Adriana Martins Pimenta

CONTROLO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS BASEADO EM SISTEMAS DE EXACTIDÃO AFERIDA

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO
2003

Adriana Martins Pimenta

Licenciada em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Porto

CONTROLO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS BASEADO EM SISTEMAS DE EXACTIDÃO AFERIDA

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



FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

2003

Para o André

ÍNDICE

PREÂMBULO

AGRADECIMENTOS ..... *VII*

RESUMO ..... *IX*

ABSTRACT ..... *XI*

LISTA FIGURAS ..... *XIII*

LISTA TABELAS ..... *XIV*

ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO ..... *XV*

CAPÍTULO I- INTRODUÇÃO **1**

1. CONTROLO QUALIDADE MEDICAMENTOS *1*

1.1 Qualidade e segurança 1

1.2 Especificações de qualidade 6

1.3 Controlo químico 9

1.4 Métodos instrumentais de análise utilizados no desenvolvimento de medicamentos 11

1.4.1 Descoberta de uma nova molécula 13
1.4.2 Análise farmacêutica 13
1.4.2.1 Controlo das matérias-primas 13
1.4.2.1.1 testes de identificação 14
1.4.2.1.2 testes de pureza 15
1.4.2.1.3 testes de potência 16
1.4.2.2 Desenvolvimento da formulação 17
1.4.2.3 Produção e controlo 18
1.4.2.4 Estudo da estabilidade 19
1.4.3 Ensaios clínicos 20
1.5 Referências bibliográficas 21

2. GARANTIA DE QUALIDADE ANALÍTICA *23*

2.1 Princípios de qualidade 23

2.2 Programa de garantia de qualidade 26

2.3 Validação de métodos analíticos 29

2.3.1 Adequação da validação de métodos na análise de produtos farmacêuticos ... 30
2.3.2 Validação interna 32

2.3.3 Características de validação 33
2.3.3.1 Exactidão 33
2.3.3.2 Precisão 38
2.3.3.3 Especificidade 40
2.3.3.4 Limite de detecção e quantificação 42
2.3.3.5 Linearidade e intervalo 44
2.3.3.6 Robustez/rigidez 45
2.3.3.7 Testes de adequação do sistema 46
2.3.3.8 Revalidação 47
2.4 Controlo de qualidade 48
2.4.1 Controlo de qualidade interno 48
2.4.2 Controlo de qualidade externo 50
2.4.2.1 Estudos colaborativos 50
2.4.2.2 Testes de competência 52
2.4. 2.3 Auditoria 53
2.5 Acreditação e certificação 53
2.6 Incerteza de uma medida 54
2.7 Rastreabilidade de uma medida 55
2.8 Referências bibliográficas 57
3. O ERRO NA ANÁLISE QUÍMICA 61
3.1 Erro experimental 61
3.2 Erro aleatório 62
3.3 Erro sistemático 62
3.3.1 Erros instrumentais 63
3.3.2 Erros pessoais 64
3.3.3 Erros de método 65
3.3.3.1 Efeitos dos erros de método nos resultados analíticos 65
3.3.3.2 Erros constantes ou aditivos 66
3.3.3.3 Erros proporcionais 66
3.3.3.4 Detecção dos erros sistemáticos de método 67
3.4 Erro humano 68
3.4.1 Considerações gerais 68
3.4.2 Classificação dos erros humanos 70
3.4.3 Erros activos 71
3.4.3.1 Origem dos erros activos 74
3.4.3.2 Tipos e formas de erros activos 77
3.4.4 Erros latentes 78
3.4.5 Os erros de um sistema e o modelo do queijo suiço 79
3.4.6 Gestão do erro 81
3.4.6.1 Prevenir os erros 82
3.4.6.2 Tornