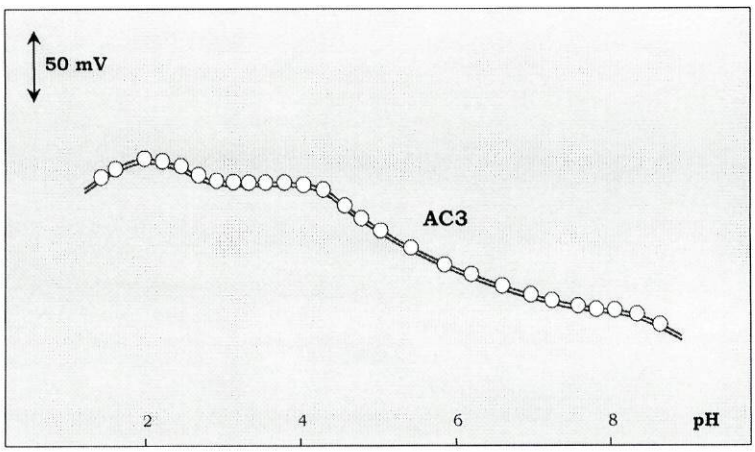
V.3.2.3 EFEITO DO pH NO POTENCIAL DOS DETECTORES TUBULARES

Para a determinação do intervalo de pH, para o qual a operacionalidade dos eléctrodos não dependia do valor de pH das soluções de medida, seguiram-se os procedimentos indicados em II.6.3, p. II37. A montagem utilizada para este estudo constituiu uma adaptação do sistema de fluxo de baixa dispersão e foi representada na Figura II.20, p. II39.

As avaliações foram efectuadas para uma solução de CEF.Na, de concentração igual a $5x10^{-3}$ mol L^{-1}, com a força iónica fixada em $1x10^{-1}$ mol L^{-1}. Para as variações de pH escolheram-se as mesmas soluções utilizadas no estudo equivalente para os eléctrodos de configuração convencional. Nestas condições, o diagrama de *Reilley* traçado (Figura V.5) indicou que as variações do potencial da célula potenciométrica eram inferiores a ± 5 mV para intervalos de pH compreendidos entre 3,0 e 4,0 unidades.

O intervalo de pH operacional aqui registado foi equivalente ao encontrado para as unidades convencionais correspondentes.

Figura V.5 Diagrama de *Reilley* do detector tubular tipo AC3. Variação do potencial da célula de eléctrodo selectivo de CEF com o pH de uma solução de CEF.Na, de concentração igual a $5x10^{-3}$ mol L^{-1} e com o valor da força iónica igual a $1x10^{-1}$ mol L^{-1}.



V.3.2.4 DETERMINAÇÃO DE COEFICIENTES DE SELECTIVIDADE POTENCIOMÉTRICA

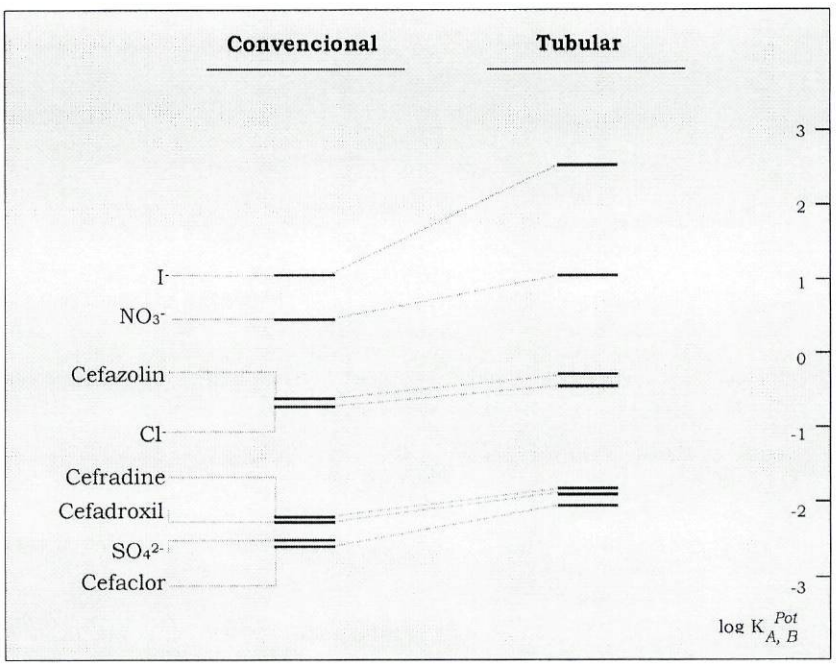
Para avaliar a extensão da interferência de alguns aniões nos detectores tubulares procedeu-se à determinação de $K^{pot}_{A,B}$, com base no método das soluções separadas. O procedimento experimental seguido foi aquele descrito na secção II.6.4, p. II39. As soluções de CEF eram iguais às utilizadas nos ensaios discretos correspondentes, embora aqui preparadas em solução ajustadora da força iónica.

Os valores médios de logaritmo de $K^{pot}_{A,B}$ obtidos e os respectivos desvios padrão (tabela V.10), indicaram uma menor selectividade para os detectores tubulares (Figura V.6). Contudo, este situação poderia ter resultado da presença simultânea de duas espécies nas soluções ensaiadas, o anião em estudo e aquele presente no electrólito ajustador da força iónica, quando estes ensaios decorreram em fluxo.

tabela V.10 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os detectores tubulares selectivos de CEF tipo AC3. Valores obtidos em solução aquosa com força iónica igual a $1x10^{-1}$ mol L^{-1}.

	log $K^{pot}_{A,B}$	**Tubulares, AC3**
Interferente	*Concentração (mol L^{-1})*	
Cloreto	$1,0x10^{-3}$	-0,06 ± 0,03
	$5,0x10^{-3}$	-0,20 ± 0,03
	$1,0x10^{-2}$	-0,37 ± 0,02
Nitrato	$1,0x10^{-3}$	+1,29 ± 0,01
	$5,0x10^{-3}$	+1,41 ± 0,01
	$1,0x10^{-2}$	+1,37 ± 0,04
Iodeto	$1,0x10^{-3}$	+2,27 ± 0,04
	$5,0x10^{-3}$	+2,48 ± 0,05
	$1,0x10^{-2}$	+2,49 ± 0,05
Cefaclor	$1,0x10^{-3}$	-0,87 ± 0,01
	$5,0x10^{-3}$	-1,67 ± 0,03
	$1,0x10^{-2}$	-2,08 ± 0,01
Cefadroxil	$1,0x10^{-3}$	-0,78 ± 0,03
	$5,0x10^{-3}$	-1,57 ± 0,04
	$1,0x10^{-2}$	-2,00 ± 0,03
Cefazolin	$1,0x10^{-3}$	+0,10 ± 0,01
	$5,0x10^{-3}$	+0,06 ± 0,01
	$1,0x10^{-2}$	-0,04 ± 0,01
Cefradine	$1,0x10^{-3}$	-0,83 ± 0,05
	$5,0x10^{-3}$	-1,60 ± 0,09
	$1,0x10^{-2}$	-2,02 ± 0,07

Figura V.6 Diagrama representativo da variação dos valores de log $K^{pot}_{A,B}$ dos eléctrodos selectivos de CEF, tipo AC3, quando determinados na sua configuração convencional ou tubular. Determinações relativas a soluções de concentração igual a $5x10^{-3}$ mol L^{-1}.



Após o estudo comparativo das várias unidades convencionais construídas, selecção da membrana mais adequada e avaliação das características de funcionamento do detector tubular, verificou-se que as membranas AC3 eram as que possuíam as características mais adequadas para a análise potenciométrica de amostras reais.

V.3.3 ANÁLISE DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

As análises de Curoxime®, o nome comercial de uma forma injectável, a única disponível no mercado contendo CEF.Na, foram efectuadas tanto com os eléctrodos convencionais de tipo AC3 como com os detectores tubulares correspondentes. Cada solução injectável preparada extemporaneamente, deveria conter, de acordo com a bula informativa, uma quantidade de 750 mg em CEF, correspondente a 790 mg em CEF.Na.

As análises de soluções diluídas de amostra, preparadas de acordo com o descrito em V.2.5, foram realizadas após a curva de calibração da célula de eléctrodo selectivo de ião ao longo de uma gama de concentrações compreendida entre $1x10^{-3}$ e $1x10^{-2}$ mol L^{-1}. Os resultados das análises potenciométricas foram indicados na tabela V.11. Um exemplo típico de uma análise e da calibração precedente está representado na Figura V.7.

tabela V.11 Resultados da determinação potenciométrica (POT) de CEF.Na em Curoxime®, efectuada de uma forma discreta, com os eléctrodos convencionais, ou em fluxo, com os detectores tubulares. Desvios relativos (DR) com relação à monografia da USP.

condições analíticas	**POT**		**USP**	**DR**	**teste t**
	C (mg/injectável)	recuperação (%)	(mg/injectável)	(%)	
Analise discreta	923,6 ± 23,9	99,8 ± 0,5	888,3 ± 27,7	-4,0	0,012
Análise em fluxo	848,4 ± 49,2	100,0 ± 1,2	827,5 ± 22,9	-2,5	0,294

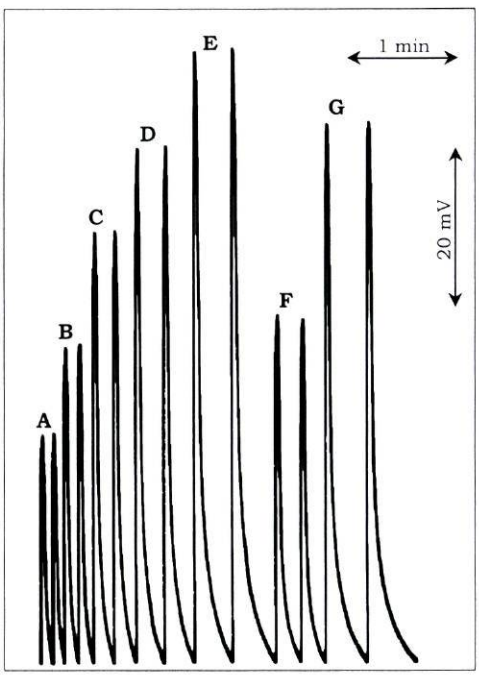
Os resultados dos ensaios de recuperação sugeriram que as análises efectuadas seriam exactas, dada a proximidade ao valor médio teoricamente esperado. Estes

resultados indicaram ainda a boa precisão das leituras analíticas, característica que deriva das boas características de resposta apresentadas pelos eléctrodos, nomeadamente no que se relaciona com a repetibilidade do sinal analítico.

A exactidão dos resultados das análises potenciométricas foi efectivamente confirmada por comparação com os valores resultantes da execução de um método independente, o ensaio de doseamento proposto na monografia da *USP*, 1995. A igualdade estatística entre os valores médios dos dois ensaios foi comprovada pelo teste *t de Student*, para um nível de confiança de 95% e com um número de ensaios, *n*, igual a 8. Nestas condições, o valor de *t* tabelado era igual a 3,365, inferior portanto aos obtidos por comparação com as análises potenciométricas discretas e em fluxo (tabela V.11).

Figura V.7 Registo de uma calibração da célula de eléctrodo selectivo tubular com cinco soluções padrão de CEF.Na (A, B, C, D e E) seguida da análise da solução de amostra diluída e do ensaio de recuperação correspondente, para os quais se previam, respectivamente, valores de concentração F e G.

A: $1{,}3 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}
B: $2{,}0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}
C: $4{,}0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}
D: $6{,}0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}
E: $1{,}0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}
F: $2{,}4 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}
G: $7{,}2 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}



Apesar da igualdade estatística entre os métodos potenciométricos e aquele proposto na USP, 1995, é de salientar que os menores desvios relativos corresponderam às análises realizadas no sistema FIA. Adicionalmente, estes sistemas permitiram também a determinação de, cerca de, 130 amostras por hora (tabela V.9). Destas características, e em comparação com as análises discretas, decorreram algumas vantagens na realização das determinações em fluxo, sobretudo quando a frequência analítica constitui um factor preponderante.

V.4 CONCLUSÕES

Através da construção de eléctrodos selectivos de CEF, de configuração convencional, tendo como base diferentes membranas sensoras, foi possível avaliar a influência dos vários elementos constituintes da membrana no comportamento dos detectores potenciométricos. De um modo global, a presença de 4-*tert*-octilfenol foi fundamental, propriedade que se julgou resultar da influência deste aditivo nas características de selectividade dos eléctrodos. Relativamente aos solventes mediadores, escolheu-se aquele que originou unidades de maior sensibilidade analítica, o *o*NFOE. No que se refere ao sensor iónico, a sua influência foi pouco nítida e traduziu-se através da maior sensibilidade das unidades que continham CEF de tetraoctilamónio. Seleccionou-se, por isso, a membrana sensora constituída por este sensor iónico, por *o*NFOE e 4-*tert*-octilfenol.

A membrana que conferia melhores características aos eléctrodos convencionais foi seleccionada para a construção de unidades com uma configuração tubular, o que conduziu à automatização dos procedimentos envolvidos tanto na caracterização dos detectores como na sua aplicação analítica em produtos farmacêuticos, através da sua incorporação em sistemas FIA. As características gerais de funcionamento fornecidas pelos detectores tubulares inseridos naqueles sistemas foram significativamente melhores do que aquelas registadas para os eléctrodos convencionais correspondentes.

A utilidade analítica, dos eléctrodos construídos com a membrana seleccionada, foi explorada com base na análise de formulações farmacêuticas disponíveis no comércio local. A comparação dos resultados obtidos com os decorrentes da aplicação do método referenciado na USP, 1995, revelou a exactidão das análises potenciométricas. Essa exactidão foi confirmada através de desvios relativos, nunca superiores a 4,0%, e pelo teste *t de Student*.

Pelas razões indicadas, os eléctrodos selectivos de CEF propostos constituem uma alternativa importante aos métodos descritos na literatura para a determinação de CEF em produtos farmacêuticos. A implementação em análises de rotina dos detectores tubulares incorporados em sistemas FIA poderá mesmo ser uma alternativa atractiva, considerando a elevada frequência analítica, de cerca de 130 amostras por hora, o baixo custo dos detectores e das montagens envolvidas e, ainda, a simplicidade do procedimento analítico.

V.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMSTRONG R. D., WANG H., TODD M. (**1989**). Solvent properties of PVC membranes. *J. Electroanal. Chem.*, 266, 173-174.

BAUM G., LYNN M. (**1973**). Polymer membrane electrodes. Part II. Potassium ion-selective membrane electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 65, 393-403.

COOMBER P. A., JEFFERIES J. P., WOODFORD J. D. (**1982**). High-performance liquid Chromatographic determination of cefuroxime. *Analyst*, 107, 1451-1456.

CORTI P., DREASSI E., CERAMELLI G., LONARDI S., VIVIANI R., GRAVINA S. (**1991**). Near infrared reflectance spectroscopy applied to pharmaceutical quality control. Identification and assay of cephalosporins. *Analusis*, 19, 198-204.

GANS P., SABATINI A., VACCA A. (**1985**). Superquad: an improved general program for computation of formation constants from potentimoteric data. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1195-1200.

GIBSON N. A., WEATHERBURN D. C. (**1972**). The distribution of salts of large cations between water and organic solvents. Part II. Factors affecting the magnitude of the distribution ratio. *Anal. Chim. Acta*, 58, 159-165.

GRAN G. (**1952**). Determination of equivalence point in potentiometric titrations. Part II. *Analyst*, 77, 661-671.

HARA H., OKAZAKI S., FUJINAGA T. (**1980**). Enhancement of selectivity of a benzoate-sensitive liquid-membrane electrode by alkylphenol. *Anal. Chim. Acta*, 121, 119-123.

HARA H., KONDOH Y., MITANI O., OKAZAKI S. (**1990**). Solid solvent membrane coated wire electrodes and their response to nitrate, *p*-toluenesulfonate, chloride, calcium and potassium. *Anal. Chem.*, 62, 1139-1143.

HARA H., OHKUBO H., SAWAI K. (**1993**). Nitrate ion-selective coated-wire electrode based on tetraoctadecylammonium nitrate in solid solvents and the effect of additives on its selectivity. *Analyst*, 118, 549-552.

HARVEY S. C. (**1990**). *Remington's; Pharmaceutical Sciences*. Capítulo 62, *Antimicrobial Drugs*. GENNARO A. R., editor. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 18ª edição, p. 1197.

INDEX MERCK (**1989**). *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*. SUSAN BUDAVARI, editor. Merck & Co, Inc., Rahway, N. J., USA, 11ª edição, pp. 948-949.

ISSOPOULOS P. B. (**1989**). Spectrophotometric determination of certain cephalosporins using molybdophosphoric acid. Part II. Determination of cefadroxil, cefapirin, ceforanide and cefuroxime. *Analyst*, 114, 237-239.

LIMA J. L. F. C., MONTENEGRO M. C. B. S. M., SALES M. G. F. (**1996**). Benzoate ion-selective electrode with improved selectivity and reproducibility for benzoate. determination in medicinal syrups. *Mikrochim. Acta*, 124, 35-41.

MORF W. E. (**1981**). *The Principals of Ion-Selective Electrodes and of Membrane Transport*. Elsevier, Amsterdam.

MURILLO J. A., LEMUS J. M., GARCIA L. F. (**1994**). Spectrofluorimetric analysis of cefuroxime in pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Bimoed. Anal.*, 12, 875-881.

NIELSEN H. J., HANSEN E. H. (**1976**). New nitrate ion-selective electrodes based on quaternary ammonium compounds in nonporous polymer membranes. *Anal. Chim. Acta*, 85, 1-16.

OKADA T. SUGIHARA H., HIRATANI K. (**1995**). Role of plasticizers on the characteristics of poly(vinyl chloride)-membrane lithium-selective electrodes based on phenanthroline derivatives. *Analyst*, 120, 2381-2386.

POSPISILOVA B., KUBES J. (**1988**). Contribution to mercurimetric determination of cephalosporin antibiotics. *Pharmazie*, 43, 246-248.

QUERCIA V., SENA C., GAMBERO P., PAGNOZZI G., PIERINI N., TERRACCIANO M. (**1979**). Applicazione dell'HPLC all'analisi di alcune cefalosporine. *Boll. Chim. Farm.*, 118, 308-315.

SANDE M. A., KAPUSNIK-UNER J. E., MANDELL G. L. (**1992**). *Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Secção XI, *Chemotherapy of Microbial Diseases*. Capítulo 44, *Antimicrobial Agents*. GILMAN A. F., RALL T. W., NIES A. S., TAYLOR P., editores. McGraw Hill International Editions, 8ª edição, p. 1086.

SENGUN F. I., ULAS K., FEDAI I. (**1985**). Analytical investigations of cefalosporins. II. Polarographic behaviour of ceftriaxone, cefuroxime, cefotaxime and ceftizoxime and assay of their formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 3, 191-199.

SPRINGOLO V., COPPI G. (**1983**). Comparison between HPLC and microbiological assay of some cephalosporins. *Boll. Chim. Farm.*, 122, 104-108.

USP (**1995**). Cefuroxime Sodium Injection Official Monograph. United States Pharmacopoeial Convention. *United States Pharmacopoeia XXIII*, Rockville, MD, p. 317.

VYTRAS K. (**1989**). The use of ion-selective electrodes in the determination of drug substances. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 7, 789-812.

ZHANG H., STEWART J. T. (**1994**). Determination of a cefuroxime and aminophylline/theophylline mixture by high-performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.*, 17, 1327-1335

WEGMANN D., WEISS H., AMMANN D., MORF W. E., PRETSCH E., SUGAHARA K., SIMON W. (**1984**). Anion-selective liquid membrane electrodes based on lipophilic quaternary ammonium compounds. *Mikrochim. Acta*, Part III, 1-16.

ELÉCTRODOS SELECTIVOS DE TETRACICLINA

VI. 1 INTRODUÇÃO

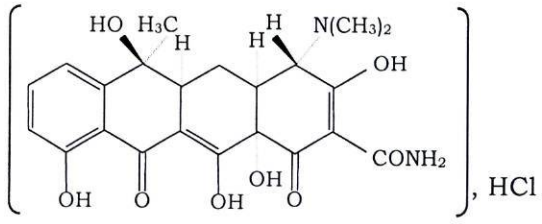
O aparecimento das tetraciclinas deve-se à procura sistemática de microorganismos produtores de antibióticos em amostras de solos colectadas nos mais diversos pontos do globo. A actividade anti-bacteriana das tetraciclinas processa-se por inibição da síntese proteica, sendo o alvo dessa acção o ribossoma bacteriano. Esta característica confere-lhes actividade sobre uma alargada diversidade de bactérias, passando a ser designadas por antibióticos de largo espectro e sendo por isso frequentemente utilizados no combate às infecções (Sande *et al.*, em *Goodman and Gilman's*, 1992).

Os compostos que integram este grupo terapêutico têm como estrutura química comum um núcleo de hidronaftaceno, constituído por quatro anéis, de seis carbonos, fundidos, residindo as suas diferenças nos grupos ligados àquela estrutura base (*Drug Evaluations*, 1986). A clortetraciclina constitui o primeiro composto daquele grupo terapêutico e foi introduzida em 1948 (*Drug Evaluations*, 1986). O elemento mais característico deste grupo é contudo a própria tetraciclina (TC) (Harvey, em *Remington's*, 1990).

A administração da TC, composto seleccionado para este trabalho, é efectuada preferencialmente por via oral, sob a forma de cápsulas, comprimidos ou drageias. Existe sempre a precaução de evitar a sua administração conjunta com leite ou produtos lácteos e formulações anti-ácidas ou minerais. Esta precaução advém da facilidade de ligação da TC aos catiões di e trivalentes aí presentes, conduzindo à diminuição do teor de fármaco disponível para absorção (*Drug Evaluations*, 1986). A administração da TC via intravenosa é utilizada apenas perante uma terapia oral inadequada ou mal tolerada e na falta de qualquer outra alternativa, sendo a administração intramuscular não recomendada de todo (*Drug Evaluations*, 1986). A sua aplicação tópica, efectuada sob a forma de pomadas é recomendada sobretudo para uso oftálmico (Sande *et al.*, em *Goodman and Gilman's*, 1992).

Dada a maior solubilidade do cloridrato da TC (HCl.TC, Figura VI.1), este é empregue sobretudo nas pomadas (Harvey, em *Remington's*, 1990), embora comercialmente apareça também incorporado em formas farmacêuticas para administração oral.

Figura VI.1 Cloridrato de tetraciclina (HCl.TC). $C_{22}H_{24}N_2O_8.HCl$ 480,90 g mol^{-1}.



A monografia actual da USP, 1995, propõe a separação por HPLC dos vários constituintes da matriz farmacêutica seguida de detecção espectrofotométrica a 280 nm, utilizando uma coluna C-8 e um eluente de oxalato de amónio, dimetilformamida e hidrogenofosfato de amónio. Os estudos de robustez desta nova proposta, efectuados por Heyden *et al.*, 1996, indicam contudo que o valor de pH e o conteúdo de dimetilformamida na fase móvel são os parâmetros que mais contribuem para a variabilidade dos resultados obtidos, não sendo mesmo possível separar a 2-acetil-2-decarboxamidatetraciclina ou resolver completamente a 4-epitetraciclina e a anidrotetraciclina.

No entanto, esta nova monografia para o doseamento da TC (USP, 1995), surge em substituição do método microbiológico inscrito nas suas edições anteriores, no qual, além das análises decorrerem num período de tempo substancialmente mais alargado, os resultados produzidos são de baixa precisão e exactidão, sobretudo devido à variabilidade da resposta biológica. Efectivamente, a procura de métodos alternativos aos microbiológicos é motivo de grande atenção por parte dos investigadores, conduzindo ao aparecimento frequente na literatura de trabalhos dedicados à determinação de TC em formulações farmacêuticas, com base em diferentes métodos e técnicas analíticas.

Relativamente às determinações colorimétricas, um grande número dos trabalhos publicados tem por base os estudos de Albert *et al.*, 1956, acerca da afinidade da TC para os catiões metálicos (tabela VI.1). Uma série de outros trabalhos baseados na complexação da TC com o ião tungstato ou o ião molibdato foram entretanto explorados (tabela VI.1), embora os estudos relativos à determinação das constantes de estabilidade daqueles complexos se tenham efectuado mais tarde, por Veselinovic *et al.*, 1989. Outros reagentes, bem como a hidrólise da própria TC em meio ácido ou alcalino, foram também objecto de atenção de alguns investigadores, servindo de base à mesma determinação (tabela VI.2).

tabela VI.1 Determinações espectrofotométricas de TC com base na formação de complexos corados com alguns metais.

Reagente	Sensibilidade ($L\ mol^{-1}\ cm^{-1}$)	Linearidade ($\mu g\ mL^{-1}$)	Algumas etapas envolvias	Referência Bibliográfica
Molibdato	—	—	+ 60 °C, 15 min	Kakemi *et al.*, 1955
	9480 (430 nm)	10-140	+ molibdato/HCl + 100±5 °C, 15 min	Sultan *et al.*, 1986
Zinco	— (≈440 nm)	—	+ 100 °C, 10 min (colorimetria)	Fouchet, 1956
Zircónio	5578 (— nm)	15-40	+ metanol + 30 min (fotometria)	Vogt, 1956
Tório	23404 (395 nm)	≈ 5-25	+20 min até cor estável	Chatten *et al.*, 1971
Uranilo	≈5500 (404 nm)	3-22	soluções preparadas em água/dioxano	Mahgoub *et al.*, 1974
	10500 (414 nm)	0-115	+ acetato de uranilo em dimetilformamida	Saha *et al.*, 1990
Tungstato	— (386nm)	1-25	+ tungstato de sódio + hidróxido de sódio + leitura até 50 minutos	Rao *et al.*, 1989
Vanadato	≈2938 (750 nm)	20-100	+ 100 °C, 10 min + leitura após 5 min	Abdel-khalek *et al.*, 1983
Cobre	19900 (400 nm)	0-20	+ $CuCl_2$, agitação vigorosa + NaOH (pH 11-12,5) + leitura antes de 30 min	Saha, 1987
Cobaltinitrito	≈16283 (256 nm)	10-30	+ ácido acético glacial + 100 °C, 15 min	Mahrous *et al.*, 1984
Ferro	4646 (423 nm)	10-200	+ 20 min + diluição em H_2SO_4	Sultan *et al*, 1988
	12503 (423 nm)	20-200	◦ 157 µL de solução de TC (em H_2SO_4); ◦ solução de transporte de sulfato de amónio e ferro (em H_2SO_4); ◦ 3,72 mL min^{-1}; ◦ reactor de 55 cm; ◦ ≥ 170 amostras por hora	Sultan *et al*, 1992

tabela VI.2 Algumas determinações espectrofotométricas de TC baseadas na sua reacção química com vários reagentes.

"Reagente"	Sensibilidade ($L\ mol^{-1}\ cm^{-1}$)	Linearidade ($\mu g\ mL^{-1}$)	Algumas etapas envolvias	Referência Bibliográfica
4-Aminoatipirina	— (435 nm)	40-120	+ $K_3Fe(CN)_6$	Ayad *et al.*, 1986
4-Aminofenazona (4AF)	5020 (520 nm)	1-20	◦filtração (0,85 μm) e desarejamento ◦200 μL de amostra (0,67 mL min^{-1}) ◦confluência c/ solução de 4AF (em Na_2EDTA/ NaOH) (0,54 mL min^{-1}) ◦reactor de 293 cm; ◦confluência c/ solução de $K_3Fe(CN)_6$ (0,54 mL min^{-1}) ◦reactor de 270 cm; ◦60-70 amostras por hora	Karlicek, *et al.*, 1994
N-Bromo-succinimida (NBS)	17040 (540 nm)	0,2-1,6	+HCl, NBS + *celestine blue*, aos 10 min + leitura aos 5 min	Sastry *et al.*, 1996
Sulfanilamida	23700 (410 nm)	1-8	+ $NaNO_2$ + HCl, aos 5 min + ureia (em etanol), aos 10 min	Gupta *et al.*, 1980
Cálcio + ácido dietilbarbitúrico	(520 nm)	2,5-15	+ evaporação + dissolução + 60°C, 12 min	Emara *et al.*, 1991
PH do meio	≈14509 (357 nm)	5-35	+ dissolver, filtrar + H_2SO_4	Wahbi *et al.*, 1985
	≈5718 (393 nm)	8-40	Método cinético (baseado na velocidade de degradação da TC ao derivado anidro) + metanol + HCl anidro + 100 °C/30 min (*t*) + arrefecer (2 min) + NaOH (parar degradação)	ElSayed *et al.*, 1985
	7210 (≈440 nm)	4-20	*Brucine* +$NaIO_4$ +H_2SO_4 + 100 °C, 15 min	Divakar *et al.*, 1984
	— (350 nm)	4-40	+ HNO_3 + H_2SO_4 + 70 °C, 5 min + KOH e acetona	El-Sadek *et al.*, 1987
	≈17890 (380 nm)	0,8-40	+ NaOH, + leitura a 6 min	Woolford *et al.*, 1956

Os trabalhos até aqui referidos apresentam algumas limitações, sobretudo intervalos de trabalho muito limitados, envolvendo também longos períodos de tempo para o tratamento adequado das amostras no sentido de obter determinações sensíveis e obviar problemas como a turvação e/ou coloração de amostras e variações de índices de refracção.

Embora os sistemas de fluxo contribuam para uma redução substancial de algumas etapas de processamento das amostras, bem como do consumo de reagentes, surgem apenas dois trabalhos na literatura baseados nestes sistemas (Sultan *et al.*, 1992, tabela VI.1, e Karlicek *et al*, 1994, tabela VI.2). Ambos se baseiam em sistemas FIA e detecção espectrofotométrica para a determinação de TC em formulações farmacêuticas.

Contrariamente a esta situação, os métodos ópticos baseados em fluorimetria, chemiluminescência e fosforecência, propostos na literatura para a determinação de TC em produtos farmacêuticos, surgem frequentemente associados a sistemas de fluxo.

Relativamente aos trabalhos com detecção fluorimétrica descritos, são de salientar os reduzidos limites de detecção conseguidos pelos autores. Este facto é aliás bem evidente num trabalho de Gong *et al.*, 1997, onde um sensor óptico constituído por 2,6-*O*-dietil-β-ciclodextrina, imobilizada em gel de sílica, detecta concentrações de TC iguais a 4 nmol L^{-1} e apresenta um intervalo de linearidade de 9 a 800 nmol L^{-1}. Uma limitação deste trabalho reporta-se à interferência de alguns catiões metálicos. Sem esta limitação, Liu *et al.*, 1998, propõe um sensor óptico constituído por *bis*(2-etilhexil)sebacato incorporado num co-polímero contendo antraceno, com o qual obtém intervalos de linearidade de 0,202 a 202 μmol L^{-1} e limites de detecção iguais a 0,1 μmol L^{-1}. A frequência analítica aqui apresentada é de cerca de 60 amostras por hora, dado que o tempo de resposta do sensor, até à obtenção de um sinal de fluorescência estável, era de 30 s, acrescido de um período de tempo igual para a sua reversibilidade. Wang *et al.*, 1998, com base num sensor

óptico de 1,4-*bis*(5,5'-dimetilbenzoxazole-1'-il-2')benzeno, tricresilfosfato, *bis*(2-etilhexil)sebacato e PVC, consegue limites de detecção de 0,106 μmol L^{-1} e intervalos de trabalho compreendidos entre 0,698 e 87,3 μmol L^{-1}. Em comparação com os trabalhos anteriores, o intervalo de linearidade é significativamente reduzido.

Uma das primeiras determinações de TC em produtos farmacêuticos por chemiluminescência foi estabelecida por Alwarthan *et al.*, 1988, e é baseada na sua oxidação por bromo, em meio alcalino. Os autores propõem para esta determinação a intercalação de 40 μL de uma solução aquosa de HCl.TC numa solução de reagente oxidante, seguindo-se a adição de uma solução de carbonato por confluência. Com base neste procedimento, o limite de detecção obtido é de 40 μmol L^{-1} e os intervalos de linearidade estão compreendidos entre 0,050 e 10 mmol L^{-1}. São contudo de salientar a interferência significativa de Cu^{2+}, Al^{3+} ou glicina no sinal analítico e a baixa sensibilidade das determinações. Similarmente, Syropoulos *et al.*, 1991, propõe para a determinação de TC a monitorização da luminescência produzida pela oxidação dos derivados da degradação ácida ou alcalina da TC, promovida pelo hexacianoferrato de potássio ou a lucigenina, respectivamente. O procedimento estabelecido com lucigenina é contudo inadequado pela emissão de fundo provocada pelo reagente com iões hidroxilo e também pela deposição de N-metilacridona, o seu produto excitado primário, ao longo dos tubos do sistema de fluxo. Quando o procedimento é baseado em hexacianoferrato de potássio (III), o sistema implementado não apresenta estas limitações, permitindo uma frequência analítica de 70 amostras por hora, num intervalo de concentrações compreendido entre 0,2 e 2,5 μmol L^{-1}. Contudo, embora a interferência da glicina seja aqui obviada, são dignas de registo as interferências provocadas pela presença de Ca^{2+}, Mg^{2+} e Zn^{2+}. Halvatzis *et al.*, 1993, recorre também à chemiluminescência para a determinação de TC, desta vez baseada na acção da N-bromosuccinimida nos derivados de degradação alcalina daquele composto. Com o procedimento estabelecido é possível a análise de cerca de 130 amostras por hora, para um intervalo de concentrações compreendido

entre 0,10 a 6,2 μmol L^{-1}, embora as interferências relacionadas com a presença de cálcio e de magnésio sejam significativas. O trabalho desenvolvido por Zhang *at el.*, 1995, decorre em sistemas de fluxo e baseia-se na oxidação da TC pelo peróxido de hidrogénio em meio amoniacal, utilizando o cobre (II) como catalisador e o persulfato de potássio como agente co-oxidante. O intervalo de linearidade indicado pelos autores é de 0,25 a 25 nmol L^{-1}, com um limite de detecção de 0,1 nmol L^{-1}. A única interferência de registo, o manganês, pode ser mascarada com EDTA. Embora o procedimento proposto seja sensível, selectivo e capaz de determinar concentrações de TC muito baixas, é porém demasiado longo. A reacção envolvida decorre em duas etapas, sendo a primeira mais longa, com uma duração de cerca de 35 minutos. Um último trabalho publicado na literatura, desenvolvido por Li *et al.*, 1997, baseia-se na quantificação da chemiluminescência produzida pela reacção redox entre o $KMnO_4$ e a TC, em meio ácido e na presença de octilfenilpoliglicoléter. Este último reagente, quando acima da sua concentração micelar crítica, promove um ambiente protector para o estado excitado através da formação de micelas, favorecendo assim a chemiluminescência. Neste trabalho, a variação do sinal é linear para valores de concentração de TC entre 0,002 a 2,079 mmol L^{-1}, com um limite de detecção de 0,83 μmol L^{-1}, existindo contudo a interferência de metanol, etanol, ácido ascórbico e fenol.

Moreno *et al.*, 1993, propõe um procedimento para a determinação da TC baseado na luminescência que caracteriza alguns lantanídeos, neste caso particular o Eu (III). Os autores imobilizam de uma forma transiente o complexo TC-Eu (III), que exibe fosforescência à temperatura ambiente, numa célula de fluxo empacotada com resina não iónica e incorporada num sistema FIA. Após a leitura do sinal produzido ($\lambda_{excitação}$=390nm; $\lambda_{emissão}$=622nm), é então injectada uma solução de HCl para remoção do quelato retido na fase sólida. A única interferência de relevo é o Fe (III), que pode ser mascarada com a 1,10-fenantrolina. Este procedimento conduz a bons

limites de detecção, iguais a 0,52 μmol L^{-1}, embora a frequência analítica seja limitada a cerca de 10 a 12 amostras por hora.

O recurso a técnicas de separação para o doseamento de TC tem sido também uma proposta frequente na literatura, não apenas porque permitem separar a TC dos restantes elementos incorporados em amostras farmacêuticas, mas também pela separação dos seus derivados químicos antes de realizar uma leitura analítica. Entre esses compostos encontram-se a 4-epitetraciclina e a anidrotetraciclina, resultantes quer da epimerização quer da degradação ácida da TC, respectivamente. Além destes, um outro derivado é a 4-epianidrotetraciclina, composto pode ser originado quer por degradação ácida da 4-epitetraciclina, quer por epimerização da anidrotetraciclina. Este derivado apresenta toxicidade com respeito à função renal, iniciando um síndroma de Falconi reversível.

Entre as várias técnicas separativas, a mais frequentemente referida na literatura é, sem dúvida, a cromatografia. Neste sentido, Ascione *et al.*, 1967, estabelece um método baseado na separação cromatográfica da TC numa coluna de terra de diactomáceas tratada com solução tampão de Na_2EDTA, glicerina e polietilenoglicol 400. A quantificação é efectuada por determinação espetrofotométrica, a 366 nm, de eluatos de clorofórmio/*n*-butanol, previamente adicionados de uma solução de metanol alcalina. Entre o tratamento da coluna cromatográfica, separação dos componentes e adição de reagentes para quantificação, estão envolvidas uma série de etapas e reagentes, que conduzem a um procedimento moroso e fastidioso, de frequência analítica limitada.

Recorrendo a cromatografia em camada fina, Fernandez *et al.*, 1969, estabelece um procedimento para o doseamento da TC e quantificação por separação das manchas obtidas e sua medição espectrofotométrica a 430 nm. Gatsonis *et al.*, 1982, retoma posteriormente este tipo de cromatografia com uma abordagem ligeiramente distinta, recorrendo à densitometria, com a qual estabelece uma relação de linearidade entre a quantidade de TC e a unidade de integração de cada mancha

(fornecida por um espectrodensitómetro). Com este procedimento não é necessário recorrer a reagentes para identificação das manchas, dado que estas são localizáveis perante irradiação de luz UV (365 nm). Embora com uma precisão de 5,2 % para as determinações de TC, o procedimento descrito requer uma hora para que as leituras possam ser executadas.

Tsuji *et al.*, 1976, é o primeiro a determinar TC em apenas 16 minutos recorrendo a cromatografia liquida, particularmente HPLC. Para isso, 2 μL de amostra são intercalados numa solução de acetonitrilo/água, que atravessa o sistema com pressão elevada e velocidade de fluxo igual a 1,0 mL min^{-1}. A separação é efectuada numa coluna empacotada com octadecilsilano, ligado a um suporte de gel de sílica, e os compostos eluídos são detectados a 280 nm. Com este sistema, os autores conseguem uma boa resolução entre a TC e os seus derivados. Posteriormente, Khan *et al.*, 1990, estabelece um sistema baseado em HPLC que, com uma fase móvel de pH igual a 9,0 unidades e colunas empacotadas com diferentes materiais de poli(estireno-divinilbenzeno), indica a possibilidade de separação e doseamento tanto da TC como dos seus derivados e, ainda, da 2-acetil-2--decarboxamidotetraciclina, uma impureza de fermentação, praticamente sem actividade terapêutica. Estando na origem da monografia proposta na Farmacopeia Europeia, 1993, para o doseamento de TC, este procedimento é posteriormente submetido a estudos de variabilidade inter-laboratorial por Hendrix *et al.*, 1993, onde se concluiu a sua boa reprodutibilidade. Contudo, foram também encontradas divergências entre a 4-epitetraciclina/TC e a TC/4-epianidrotetraciclina, bem como factores de capacidade diferentes para as várias colunas presentes neste estudo inter-laboratorial.

A associação de sistemas FIA às técnicas electro-analíticas, mais particularmente a voltametria, a polarografia e a amperometria, tem também sido explorada em diversos trabalhos. Dentro deste contexto, Ji *et al*, 1988, descreve um sistema FIA com detecção amperométrica, baseado na transferência iónica através de

uma interface de água/nitrobenzeno. Neste sistema, a fase orgânica encontra-se imobilizada em PVC e agar e é adicionada de um electrólito, o tetrafenilborato de tetrabutilamónio, para que o processo de transferência seja facilitado. Perante a aplicação de um potencial constante, igual a 0,430 V, o catião TC atravessa a interface e origina uma intensidade de corrente linear para valores de concentração compreendidos entre 2 e 200 μmol L^{-1}. Este sistema pode ser utilizado ao longo de uma semana, período durante o qual se vai verificando um perda gradual de resposta, causada pela perda de electrólito da fase sólida de nitrobenzeno. A frequência analítica encontrada é de apenas 60 amostras por hora.

No que se refere às técnicas voltamétricas e polarográficas propostas na literatura, é possível encontrar um trabalho de revisão estabelecido por Bersier *et al.*, 1994. Tendo em vista a determinação de TC numa gama de concentrações compreendida entre 1 a 200 mg L^{-1}, Tanase *et al.*, 1996, estabelece um procedimento baseado em polarografia, de corrente alternada. Este trabalho, onde se utiliza um eléctrodo de mercúrio de gota pendente e é necessário proceder-se a um desarejamento prévio das soluções com Argon (5-10 min), torna-se inadequado, tanto em termos ambientais, como pela dificuldade de execução.

A determinação de TC com base em técnicas potenciométricas surge com Simpson *et al.*, 1982, e consiste numa adaptação dos métodos microbiológicos. Neste trabalho detectam-se as alterações da actividade metabólica de microorganismos decorrentes da presença de uma substância inibidora, antes que o crescimento celular seja observado. Para isso, efectua-se a monitorização do CO_2 produzido por uma suspensão de *Escherichia coli*, recorrendo a um sensor daquele gás. Simpson *et al.*, 1984, propõe posteriormente um sistema similar para a mesma determinação, desta vez baseado na inibição da produção de NH_4^+ pela suspensão bacteriana na presença de TC e detecção potenciométrica com eléctrodo de gás sensível a NH_3. Estes trabalhos potenciométricos, além de requerem períodos de 12 a 24 horas para incubação das células bacterianas, apresentam uma sensibilidade consideravelmente

reduzida. Os intervalos de linearidade são também limitados, compreendidos entre 33 e 167 ou entre 16,7 e 83,3 $\mu g\ mL^{-1}$, respectivamente.

Surge também na literatura um eléctrodo selectivo de TC proposto por Shoukry *et al.*, 1987. O eléctrodo é composto por uma membrana de PVC, preparada com tetrafenilborato de TC dissolvido em dioctilftalato, e apresenta uma solução de referência interna. A presença desta solução, além de dificultar a manipulação da unidade potenciométrica, conduz usualmente a uma redução da sua durabilidade (Moody *et al.*, 1988), muito embora o tempo de vida dos eléctrodos propostos não seja indicado. Por outro lado, o eléctrodo construído não apresenta a configuração mais adequada à sua incorporação em sistemas FIA, com os quais seria possível realizar análises mais expeditas. A sua aplicação na determinação de TC em formulações farmacêuticas limita-se também à aplicação do método da adição padrão, recorrendo a ensaios discretos.

Explorando as propriedades anfotéricas da TC em solução aquosa, Zhou *et al.*, 1989, propõe uma série de eléctrodos selectivos a esta espécie química, construídos com uma configuração convencional e com solução de referência interna. Neste sentido, a preparação de sensores baseados em sais de amónio, fosfónio e de arsénio torna possível a construção de eléctrodos selectivos à forma aniónica da TC. Estas unidades apresentam contudo uma aplicabilidade limitada pela decomposição da TC em meio alcalino. A preparação de sensores baseados em silicotungstato, tetrafenilborato e em dipicrilaminato dá por sua vez origem a eléctrodos selectivos à forma catiónica da TC. Embora estes eléctrodos apresentem boas características de funcionamento, sobretudo aqueles baseados em silicotungstato de TC, o tempo de vida reporta-se apenas a 2 meses. Esta característica estará provavelmente associada à presença da solução de referência interna que, aumentando a pressão hidrodinâmica sobre a membrana, favorece a perda gradual dos constituintes do sensor. Além disso, a construção proposta não é também a mais adequada à sua incorporação em sistemas FIA.

Perante os vários trabalhos propostos na literatura, conclui-se a inexistência de um procedimento que, de uma forma simples e expedita, permita efectuar a determinação de TC em formulações farmacêuticas. Salientam-se sobretudo a necessidade de recorrer aos longos e fastidiosos processos de pré-tratamento das amostras e/ou ao envolvimento de equipamento sofisticado, de elevado custo e que requer um operador especializado.

Com o objectivo de contornar esta situação, propõe-se aqui uma determinação directa da TC com base em eléctrodos selectivos àquela espécies na sua forma catiónica, construídos sem solução de referência interna e com uma membrana polimérica, composta por elementos sensores adequados. Para isso, pretende-se preparar várias membranas sensoras fazendo variar os seus elementos constituintes, desde o sensor iónico ao polímero de suporte. Pretende-se ainda a aplicação de uma destas membranas na construção de detectores de configuração tubular, tendo em vista a automatização, em sistemas FIA simples, dos procedimentos analíticos envolvidos no controle de qualidade de produto acabado, quer no que respeita ao teor de substância activa quer relativamente ao estudo da sua dissolução *in vitro*.

Este último ensaio assume particular importância nas situações em que os fármacos, veiculados em formas sólidas, apresentam uma baixa solubilidade em solução aquosa (Prista *et al.*, em *Tecnologia Farmacêutica*, 1995), estando a sua biodisponibilidade grandemente condicionada pela sua velocidade de dissolução nos fluídos biológicos. Neste sentido, o tempo de dissolução de cápsulas de HCl.TC constitui também um dos parâmetros especificados na monografia da USP, 1995, na qual se refere que, ao fim de 60 minutos, o teor de fármaco dissolvido deverá ser superior a 70 % do teor indicado na especialidade farmacêutica. Contudo, reveste-se de grande importância conhecer, não apenas os valores limite da relação tempo/teor para a dissolução mas também, a cinética com que decorre este processo.

Apesar importância destes estudos de dissolução, nada se refere na literatura no sentido de automatizar os procedimentos referidos naquela monografia para o

controle de dissolução de formas orais sólidas de HCl.TC, visando não apenas minorar a intervenção do operador, mas também melhorar a qualidade dos resultados obtidos e fornecer informações adicionais deste processo de dissolução.

VI.2 PARTE EXPERIMENTAL

VI.2.1 APARELHAGEM E ELÉCTRODOS

Para todos os ensaios realizados com os eléctrodos construídos, quer para o traçado da curva de calibração experimental, quer para as análises potenciométricas das formulações farmacêuticas, utilizaram-se os aparelhos indicados nas secções II.2 (p. II3) e II.3 (p. II7). A solução presente no compartimento externo do eléctrodo de referência era constituída por $ZnCl_2$, com concentração igual a $3{,}3x10^{-3}$ mol L^{-1}, tendo a sua escolha sido baseada na baixa interferência do catião zinco no comportamento dos eléctrodos.

Para os ensaios de dissolução das formulações farmacêuticas utilizou-se um aparelho de dissolução com pá agitadora, que se apresentava de acordo com as especificações da USP, 1995, onde era designado por "aparelho 2" (Prista *et al.*, em *Tecnologia Farmacêutica*, 1995).

VI.2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

As soluções de TC de maior concentração foram preparadas por pesagem rigorosa de HCl.TC (Sigma) e posterior diluição, a um volume rigoroso, com água desionizada. As de menor concentração foram obtidas por diluição das primeiras. Todas as soluções foram preparadas diariamente.

Todos os reagentes utilizados, nomeadamente HCl.TC (Sigma), oxitetraciclina (Sigma) e clortetraciclina (Sigma), eram de qualidade p.a. ou semelhante, sem terem sido submetidos a qualquer purificação adicional.

Para a preparação das membranas usaram-se tetrakis(4-clorofenil)borato de potássio (Fluka), como extractor, *o*-nitrofeniloctiléter (*o*NFOE, Fluka) ou *bis*(2-

etilhexil)sebacato (*b*EHS, Fluka), como solvente mediador, e poli(cloreto de vinilo) (PVC) de elevado peso molecular (Fluka) ou um co-polímero de etileno e acetato de vinilo (EVA, Bayer), como suporte imobilizador. Estes polímeros foram dissolvidos em tetrahidrofurano (THF, Riedel-deHaen).

Como ajustador de força iónica utilizou-se uma solução aquosa de $ZnCl_2$ com uma concentração igual a $3{,}3 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}. Para se efectuar o doseamento potenciométrico da TC em formulações farmacêuticas ajustaram-se os valores de pH e da força iónica com uma solução de $HCl/(CH_3COO)_2Zn$ que apresentava um pH igual a 3,5 unidades. Para os ensaios com os eléctrodos convencionais esta solução apresentava uma força iónica igual 1×10^{-2} mol L^{-1} e foi obtida pela mistura de 200,0 mL de uma solução de HCl com 100,0 mL de uma solução $(CH_3COO)_2Zn$, ambas com um valor de concentração igual a $2{,}0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}, diluindo-se a um volume final de 1000,0 mL. Para os ensaios realizados com os eléctrodos de configuração tubular utilizou-se uma solução com a mesma composição mas com uma concentração dupla da anterior, dada a sua diluição no interior da montagem (Figura II.17, p. II31).

VI.2.3 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS SENSORES E DAS MEMBRANAS

O sensor iónico, tetrakis(4-clorofenil)borato de TC, foi preparado por uma reacção de precipitação entre uma solução aquosa de tetrakis(4-clorofenil)borato de potássio e uma solução aquosa de HCl.TC, seguindo o procedimento descrito na secção II.5.2 (p. II15). As soluções sensoras foram obtidas por dissolução de cerca de 0,04 g do precipitado seco em aproximadamente 2,0 g de solvente mediador. As membranas foram preparadas através da imobilização de 0,4 mL da solução sensora correspondente em, aproximadamente, 0,18 g de PVC ou EVA, previamente dissolvido em THF. Às membranas de PVC que apresentavam na sua constituição *o*NFOE e *b*EHS atribuiu-se a designação CTC1 e CTC3, respectivamente (tabela VI.3).

Às membranas de EVA utilizando também *o*NFOE e *b*EHS atribuiu-se a designação CTC2 e CTC4, respectivamente (tabela VI.3).

Prepararam-se ainda membranas selectivas sem solvente mediador dissolvendo 0,04 ou 0,0078 g de sensor na solução de 0,18 g de EVA em THF. A estas membranas, cuja diferença residia meramente na quantidade de sensor, atribui-se a designação de CTC5 e CTC6, respectivamente (tabela VI.3).

tabela VI.3 Correspondência entre os elementos constituintes de cada membrana (assinalados com X) e a designação atribuída.

designação / *constituintes*	CTC1	CTC2	CTC3	CTC4	CTC5	CTC6
Tetrakis(4-clorofenil)borato de TC	x	x	x	x	x	x
*o*NFOE	x	x	–	–	–	–
*b*EHS	–	–	x	x	–	–
PVC	x	–	x	–	–	–
EVA	–	x	–	x	x	x

As membranas preparadas, de composição igual à indicada na tabela VI.4, foram utilizadas na preparação de eléctrodos convencionais construídos de acordo com o indicado em II.5.1.1, p. II9, ou de eléctrodos de configuração tubular, cuja construção está referida em II.5.1.2, p. II13. Após a secagem das membranas, os eléctrodos de ambas as configurações foram colocados em condicionamento numa solução aquosa de HCl.TC, com uma concentração de $1x10^{-3}$ mol L^{-1}. Esta solução tinha uma composição igual à utilizada para guardar os eléctrodos quando não estavam a ser utilizados.

tabela VI.4 Composição percentual (m/m) das seis membranas sensoras preparadas.

Constituintes / *Tipo*	**Sensor iónico** (%)	**Solvente mediador** (%)	**PVC** (%)
CTC1	1,4	67,6	31,0
CTC2	1,3	66,6	32,1
CTC3	1,4	67,6	31,0
CTC4	1,3	66,7	32,0
CTC5	18,2	_	81,8
CTC6	4,1	_	95,9

VI.2.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA OS DOSEAMENTOS POTENCIOMÉTRICOS

As determinações potenciométricas foram efectuadas em formulações farmacêuticas disponíveis no mercados português, sob a forma de cápsulas, designadas por Ciclobiótico® e cujo um teor em HCl.TC era igual a 500 ou 250 mg.

Tal como o descrito na secção II.7.1, p. II44, a solução *stock* da amostra foi preparada por dissolução com água de uma quantidade de pó equivalente a 500 mg em HCl.TC num volume final de 50,00 mL, tendo-se recorrido para o efeito a um banho de ultra-sons. Previa-se para a solução resultante uma concentração em HCl.TC igual a $2,1 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}.

A análise potenciométrica foi efectuada sobre uma toma de 600,0 μL da solução *stock*, diluída a um volume final de 25,00 mL. A solução obtida apresentava uma concentração em HCl.TC que se pensava ser igual a cerca de $7,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}, valor incluído na zona de resposta linear dos eléctrodos.

Os ensaios de recuperação do sinal analítico, efectuados para avaliar a qualidade das análise potenciométricas, decorreram de acordo com o descrito em II.7.3, p. II46. Para isso, misturaram-se 600,0 μL de solução *stock* e 2500,0 μL de

uma solução de HCl.TC com concentração igual a $1,5x10^{-2}$ mol L^{-1}, num volume total de 25,00 mL. A solução resultante apresentava uma concentração que se previa ser $2,1x10^{-3}$ mol L^{-1}, valor também incluído no intervalo de resposta linear dos eléctrodos.

Para a análise potenciométrica com os eléctrodos de configuração convencional, todas as diluições necessárias foram efectuadas em solução tampão de $HCl/(CH_3COO)_2Zn$ com um pH igual a 3,7 unidades e força iónica de $1x10^{-2}$ mol L^{-1}. Para a análise no sistema FIA, as diluições necessárias foram realizadas com água desionizada. Era no interior da montagem (Figura II.17, p. II31) que se efectuavam quer o ajuste de pH quer o da força iónica das soluções, aos mesmos valores utilizados nas análises discretas com os eléctrodos de configuração convencional.

VI.2.5 MONITORIZAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DE ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO in vitro

Para a execução dos ensaios de dissolução de cápsulas de HCl.TC recorreu-se às condições especificadas na monografia da USP, 1995. Assim, utilizou-se como meio de dissolução 900,0 mL de água, um aquecimento de 37 ± 0,5 °C e uma agitação do meio através de uma pá que rodava a 75 rpm (Figura VI.2). A monitorização da quantidade de HCl.TC dissolvida foi efectuada injectando, em intervalos regulares de geralmente 3 minutos, uma alíquota de 270 μL do meio de dissolução no interior da montagem, adaptada para este efeito (Figura VI.3). Por forma a evitar a entrada de partículas em suspensão para o sistema FIA, colocou-se um filtro à entrada do tubo por onde era aspirada a amostra. De acordo com a referida farmacopeia, a quantidade de HCl.TC dissolvida ao fim de 60 minutos deveria ser superior a 70% do conteúdo indicado para a formulação.

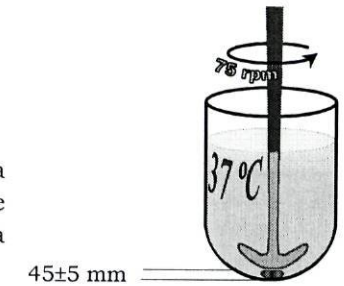


Figura VI.2 Aspecto do vaso de dissolução recomendado pela USP, 1995, para a execução dos ensaios de dissolução de cápsulas de HCl.TC. O vaso estava mergulhado em banho de água a 37 ± 0,5 °C.

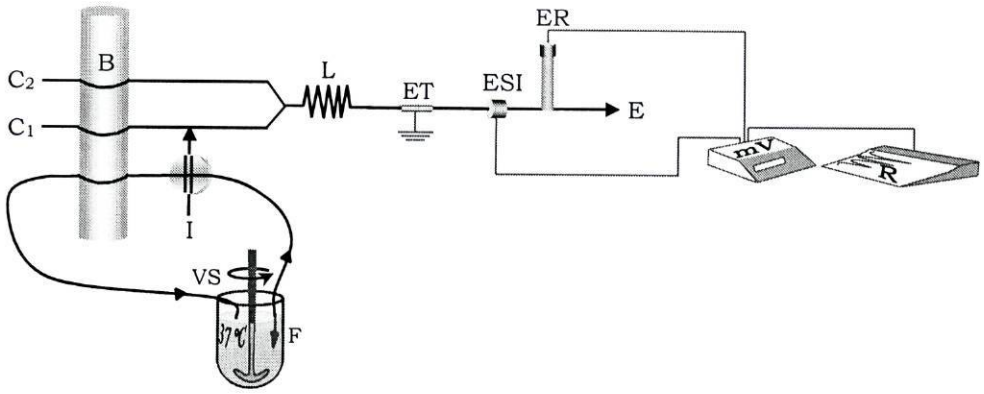


Figura VI.3 Montagem FIA para execução de ensaios de dissolução em fluxo. B: bomba peristáltica; I, válvula de injecção (270 μL); C_1: canal de transporte da solução ajustadora de pH e de força iónica; C_2: canal de transporte (água); L: reactor (50 cm); ET: eléctrodo de terra; ESI: eléctrodo selectivo de ião; ER: eléctrodo de referência; E: esgoto; mV: decimilivoltímetro; R: registador; VD: vaso de dissolução; F: filtro. Velocidade de fluxo total: 6 mL min^{-1}.

VI.2.6 PROCEDIMENTOS PARA A EXECUÇÃO DA MONOGRAFIA DA USP

Para a comparação dos resultados das análises potenciométricas com aqueles resultantes de um método independente seguiu-se o procedimento indicado na monografia da *USP*, 1995. Na referida monografia era indicado um método baseado na separação da HCl.TC por HPLC e posterior detecção espectrofotométrica a 280 nm. A fase móvel era constituída por uma mistura de oxalato de amónio,

dimetilformamida e fosfato de amónio dibásico, com um valor de pH igual a 7,5 unidades, ajustado com hidróxido de sódio 3 mol L^{-1}. Esta solução foi desarejada e filtrada antes de ser utilizada. As soluções padrão foram preparadas por diluição em fase móvel antes de serem introduzidas no sistema cromatográfico. Relativamente às cápsulas com HCl.TC, misturou-se uma determinada quantidade do seu conteúdo com eluente, tendo-se promovido a dissolução por meio de um banho de ultra-sons por um período de cinco minutos. Antes de injecção no sistema cromatográfico, procedeu-se à filtração da solução obtida.

Os ensaios de dissolução decorreram tal como foi referido no ponto anterior, com excepção de que a monografia proposta refere uma única colheita de amostra, ao fim de um período de tempo de 60 minutos. Uma vez decorrido esse período, era então necessário filtrar porções do ensaio de dissolução, diluir com meio de dissolução se necessário, e medir a absorvância a 276 nm, comparando os resultados com os obtidos para uma solução padrão HCl.TC, preparada no mesmo meio.

VI.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tendo em vista a selecção de uma das membranas utilizadas na preparação de eléctrodos convencionais, procedeu-se inicialmente à avaliação das características gerais de funcionamento dessas unidades. Os resultados obtidos são apresentados de seguida.

VI.3.1 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMENTO DOS ELÉCTRODOS CONVENCIONAIS

As características gerais de funcionamento dos seis tipos de eléctrodos, nomeadamente os parâmetros das curvas de calibração, a repetibilidade, o tempo de resposta e o tempo de vida foram determinadas a partir da execução experimental de traçados de calibração consecutivos para cada célula de eléctrodo selectivo de TC (secção II.6.1.1, p. II21).

A influência de pH e a determinação dos coeficientes de selectividade potenciométrica face a várias espécies catiónicas foram abordados posteriormente.

VI.3.1.1 PARÂMETROS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

O traçado das curvas de calibração foi efectuado de acordo com o indicado na secção II.6.1.1.1, p. II25, para valores de concentração de HCl.TC compreendidos entre $8x10^{-7}$ e $1x10^{-2}$ mol L^{-1}. Os valores médios dos parâmetros de calibração e a repetibilidade do sinal analítico foram calculados a partir de oito ensaios, de acordo com II.6.1.2, p. II32. A partir das mesmas curvas de calibração foi ainda possível estimar o tempo de resposta das várias unidades construídas (secção II.6.2, p. II35).

Numa fase inicial, utilizaram-se soluções de ião principal sem a força iónica ajustada Os valores médios dos parâmetros de calibração, indicados na tabela VI.5, contribuíram para estabelecer as condições experimentais adequadas ao estudo da selectividade dos eléctrodos (VI.3.1.3). Os resultados obtidos sugeriram melhores características para as unidades com membranas de PVC, dada a maior sensibilidade e a melhor repetibilidade do sinal analítico.

tabela VI.5 Características gerais de funcionamento dos seis tipos de eléctrodos selectivos de TC, obtidas em soluções aquosas sem qualquer ajuste de força iónica.

Tipo de eléctrodo / *Características*	**CTC1**	**CTC2**	**CTC3**	**CTC4**	**CTC5**	**CTC6**
LD (mol L^{-1})	$1,2x10^{-5}$	$3,2x10^{-5}$	$9,8x10^{-6}$	$3,3x10^{-5}$	$3,1x10^{-5}$	$2,7x10^{-5}$
LIRL (mol L^{-1})	$4,3x10^{-5}$	$8,1x10^{-5}$	$5,3x10^{-5}$	$8,1x10^{-5}$	$5,7x10^{-5}$	$5,7x10^{-5}$
Declive (mV década^{-1})	+60,2±0,9	+51,5±3,2	+59,0±0,5	+24,9±2,9	+20,1±2,9	+40,2±3,1
Repetibilidade (mV)	±0,6	±1,2	±0,3	±1,0	±0,9	±1,8
t de resposta (s)	<20	<20	<20	<20	<30	<30
R^2	>0,99900	>0,99400	>0,99900	>0,99700	>0,99750	>0,99500

Para a determinação dos parâmetros das curvas de calibração com ajuste da força iónica, procedeu-se de um modo análogo, tendo-se utilizado desta vez soluções de HCl.TC com uma força iónica igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1}. Os valores médios dos parâmetros de calibração, também calculados a partir de 8 determinações, foram indicados na tabela VI.6.

Quando comparados estes resultados com os obtidos sem ajuste da força iónica verificou-se, na generalidade, um aumento do LIRL e um decréscimo do declive. Este registo resultou, provavelmente, de uma certa interferência do electrólito usado para ajustar a força iónica.

tabela VI.6 Características gerais de funcionamento dos seis tipos de eléctrodos selectivos de TC, obtidas em soluções aquosas com uma força iónica de $1x10^{-2}$ mol L^{-1}.

Tipo de eléctrodo / *Características*	CTC1	CTC2	CTC3	CTC4	CTC5	CTC6
LD (mol L^{-1})	$4,7x10^{-5}$	$5,7x10^{-5}$	$4,7x10^{-5}$	$5,7x10^{-5}$	$5,3x10^{-5}$	$5,3x10^{-5}$
LIRL (mol L^{-1})	$1,2x10^{-4}$	$8,1x10^{-5}$	$1,2x10^{-4}$	$8,1x10^{-5}$	$2,4x10^{-4}$	$2,4x10^{-4}$
Declive (mV década^{-1})	+54,7±1,1	+46,1±0,6	+57,4±1,0	+25,6±0,3	+18,5±0,1	+34,1±0,3
Repetibilidade (mV)	±0,5	±0,5	±0,3	±0,4	±0,5	±0,6
t de resposta (s)	<20	<20	<20	<20	<30	<30
R^2	>0,99874	>0,99830	>0,99800	>0,99887	>0,99813	>0,99774

As avaliações em soluções com a força iónica ajustada indicaram que as unidades construídas com membranas à base PVC e *b*EHS deram origem a melhores características de funcionamento. Com efeito, estas unidades destacaram-se das restantes no que se refere a uma maior sensibilidade.

A influência do solvente mediador no comportamento das unidades potenciométricas variou de acordo com o polímero imobilizador utilizado. Assim, para as membranas à base de PVC, designadamente as de tipo CTC1 e CTC3, verificou-se que as melhores características de funcionamento, nomeadamente no que se refere à sensibilidade, foram fornecidas pelas unidades preparadas com *b*EHS. Este solvente mediador era o de menor constante dieléctrica, igual a 4,6 (Okada *et al.*, 1995), e estava incorporado nas membranas CTC3.

Contrariamente, as membranas á base de EVA (tipo CTC2 e CTC4) deram origem a unidades de maior sensibilidade analítica quando o solvente mediador que incorporavam era o *o*NFOE, com constante dieléctrica igual a 23,6 (Okada *et al.*, 1995). Este solvente encontrava-se presente nas membranas tipo CTC2.

A influência polímero imobilizador foi constatado por comparação entre os pares CTC1/CTC2 e CTC3/CTC4, os primeiros à base de PVC e os segundos à base de

EVA. As unidades construídas à base de PVC forneceram, de um modo sistemático, os maiores declives (tabela VI.6), parecendo por isso constituir o suporte polimérico mais adequado.

O emprego neste trabalho de EVA, um copolímero de etileno e acetato de vinilo, deveu-se sobretudo à sua baixa temperatura de transição vítrea (-50 °C) (El-Jammal *et al.*, 1991), assumindo uma estrutura plástica à temperatura ambiente. Esta propriedade indicava que este polímero era adequado à preparação de membranas poliméricas (Fiedler *et al.*, 1973), dado que essa estrutura maleável e flexível permitiria a mobilidade das moléculas em permuta iónica. Contudo, os resultados sugeriram que essa permuta iónica na membrana foi estabelecida com baixa extensão, dada a menor sensibilidade das unidades constituídas por EVA.

A baixa temperatura de transição vítrea do EVA permitiu ainda a preparação de membranas que não incorporavam qualquer solvente mediador plastificante. Este constituinte permite a utilização de polímeros com elevada temperatura de transição vítrea na preparação de membranas poliméricas, como é o caso do PVC (+81 °C, Fiedler *et al.*, 1973), garantindo as suas propriedade plásticas à temperatura ambiente. As unidades correspondentes, tipos CTC5 e CTC6, apresentaram características de funcionamento deficientes, tendo-se registado mais um vez declives muito baixos (tabela VI.6). Embora os estudos de El-Jammal *et al.*, 1991, indicassem que o EVA constituía um boa alternativa ao PVC, sobretudo porque a sua dissolução pode ser efectuada com um variedade de solventes, além de THF, nomeadamente tetracloreto de carbono, clorofórmio, diclorometano, p-xileno e tolueno, os resultados aqui apresentados sugeriram o contrário. Além disso, os autores descreveram também problemas de estabilidade do potencial quando a secagem da membrana à base de EVA, dissolvido em clorofórmio, não era controlada, deixando-a ficar demasiado endurecida. Com o trabalho aqui descrito verificou-se, contudo, o problema oposto, dado que a secagem das membranas tipos CTC5 e CTC6, levou

aproximadamente uma semana até à obtenção de uma resistência mecânica que lhe permitisse aderir ao corpo do eléctrodo sem se desprender para a solução aquosa.

Com os eléctrodos construídos foram ainda efectuados estudos em condições de ajuste simultâneo de pH e da força iónica das soluções, estabelecido por meio de uma solução tampão de $HCl/(CH_3COO)_2Zn$ com 3,5 unidades de pH e com um valor da força iónica igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1}. A escolha desta solução, nomeadamente no que diz respeito ao seu valor de pH, resultou do estudo da influência deste parâmetro, descrito na secção VI.3.1.2.

Os resultados obtidos indicaram, sobretudo para as unidades preparadas com membranas à base de PVC, um decréscimo na qualidade da resposta potenciométrica, sugerindo um efeito interferente da solução tampão utilizada (tabela VI.7). Testaram-se por isso, outras soluções tampão, constituídas por HCl ou CH_3COOH e CH_3COONa ou $(CH_3COO)_2Zn$, contudo as melhores características foram registadas para aquela constituída por $HCl/(CH_3COO)_2Zn$. Esta solução foi também ensaiada com valores de força iónica compreendidos entre $1x10^{-1}$ e $1x10^{-3}$ mol L^{-1} e valores de pH que variavam entre 2,0 e 3,9 unidades. Mesmo assim, as condições que forneciam melhores resultados foram as indicadas inicialmente.

Genericamente, as unidade do tipo CTC3 continuaram, mesmo nestas condições, a apresentar as melhores características de funcionamento. Dado que os eléctrodos cujas membranas foram preparadas por dissolução directa do sensor iónico em EVA mantinham declives muito baixos, da ordem dos 20 mV década^{-1}, eles foram excluídos do trabalho, tendo-se prosseguido com os restantes.

No que respeita à repetibilidade, o sinal analítico fornecido por qualquer um dos eléctrodos construídos não variou além de ± 1,8 mV. Perante as várias condições ensaiadas, os eléctrodos selectivos do tipo CTC3 ofereceram geralmente a maior estabilidade de potencial, nunca variando além de ± 0,5 mV.

tabela VI.7 Características gerais de funcionamento dos seis tipos de eléctrodos selectivos de TC, obtidas em solução aquosa com pH igual a 3,5 unidades e com força iónica $1x10^{-2}$ mol L^{-1}.

Tipo de eléctrodo / *Características*	CTC1	CTC2	CTC3	CTC4	CTC5	CTC6
LD (mol L^{-1})	$1,3x10^{-4}$	$2,2x10^{-4}$	$1,4x10^{-4}$	$2,6x10^{-4}$	$2,9x10^{-4}$	$3,2x10^{-4}$
LIRL (mol L^{-1})	$2,4x10^{-4}$	$9,2x10^{-4}$	$2,4x10^{-4}$	$9,9x10^{-4}$	$1,4x10^{-3}$	$1,4x10^{-3}$
Declive (mV década^{-1})	+50,8±0,8	+46,8±0,6	+51,3±1,3	+25,9±5,3	+21,5±5,4	+20,6±6,7
Repetibilidade (mV)	±0,8	±0,7	±0,5	±0,4	±0,7	±0,8
t de resposta (s)	<20	<20	<20	<20	<30	<30
R^2	>0,99897	>0,99781	>0,99910	>0,99841	>0,99799	>0,99766

Com excepção do tempo de resposta mais longo registado para as unidades tipo CTC5 e CTC6, todos os eléctrodos construídos apresentaram, perante as várias condições em que foram ensaiados, tempos de resposta semelhantes e inferiores 20 segundos.

O tempo de vida das unidades CTC1 a CTC4, determinado a partir de vários traçados de curva de calibração realizados (secção II.6.1.2, p. II32), foi estimado em três meses. Por entre os vários eléctrodos propostos ao longo desta dissertação, os eléctrodos selectivos de TC foram aqueles que apresentaram menor durabilidade. Esta característica poderia estar contudo associada à instabilidade química do HCl.TC, evidenciada sobretudo em solução aquosa e perante determinados valores de pH (*Martindale*, 1993).

VI.3.1.2 EFEITO DO PH NO VALOR DE POTENCIAL DOS ELÉCTRODOS

O efeito do pH nos valores de potencial dos eléctrodos foi avaliado para soluções aquosas com concentração em HCl.TC igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}, tendo-se seguido os

procedimentos descritos na secção II6.3, p. II37. Esta solução apresentava uma força iónica igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1}, ajustada com $ZnCl_2$, e um valor de pH igual a 1 unidade, obtido pela adição de HCl. O valor de pH desta solução foi aumentado pela adição de uma solução saturada de NaOH, dada a falta de uma solução de base forte em que a espécie catiónica presente fosse o Zn^{2+}.

A partir dos diagramas de *Reilley* obtidos definiram-se os intervalos de pH para os quais o valor de potencial não variou além de ±5 mV (tabela VI.8). Encontrou-se inicialmente um intervalo de pH na região ácida, seguindo-se um outro em região alcalina. Este segundo intervalo não foi considerado uma vez que o HCl.TC era muito instável em solução alcalina. Dado o longo período de tempo envolvido nestes ensaios, igual a cerca de 4 horas, o composto já estaria provavelmente alterado quando se registou aquele patamar em região alcalina. O decréscimo dos valores de potencial com o aumento do pH da solução de medida, para além de 3,9 unidades, estará contudo relacionado com a desprotonação da TC.

tabela VI.8 Intervalos de pH operacional dos vários eléctrodos selectivos de TC, obtidos em solução aquosa com força iónica igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1} e de concentração, em HCl.TC, igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}.

Tipo de eléctrodo / *Características*	**CTC1**	**CTC2**	**CTC3**	**CTC4**
intervalo de pH	2,0-3,9 7,2-11,5	2,0-3,9 9,2-11,5	2,0-2,8 7,5-11,5	2,0-2,8 7,5-10,5

Embora o comportamento dos vários eléctrodos tenha sido genericamente similar, a variação do potencial da célula, com o pH da solução de medida, indicou um patamar operacional mais amplo para as membranas à base de PVC (eléctrodos tipo CTC1 e CTC3).

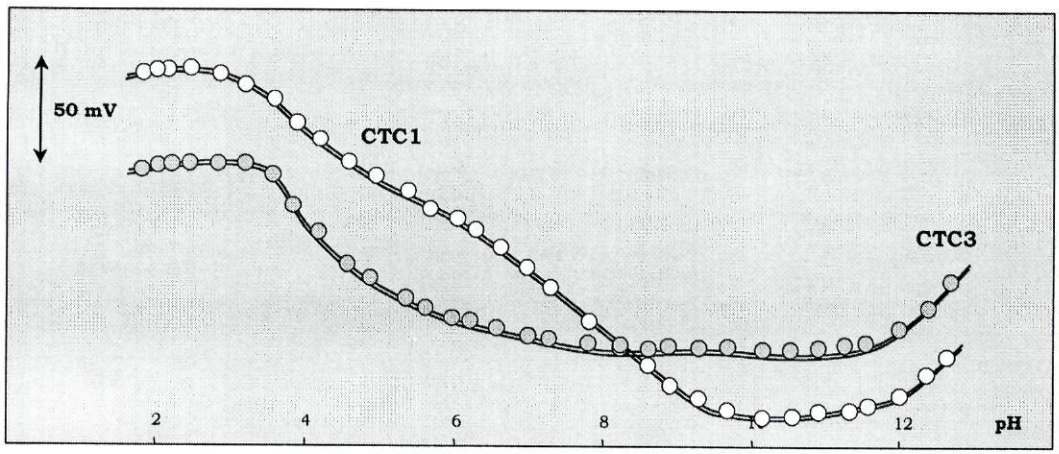


Figura VI.4 Diagramas de *Reilley* dos eléctrodos selectivos de TC com membranas de PVC, obtidos em soluções com força iónica igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1} e de concentração, em HCl.TC, igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}.

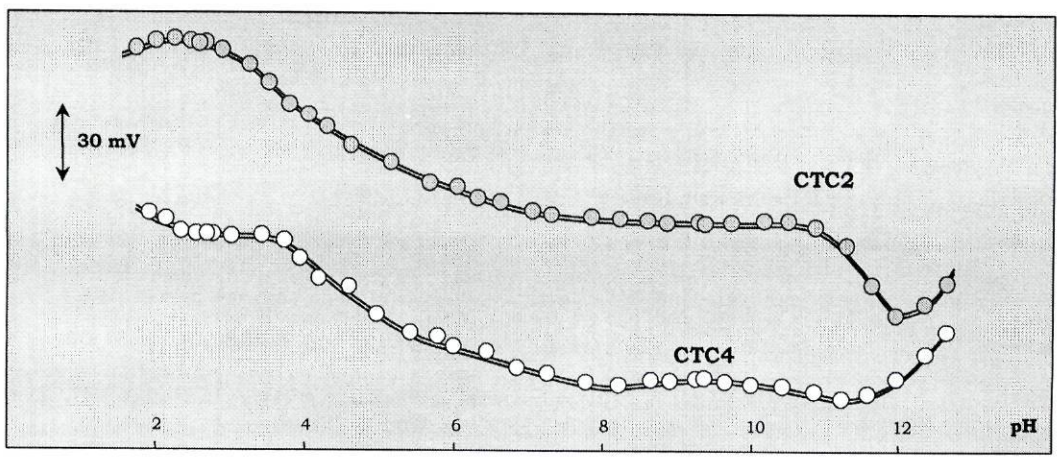


Figura VI.5 Diagramas de *Reilley* dos eléctrodos selectivos de TC com membranas de EVA, obtidos em soluções com força iónica igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1} e de concentração, em HCl.TC, igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}.

VI.3.1.3 DETERMINAÇÃO DE COEFICIENTES DE SELECTIVIDADE POTENCIOMÉTRICA

A avaliação da extensão de interferência de algumas espécies iónicas, presentes ou não em formulações, foi realizada pela determinação de coeficientes de selectividade potenciométrica, $K^{pot}_{A,B}$, através dos procedimentos indicados em II.6.4, p. II39. Para esta avaliação escolheram-se algumas espécies químicas de carácter inorgânico, designadamente potássio, sódio, cálcio, magnésio e zinco e ainda a oxitetraciclina e a clortetraciclina, como espécies orgânicas do grupo das tetraciclinas. A escolha destas espécies orgânicas em particular teve um intuito meramente académico.

Para este estudo utilizaram-se concentrações de ião principal e interferente iguais a $1{,}0\times10^{-4}$, $5{,}0\times10^{-4}$ e $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, valores incluídos na zona de resposta linear dos eléctrodos quando em soluções de HCl.TC sem a força iónica ajustada (VI.3.1.1, tabela VI.5) e, ainda, na gama de concentrações em que era previsível efectuar-se as análises. Os valores de $K^{pot}_{A,B}$ calculados foram indicados na tabela VI.9.

O catião inorgânico que representava uma menor interferência no comportamento genérico dos eléctrodos foi o zinco, o que conduziu à escolha $ZnCl_2$ como electrólito ajustador da força iónica.

A ordem relativa da intensidade da interferência das várias espécies iónicas no comportamento de cada unidade potenciométrica foi equivalente para os vários eléctrodos, i.e., zinco < magnésio, cálcio < potássio < sódio < oxitetraciclina < clortetraciclina (Figura VI.6).

tabela VI.9 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os eléctrodos selectivos de TC. Valores obtidos em solução aquosa sem qualquer ajuste da força iónica.

	$\log K^{pot}_{A,B}$	CTC1	CTC2	CTC3	CTC4
Interferente	*Concentração (mol L^{-1})*				
Potássio	1,0x10^{-4}	-0,52 ± 0,04	-0,43 ± 0,27	-1,36 ± 0,06	-0,80 ± 0,09
	5,0x10^{-4}	-1,17 ± 0,03	-0,97 ± 0,21	-1,94 ± 0,06	-1,52 ± 0,02
	1,0x10^{-3}	-1,50 ± 0,04	-1,17 ± 0,23	-2,23 ± 0,08	-1,88 ± 0,08
Sódio	1,0x10^{-4}	-0,88 ± 0,04	-0,32 ± 0,07	-2,09 ± 0,09	-1,01 ± 0,20
	5,0x10^{-4}	-1,04 ± 0,03	-0,81 ± 0,08	-1,89 ± 0,09	-1,14 ± 0,23
	1,0x10^{-3}	-1,36 ± 0,01	-1,05 ± 0,06	-2,17 ± 0,08	-1,60 ± 0,36
Cálcio	1,0x10^{-4}	-2,67 ± 0,01	-2,47 ± 0,22	-3,75 ± 0,03	-3,30 ± 0,04
	5,0x10^{-4}	-2,94 ± 0,04	-2,77 ± 0,33	-4,07 ± 0,03	-3,22 ± 0,08
	1,0x10^{-3}	-3,00 ± 0,02	-2,76 ± 0,29	-4,01 ± 0,02	-3,26 ± 0,26
Magnésio	1,0x10^{-4}	-2,63 ± 0,01	-2,63 ± 0,01	-3,54 ± 0,02	-3,13 ± 0,13
	5,0x10^{-4}	-3,04 ± 0,06	-2,98 ± 0,03	-4,05 ± 0,07	-3,44 ± 0,20
	1,0x10^{-3}	-3,10 ± 0,03	-2,97 ± 0,12	-4,09 ± 0,06	-3,32 ± 0,14
Zinco	1,0x10^{-4}	-2,87 ± 0,07	-3,16 ± 0,08	-3,73 ± 0,08	-3,72 ± 0,07
	5,0x10^{-4}	-3,26 ± 0,04	-3,42 ± 0,25	-4,17 ± 0,01	-3,88 ± 0,08
	1,0x10^{-3}	-3,43 ± 0,07	-3,66 ± 0,08	-4,35 ± 0,08	-4,17 ± 0,10
Oxitetraciclina	1,0x10^{-4}	-0,21 ± 0,03	-0,18 ± 0,04	-0,28 ± 0,04	+0,05 ± 0,01
	5,0x10^{-4}	-0,46 ± 0,01	-0,37 ± 0,01	-0,36 ± 0,01	+0,07 ± 0,03
	1,0x10^{-3}	-0,56 ± 0,07	-0,46 ± 0,02	-0,40 ± 0,07	-0,17 ± 0,04
Clortetraciclina	1,0x10^{-4}	+0,54 ± 0,01	+0,34 ± 0,02	+0,42 ± 0,01	+0,18 ± 0,05
	5,0x10^{-4}	+0,73 ± 0,10	+0,60 ± 0,05	+0,53 ± 0,01	+0,48 ± 0,12
	1,0x10^{-3}	+0,82 ± 0,12	+0,68 ± 0,01	+0,62 ± 0,02	+0,61 ± 0,25

A membrana que conduziu sistematicamente a unidades potenciométricas com melhores características de selectividade foi a do tipo CTC3, que apresentava um suporte de polimérico de PVC e *b*EHS como solvente mediador. Com efeito, os menores valores de logaritmo de $K^{pot}_{A,B}$ genericamente apresentados pelas unidades

CTC1 e CTC3, em comparação com os fornecidos pelas unidades CTC2 e CTC4, respectivamente, indicaram uma maior selectividade para as unidades com membranas à base de PVC. Analogamente, e de um modo mais vincado, os menores valores de logaritmo de $K^{pot}_{A,B}$ produzidos pelas unidades tipo CTC3 e CTC4, em comparação com os fornecidos pelas unidades CTC1 e CTC2, respectivamente, indicaram que a presença de *b*EHS nas membranas favorecia as características de selectividade apresentadas pelos eléctrodos.

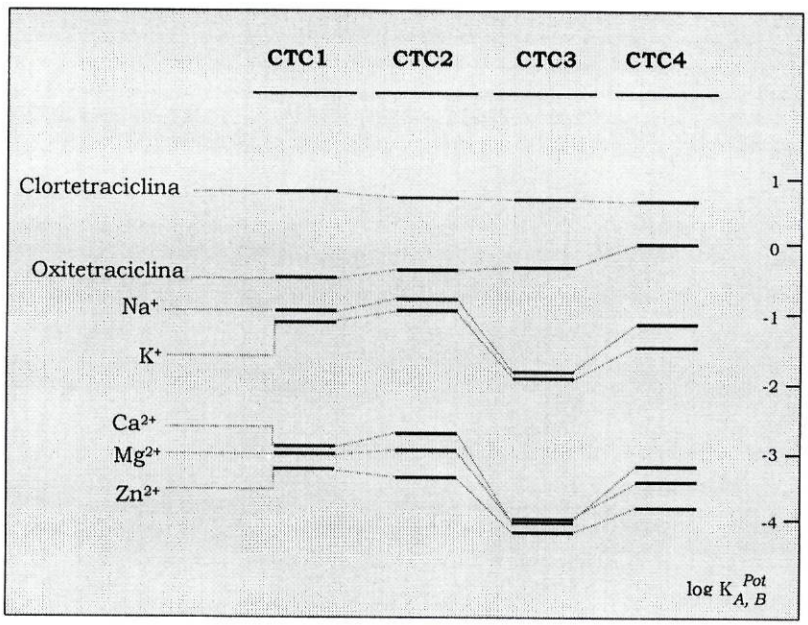


Figura VI.6 Diagrama representativo dos log $K^{pot}_{A,B}$ dos eléctrodos selectivos de TC, com configuração convencional. Determinações relativas a soluções de concentração igual a $5x10^{-4}$ mol L^{-1}.

Dadas as características de funcionamento e de selectividade obtidas para as várias unidades potenciométricas, a membrana do tipo CTC3 foi a seleccionada para a construção de eléctrodos selectivos de TC com configuração tubular.

VI.3.2 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMENTO DOS DETECTORES TUBULARES

Visando a avaliação das características gerais de funcionamento dos detectores tubulares, efectuada tanto para condições de ajuste de força iónica como para condições de ajuste simultâneo de pH e de força iónica, definiu-se inicialmente as condições experimentais a utilizar.

VI.3.2.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO SISTEMA FIA

Para os ensaios com ajuste da força iónica recorreu-se a uma montagem FIA de baixa dispersão (Figura II.15, p. II26), onde o transportador da amostra era uma solução de $ZnCl_2$ com concentração igual a $3{,}3x10^{-3}$ mol L^{-1}. Esta solução apresentava ainda uma concentração em ião principal igual a $1x10^{-7}$ mol L^{-1} (II.6.1.1.2, p. II26).

A selecção do volume de amostragem e da velocidade de fluxo da solução de transporte foi efectuada de acordo com o descrito em II.6.1.1.2, p. II26, mantendo uma distância de 20 cm entre a válvula de injecção e o eléctrodo selectivo. Utilizaram-se neste estudo volumes de amostragem iguais a 170, 270, 570 e 1070 μL e valores de velocidade de fluxo iguais a 4, 6 e 8 mL min^{-1}. Para a determinação do declive, necessário ao cálculo da dispersão (equação II.5, p. II29) injectaram-se no sistema soluções padrão de HCl.TC com concentrações iguais a $1x10^{-4}$, $5x10^{-4}$, $1{,}0x10^{-3}$ e $5{,}0x10^{-3}$ mol L^{-1}. Os cálculos de dispersão das soluções no interior da montagem foram efectuados em relação à solução de concentração igual a $5x10^{-3}$ mol L^{-1}.

A partir dos resultados obtidos (tabela VI.10) verificou-se genericamente um decréscimo da dispersão para o aumento do volume de amostragem.

tabela VI.10 Dispersão de uma solução de HCl.TC, de valor de concentração igual a $5x10^{-3}$ mol L^{-1}, relativamente ao volume de amostragem e à velocidade de fluxo usadas na montagem FIA de baixa dispersão.

Velocidade de fluxo / *Volume amostragem*	**4 mL min^{-1}**	**6 mL min^{-1}**	**8 mL min^{-1}**
170 µL	1,53	1,42	1,92
270 µL	1,04	1,21	1,30
570 µL	1,03	1,00	1,08
1070 µL	1,00	1,00	1,04

A associação entre volumes de amostragem de 270 µL e velocidades de fluxo de 6 ml min^{-1} garantiu uma baixa dispersão, sendo o sinal correspondente igual a 95% do sinal obtido em condições equivalentes ao estado estacionário. Com os valores seleccionados foi possível obter, sem perda evidente de sensibilidade, uma elevada frequência analítica e um baixo consumo de amostra e reagentes.

Para a caracterização dos detectores tubulares em condições de ajuste simultâneo de pH e de força iónica utilizou-se uma montagem de duplo canal (Figura II.17, p. II31). As soluções padrão e de amostra, previamente preparadas por diluição em água, foram injectadas numa solução de transporte constituída também por água. Os valores de pH e de força iónica foram ajustados em linha, por confluência com uma solução tampão constituída por $HCl/(CH_3COO)_2Zn$, com um pH igual a 3,5 unidades. Esta última solução apresentava, ainda, o dobro dos valores de força iónica e de concentração em HCl.TC relativamente à solução de transporte do sistema de baixa dispersão, dada a sua diluição a aproximadamente metade, por confluência com o canal de água.

A mistura das soluções confluentes foi assegurada por um reactor em malha. Por forma a obter uma mistura adequada testaram-se comprimentos de reactor iguais 30, 60 e 90 cm. Para estes comprimentos, comparou-se o sinal analítico fornecido pelo detector após a injecção de 270 μL de uma solução de HCl.TC ($5x10^{-4}$ mol L^{-1}) com aquele produzido pela passagem continua desta mesma solução de ião principal pelo detector. Durante este estudo manteve-se a velocidade de fluxo total igual a 6 mL min^{-1}.

tabela VI.11 Variação percentual do sinal analítico de uma solução de HCl.TC, de valor de concentração igual a $5x10^{-4}$ mol L^{-1}, com o comprimento de reactor.

Comprimento do reactor / *Condições do sistema*	**30 cm**	**60 cm**	**90 cm**
270 μL, 6 mL min^{-1}	96,5	96,0	92,2

Perante os resultados obtidos (tabela VI.11), seleccionou-se um reactor com um comprimento de 30 cm que, para além de provocar uma dispersão semelhante à proporcionada por comprimentos maiores, era suficiente para promover uma boa mistura da amostra, sem comprometer a frequência analítica.

Uma vez seleccionadas as condições de trabalho consideradas óptimas para as montagens FIA estabelecidas, efectuou-se o traçado de curvas de calibração da célula potenciométrica, tendo em vista a caracterização do detector tubular.

VI.3.2.2 PARÂMETROS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Para a execução experimental de curvas de calibração procedeu-se à injecção de soluções padrão de HCl.TC (II.6.1.1.2, p. II26), com concentrações compreendidas

entre $1x10^{-5}$ mol L^{-1} e $1x10^{-2}$ mol L^{-1}. De acordo II.6.1.2, p. II32, calcularam-se o LIRL e o declive, a partir dos dados gráficos das curvas obtidas. Os valores médios, bem como os desvios correspondentes foram indicados na tabela VI.12.

tabela VI.12 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de TC, tipo CTC3, com configuração tubular. Valores obtidos em condições de ajuste da força iónica (I) e de ajuste, simultâneo, do valor de pH e da força iónica.

Condições analíticas / *Características*	**I=1x10^{-2} mol L^{-1}**	**pH=3,5 I=1x10^{-2} mol L^{-1}**
LIRL (mol L^{-1})	$1,0x10^{-4}$	$1,2x10^{-4}$
Declive (mV década^{-1})	56,6±1,4	54,2±0,6
Repetibilidade (mV)	±0,3	±0,3
Frequência de amostragem (amostra h^{-1})	–	≈ 80
R^2	>0,9995	>0,9992

Em comparação com as características obtidas a partir dos eléctrodos convencionais CTC3, quando ensaiados em condições equivalentes, os detectores tubulares originaram características de resposta similares. Os melhores valores de LIRL e de sensibilidade registados para os detectores tubulares em condições de ajuste simultâneo dos valores de pH e de força iónica, constituem a excepção a essa semelhança.

A repetibilidade do sinal analítico dos eléctrodos tubulares foi determinada de acordo com II.6.1.2, p. II32, utilizando soluções de HCl.TC com valores de concentração iguais a $5x10^{-4}$ e $1x10^{-3}$ mol L^{-1}.

A frequência de amostragem (II.6.2, p. II35), que era a expressão do tempo de resposta dos detectores tubulares inseridos num sistema FIA apresentando as condições experimentais seleccionadas, foi igual a aproximadamente 80 amostras por hora.

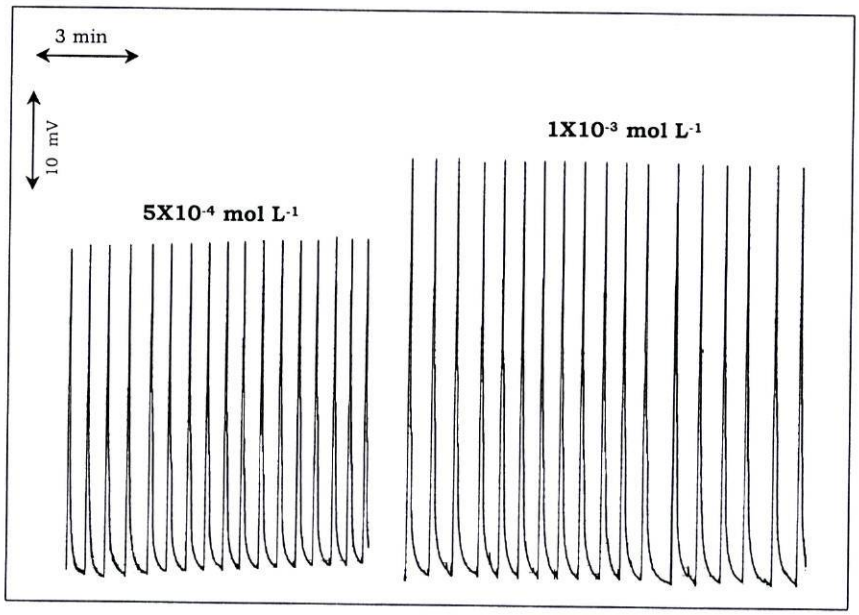


Figura VI.7 Repetibilidade do sinal analítico dos detectores tubulares selectivos de TC no sistema de baixa dispersão. Registo obtido para uma solução daquele ião, com valor de concentração igual a $5{,}0\times10^{-4}$ e $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}, com o comprimento de um reactor de 20 cm e com um volume de amostragem e uma velocidade de fluxo iguais a 270 µL e 6 mL min^{-1}, respectivamente.

VI.3.2.3 EFEITO DO pH NO POTENCIAL DOS DETECTORES TUBULARES

Para a determinação do intervalo de valores de pH, ao longo do qual a operacionalidade dos eléctrodos não dependia do valor desse parâmetro nas soluções de medida, recorreu-se à montagem FIA representada na Figura II.20, p. II39, tendo-se seguido os procedimentos indicados em II.6.3, p. II37.

As avaliações foram efectuadas para uma solução de HCl.TC, de concentração igual a 1×10^{-3} mol L^{-1}, com a força iónica fixada em 1×10^{-2} mol L^{-1}. Para as variações de pH escolheram-se soluções iguais àquelas utilizadas, para o mesmo estudo com os eléctrodos de configuração convencional. Nestas condições, os diagramas de

Reilley indicaram variações de potencial da célula potenciométrica inferiores a ± 5 mV para valores de pH compreendidos entre 1,9 e 3,9 unidades (Figura VI.8).

O intervalo de pH operacional aqui registado foi similar ao encontrado com as unidades convencionais correspondentes.

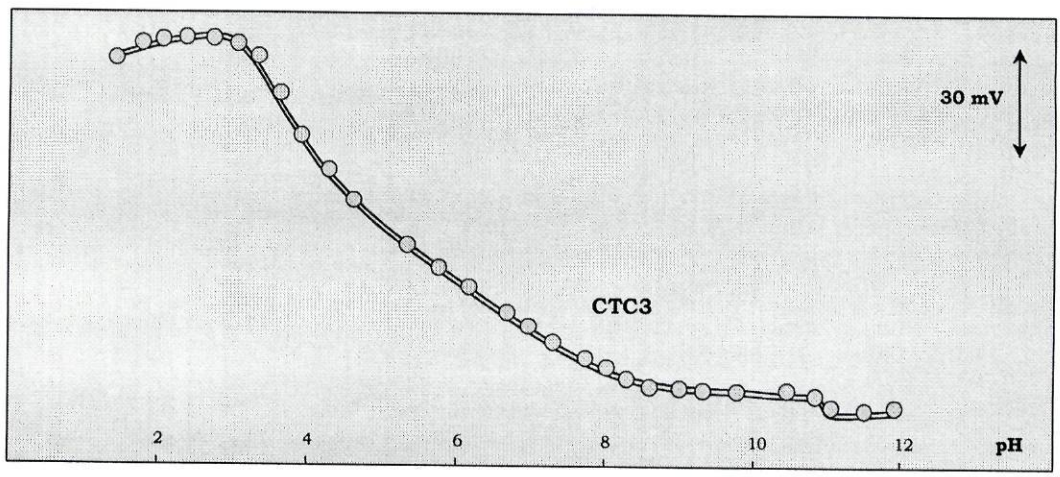


Figura VI.8 Diagrama de *Reilley* do eléctrodo selectivo de TC, tipo, obtido em soluções com força iónica igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1} e de concentração, em HCl.TC, igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}.

VI.3.2.4 DETERMINAÇÃO DE COEFICIENTES DE SELECTIVIDADE POTENCIOMÉTRICA

Para avaliar a extensão da interferência de algumas espécies iónicas nos detectores tubulares precedeu-se à determinação de logaritmos de $K^{pot}_{A,B}$, com base no método das soluções separadas. O procedimento seguido, descrito na secção II.6.4, p. II39, decorreu na montagem FIA de baixa dispersão (Figura II.15, p. II26). As soluções utilizadas eram iguais às envolvidas nos ensaios discretos correspondentes, porém preparadas em solução ajustadora da força iónica.

Os logaritmos de $K^{pot}_{A,B}$ médios obtidos e os respectivos desvios padrão, apresentados na tabela VI.13, indicaram um ligeiro decréscimo da selectividade para os detectores tubulares comparativamente aos eléctrodos convencionais correspondentes (Figura VI.9). Esta característica estava provavelmente relacionada com a presença de duas espécies interferentes nas soluções de medida, o catião em estudo e aquele constituinte do electrólito ajustador da força iónica. Com efeito, já para os eléctrodos de configuração convencional se tinha verificado um decréscimo da qualidade da resposta quando se passou das soluções sem a força iónica ajustada para outras em que este parâmetro se encontrava fixo.

tabela VI.13 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os detectores tubulares selectivos de TC, tipo CTC3. Valores obtidos em soluções aquosas com a força iónica igual a $1x10^{-2}$ mol L^{-1}.

	$\log K^{pot}_{A,B}$	**Tubulares, CTC3**
Interferente	*Concentração (mol L^{-1})*	
Potássio	$1,0x10^{-4}$	-0,88 ± 0,04
	$5,0x10^{-4}$	-1,60 ± 0,04
	$1,0x10^{-3}$	-1,81 ± 0,05
Sódio	$1,0x10^{-4}$	-0,78 ± 0,01
	$5,0x10^{-4}$	-1,54 ± 0,02
	$1,0x10^{-3}$	-1,79 ± 0,03
Cálcio	$1,0x10^{-4}$	-2,92 ± 0,04
	$5,0x10^{-4}$	-3,28 ± 0,03
	$1,0x10^{-3}$	-3,08 ± 0,04
Magnésio	$1,0x10^{-4}$	-2,88 ± 0,01
	$5,0x10^{-4}$	-3,23 ± 0,01
	$1,0x10^{-3}$	-3,33 ± 0,01
Oxitetraciclina	$1,0x10^{-4}$	+0,01 ± 0,02
	$5,0x10^{-4}$	-0,05 ± 0,00
	$1,0x10^{-3}$	-0,10 ± 0,00
Clortetraciclina	$1,0x10^{-4}$	+0,04 ± 0,01
	$5,0x10^{-4}$	+0,10 ± 0,01
	$1,0x10^{-3}$	+0,20 ± 0,00

Esse decréscimo de selectividade fez-se sentir com maior evidência por parte das espécies inorgânicas estudadas. Este efeito resultou provavelmente da maior mobilidade destas espécies, comparativamente às espécies orgânicas, de dimensões significativamente superiores.

Após caracterização e discussão do comportamento das várias unidades, avaliou-se de seguida a sua utilidade analítica, aplicando-as no doseamento e no ensaio de dissolução de HCl.TC, em especialidades farmacêuticas sólidas, para administração oral.

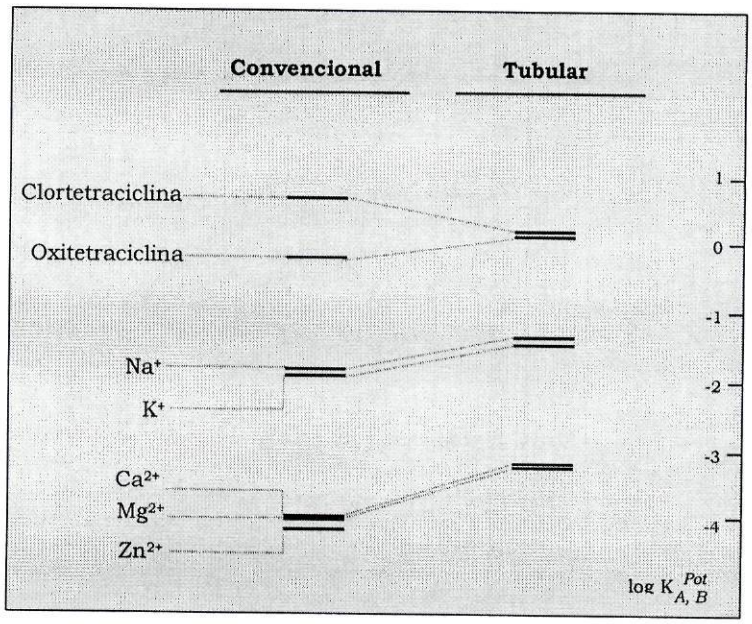


Figura VI.9 Diagrama representativo da variação dos valores de log $K^{pot}_{A,B}$ dos eléctrodos selectivos de HCl.TC, tipo CTC3, quando determinados na sua configuração convencional ou tubular. Valores encontrados para soluções de concentração igual a $5x10^{-4}$ mol L^{-1}.

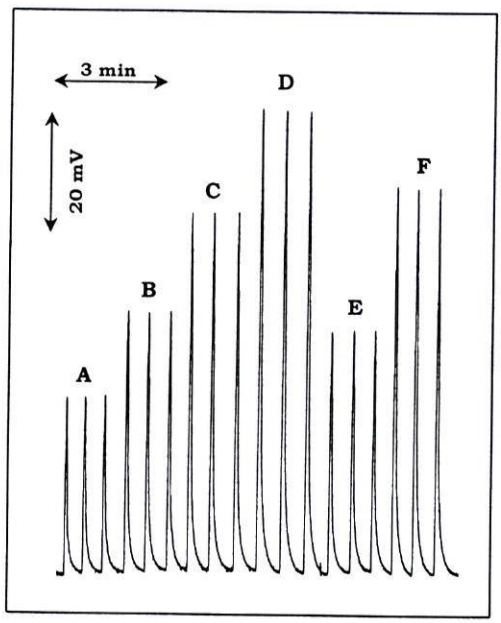
VI.3.3 ANÁLISE DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

As análises de Ciclobiótico®, uma especialidade farmacêutica na forma de cápsulas e comercializada com 250 e 500 mg de HCl.TC, foram efectuadas tanto com os eléctrodos convencionais de tipo CTC3 como com os detectores tubulares correspondentes.

As análises de soluções diluídas de amostra, preparadas de acordo com o descrito em VI.2.4, foram realizadas após a curva de calibração dos eléctrodos no intervalo de concentrações compreendido entre $5{,}0\times10^{-4}$ e $4{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}. Os valores médios destas análises, bem como os desvios padrão correspondentes, foram indicados na tabela VI.14, encontrando-se representado na Figura VI.10 um exemplo típico de uma análise e da calibração precedente, realizada com os detectores tubulares.

Figura VI.10 Registo de uma curva de calibração do detector tubular tipo CTC3, efectuada com quatro soluções padrão de HCl.TC (A, B, C e D), seguida da análise da solução de amostra diluída (E) e do ensaio de recuperação correspondente (F).

A: $5{,}0\times10^{-4}$ mol L^{-1}
B: $1{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}
C: $2{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}
D: $4{,}0\times10^{-3}$ mol L^{-1}
E: $7{,}0\times10^{-4}$ mol L^{-1}
F: $2{,}1\times10^{-3}$ mol L^{-1}



Por forma a estimar a qualidade dos resultados das análises potenciométricas de Ciclobiótico®, precedeu-se à execução de ensaios de recuperação. Os valores de concentração médios obtidos foram muito próximos do valor teoricamente esperados, sugerindo a exactidão dos resultados. A boa precisão destes ensaios foi mesmo confirmada pelos baixos valores de desvio padrão das medidas potenciométricas, sempre inferiores a 5 %. É contudo de realçar a maior precisão das determinações efectuadas com os detectores tubulares, o que resultou provavelmente da maior repetibilidade do sinal analítico destas unidades, comparativamente à encontrada para os eléctrodos convencionais.

tabela VI.14 Resultados da determinação potenciométrica de TC em formulações farmacêuticas em condições discretas, com os eléctrodos convencionais, e em FIA, com os detectores tubulares, recorrendo a membranas selectivas de tipo CTC3 e pela execução da monografia de referência da USP, 1995.

Condições analíticas / *Formulações farmacêuticas*	**Discretas**		**FIA**		**USP**
	C (mg/cápsula)	recuperação (%)	*C* (mg/cápsula)	recuperação (%)	(mg/Cápsula)
Ciclobiótico, 250 mg	249,1 ± 10,6	100,2 ± 1,1	250,2±4,2	100,3±1,5	258,1 ± 8,5
Ciclobiótico, 500 mg	495,6 ± 19,4	98,6 ± 1,2	497,1±8,5	99,5±0,7	490,5 ± 22,0

Efectuou-se, ainda, a comparação entre os resultados das análises potenciométricas e aqueles obtidos pela execução de um ensaio independente, tendo-se escolhido aqui o ensaio de doseamento presente na monografia da USP, 1995. A igualdade estatística entre os valores médios dos dois ensaios foi comprovada pelo teste *t de Student*. Para as amostras de Ciclobiótico de 250 e 500 mg, encontraram-se, respectivamente, valores de *t* iguais a 0,689 e 0,530 nas análises discretas e a 0,132 e 0,140 nas análises em fluxo. Estes valores foram sempre inferiores ao valor de *t* tabelado (2,262), e eram relativos a um nível de confiança de 95% e a um

número de ensaios, *n*, igual a 10. Estatisticamente não existiram, portanto, diferenças significativas entre os valores decorrentes das análises potenciométricas e os das análises efectuadas pela execução do método independente proposto na USP, 1995, concluindo-se assim a sua exactidão.

Além da determinação do teor de HCl.TC em cápsulas, procedeu-se ainda à automatização dos ensaios de dissolução descritos na monografia da USP, 1995, correspondente, através da inserção dos detectores tubulares numa montagem FIA de duplo canal adaptada para o efeito (Figura VI.3).

Após calibração da célula potenciométrica, deu-se início ao ensaio de dissolução, de acordo com o indicado em VI.2.5. Para a monitorização da dissolução do HCl.TC, incorporado na formulação, no meio de dissolução, injectou-se uma toma de 270 µL desse meio, em intervalos de 3 minutos. Dada a existência de partículas em suspensão nesse meio de dissolução, provenientes da forma farmacêutica, a inserção desta amostra no sistema requeria um filtragem prévia (Figura VI.3). O sistema de filtração adaptado permitia obviar a entrada de partículas de grandes dimensões para o interior do sistema, sem que a aspiração de amostra para o canal do válvula de injecção oferecesse demasiada resistência.

Dado que a dissolução daquele fármaco decorria com maior velocidade nos primeiros minutos, as primeiras leituras foram efectuadas com intervalos de 1 minuto. A partir dos 20 minutos de ensaio, e até ao 60 minutos, a quantidade de HCl.TC no meio de dissolução permanecia constante, indicando que a dissolução do fármaco estava completa neste estágio do processo (Figura VI.11). Dado que a monitorização do ensaio até aos 60 minutos não contribuía com informações adicionais, com excepção de demonstrar que o sistema implementado apresentava a repetibilidade suficiente para a realização de um ensaio tão longo, sem necessidade de re-calibração periódica, alguns ensaios foram realizados por um período de apenas 30 minutos.

Os valores percentuais médios de fármaco dissolvido no meio de dissolução ao fim de 30 minutos de ensaio encontram-se indicados na tabela VI.15. As especialidades farmacêuticas em questão correspondem por isso ao requisitos indicados na farmacopeia, onde se refere um dissolução de pelo menos 70% do fármaco ao fim de 60 minutos. Esta situação não é pois estranha, uma vez que os produtos comercializados teriam já sido submetidos a este controlo analítico.

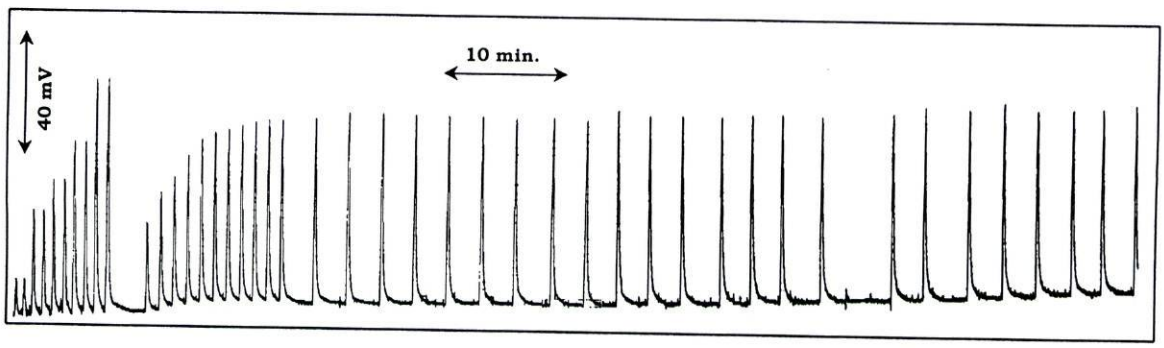


Figura VI.11 Registo de uma calibração da célula de eléctrodo selectivo tubular com cinco soluções padrão de HCl.TC ($1,2x10^{-4}$, $4,0x10^{-4}$, $6,0x10^{-4}$, $1,0x10^{-3}$ e $2,0x10^{-3}$ mol L^{-1}) seguida de ensaio de dissolução de Ciclobiótico®, cápsulas, 500 mg HCl.TC.

tabela VI.15 Valor percentual da dissolução de cápsulas de HCl.TC indicados pelos detectores tubulares ao final de 30 minutos de ensaio.

Dosagem da formulação comercial, Ciclobiótico®	**250 mg**	**500 mg**
% dissolução	103,5 98,8 99,8 94,8 94,9 96,6	101,5 101,6 100,4 99,0 98,5 103,1
Valor médio	98,1	100,7
Desvio padrão	3,3	1,7

Por motivos de comparação, procedeu-se ainda à execução do procedimento proposto na USP, 1995, para os ensaios de dissolução de cápsulas de HCl.TC. Os valores percentuais médios de fármaco dissolvido para o Ciclobiótico® de 250 e de 500 mg foram iguais a 102,7 ± 5,2 e 101,5 ± 5,0, respectivamente. Embora estes resultados tenham sido concordantes com aqueles fornecidos com o sistema potenciométrico, assumindo que a dissolução do fármaco estaria completa aos 30 minutos, eles decorrem de leituras de tomas de amostra ao final de 60 minutos de ensaio.

Confirmou-se assim a aplicabilidade do detector tubular selectivo de TC na automatização de ensaios de dissolução *in vitro*, permitindo a determinação da quantidade dissolvida de HCl.TC ao fim de um determinado período de tempo, tal como o requerido nas monografias propostas nas mais diversas farmacopeias. Adicionalmente, o acompanhamento da dissolução do fármaco, com resultados analíticos muito próximos ao tempo real do processo de dissolução, conduziu ainda ao registo de valores que permitem a avaliação da cinética desse processo.

VI.4 CONCLUSÕES

Através da preparação de eléctrodos selectivos de TC, com configuração convencional, tendo como base diferentes membranas sensoras foi possível a selecção de uma unidade potenciométrica de características adequadas à determinação de TC em formulações farmacêuticas, sobretudo com relação à sua selectividade. A membrana escolhida foi obtida por dissolução de tretrakis(4--clorofenil)borato de TC em *b*EHS, e posterior imobilização em PVC.

A utilização desta membrana na construção de detectores tubulares selectivos de TC para incorporação em sistemas FIA conduziu a uma automatização dos procedimentos analíticos envolvidos na determinação de HCl.TC em produtos farmacêuticos. Os valores encontrados foram confrontados com aqueles resultantes da execução dos procedimentos propostos na USP, 1995, para o efeito, confirmando--se assim a exactidão análises potenciométricas.

Os detectores tubulares foram ainda aplicados com sucesso, na automatização dos ensaios de dissolução descritos para as cápsulas de HCl.TC na USP, 1995. Para os bons resultados obtidos houve uma grande contribuição das características dos detectores tubulares, nomeadamente no que diz respeito à selectividade e repetibilidade do sinal analítico.

Pelas razões indicadas, os métodos potenciométricos, quer com os eléctrodos convencionais, quer com os eléctrodos tubulares em sistemas FIA, constituem uma alternativa de grande importância aos métodos descritos na literatura para o controlo analítico de formulações com HCl.TC.

VI.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-KHALEK M. M., MAHROUS M. S. (**1983**). Spectrophotometric determination of Tetracyclines and cephalosporins with ammonium vanadate. *Talanta*, 30, 792-794.

ALWARTHAN A. A., TOWNSHEND A. (**1988**). Determination of tetracycline by flow injection with chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta*, 205, 261-265.

ALBERT A., REES C. W. (**1956**). Avidity of the tetracyclines for the cations of metals. *Nature*, 177, 433-434.

ASCIONE P. P., ZAGAR J. B., CHREKIAN G. P. (**1967**). Tetracyclines II. Separation and determination by column chromatography. *J. Pharm. Sci.*, 56, 1396-1400.

AYAD M., EL-SADEK M., MOSTAFFA S. (**1986**). 4-Aminoantipyrine as an analytical reagent for the colorimetric determination of tetracycline and oxytetracycline. *Anal. Lett.*, 19, 2169-2181.

BERSIER P. M., BERSIER J. (**1994**). Polarographic, voltammetric, and HPLC-EC of pharmaceutically relevant cyclic compounds. *Electroanalysis*, 6, 171-191.

CHATTEN L. G., KRAUSE S. I. (**1971**). Colorimetric assay of tetracycline antibiotics. *J. Pharm. Sci.*, 60, 107-110.

DIVAKAR T. E., TUMMURU M. K., SASTRY C. S. P. (**1984**). Spectrophotometric estimations of tetracyclines, streptomycin and chloramphenicol using brucine and sodium metaperiodate. *Indian Drugs*, 22, 28-30.

DRUG EVALUATIONS (**1986**). *Drug Evaluations*. Capítulo 69, *Tretracyclines and chloramphenicol*. American Medical Association, Saunders W. B. Company, 6ª edição, pp. 1409-1416.

EL-JAMMAL A., BOUKLOUZE A. A., PATRIARCHE G. J. (**1991**). Use of ethylene-vinyl-acetate as a new membrane matrix for calcium ion-selective electrode preparation. *Talanta*, 38, 929-935.

EL-SADEK M., AYAD M., MOSTAFFA S. (**1987**). New colorimetric method for determination of tetracycline and oxytetracycline via charge transfer complex formation. *Anal. Lett.*, 20, 1885-1893.

ELSAYED M. A. H., BARARY M. H., MAHGOUB H. (**1985**). Kinetic method of tetracycline and oxytetracycline assay using spectrophotometric measurements. *Anal. Lett.*, 18, 1357-1373.

EMARA K. M., ASKAL H. F., SALEH G. A. (**1991**). Spectrophotometric determination of tetracycline and oxytetracycline in pharmaceutical preparations. *Talanta*, 38, 1219-1221.

FARMACOPEIA EUROPEIA (**1993**). European Pharmacopoeia, 2nd edition. Monograph 210. Maisonneuve Sainte-Ruffine, France.

FERNANDEZ A. A., NOCEDA V. T., CARRERA E. S. (**1969**). Simultaneous separation and quantitative determination of tetracycline, anhydrotetracycline, 4-epitetracycline and 4-epianhydrotetracycline in degraded tetracyclines by thin-layer chromatography. *J. Pharm. Sci.*, 58, 443-446.

FIEDLER U., RUZICKA J. (**1973**). Selectrode - the universal ion-selective electrode. Part VII. A valinomycin based potassium electrode with nonporous polymer membrane and solid-state inner reference system. *Anal. Chim. Acta*, 67, 179-193.

FOUCHET M. A. (**1956**). Dosage des tétracyclines. *Annales Pharm. Franc.*, 14, 36-38.

GATSONIS G. D., AGELOUDIS C. A. (**1982**). Quantitative determination of antibiotics by means of densitometry on TLC. *Pharmazie*, 37, 649-650.

GONG Z. L., ZHANG Z. J. (**1997**). Determination of tetracyclines with a modified β-cyclodextrin based fluorosensor. *Anal. Chim. Acta*, 351, 205-210.

GUPTA R. P., TIWARI O. P., YADAV B. N., SRIVASTAVA A. A. (**1980**). Colorimetric determination of tetracycline-HCl using sulphanilamide as the colour reagent. *Chemical Era*, 16, 161-163.

HALVATZIS S. A., POTAMIA M. M. T., CALOKERINOS A. C. (**1993**). Continuous-flow chemiluminometric determination of tetracyclines in pharmaceutical preparations and honey by oxidation with n-bromosuccinimide. *Analyst*, 118, 633-637.

HARVEY S C. (**1990**). *Remington's. Pharmaceutical Sciences*. Capítulo 62, *Antimicrobial Drugs*. GENNARO A. R., editor. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 18ª edição, p. 1197.

HENDRIX C., ROETS E., CROMMEN J., DE-BEER J., PORQUERAS E., VAN-DER-BOSSCHE W., HOOGMARTENS J. (**1993**). Collaborative study of the analysis of tetracycline by liquid chromatography on poly(styrene-divinylbenzene). *J. Liq. Chromatogr.*, 16, 3321-3329.

HEYDEN Y. V., MASSART D. L., ZHU Y., HOOGMARTENS J., DE-BEER J. (**1996**). Ruggedness tests on the high-performance liquid chromatography assay of the united states pharmacopoeia 23 for tetracycline hydrochloride: comparison of different columns in an inter-laboratory approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14, 1313-1326.

JI H., WANG E. (**1988**). Flow injection amperometric detection based on ion transfer across a water-solidified nitrobenzene interface for the determination of tetracycline and terramycin. *Analyst*, 113, 1541-1543.

KHAN N. H., WERA P., ROETS E., HOOGMARTENS J. (**1990**). Quantitative analysis of tetracycline by high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene packing materials. *J. Liq. Chromatogr.*, 13, 1351-1374.

KAKEMI K., Uno T., SAMEJIMA M. (**1955**). Chemical methods for the determination of antibiotics. III. colorimetric determination of tetracycline. *J. Pharm. Soc. Jap.*, 75, 970-972.

KARLÍČEK R., SOLICH P. (**1994**). Flow-injection spectrophotometric determination of tetracycline antibiotics. *Anal. Chim. Acta.*, 285, 9-12.

LI Z., FENG M., LU J., GONG Z., JIANG H. (**1997**). Flow injection chemiluminescence determination of tetracyclines. *Anal. Lett.*, 30, 797-807.

LIU W., WANG Y., TANG J., SHEN G., YU R. (**1998**). Optical fiber sensor for tetracycline antibiotics based on fluorescence quenching of covalently immobilized anthracene. *Analyst*, 123, 365-369.

MAHROUS M. S., ABDEL-KHALEK M. M. (**1984**). Spectrophotometric determination of phenothiazines, tetracyclines and chloramphenicol with sodium cobaltinitrite. *Talanta*, 31, 289-291.

MAHGOUB A. E., KHAIRY E. M., KASEM A. (**1974**). Complex formation of uranyl acetate with tetracycline and its utilization for their microdetermination. *J. Pharm. Sci.*, 63, 1451-1455.

MARTINDALE (**1993**). *Martindale. The Extra Pharmacopeia*. REYNOLDS J. E. F., editor. The Pharmaceutical Press, London, 30ª edição, p. 213.

MOODY G. J., THOMAS J. D. R., LIMA J. L. F. C., MACHADO A. A. S. C. (**1988**). Characterisation of poly(vinyl chloride) barium ion-selective electrodes without inner reference solution. *Analyst*, 113, 1023-1027.

MORENO A. F., García M. E. D., Medel A. S. (**1993**). Room temperature phosphorescence optosensor for tetracyclines. *Anal. Chim. Acta*, 281, 637-644.

OKADA T. SUGIHARA H., HIRATANI K. (**1995**). Role of plasticizers on the characteristics of poly(vinyl chloride)-membrane lithium-selective electrodes based on phenanthroline derivatives. *Analyst*, 120, 2381-2386.

PAZ J. L. L., CALATAYUD J. M. (**1998**). Flow injection analysis (FIA) methodology: its application in the dissolution testing of oral dosage forms. *Pharm. Tech. Europe*, 10, 16-22.

PRISTA L. N., ALVES A. C., MORGADO R. (**1995**). *Tecnologia Farmacêutica.* I Volume. Capítulo 6, *Formas Farmacêuticas Obtidas por Dispersão Mecânica.* Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, 5ª edição, p. 576.

RAO G. R., AVADHANULU A. B., GIRIDHAR R. (**1989**). Spectrophotometric estimation of tetracyclines in their formulations using sodium tungstate as reagent. *Indian Drugs,* 26, 298-300.

SANDE M. A., MANDELL G. L. (**1992**). *Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics.* Volume 2. Secção XI, *Chemotherapy of Microbial Diseases.* Capítulo 48, *Antimicrobial Agents: Tetracyclines, Chloramphenicol, Erithromycin, and Miscellaneous Antibacterial Agents.* GILMAN A. F., RALL T. W., NIES A. S., TAYLOR P., editores. McGraw Hill International Editions. 8ª edição.

SAHA U., SEN A. K., DAS T. K., BHOWAL S. K. (**1990**). Spectrophotometric determination of tetracyclines in pharmaceutical preparations, with uranyl acetate. *Talanta,* 37, 1193-1196.

SAHA U. (**1987**). Colorimetric determination of tetracycline hydrochloride in pharmaceutical preparations. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.,* 70, 686-688.

SASTRY C. S. P., SRINIVAS K. R., PRASAD K. M. M. K. (**1996**). Spectrophotometric determination of drugs in pharmaceutical formulations with N-bromosuccinimide and celestine blue. *Mikrochim. Acta,* 122, 77-96.

SHOUKRY A. F., BADAWY S. S. (**1987**). Determination of tetracycline and related compounds using plastic membrane ion-selective electrodes. *Michrochem. J.,* 36, 107-112.

SIMPSON D. L., KOBOS R. K. (**1984**). Microbiologial assay of antibiotics based on inhibition of ammonia produtction monitored with an ammonia electrode. *Anal. Chim. Acta,* 164, 273-277.

SIMPSON D. L., KOBOS R. K. (**1982**). Microbiological assay of tetracycline with a potentiometric CO_2 gas sensor. *Anal. Lett.,* 15, 1345-1359.

SULTAN S. M. (**1986**). Spectrophotometric determination of tetracycline with sodium molybdate. *Analyst,* 111, 97-99.

SULTAN S. M., ALZAMIL I. Z., ALARFAJ N. A. (**1988**). Complexometric – spectrophotometric assay of tetracyclines in drug formulations. *Talanta,* 35, 375-378.

SULTAN S. M., SULIMAN F. E. O., DUFFUAA S. O., ABU-ABDOUN I. I. (**1992**). Simplex-optimized and flow injection spectrophotometric assay of tetracycline antibiotics in drug formulations. *Analyst,* 117, 1179-1183.

SYROPOULOS A. B., CALOKERINOS A. C. (**1991**). Continuous-flow chemiluminometric determination of some tetracyclines. *Anal. Chim. Acta,* 255, 403-411.

TANASE I. G., DAVID I. G., RADU G. L., IORGULESCU E. E., MAGEARU V. (**1996**). Optimised electroanalysis of tetracycline by alternating current polarography. *Analusis,* 24, 281-284.

TSUJI K., ROBERTSON J. H. (**1976**). Analysis of tetracycline in pharmaceutical preparations by improved high-performance liquid chromatographic method. *J. Pharm. Sci.,* 65, 400-404.

USP (1995). Tetracycline Hydrochloride Capsules Official Monograph. United States Pharmacopoeial Convention. *United States Pharmacopoeia XXIII,* Rockville, MD, p. 1510.

VESELINOVIC D., STANKOV M. J. (**1989**). Complex compounds of tetracycline with WO_4^{2-} and MoO_4^{2-} ions. Investigation by pH-metrix and conductometric methods. *Mikrochim. Acta,* 1, 329-336.

VOGT H. (**1956**). Beiträge zur chemischen wertbestimmung von tetracyclin. *Archiv der Pharmazie,* 289, 502-508.

VYTRAS K. (**1989**). The use of ion-selective electrodes in the determination of drug substances. *J. Pharm. Biomed. Anal.,* 7, 789-812.

WAHBI A. A. M., BARARY M, MAHGOUB H., ELSAYED A. H. (**1985**). pH-induced difference, spectrophotometric assay of tetracycline and oxytetracycline. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68, 1045-1048.

WANG Y., LIU W. H., WANG K. M., SHEN G. L. , YU R. Q. (**1998**). Fluorescence optical-fibre sensor for tetracycline. *Talanta*, 47, 33-42.

WOOLFORD M. H, JR., CHICCARELLI F. S. (**1956**). The assay for tetracycline HCl and chlortetracycline HCl in tetracycline HCl. *J. Amer. Pharm. Assoc.*, 45, 400-401.

ZHANG X. R., BAEYENS W. R. G., VAN DEN BORRE A., VAN DER WEKEN G., CALOKERINOS A. C., SCHULMAN S. G. (**1995**). Chemiluminescence determination of tetracyclines based on their reaction with hydrogen peroxide catalysed by the copper ion. *Analyst*, 120, 463-466.

ZHOU Y. S., JING S., HUA N. L. (**1989**). Amphoteric tetracycline-sensitive electrodes and their selectivities. *Talanta*, 36, 849-854.

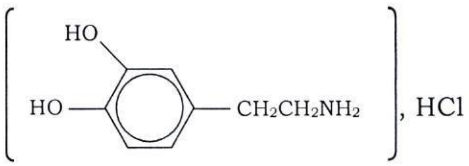
DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA

VII. 1 INTRODUÇÃO

A dopamina (DOP) é uma catecolamina natural, formada pela descarboxilação de 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), sendo também um percursor da norepinefrina em nervos noradrenérgicos. A DOP é ainda um neurotransmissor, actuando ao nível de algumas áreas do sistema nervoso central e de alguns nervos simpáticos periféricos (Harvey, em *Remington's*, 1990). A DOP é portanto um agente adrenérgico, desempenhando uma actividade adrenomimética, mais vulgarmente designada por simpaticomimética, sendo a sua acção exercida de uma forma directa ou indirecta (*Martindale*, 1993).

A DOP é aplicada mais frequentemente no tratamento de *shock*, sendo para isso administrada sob a forma de cloridrato (HCl.DOP, Figura VII.1), incorporada em formulações injectáveis (*Drug Evaluations*, 1986). Actualmente, a sua aplicação em Portugal reporta-se apenas a uso exclusivo hospitalar, para o qual se encontram disponíveis ampolas injectáveis, de 5 mL, contendo 200 mg de HCl.DOP.

Figura VII.1 Cloridrato de dopamina (HCl.DOP).
$C_8H_{11}NO_2.HCl$
189,64 g mol^{-1}.



Para a determinação de HCl.DOP em injectáveis, a USP, 1995, propõe uma monografia baseada numa separação, por HPLC, com posterior detecção espectrofotométrica, a 280 nm. Muito embora constitua uma metodologia vulgarmente empregue na análise de matrizes complexas, o recurso àquela técnica separativa pressupõe geralmente a falta de um sistema simples que, com rapidez, permita efectuar análises rigorosas de compostos incorporados em formulações farmacêuticas.

Outros métodos alternativos para o doseamento de HCl.DOP em produtos farmacêuticos surgem também na literatura, sendo a maioria baseada em métodos espectrais, mais concretamente na técnica de espectrofotometria de UV/Vis. Genericamente, os ensaios discretos são baseados numa série de etapas convencionais com vista ao desenvolvimento de um composto corado (tabela VII.1). Estes procedimentos, embora fornecendo resultados adequados, são contudo morosos. No sentido de aumentar a rapidez da determinação e de diminuir o consumo de reagentes, foram entretanto estabelecidos alguns procedimentos baseados na técnica de análise por injecção em fluxo ou na de *stopped-flow* (tabela VII.2).

tabela VII.1 Determinações discretas de DOP baseadas em técnicas espectrofotométricas

	Sensibilidade ($L\ mol^{-1}\ cm^{-1}$)	Linearidade ($\mu g\ mL^{-1}$)	Algumas etapas envolvias	Referência Bibliográfica
Ultravioleta Visível	10711 (418 nm)	2-8	+ cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona-hidrazona (MBTH) + sulfato de amónio cérico em ácido + leitura entre 30 e 120 minutos	Dutt *et al.*, 1992
	29200 (— nm)	≈1-13	+ tampão acetato (pH 5,5) + EDTA e solução de *Bengal Rose* + desarejamento por 15 minutos + irradiação por lâmpada de halogéneo + medição do tempo necessário para a redução a 10% da absorvância inicial	Lozano *et al.*, 1991
	≈3982 (465 nm)	5-45	+ acetona + repouso de 10 minutos + adição de metaperiodato de sódio + aquecimento a 60±5 °C/3-7 min + arrefecimento e diluição em etanol	El-Kommos *et al.*, 1990
	— (298 nm)	1-30	+ Na_2WO_4 + leitura até aos 40 min	Rao *et al.*, 1988
	— (540 nm)	2,5-81	+ tampão de glicina + reagente $FeSO_4$ / citrato + leitura até 1 hora	
	24000 (504 nm)	1-8	+ semicarbazida e NaOH + diluição com propan-2-ol + repouso de 45 minutos	El-Kommos *et al.*, 1987
	18960 (600 nm)	2-12	+ reagente de *Folin-Ciocalteau* + hidróxido de sódio	Sane *et al.*, 1987
	6630 (520 nm)	4-24	+ *p*-feniletilenodiamónio + hidróxido de sódio	
	28450 (405 nm)	2-10	+ resorcinol + hidróxido de sódio	
	8530 (520 nm)	2,5-20	+ 4-aminofenazona + hexacianoferrato de potássio + carboanto de sódio	
	3540 (475 nm)	5-40	+ metaperiodato de potássio + etanol	
	2850 (440 nm)	2-24	+ *p*-aminoacetofenona, em meio ácido + metaperiodato + leitura entre 15 e 65 minutos	Sastry *et al.*, 1985

tabela VII.2 Determinações espectrofotométricas de DOP em fluxo.

	Frequência analítica (amostra h^{-1})	Linearidade ($\mu g\ mL^{-1}$)	Algumas etapas envolvias	Referência Bibliográfica
Ultravioleta Visível	—	1,0-37,9 (360 nm)	(*Stop-flow*) ▫ 350 µL de amostra em NaOH (aquecido a 60 °C) ▫ reactor de 1 m (0,5 mm d.i.) ▫ fluxo total de 1,25 mL min^{-1}	Nevado *et al.*, 1997
	240	9,5-142,2 (475 nm)	(FIA) ▫ 25 µL de amostra ▫ solução de transporte de tampão fosfato ▫ reactor com tirosinase ▫ 0,9 mL min^{-1}	Ortega *et al.*, 1996
	130	≈3,8-37,9 (390 nm)	(FIA) ▫ 350 µL de amostra (em tampão acetato) ▫ transportador de água (65 °C) ▫ confluência com NaOH (65 °C) ▫ reactor (2 m; 0,5 mm d.i.); ▫ fluxo total de 4,0 mL min^{-1}	Nevado *et al.*, 1996
	130	≈4-38 (473 nm)	(FIA) ▫ 200 µL de amostra (tampão acetato) ▫ solução de transporte de periodato ▫ reactor de 160 cm (65 °C) ▫ fluxo de 3 mL min^{-1}	Nevado *et al.*, 1995
Luminescência	80	≈0,1-10	(FIA) 500 µL de amostra oxidada com KNO_3 em meio ácido e na presença de formaldeído	Deftereos *et al.*, 1993

Dado que todos estes trabalhos propõem como processo de detecção um método óptico, a sua aplicabilidade analítica é contudo reduzida, em termos de concentração. Além disso, requerem procedimentos que permitam obviar problemas inerentes à turvação, à coloração, ao índice de refracção de amostras, etc..

Surgem ainda descritos na literatura alguns métodos separativos, nomeadamente o trabalho desenvolvido por Sleckman *et al.*, 1983, onde se refere a separação e quantificação de algumas catecolaminas com base na utilização da cromatografia em camada fina. Outros trabalhos envolvendo a cromatografia líquida, em particular sistemas de HPLC, são os mais frequentes. Entre eles, Brown *et al.*, 1987, consegue a separação de produtos de degradação e de excipientes em 2 minutos, recorrendo a um sistema constituído por uma fase estacionária de sílica

C18, uma fase móvel constituída por acetonitrilo, ácido acético, octanosulfonato de sódio e EDTA e um detector espectrofotométrico, sintonizado a 280 nm. Para a mesma técnica de detecção, Camanas *et al.*, 1995, estabelece entretanto um sistema constituído por uma coluna C18 e uma fase móvel constituídas por dodecilsulfato de sódio, propanol e tampão acetato. Ragab *et al.*, 1995, estabelece também um sistema baseado em HPLC, desta vez com detecção chemiluminescente. Este trabalho requer a derivatização do analito, recorrendo-se para isso a um procedimento que envolve vários reagentes e a incubação da mistura reaccional a 37°C, por um período de 25 minutos. Os produtos resultantes são separados no sistema cromatográfico e de seguida misturados, num reactor em pós-coluna, com *bis*-[4-nitro-2-(3,6,9--triocadeciloxicarbonil)fenil]oxalato e peróxido de hidrogénio. O sinal analítico resultante é detectado a 450-700 nm, registando-se linearidade para um intervalo de concentrações compreendido entre 0,5 e 100 fmol L^{-1}. Embora permitindo quantificar baixos valores de concentração de DOP ou identificar outras espécies dela derivadas, as análises efectuadas com recurso aos métodos separativos são de difícil execução e morosas, tornando-se por isso pouco expeditas, e podem envolver um consumo elevado de reagentes, alguns deles tóxicos.

Ainda com o objectivo de determinar DOP em formulações farmacêuticas, surgem também as técnicas electro-analíticas, nomeadamente a voltametria e a amperometria. No que diz respeito às técnicas voltamétricas, surge na literatura o trabalho desenvolvido por Peng *et al.*, 1993, dedicado ao doseamento de DOP em formas injectáveis. Esta determinação é feita com base na oxidação da DOP, em meio tamponado, para a qual os autores recorrem a um micro-eléctrodo de fibra de carbono, multi-cilíndrico, acoplado a um eléctrodo de carbono vítreo convencional. O sistema estabelecido fornece sinais analíticos lineares com a concentração de DOP, para valores compreendidos entre 0,5 μmol L^{-1} e 0,1mmol L^{-1}. Neste trabalho regista-se contudo uma forte interferência de Fe (II).

Fogg *et al.*, 1985, propõe para a determinação de DOP em formulações farmacêuticas um sistema FIA com detecção amperométrica, recorrendo a um eléctrodo de mercúrio de gota pendente. As calibrações decorrem a +0,26 V, em relação ao eléctrodo saturado de calomelanos, e são lineares entre 0,1 e 60 $\mu g\ mL^{-1}$. Além de um intervalo de linearidade estreito, o método proposto envolve ainda a utilização de mercúrio, elemento de elevada toxicidade. O anião cloreto constitui também uma interferência significativa, o que em formulações injectáveis se torna crítico.

Mais recentemente, Ortega *et al.*, 1996, estabelece um sistema FIA onde decorre a reacção entre a tirosinase, imobilizada em reactor, e a DOP, com posterior detecção amperométrica, a –0,050 V em relação ao eléctrodo saturado de calomelanos. O sinal indicado por um eléctrodo de grafite é linear entre 0,005 e 1 $mmol\ L^{-1}$. Embora com uma frequência analítica de 240 amostras por hora, este sistema requer a renovação periódica da coluna enzimática, o que constitui uma limitação em termos de análises de rotina.

No que diz respeito a determinações potenciométricas, dedicadas ao doseamento de catecolaminas em produtos farmacêuticos, encontra-se apenas um trabalho na literatura, baseado na reacção entre compostos aminados e o 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno. Este trabalho, estabelecido por Malaki *et al.*, 1989, avalia o efeito de vários surfactantes na extensão daquela reacção e o efeito catalítico de micelas de brometo de hexadeciltrimetilamónio para a mesma reacção. O estudo é feito utilizando um eléctrodo selectivo de fluoreto. Apesar da determinação cinética catalisada por micelas ser aplicada à determinação de catecolaminas em produtos farmacêuticos, a DOP não é contemplada nestes ensaios.

Dada a inexistência na literatura de procedimentos expeditos, simples, de baixo custo e que não apresentem interferências significativas de outras espécies, propõe-se neste trabalho a implementação de um sistema FIA associado a detecção potenciométrica.

Embora a construção de um eléctrodo selectivo à forma iónica da DOP e com boas características de funcionamento permitisse efectuar leituras directas daquele fármaco, pretende-se, desta vez, estabelecer um procedimento baseado na reacção de oxidação de DOP pelo periodato (PER), um oxidante forte, amplamente utilizado em química analítica (Efstathiou *et al.*, 1995).

A monitorização daquela reacção através de um detector potenciométrico, selectivo ao anião PER, com boas características de funcionamento, nomeadamente um intervalo de resposta linear amplo e uma boa selectividade, permitiria simplificar as etapas de pré-tratamento de amostra, requeridas quando a mesma reacção é associada a um detector espectrofotométrico (Nevado *et al.*, 1995). Por além disso, a ampla zona de resposta linear característica daquele tipo de detector permitiria ainda determinações sensíveis, mesmo para baixas concentrações de DOP e facilitaria a preparação das amostras.

Neste sentido, descreve-se neste trabalho a construção de um eléctrodo selectivo de PER, caracterizado na sua configuração convencional, e a sua incorporação num sistema FIA adaptado à determinação de DOP, recorrendo mais uma vez a um detector potenciométrico de configuração tubular.

VII.2 PARTE EXPERIMENTAL

VII.2.1 APARELHAGEM E ELÉCTRODOS

Para todos os ensaios realizados com os eléctrodos construídos, quer para o traçado experimental da curva de calibração, quer para as análises potenciométricas das formulações farmacêuticas, utilizaram-se os aparelhos indicados nas secções II.2 e II.3 (p. II3 a II7). A solução utilizada no compartimento externo do eléctrodo de referência era constituída por Na_2SO_4, com uma concentração igual a $3{,}3x10^{-2}$ mol L^{-1}, e a sua escolha deveu-se à baixa influência do anião sulfato no comportamento dos eléctrodos.

VII.2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

As soluções de DOP e de PER mais concentradas foram preparadas por pesagem rigorosa dos sólidos correspondentes e diluição, a um volume rigoroso, com água desionizada. As de menor concentração foram obtidas por diluição das primeiras. Todas as soluções de DOP foram preparadas diariamente.

Todos os reagentes utilizados, nomeadamente HCl.DOP (Sigma), metaperiodato de sódio (PER.Na, Riedel-deHaen), sulfato de sódio (Riedel-deHaen), metabisulfito de sódio (Merck), cloreto de sódio (Riedel-deHaen), glucose (Riedel-deHaen), polietilenoglicol 400 (Merck), sacarose (Merck) e frutose (Merck), eram de qualidade p.a. ou semelhante, sem terem sido submetidos a qualquer purificação adicional.

Para a preparação das membranas foram ainda utilizados cloreto de *bis*-(trifenilfosforaniliden)amónio (Aldrich), *o*-nitrofeniloctiléter (*o*NFOE, Fluka),

poli(cloreto de vinilo) (PVC) de elevado peso molecular (Fluka) e tetrahidrofurano (THF, Riedel-deHaen).

Para o ajuste da força iónica das soluções, necessário à caracterização das unidades potenciométricas, utilizou-se uma solução aquosa de Na_2SO_4 com concentração igual a $3{,}3x10^{-2}$ mol L^{-1}. Para as determinações em FIA, onde se procedeu ao ajuste dos valores de pH e da força iónica, recorreu-se a uma solução tampão acetato com um valor de pH igual a 5 unidades, preparada pela mistura de soluções de CH_3COOH e CH_3COONa, ambas de concentração igual a $2{,}0x10^{-1}$ mol L^{-1}. Esta solução tampão apresentava uma força iónica de $2{,}0x10^{-1}$ mol L^{-1}, dada a sua diluição a aproximadamente metade no interior da montagem (Figura II.17, p. II31).

VII.2.3 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS SENSORES E DAS MEMBRANAS

O sensor iónico, PER de *bis*(trifenilfosforaniliden)amónio, foi preparado por uma reacção de precipitação entre uma solução aquosa de cloreto de *bis*(trifenilfosforaniliden)amónio e PER.Na, seguindo o procedimento descrito na secção II.5.2, p. II15. As soluções sensoras foram obtidas por dissolução de cerca de 0,036 g do precipitado seco em aproximadamente 1,9 g de solvente mediador. A membrana foi preparada por imobilização de 0,4 mL da solução sensora em, aproximadamente, 0,18 g de PVC, previamente dissolvido em THF. À membrana correspondente atribuiu-se a designação AP3 (tabela VII.3). Para efeitos de comparação, indica-se também a constituição de duas membranas, propostas anteriormente por Montenegro *et al.*, 1993, e aqui designadas por tipo I e tipo II (tabela VII.3).

A membrana AP3 apresentava uma composição igual à indicada na tabela VII.4 e foi aplicada em corpos de eléctrodos convencionais (II.5.2, p. II15), construídos de acordo com os procedimentos indicados em II.5.1.1, p. II9. Com esta membrana

procedeu-se ainda à construção de eléctrodos selectivos de PER com uma configuração tubular (II.5.1.2 p. II13). Para efeitos de comparação, a composição das unidades selectivas de PER tipos I e II foi também indicada na tabela VII.4.

tabela VII.3 Correspondência entre os elementos constituintes de cada membrana (assinalados com X) e a designação atribuída ao longo deste capítulo.

designação / *constituintes*	**Tipo I**	**Tipo II**	**AP3**
PER de *bis* (trifenilfosforaniliden)amónio	–	–	**x**
PER de tetraoctilamónio	**x**	**x**	–
dibutilftalato	**x**	–	–
*o*NFOE	–	**x**	**x**
PVC	**x**	**x**	**x**

tabela VII.4 Composição percentual (m/m) das membranas selectivas de PER.

Constituintes / *Tipo*	**Sensor iónico (%)**	**Solvente mediador (%)**	**PVC (%)**
Tipo I	2,5	66,5	31,0
Tipo II	4,9	64,1	31,0
AP3	1,3	67,5	31,2

Uma vez secas as membranas, os eléctrodos foram colocados em condicionamento numa solução aquosa de PER.Na, com concentração igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}. Esta solução tinha uma composição igual à utilizada para guardar os eléctrodos quando não estavam a ser utilizados.

VII.2.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA OS DOSEAMENTOS POTENCIOMÉTRICOS

As determinações potenciométricas de DOP em formulações farmacêuticas, que se apresentavam sob a forma de injectáveis contendo 200 mg de HCl.DOP por unidade (5 mL), foram efectuadas em fluxo, recorrendo ao detector tubular selectivo de PER incorporado num sistema FIA.

Para isso, preparou-se uma solução diluída de amostra com concentração igual a cerca de $8{,}0\times10^{-2}$ g L^{-1}, valor incluído na zona de resposta linear fornecida pelo sistema estabelecido. Para a preparação daquela solução procedeu-se à diluição de 200,0 μL de amostra, com água desionizada, a um volume total de 100,00 mL.

Os ensaios de recuperação do sinal analítico foram obtidos de acordo com o descrito em II.7.3, p. II46, misturando 200,0 μL de amostra e 800,0 μL de uma solução de HCl.DOP com concentração igual a 10,0 g L^{-1}, num volume global de 100,00 mL, preenchido com água desionizada. O valor de concentração esperado para esta solução era de $1{,}6\times10^{-1}$ g L^{-1}.

VII.2.5 PROCEDIMENTOS PARA A EXECUÇÃO DA MONOGRAFIA DA USP

Para a validação dos resultados das análises potenciométricas procedeu-se à análise das mesmas amostras seguindo-se o procedimento indicado na monografia da USP, 1995. A referida monografia propunha um método baseado na separação dos vários componentes da matriz, por HPLC, e posterior detecção espectrofotométrica a 280 nm. A fase móvel era constituída por uma mistura de acetonitrilo com uma solução de 1-octanosulfonato de sódio em ácido acético. Esta solução foi filtrada e desarejada antes de ser utilizada. A solução padrão de HCl.DOP foi preparada por diluição de 10,00 mL de uma solução com 1,6 mg mL^{-1} a um

volume final de 100,00 mL, preenchido com fase móvel. Relativamente aos injectáveis, transferiu-se 400,0 μL de amostra, contendo uma quantidade de HCl.DOP equivalente a cerca de 16 mg, para um balão volumétrico de 100,00 mL, tendo-se completado o volume com fase móvel.

VII.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A construção de um novo eléctrodo selectivo a PER teve por objectivo principal encontrar uma unidade potenciométrica com melhores características de funcionamento do que aquelas indicadas para as unidades tipos I e II (Montenegro *et al.*, 1993), nomeadamente no que diz respeito ao intervalo de resposta linear. Este aspecto era importante na medida em que se optou por uma medida indirecta, baseada na oxidação da DOP pelo PER.

Neste sentido, procedeu-se, numa primeira fase, à avaliação das características de funcionamento dos eléctrodos convencionais preparados com a membrana AP3 e à comparação dos valores obtidos com aqueles referidos na literatura para as unidades tipos I e II (Montenegro *et al.*, 1993).

VII.3.1 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMENTO DOS ELÉCTRODOS CONVENCIONAIS

As características de funcionamento aqui avaliadas foram aquelas previamente indicadas para os eléctrodos que eram objecto de comparação, designadamente o LIRL, o declive, a reprodutibilidade e o tempo de resposta. Este estudo foi efectuado com base no traçado de curvas de calibração, tendo-se seguido em grande parte a metodologia indicada em II.6.1, p. II21. Este estudo contribuiu ainda para definir o tempo de vida das unidades, um parâmetro também aqui avaliado.

Posteriormente, indicou-se o estudo da influência do pH e de algumas espécies aniónicas inorgânicas no comportamento dos eléctrodos.

VII.3.1.1 PARÂMETROS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As curvas de calibração foram efectuadas de acordo com o indicado na secção II.6.1.1.1, p. II25, utilizando soluções aquosas de PER.Na com valores de concentração compreendidos entre $1x10^{-6}$ e $1x10^{-1}$ mol L^{-1}. Os parâmetros calculados a partir destes ensaios foram determinados de acordo com II.6.1.2, p. II32.

Para a determinação dos parâmetros das curvas de calibração com ajuste da força iónica, utilizaram-se soluções de PER.Na com força iónica igual a $1x10^{-1}$ mol L^{-1}. Para ajustador da força iónica escolheu-se uma solução de Na_2SO_4, com uma concentração igual a $3,3x10^{-2}$ mol L^{-1}. O anião que a constituía foi escolhido de acordo com os coeficientes de selectividade potenciométrica (tabela VII.7).

A partir dos valores médios daqueles ensaios, indicados na tabela VII.5, destacou-se o baixo valor do LIRL das unidades AP3, em comparação com aqueles indicados para as unidades tipo I e II. A amplitude da zona de resposta linear das unidades AP3 era maior em, aproximadamente, uma década de concentração.

tabela VII.5 Características gerais de funcionamento dos eléctrodos selectivos de PER, obtidas em soluções aquosas de força iónica $1x10^{-1}$ mol L^{-1}.

Tipo de eléctrodo / *Características*	**Tipo I**	**Tipo II**	**AP3**
LIRL (mol L^{-1})	$5x10^{-5}$	$5x10^{-5}$	$8x10^{-6}$
Declive (mV década^{-1})	-60,5±0,2	-57,4±0,3	-58,7±0,1
Reprodutibilidade (mV dia^{-1})	±0,2	±0,2	±0,3
t de resposta (s)	< 2	< 2	< 3

A utilização de um sensor iónico com características diferentes do tetraoctilamónio, utilizado anteriormente, bem como a sua presença na membrana em concentração mais baixa, poderão ter sido factores responsáveis pelo registo de um intervalo de resposta linear mais alargado para as unidades tipo AC3. Efectivamente, em termos qualitativos é aquele constituinte que distingue estas unidades daquelas do tipo II.

No que diz respeito a reprodutibilidade e tempo de resposta, o comportamento das várias unidades potenciométricas foi similar (tabela VII.5). Os resultados indicados decorreram da variação média diária do sinal fornecido pelos eléctrodos selectivos de PER quando mergulhados numa solução de PER.Na de concentração igual a $5x10^{-3}$ mol L^{-1} ao longo de três dias.

De acordo como o indicado em II.6.1.2, p. II32, as unidades mantiveram-se em pleno funcionamento durante pelo menos 3 meses, período durante o qual decorreram os ensaios.

VII.3.1.2 EFEITO DO pH NO VALOR DE POTENCIAL DOS ELÉCTRODOS

Para o estudo da influência do pH nos valores de potencial dos eléctrodos tipo AP3 utilizou-se uma solução aquosa de PER.Na com concentração igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}. O valor de pH desta solução, preparada em ajustador de força iónica, foi feito variar adicionando uma solução de NaOH saturada ou de H_2SO_4 concentrada, tendo-se seguido os procedimentos descritos na secção II6.3, p. II37. Estes ensaios conduziram aos intervalos de pH indicados na tabela VII.6, para os quais o valor de potencial não variou além de ±5 mV.

tabela VII.6 Intervalos de pH operacional dos eléctrodos selectivos de PER, obtidos em soluções com força iónica igual a $1x10^{-1}$ mol L^{-1} e de concentração em PER.Na igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}.

Tipo de eléctrodo / *Características*	**Tipo I**	**Tipo II**	**AP3**
intervalo de pH	3,0-7,5	3,0-7,5	2,7-7,5

Globalmente, as várias unidades forneceram intervalos de pH muito similares. Estes intervalos correspondiam, na realidade, ao intervalo de pH onde a espécie IO_4^- é aquela que predomina em solução.

Efectivamente, para valores de pH exteriores àquele intervalo, a hidratação do IO_4^- em solução aquosa, com formação de $H_4IO_6^-$, decorre em maior extensão, como resultado da participação desta última espécie nas várias protólises do ácido ortoperiódico, H_5IO_6. Neste sentido, já Lima *et al.*, 1978, previa intervalos de pH operacionais compreendidos entre 3,5 e 6,5 unidades de pH, valores para os quais as referidas protólises poderiam ser desprezadas.

VII.3.1.3 DETERMINAÇÃO DE COEFICIENTES DE SELECTIVIDADE POTENCIOMÉTRICA

Para a avaliação das características de selectividade das unidades tipo AP3, comparativamente às dos tipos I e II, determinaram-se os coeficientes de selectividade potenciométrica, $K_{A,B}^{pot}$, para as mesmas espécies aniónicas seleccionadas nos estudos de Montenegro *et al.*, 1993, e para os mesmos valores de concentração. Estudaram-se por isso a influência dos aniões perclorato, nitrato,

iodeto, brometo, cloreto e sulfato, utilizando concentrações de ião principal e interferente iguais a $1{,}0x10^{-4}$, $1{,}0x10^{-3}$ e $1{,}0x10^{-2}$ mol L^{-1}.

Os valores de $K^{pot}_{A,B}$ calculados para as unidades AP3 foram indicados na tabela VII.7. O anião sulfato foi aquele que representou a menor interferência no comportamento do eléctrodo, o que conduziu à escolha Na_2SO_4 como electrólito ajustador da força iónica A ordem crescente da intensidade da interferência das várias espécies iónicas foi a seguinte: sulfato < cloreto < brometo < iodeto, nitrato < perclorato (Figura VII.2). Esta sequência está também de acordo com os valores encontrados anteriormente por Lima *et al.*, 1978.

tabela VII.7 Logaritmo dos coeficientes de selectividade potenciométrica (log $K^{pot}_{A,B}$) para os eléctrodos selectivos de PER. Valores obtidos em solução aquosa sem qualquer ajuste da força iónica.

Interferente	*log* $K^{pot}_{A,B}$ *Concentração (mol* L^{-1}*)*	**Tipo I**	**Tipo II**	**AP3**
Perclorato	$1{,}0x10^{-4}$	-0,23 ± 0,01	+0,03 ± 0,02	+0,05 ± 0,01
	$1{,}0x10^{-3}$	-0,41 ± 0,02	+0,01 ± 0,01	+0,01 ± 0,01
	$1{,}0x10^{-2}$	-0,20 ± 0,03	+0,01 ± 0,01	-0,02 ± 0,01
Nitrato	$1{,}0x10^{-4}$	-1,75 ± 0,02	-0,98 ± 0,05	-1,53 ± 0,02
	$1{,}0x10^{-3}$	-2,33 ± 0,03	-1,65 ± 0,03	-2,32 ± 0,03
	$1{,}0x10^{-2}$	-2,63 ± 0,04	-2,75 ± 0,03	-2,77 ± 0,03
Iodeto	$1{,}0x10^{-4}$	+0,34 ± 0,02	-0,54 ± 0,01	-1,61 ± 0,07
	$1{,}0x10^{-3}$	-0,25 ± 0,01	-1,67 ± 0,01	-2,52 ± 0,05
	$1{,}0x10^{-2}$	-0,08 ± 0,02	-3,08 ± 0,01	-3,28 ± 0,06
Brometo	$1{,}0x10^{-4}$	-2,16 ± 0,04	-1,06 ± 0,02	-1,58 ± 0,03
	$1{,}0x10^{-3}$	-2,80 ± 0,01	-1,94 ± 0,01	-2,58 ± 0,02
	$1{,}0x10^{-2}$	-3,23 ± 0,05	-2,62 ± 0,03	-3,20 ± 0,04
Cloreto	$1{,}0x10^{-4}$	-1,90 ± 0,01	-1,10 ± 0,10	-1,59 ± 0,01
	$1{,}0x10^{-3}$	-2,97 ± 0,04	-2,09 ± 0,08	-2,66 ± 0,07
	$1{,}0x10^{-2}$	-3,97 ± 0,02	-3,06 ± 0,04	-3,58 ± 0,04
Sulfato	$1{,}0x10^{-4}$	-5,14 ± 0,04	-5,32 ± 0,01	-5,58 ± 0,03
	$1{,}0x10^{-3}$	-5,15 ± 0,04	-5,28 ± 0,09	-5,61 ± 0,02
	$1{,}0x10^{-2}$	-4,89 ± 0,03	-5,19 ± 0,17	-5,60 ± 0,02

Embora as membranas tipo AP3 e I fossem claramente distintas, tanto ao nível do extractor, como ao nível do solvente mediador (tabela VII.3), registou-se curiosamente uma semelhança nas características de selectividade dos eléctrodos correspondentes (Figura VII.2). A excepção a esta situação foi representada pelo anião iodeto, com uma interferência pouco significativa nas unidades AP3.

Em comparação com as unidades tipo II, preparadas com tetraoctilamónio e *o*NFOE, os eléctrodos do tipo AP3, como membranas à base de *bis*(trifenilfosforaniliden)amónio e *o*NFOE, foram mais selectivos, com excepção no que se refere à interferência exercida pelo anião perclorato (Figura VII.2). Dado que a diferença entre aquelas unidades residia no extractor presente na membrana, esta divergência de comportamento estaria provavelmente associada àquele constituinte.

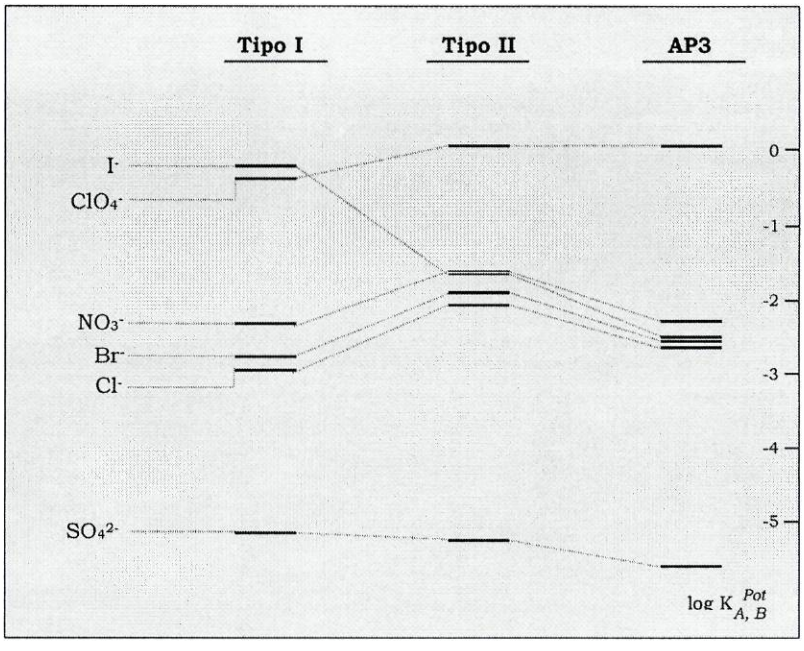


Figura VII.2 Diagrama representativo dos log $K^{Pot}_{A,B}$ dos eléctrodos selectivos de PER, relativos a soluções de concentração igual a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}.

Comparativamente às unidades anteriormente descritas por Montenegro *et al.*, 1993, o estudo sistemático das características de funcionamento dos eléctrodos aqui construídos indicou características genericamente similares, aparte de um aumento

significativo da amplitude da zona de resposta *Nernsteniana*. O baixo LIRL proporcionado pelas membranas de tipo AP3 justificou então a sua aplicação na construção de detectores tubulares, tendo em vista a determinação de DOP em sistema FIA.

VII.3.2 ESTABELECIMENTO DO SISTEMA FIA

Com o objectivo de determinar DOP através da sua reacção de oxidação com o PER, sendo a quantidade de PER monitorizada por um detector potenciométrico, estabeleceu-se um sistema FIA que, de uma forma simples, permitisse o ajuste da amostra às condições de detecção (ajuste dos valores de pH e de força iónica) no interior do sistema. Para tal, recorreu-se à montagem FIA de duplo canal, representada na Figura VII.3.

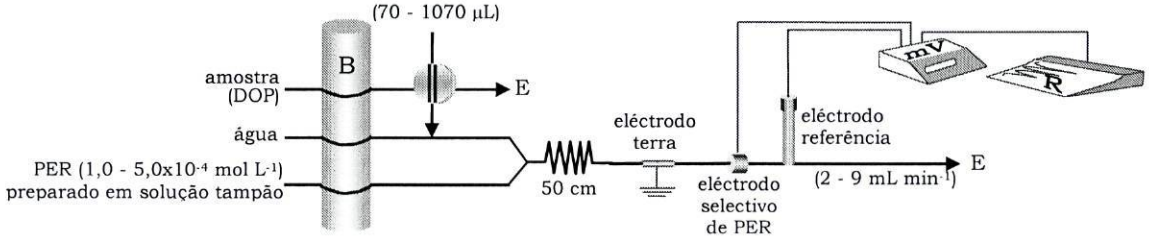


Figura VII.3 Montagem FIA de duplo canal estabelecida com vista à determinação de DOP, recorrendo a um eléctrodo selectivo de PER. B: bomba peristáltica; E: esgoto; mV: decimilivoltímetro; R: registador.

Neste sistema, as soluções padrão de HCl.DOP, preparadas em água desionizada e intercaladas num canal de transporte de água, eram misturadas com reagente oxidante por confluência com uma solução aquosa de PER.Na, cuja concentração era conhecida e fixada, preparada em tampão acetato, com um valor de pH igual a 5,0

unidades e uma força iónica igual a $2{,}0x10^{-1}$ mol L^{-1}. A reacção de oxidação da DOP decorria posteriormente, ao longo de um reactor, dando origem a um decréscimo na concentração de PER existente na solução de transporte. Este decréscimo, que ocorria de uma forma quase instantânea, era entretanto registado pelo eléctrodo selectivo.

VII.3.2.1 OPTIMIZAÇÃO DO SISTEMA FIA

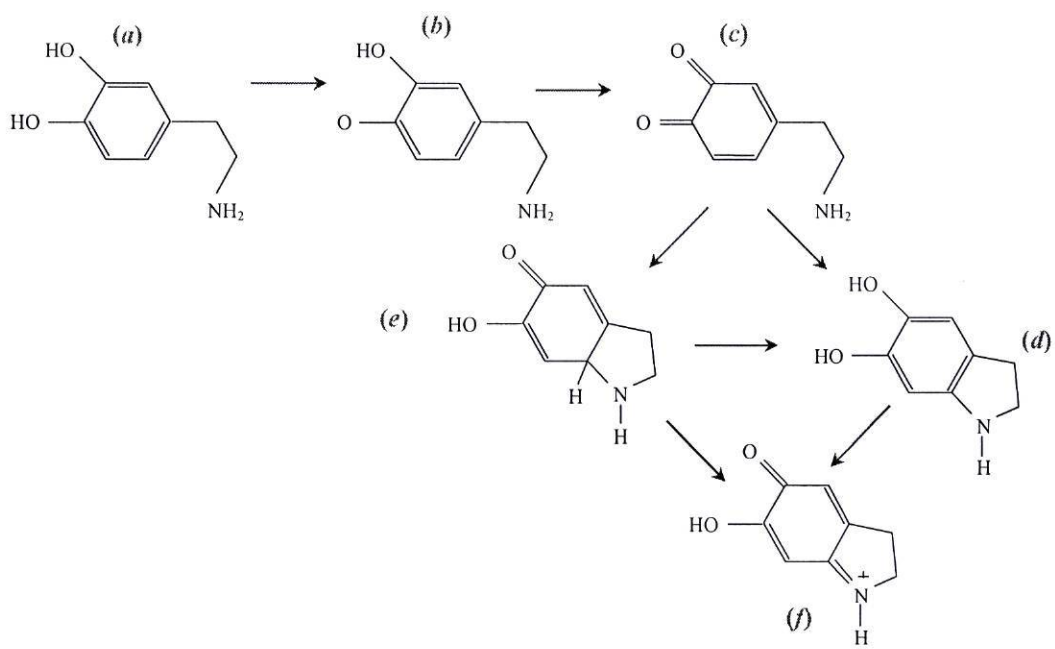
Os sinais decorrentes desta reacção no sistema FIA variavam com uma série de parâmetros, nomeadamente a concentração de PER.Na no transportador, o volume e concentração de solução de HCl.DOP injectada no sistema, o comprimento do reactor e a velocidade de fluxo das soluções. No sentido de encontrar condições experimentais que permitissem estabelecer uma relação matemática entre os sinais fornecidos pelo detector e a concentração de DOP injectada, optou-se, numa primeira fase, por fixar três daqueles parâmetros: a concentração de PER.Na na solução de transporte, a concentração de soluções de DOP a injectar no sistema e o comprimento do reactor.

No que diz respeito à escolha de um valor de concentração de PER.Na na solução de transporte, foram considerados sobretudo dois factores. Um dos factores relacionava-se com a validade da equação de *Nernst* e determinava, sobretudo, que cada sinal analítico registado teria que corresponder a uma concentração de PER superior a $8x10^{-6}$ M, o valor de LIRL do eléctrodo selectivo. Esta situação sugeria por isso a utilização de valores de concentração de PER no transportador elevados, por forma a que, após a reacção com a amostra, a concentração de PER remanescente não descesse a um valor de concentração além do valor de LIRL dos eléctrodos. Por outro lado, de acordo com Efstathiou *et al.*, 1995, a concentração de PER que passava pelo eléctrodo deveria ser inferior a $1x10^{-3}$ mol L^{-1}, com vista à preservação

da sua membrana sensora. Nesta fase, a concentração de PER.Na foi portanto fixada em $2x10^{-4}$ mol L^{-1}, o que correspondia, na ausência de reacção, a uma concentração de PER igual a $1x10^{-4}$ mol L^{-1} à sua passagem pelo detector, dada a diluição a metade por confluência com o canal da amostra (Figura VII.3).

Relativamente à concentração das soluções de DOP a injectar no sistema, seleccionou-se um intervalo de valores que incluísse o valor de concentração de PER no transportador. Escolheram-se então soluções aquosas de HCl.DOP entre $1,0x10^{-3}$ e $1,0x10^{-5}$ mol L^{-1}, garantindo-se por um lado um défice de DOP em relação ao PER e por outro o seu excesso.

A escolha destas concentração decorreu, por um lado, do desconhecimento da extensão da reacção em condições de fluxo e, por outro, do conhecimento da existência de uma reacção de estequeometria 1:1, proposta por El-Kommos *et al.*, 1990. Os autores admitiram para esta reacção a formação de um produto cromóforo, o sal de iodeto do produto de ciclização da catecolamina, seguindo o mecanismo:



Neste trabalho, os autores confirmaram a formação de um único produto que, mesmo após as transformações indicadas, no caso particular da epinefrina teria como fórmula elementar: $C_9H_{10}N^+O_3I^-$.

O último parâmetro definido inicialmente para o sistema FIA foi o comprimento do reactor. Para isso, determinou-se a variação do sinal fornecido pelo detector por injecção de 70 ou 170 μL de uma solução de DOP (em igual concentração à do PER.Na presente na solução de transporte), quando a reacção decorria ao longo de um reactor com uma comprimento entre 25 e 600 cm. Para soluções que atravessavam o detector a 1,8; 3,0; 4,0 ou 5 mL min^{-1}, os sinais de maior intensidade foram registados para um reactor com 50 cm, conduzindo à escolha deste comprimento. Os resultados encontrados para uma velocidade de fluxo igual a 1,8 mL min^{-1} encontram-se indicados na tabela VII.8.

Enquanto que os menores valores de sinal analítico encontrados para os reactores de menor comprimento poderiam ter resultado de uma mistura pouco adequada entre os reagentes, aqueles fornecidos pelos de maior comprimento deveriam ter decorrido da instabilidade do produto cromóforo em solução aquosa (El-Kommos *et al.*, 1990).

tabela VII.8 Variação da intensidade de sinal (mV) com o comprimento do reactor, decorrente da reacção entre soluções de PER.Na e HCl.DOP, ambas com a mesma concentração, para uma velocidade de fluxo total igual a 1,8 mL min^{-1}.

Comprimento de reactor (cm) / *Condições analíticas*	25	50	100	200	300	400	500	600
70 μL / $1x10^{-3}$ mol L^{-1}	20,2	29,5	28,3	19,2	17,0	15,2	12,8	12,5
170 μL / $1x10^{-3}$ mol L^{-1}	97,3	112,3	108,3	82,5	69,2	53,2	38,9	36,3
70 μL / $1x10^{-2}$ mol L^{-1}	22,7	30,2	28,8	19,6	18,1	15,8	13,2	12,2
170 μL / $1x10^{-2}$ mol L^{-1}	142,1	158,1	150,2	110,1	79,5	50,9	39,2	34,0

Perante as condições anteriormente seleccionadas, fez-se então variar o volume de amostragem (70 a 1070 μL) e a velocidade de fluxo (0,8 a 9 mL min^{-1}) de um modo multivariado. Os sinais produzidos indicaram, curiosamente, relações lineares com a concentração de HCl.DOP injectada no sistema, situação que pareceu interessante explorar, dada a facilidade de leitura das amostras. Esses intervalos de linearidade, os declives e os coeficiente de correlação foram indicados na tabela VII.9.

tabela VII.9 Variação da intensidade de sinal analítico com a velocidade de fluxo e o volume de injecção. Resultados obtidos para uma solução de transporte de PER com uma concentração de $2x10^{-4}$ mol L^{-1} e um reactor de 50 cm.

Velocidade de fluxo (mL min⁻¹)	*Volume de injecção (μL)* / *parâmetros da recta*	**1070**	**570**	**270**	**170**	**70**
0,8	*Declive (mV g⁻¹ L)*	1239,5	1102,3	1011,3	915,1	461,5
	Intervalo de linearidade (x10⁻³ g L⁻¹)	7,6-15,2	3,8-15,2	3,8-19,0	3,8-19,0	3,8-19,0
	R^2	0,99940	0,99771	0,99694	0,99532	0,99545
1,5	*Declive (mV g⁻¹ L)*	1191,9	1123,4	938,9	698,8	410,1
	Intervalo de linearidade (x10⁻³ g L⁻¹)	7,6-19,0	7,6-19,0	7,6-19,0	3,8-19,0	3,8-15,2
	R^2	0,99568	0,99786	0,99900	0,99598	0,99779
2,2	*Declive (mV g⁻¹ L)*	1632,7	889,4	720,4	600,4	366,5
	Intervalo de linearidade (x10⁻³ g L⁻¹)	15,2-37,9	1,9-19,0	1,9-19,0	1,9-19,0	1,9-19,0
	R^2	0,99921	0,99760	0,99839	0,99607	0,99773
3,0	*Declive (mV g⁻¹ L)*	892,7	904,9	763,8	600,0	337,3
	Intervalo de linearidade (x10⁻³ g L⁻¹)	3,8-19,0	1,9-19,0	1,9-19,0	1,9-19,0	1,9-19,0
	R^2	0,99735	0,99771	0,99857	0,99756	0,99938
3,8	*Declive (mV g⁻¹ L)*	925,9	845,2	762,7	557,7	308,0
	Intervalo de linearidade (x10⁻³ g L⁻¹)	1,9-19,0	3,8-19,0	7,6-19,0	3,8-19,0	1,9-19,0
	R^2	0,99784	0,99869	0,99772	0,99804	0,99745
5,0	*Declive (mV g⁻¹ L)*	859,8	774,6	632,1	565,6	313,2
	Intervalo de linearidade (x10⁻³ g L⁻¹)	1,9-19,0	1,9-15,2	1,9-11,4	1,9-19,0	1,9-19,0
	R^2	0,99731	0,99745	0,99976	0,99715	0,99885
6,0	*Declive (mV g⁻¹ L)*	821,5	802,8	649,3	550,2	385,2
	Intervalo de linearidade (x10⁻³ g L⁻¹)	1,9-19,0	1,9-19,0	1,9-19,0	1,9-19,0	1,9-15,2
	R^2	0,99717	0,99765	0,99791	0,99683	0,99847
7,0	*Declive (mV g⁻¹ L)*	820,2	721,6	620,8	541,7	280,8
	Intervalo de linearidade (x10⁻³ g L⁻¹)	1,9-37,9	1,9-19,0	1,9-19,0	1,9-19,0	1,9-151,7
	R^2	0,99781	0,99766	0,99819	0,99817	0,99941
8,0	*Declive (mV g⁻¹ L)*	739,5	765,6	640,2	495,6	223,7
	Intervalo de linearidade (x10⁻³ g L⁻¹)	1,9-19,0	1,9-37,9	1,9-37,9	1,9-113,8	1,9-151,7
	R^2	0,99810	0,99828	0,99821	0,99795	0,99863
9,0	*Declive (mV g⁻¹ L)*	534,7	491,8	404,5	328,7	224,6
	Intervalo de linearidade (x10⁻³ g L⁻¹)	1,9-113,8	1,9-113,8	1,9-113,8	1,9-113,8	1,9-151,7
	R^2	0,99728	0,99784	0,99784	0,99779	0,99928

Genericamente, o aumento do volume de injecção originava um encurvamento na relação entre o potencial fornecido pelo detector e a concentração de DOP inserida no sistema, fenómeno que se tornou mais evidente com o decréscimo da velocidade de fluxo. Esse encurvamento deveria então ter resultado de uma quantidade de DOP no interior do sistema demasiado elevada e/ou de um tempo de reacção demasiado longo, originando valores de concentração de PER a atingir o detector provavelmente inferiores ao do seu LIRL. Os resultados encontrados para o caso particular de uma velocidade de fluxo igual a 7 mL min^{-1} foram indicados na Figura VII.4.

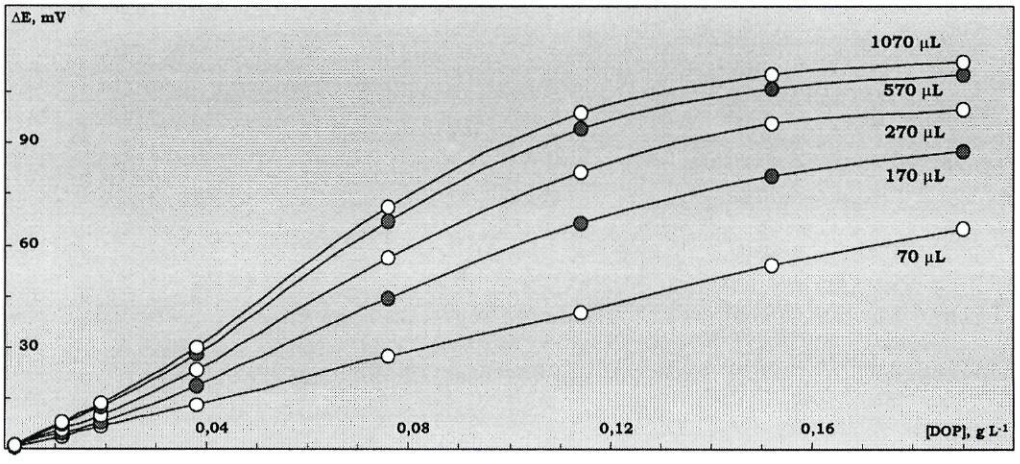


Figura VII.4 Variação de potencial com a concentração de DOP, para vários volumes de injecção. Resultados obtidos para uma velocidade de fluxo igual a 7 mL min^{-1}, uma concentração de PER.Na igual a $2{,}0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} e um reactor de 50 cm.

O mesmo efeito foi registado para o decréscimo do valor da velocidade de fluxo das soluções no interior do sistema e tornou-se mais pronunciado para valores superiores de volume de injecção. Esta situação pareceu confirmar que as concentrações de PER no interior do sistema teriam atingido valores inferiores ao do LIRL. Os resultados encontrados para o caso particular de um volume de injecção igual a 70 µL foram indicados na Figura VII.5.

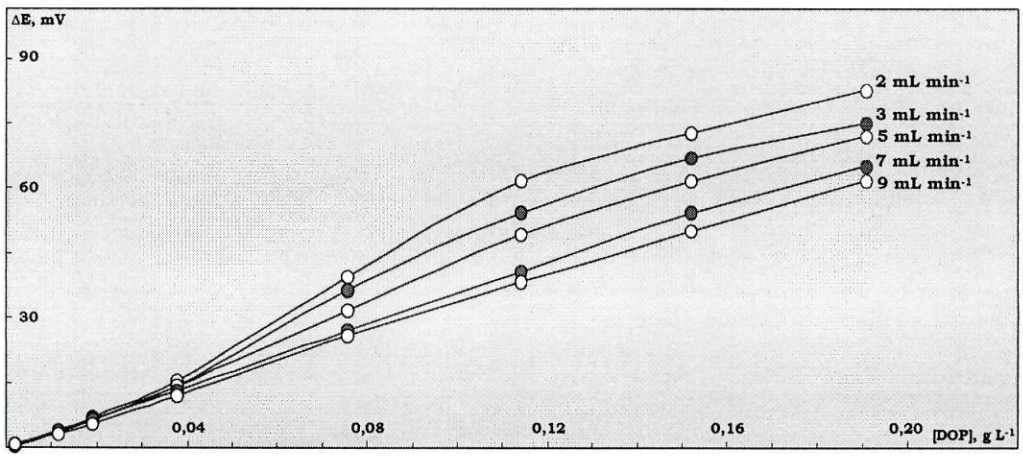


Figura VII.5 Variação de potencial com a concentração de DOP para várias velocidades de fluxo. Resultados obtidos para um volume de injecção de 70 μL, uma concentração de PER.Na igual a $2,0x10^{-4}$ mol L^{-1} e um reactor de 50 cm.

Quando um volume de 70 μL de solução de DOP percorria o sistema com uma velocidade de fluxo entre 7 e 9 mL min^{-1}, o coeficiente de correlação registado foi já muito próximo da unidade, incluindo também quase toda a gama de concentrações de HCl.DOP estudadas (tabela VII.9, Figura VII.4 e Figura VII.5).

Numa tentativa de aumentar a sensibilidade da determinação e/ou alargar a zona de resposta analítica para concentrações de DOP, fez-se variar entretanto a concentração de PER.Na no transportador, um dos parâmetros inicialmente fixados. Este estudo foi efectuado para concentrações de reagente oxidante entre $1,0x10^{-4}$ e $5,0x10^{-4}$ mol L^{-1}, utilizando velocidades de fluxo entre 7 e 9 mL min^{-1} e um volume de injecção de 70 μL de soluções de HCl.DOP ($2,0x10^{-2}$ e $2,0x10^{-1}$ g L^{-1}).

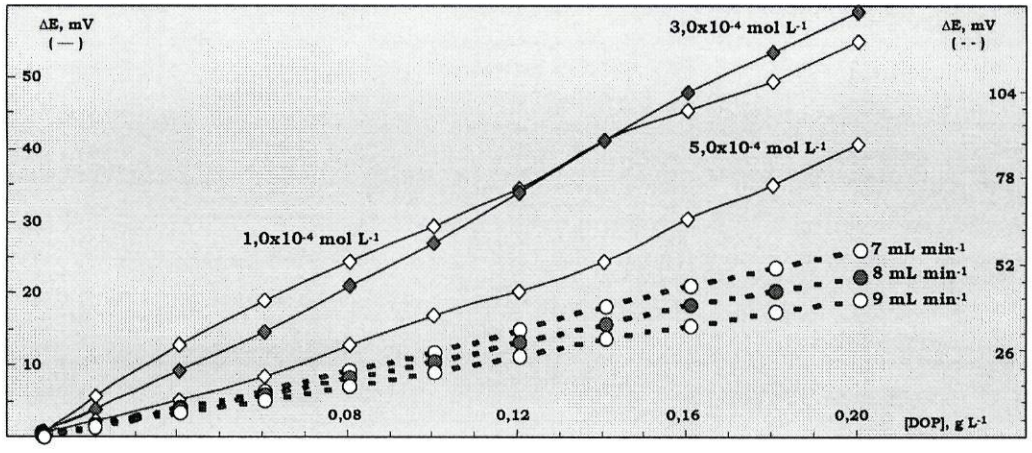
Alguns dos parâmetros das regressões lineares obtidas ao longo do intervalo de concentrações de DOP estudado foram indicados na tabela VII.10. Os resultados obtidos conduziram à escolha de uma concentração de PER igual $3,0x10^{-4}$ mol L^{-1} e

de uma velocidade de fluxo igual a 7 mL min^{-1}, condições em que a sensibilidade e a aproximação à linearidade eram máximas (Figura VII.6).

tabela VII.10 Variação da intensidade do sinal analítico com a concentração da solução de PER na solução de transporte. Resultados obtidos para uma um volume de injecção igual a 70 μL e um reactor de 50 cm.

Velocidade de fluxo (mL min^{-1})	*Concentração PER (mol L^{-1})* / *parâmetros da recta*	**1,0x10^{-4}**	**2,0x10^{-4}**	**3,0x10^{-4}**	**4,0x10^{-4}**	**5,0x10^{-4}**
7,0	*Declive (mV g^{-1} L)*	249,8	281,2	322,0	291,3	224,6
	R^2	0,99231	0,99910	0,99902	0,99882	0,99861
8,0	*Declive (mV g^{-1} L)*	239,9	227,3	225,4	181,8	135,2
	R^2	0,99189	0,99895	0,99899	0,99893	0,99897
9,0	*Declive (mV g^{-1} L)*	233,7	224,2	227,1	213,7	164,1
	R^2	0,99728	0,99851	0,99898	0,99887	0,99856

Figura VII.6 Estudo da influência da concentração do PER (—), avaliada quando a velocidade de fluxo era igual a 7 mL min^{-1}, e da velocidade de fluxo (- -), ensaiada com concentração de PER igual a 3,0x10^{-4} mol L^{-1}.



A perda sensibilidade registada para velocidades de fluxo superiores a 7 mL min^{-1} poderá ter ocorrido como resultado de uma perda da qualidade da mistura entre os reagentes ou, mesmo, de um aumento da dispersão das soluções no interior do sistema.

Dado que a extensão da reacção era dependente da temperatura, ensaiou-se ainda a influência deste parâmetro nos sinais analíticos registados. Quando se aumentou a temperatura, de 25 para 35° C, mergulhando o reactor num banho de água termostatizado, verificou-se um aumento ligeiro do sinal analítico e, também, uma perda de repetibilidade.

Após os estudos efectuados, definiram-se como condições óptimas as seguintes: a injecção de volumes de amostra de 70 μL, seguindo-se a reacção com PER por confluência com uma solução de transporte de concentração igual a $3{,}0x10^{-4}$ mol L^{-1}, ao longo de 50 cm; a velocidade de fluxo, medida após a passagem das soluções pelo sistema de detecção, igual a 7 mL min^{-1} e a temperatura igual a 25 °C.

VII.3.2.2 CONSIDERAÇÕES CINÉTICAS

Curiosamente, foi possível encontrar condições analíticas em que o sinal produzido pelo detector potenciométrico era linear com a concentração de DOP injectada, situação inesperada já que o sinal deveria corresponder em linearidade ao logaritmo da concentração de PER que passava pelo detector.

Surgiu assim a necessidade de recorrer a algumas considerações acerca da cinética da reacção. Para isso, admitiu-se que a reacção entre a DOP e o PER dava origem a um produto, que constituía a forma oxidada da DOP, e à forma reduzida do reagente oxidante, IO_3^-, podendo esta ser expressa por:

$$DOP + PER \longrightarrow produto + IO_3^- \qquad (1).$$

Esta equação estaria também de acordo com uma estequeometria entre os reagentes igual a 1:1 e com a formação de um único produto de oxidação da DOP, ambas as condições previstas por El-Kommos, 1990.

A indicação de PER na equação (1) representa apenas a espécie IO_4^-, uma vez que a reacção decorria em soluções com um valor de pH igual a 5 unidades. Com efeito, entre valores de pH 3 e 7, assume-se que a espécie predominante é IO_4^- (Crouthamel *et al.*, 1949 e 1951). De acordo com Duke *et al.*, 1954, a espécie reactiva poderia ser também $H_4IO_6^-$ e a escolha entre as duas espécies seria mesmo arbitrária, dada a sua coexistência em solução com o IO_4^-, num equilíbrio que rapidamente se estabelecia.

A equação de velocidade que indicava o desaparecimento de PER no sistema, poderia então ser representada por:

$$\frac{d[PER]}{dt} = -k[PER][DOP] \qquad (2).$$

Por outro lado, este consumo de PER era determinado com recurso ao eléctrodo selectivo a este anião, cuja resposta analítica se baseava na equação de Nernst,

$$E = K - S\ln[PER] \qquad (3),$$

onde S indicava o declive da resposta da célula de eléctrodo selectivo e K a ordenada origem da equação de calibração. A equação (3) foi expressa em termos de concentração, em vez de actividade, uma vez que as soluções que passavam pelo detector apresentavam um valor de força iónica constante.

Derivando a expressão (3) em ordem a *t*, obteve-se a equação:

$$\frac{dE}{dt} = -S\frac{1}{[PER]}\frac{d[PER]}{dt} \qquad (4),$$

que, combinada com a equação de cinética (2), passou a representar-se como:

$$\frac{dE}{dt} = -S\frac{1}{[PER]}(-k[PER][DOP]) \qquad (5).$$

A equação (5) permitia então obter uma variação linear do potencial com a concentração de DOP, inicialmente inserida no sistema, de acordo com a expressão:

$$\frac{dE}{dt} = kS[DOP] \qquad (6),$$

sempre que o tempo permitido para o decorrer da reacção fosse mantido constante. De acordo com o sistema FIA implementado, em que a reacção decorria desde a mistura dos reagentes até à sua chegada ao detector, esta condição estava assegurada, sendo o tempo de reacção determinado pelo percurso e velocidade de fluxo das soluções confluentes.

Com as equações descritas pretendeu-se apenas sugerir uma justificação para a leitura directa da DOP e em nenhuma altura se pretendeu afirmar qual o mecanismo da reacção ou mesmo a sua ordem cinética.

VII.3.2.3 PARÂMETROS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Com base nas condições previamente seleccionadas, a injecção de soluções de HCl.DOP, com concentrações entre $5{,}0\text{x}10^{-3}$ e $2{,}8\text{x}10^{-1}$ g/l, conduziu aos resultados indicados na tabela VII.11, correspondentes à realização de oitos ensaios.

tabela VII.11 Parâmetros das curvas de calibração, ensaiadas com as condições seleccionadas para os sistema FIA, para a determinação de DOP.

Tipo de eléctrodo / *Características*	**AP3**
Intervalo de resposta linear (g L^{-1})	$8{,}0\text{x}10^{-3}$ / $2{,}7\text{x}10^{-1}$
Declive (mV década^{-1})	310,1±7,4
Repetibilidade (mV)	±0,4
Frequência analítica (amostra h^{-1})	200
R^2	>0,9996

O sistema implementado era também caracterizado por uma boa repetibilidade do sinal analítico (II.6.1.2, p. II33) utilizando soluções de HCl.DOP com valores de concentração iguais a $5{,}0x10^{-2}$ e $1{,}5x10^{-1}$ g L^{-1}. A frequência de amostragem deste sistema foi aproximadamente igual a 200 amostras por hora, resultado das condições seleccionadas para a montagem FIA e da resposta rápida dos detectores potenciométricos (tabela VII.5).

VII.3.2.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE INTERFERÊNCIAS

A influência de alguns excipientes, vulgarmente associados a formulações farmacêuticas com DOP, foi avaliada através de ensaios de recuperação. Os excipientes seleccionados para este estudo foram o metabisulfito, o cloreto de sódio, a glucose, o polietilenoglicol 400, a sacarose e a frutose.

Para a execução deste ensaio, prepararam-se soluções aquosas de HCl.DOP, de concentrações iguais a $5{,}0x10^{-2}$ e $1{,}5x10^{-1}$ g L^{-1}. Paralelamente, prepararam-se soluções que, com igual concentração em DOP, haviam sido adicionadas da espécie interferente em estudo, por forma a obter relações de concentração interferente/DOP iguais a 1:1, 1:10 e 1:100. Os resultados obtidos da análises destas misturas foram indicados na tabela VII.12.

Genericamente, as espécies avaliadas não constituíam uma interferência significativa na leitura da DOP. O metabisulfito foi a única excepção, o que era aliás esperado dado o seu efeito antioxidante. Contudo, a sua influência foi apenas perceptível quando a sua concentração igualava a concentração de DOP.

tabela VII.12Ensaios de recuperação do sinal analítico de soluções de DOP, contendo espécies possivelmente interferentes, a vários níveis de concentração.

	Concentração de DOP	**5,0x10^{-2} g L^{-1}**	**1,5x10^{-1} g L^{-1}**
Interferente	*Interferente/DOP*	Recuperação (%)	Recuperação (%)
Metabisulfito de sódio	1:1	110,3 ± 2,0	112,4 ± 1,2
	1:10	101,4 ± 1,5	98,3 ± 1,8
	1:100	100,0 ± 0,0	100,7 ± 1,4
Cloreto de sódio	1:1	100,2 ± 0,7	101,4 ± 0,3
	1:10	100,7 ± 0,0	100,0 ± 0,2
	1:100	101,3 ± 0,0	100,3 ± 0,9
Glucose	1:1	101,3 ± 0,0	100,8 ± 1,3
	1:10	100,0 ± 0,0	100,6 ± 1,0
	1:100	100,9 ± 0,4	100,3 ± 0,4
Polietilenoglicol 400	1:1	101,1 ± 0,5	101,4 ± 0,7
	1:10	100,5 ± 1,9	101,2 ± 0,6
	1:100	100,2 ± 0,4	101,6 ± 0,9
Sacarose	1:1	100,2 ± 0,9	101,6 ± 0,9
	1:10	100,0 ± 1,2	99,6 ± 0,4
	1:100	100,6 ± 1,4	99,6 ± 1,3
Frutose	1:1	100,6 ± 0,5	100,0 ± 0,2
	1:10	100,3 ± 0,5	99,6 ± 0,4
	1:100	100,6 ± 0,5	99,9 ± 0,5

VII.3.3 ANÁLISE DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

O sistema FIA estabelecido foi utilizado na determinação de DOP em injectáveis, as únicas formulações farmacêuticas disponíveis e de uso exclusivo hospitalar. Para estas amostras era esperada uma quantidade de HCl.DOP igual a 200 mg por injectável.

As análises de soluções diluídas de amostra, preparadas de acordo com o descrito em VII.2.4, foram realizadas após a curva de calibração ao longo de uma

gama de concentrações compreendida entre $4,0x10^{-2}$ e $2,0x10^{-1}$ g L^{-1}. Um exemplo típico de uma análise e da calibração precedente foi representado na Figura VII.7.

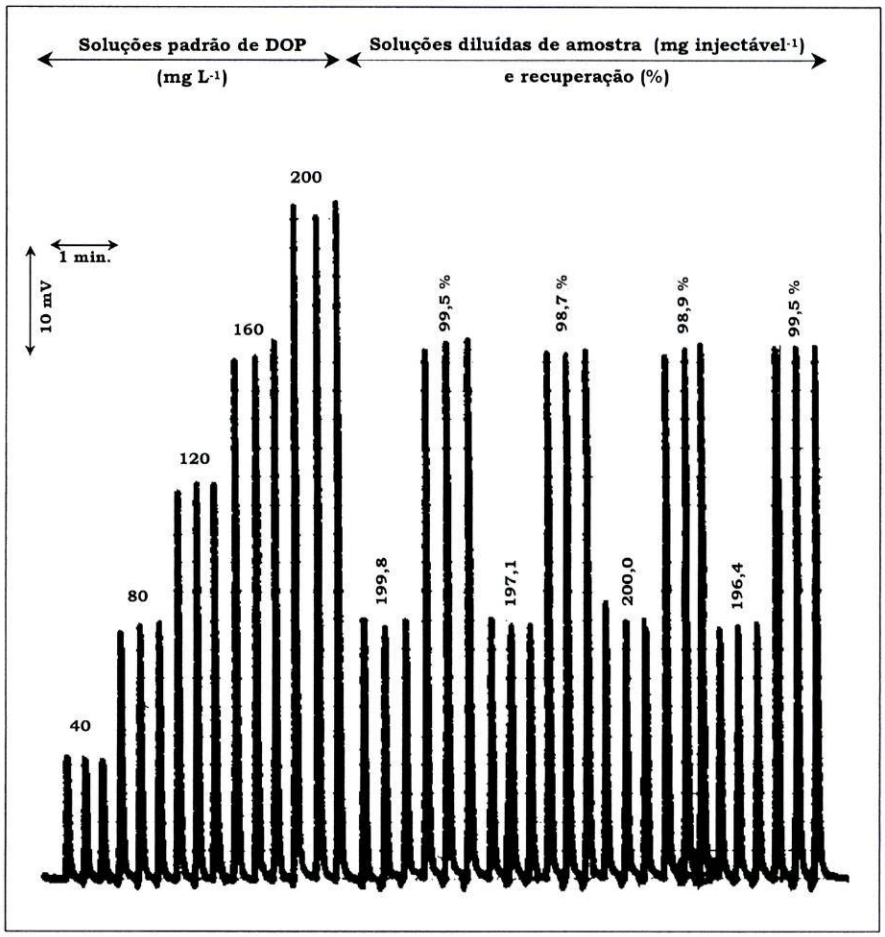


Figura VII.7 Registo de uma calibração do sistema FIA, recorrendo a cinco soluções padrão de HCl.DOP, seguida da análise da soluções diluídas de amostra e do ensaio de recuperação correspondente.

Os valores médios, bem como os desvios padrão, dos resultados obtidos foram indicados na tabela VII.13. Registou-se aqui uma proximidade aos valores indicados na bula informativa das formulações injectáveis, demonstrando-se ainda a boa repetibilidade do sinal analítico, traduzida pelos baixos desvios padrão obtidos (1,6%).

A qualidade dos resultados foi ainda avaliada pela execução de ensaios de recuperação, estando indicado na Figura VII.7 um exemplo típico deste ensaio. Os índices de recuperação encontrados estavam próximos de 100%, sugerindo a exactidão dos resultados. Os desvios padrão obtidos, confirmaram mais uma vez a repetibilidade do sinal analítico, indicando com isso uma boa precisão para o procedimento implementado.

A exactidão dos resultados potenciométricos foi efectivamente constatada através da sua comparação com os resultados fornecidos pela execução da monografia proposta pela USP, 1995, indicados na tabela VII.13. O valor de *t* obtido por aplicação do teste *t de Student* foi inferior ao valor tabelado (2,201), para um nível de confiança de 95% e com um número de ensaios, *n*, igual a 11. O desvio relativo entre os resultados dos dois procedimentos foi igual a +0,1 %.

tabela VII.13 Resultados da determinação de DOP em formulações farmacêuticas, obtidos por potenciometria com o sistema FIA (POT) e pela monografia proposta na USP, 1995 o desvio relativo (DR) entre os dois procedimentos e o valor de *t*.

Condições analíticas / *Formulação farmacêutica*	**POT**		**USP** (mg/Cápsula)	**DR** (%)	**teste *t***
	C (mg/inj.)	recuperação (%)			
Medopa®, 200 mg/injectável	201,1 ± 3,3	101,0 ± 1,5	201,4 ± 4,8	+0,1	0,586

VII.4 CONCLUSÕES

A utilização de um sal de amónio quaternário com características físico-químicas diferentes daqueles anteriormente utilizados por Montenegro *et al.*, 1993, conduziu à obtenção de unidades que apresentavam um LIRL inferior em cerca de uma década de concentração, o que contribuiu para um alargamento significativo do intervalo de resposta analítica.

A incorporação do eléctrodo selectivo ao anião PER num sistema FIA simples, permitiu estabelecer uma relação linear entre a concentração de DOP injectada e o sinal analítico registado, após optimização de alguns dos parâmetros da montagem.

A aplicação do sistema proposto na análise de formulações farmacêuticas indicou-o como uma alternativa aos demais procedimentos presentes na literatura, sobretudo pela sua simplicidade, baixo preço e rapidez analítica. Com o sistema FIA desenvolvido foi possível a análise de formulações farmacêuticas, sem necessidade de recorrer a qualquer tratamento de amostra, com uma frequência calculada em 200 amostras por hora.

VII.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROWN D. S., JENKE D. R. (**1987**). Application of fast LC to pharmaceutical analysis: dopamine hydrochloride. *J. Chromatogr. Sci.*, 25, 494-500.

CAMANAS R. M. V., MALLOLS J. M. S., LAPASIO J. R. T., RAMOS G. R. (**1995**). Analysis of pharmaceutical preparations containing catecholamines by micellar liquid chromatography with spectrophotometric detection. *Analyst*, 120, 1767-1772.

CROUTHAMEL C., MEEK H. V., MARTIN D. S., BANKS C. V. (**1949**). Spectrophotometric studies of dilute aqueous periodate solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 3031-3035.

CROUTHAMEL C., HAYES A., MARTIN D. S. (**1951**). Ionization and hydration equilibria of periodic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 82-87.

DEFTEREOS N. T., CALOKERINOS A. C., EFSTATHIOU C. E. (**1993**). Flow-injection-chemiluminometric determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and L-dopa. *Analyst*, 118, 627-632.

DRUG EVALUATIONS **(1986)**. *Drug Evaluations.* Capítulo 27, *Agents used to treat shock.* American Medical Association. Saunders W. B. Company, 6ª edição, pp. 497-502.

DUKE F. R., BULGRIN V. C. (**1954**). The kinetics of the periodate oxidation of ethylene glycol and a series of methylated ethylene glycols. *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 3803-3806.

DUTT K. R., PRASAD T. N. V., MURTHY M. S. R., RAO E. V. (**1992**). Spectrophotometric determination of dopamine hydrochloride using MBTH and cerium (IV). *Indian Drugs*, 29, 181-183.

EFSTATHIOU C. E., HADJIIOANNOU T. P. (**1995**). Analytical and other applications of periodate-selective electrodes. *Trends of Anal. Chem.*, 14, 253-277.

EL-KOMMOS M. E. (**1987**). Spectrophotometric assay of dopamine hydrochloride injection with thiosemicarbazide. *J. Pharm. Belg.*, 42, 371-376.

EL-KOMMOS M. E., MOHAMED F. A., KHEDR A. S. (**1990**). Spectrophotometric determination of some cathecolamine drugs using metaperiodate. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73, 516-520.

FOGG A. G., SUMMAN A. M., ARCINIEGA M. A. F. (**1985**). Flow-injection amperometric determination of ascorbic acid and dopamine at a sessile-mercury-drop electrode without deoxygenation. *Analyst*, 110, 341-343.

HARVEY S C. (**1990**). *Remington's. Pharmaceutical Sciences.* Capítulo 43, *Sympathominetic Drugs.* GENNARO A. R., editor. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 18ª edição, pp. 877-878.

LIMA J. L. F. C., MACHADO A. A. S. C. (**1978**). Construção e avaliação de um eléctrodo selectivo de periodato com o permutador em membrana de PVC. *Rev. Port. Quím.*, 20, 70-76.

LOZANO C. M., RUIZ T. P., TOMAS V., VAL O. (**1991**). Determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and L-dopa in pharmaceuticals by a photokinetic method. *Analyst*, 116, 857-859.

MALAKI E. A., KOUPPARIS M. A. (**1989**). Kinetic potentiometric study and analytical applications of micellar-catalysed reactions of 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene with amino-compounds. *Anal. Chim. Acta*, 219, 295-307.

MARTINDALE **(1993)**. *Martindale, The Extra Pharmacopeia.* REYNOLDS J. E. F., editor. The Pharmaceutical Press, London, 30ª edição, p. 1243.

MONTENEGRO M. C. B. S. M., LIMA J. L. F. C., MATTOS I. L., NETO G. O., NETO J. A. G., ZAGATTO E. A. G. (**1993**). Development of a tubular periodate electrode for flow-injection determination of glycerol. *Talanta*, 40, 1563-1568.

NEVADO J. J. B., GALLEGO J. M. L., LAGUNA P. B. (**1997**). Stopped-flow spectrophotometric determination of dopamine and methyldopa with sodium hydroxide. *Anal. Lett.*, 30, 1109-1120.

NEVADO J. J. B., GALLEGO J. M. L., LAGUNA P. B. (**1995**). Flow-injection spectrophotometric determination of adrenaline and dopamine with sodium hydroxide. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14, 571-577.

NEVADO J. J. B., GALLEGO J. M. L., LAGUNA P. B. (**1995**). Spectrophotometric Determination of dopamine and methyldopa with metaperiodate by flow injection analysis. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 353, 221-223.

ORTEGA F., DOMINGUEZ E. (**1996**). Selective catalytic determination of dopamine. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14, 1157-1162.

PENG W. F., WANG E. K. (**1993**). Preparation and characterization of a multi-cylinder micro-electrode coupled with a conventional glassy carbon electrode and its application to the detection of dopamine. *Anal. Chim. Acta*, 281, 663-671.

RAGAB G. H., NOHTA H., KAI M., OHKURA Y., ZAITSU K. (**1995**). 1,2-Diarylethylenediamines as sensitive pre-column derivatizing reagents for chemiluminescence detection of catecholamines in HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13, 645-650.

RAO G. R., AVADHANULU A. B., GIRIDHAR R. (**1988**). Spectrophotometric determination of dopamine hydrochloride and dobutamine hydrochloride in their dosage forms. *Indian Drugs*, 25, 382-384.

SANE R. T., DESHPANDE P. M., SAWANT C. L., DOLAS S. M., NAYAK V. G., ZARAPKAR S. S. (**1987**). Simple spectrophotometric method for the determination od dopamine hydrochloride. *Indian Drugs*, 24, 199-201.

SASTRY C. S., DAS V. G., RAO K. E. (**1985**). Spectrophotometric methods for the determination of *o*-dihydroxybenzene (cathecol) derivatives. *Analyst*, 110, 395-398.

SLECKMAN B. P., SHERMA J. (**1983**). Separation and quantification of epinephrine (adrenaline), norepinephrine (noradrenaline) and dopamine by chromatography on biphenyl thin layers. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 6, 156-157.

USP (1995). Dopamine Hydrochloride Injections Official Monograph. United States Pharmacopoeial Convention. *United States Pharmacopoeia XXIII*, Rockville, MD, pp. 549-550.

CONCLUSÕES GERAIS

Acredita-se que o desenvolvimento de sistemas FIA com detecção potenciométrica, para a avaliação de alguns parâmetros envolvidos no controlo da qualidade de formulações farmacêuticas, constitui uma alternativa, com vantagens, aos procedimentos reconhecidos nas mais diversas farmacopeias, nos quais se referem etapas de pré-tratamento de amostras fastidiosas e longas e/ou a necessidade de equipamento sofisticado e de operadores especializados para o seu funcionamento. Para que essa alternativa seja uma realidade, é fundamental que os sistemas de fluxo implementados possuam um detector adequado e uma montagem simples de operar.

A preparação de eléctrodos selectivos a espécies orgânicas de interesse farmacêutico com boas características de funcionamento reside, sobretudo, na selecção adequada de alguns parâmetros críticos, nomeadamente o tipo de construção e os compostos envolvidos na preparação da membrana polimérica.

No que se refere à preparação da membrana sensora, julga-se que a definição da sua composição mais adequada passa, também, por uma avaliação experimental exaustiva. Com efeito, para o conjunto de fármacos estudados, a utilização de vários extractores, geralmente derivados de sais de amónio quaternário e de fenilborato, de vários solventes mediadores, com baixa e elevada constante dieléctrica, e, em casos particulares, de aditivo, dá origem a uma selecção diversa daqueles constituintes (tabela VIII.1).

tabela VIII.1 Composição qualitativa das membranas seleccionadas.

fármaco / *constituintes*	**TRI**	**PRO**	**CEF**	**TC**
Tetrakis(4-clorofenil)borato	–	–	–	**x**
Tetrafenilborato	**x**	**x**	–	–
Tetraoctilamónio	–	–	**x**	–
*o*NFOE	**x**	–	**x**	–
*b*EHS	–	**x**	–	**x**
4-*tert*-octilfenol	–	–	**x**	–
PVC	**x**	**x**	**x**	**x**

Após a selecção de uma membrana sensora, a sua incorporação em sistemas FIA pressupõe a escolha de uma configuração adequada, e que se julga ser a tubular, sem solução de referência interna. A escolha desta configuração é contudo baseada numa comparação com dados encontrados na literatura, não se tendo comprovado esta situação através da utilização de outros tipos de construção.

A incorporação dessas unidades em sistemas FIA permite pois combinar a precisão, rapidez, economia e simplicidade proporcionada por estes sistemas com a selectividade, a ampla zona de resposta analítica, a sensibilidade, a rapidez de resposta, etc., dos detectores potenciométricos.

Da associação FIA/eléctrodo selectivo decorre, ainda, em algumas situações, melhorias nas características de resposta, sobretudo no que se refere a sensibilidade.

A este propósito, indicam-se na tabela VIII.2 as características dos eléctrodos seleccionados, obtidas em condições discretas e de fluxo equivalentes.

tabela VIII.2 Características de funcionamento dos vários eléctrodos seleccionados de configuração convencional (CONV) e tubular (TUB), utilizando condições de ajuste simultâneo dos valores de pH e de força iónica das soluções.

fármaco / *configuração* / *características*	TRI		PRO		CEF		TC	
	CONV	TUB	CONV	TUB	CONV	TUB	CONV	TUB
LD (mol L^{-1})	$2,8x10^{-5}$	–	$4,4x10^{-4}$	–	$1,3x10^{-4}$	–	$1,4x10^{-4}$	–
LIRL (mol L^{-1})	$4,0x10^{-5}$	$5,0x10^{-6}$	$1,7x10^{-4}$	$8,0x10^{-6}$	$2,8x10^{-4}$	$4,0x10^{-4}$	$2,4x10^{-4}$	$1,2x10^{-4}$
Declive (mV década^{-1})	+52,5±0,3	+58,9±0,2	+56,4±0,7	+58,2±0,8	-50,4±1,4	-54,6±0,4	+51,3±1,3	+54,2±0,6
Repetibilidade (mV)	±0,2	± 0,2	±0,2	± 0,3	±0,6	±0,2	±0,5	±0,3
pH operacional	5,0-9,0	4,8-7,7	5,5-7,8	6,3-7,6	3,0-4,0	3,0-4,0	2,0-3,9	1,9-3,9
t de resposta (s)	<20	–	<40	–	<20	–	<20	–
Nº amostras hora^{-1}	–	≈ 145	–	≈ 130		≈ 130	–	≈ 80
R^2	>0,9989	>0,9998	>0,9995	>0,9998	>0,9996	>0,9991	>0,99910	>0,9992

No que se refere a selectividade, ter-se-ia esperado uma melhoria nas características dos eléctrodos com a passagem da sua avaliação desde as condições estacionárias para as condições de fluxo. Dado que a membrana sensora apresenta, supostamente, uma maior afinidade para a espécie principal do que para a espécie interferente, a resposta potenciométrica mais evidenciada perante um menor tempo de contacto será aquela produzida pelo ião principal.

Esta situação é verificada com os detectores potenciométricos de PRO, porém, no que se refere aos detectores de TRI encontram-se propriedades de selectividade semelhantes, e em relação aos detectores de CEF e de TC ocorre até um decréscimo na selectividade registada. Esta situação será, então, motivada pela realização de ensaios em fluxo nos quais o ião principal coexiste em solução com o ajustador de força iónica e/ou pela baixa mobilidade das espécies orgânicas avaliadas, e que constituem sempre o ião principal.

Independentemente destas características de selectividade, as análises efectuadas indicam, genericamente, bons resultados analíticos. Embora de um modo geral exactos, os resultados das análises potenciométricas aproximam-se mais daqueles fornecidos com base num método independente quando os procedimentos decorrem em fluxo. Este sistema permite mesmo contornar problemas de interferências e de viscosidade de matriz encontrados.

Características como a selectividade para a espécie que se pretende determinar e a ampla zona de resposta apresentadas pelos detectores permitem obviar algumas etapas pré-analíticas, conferindo assim simplicidade aos sistemas de fluxo envolvidos. Efectivamente, a máxima complexidade das montagens utilizadas limita-se a estabelecer o ajuste de força iónica e/ou pH das soluções de medida, por confluência da amostra com a solução ajustadora.

Com os sistemas estabelecidos comprova-se ainda a sua aplicabilidade na monitorização de outros parâmetros envolvidos no controlo de qualidade, mais propriamente os ensaios de dissolução *in vitro* de formas sólidas. A possibilidade de realização deste ensaio, que decorre por um longo período de tempo e em que a amostra é injectada periodicamente e a sua leitura realizada sem qualquer tratamento químico, constituem uma vantagem imediata uma vez que oferecem resultados em tempo muito próximo ao real.

No caso particular da análise de injectáveis de DOP, em que se opta por uma determinação indirecta, é possível, sem quaisquer tratamentos prévios da amostra, realizar a leitura "directa" do fármaco inserido no sistema. Neste sentido, as análises decorrem com uma simplicidade extrema, permitindo frequências analíticas muito elevadas, e com um baixo custo no que se refere à instrumentação e aos operadores envolvidos.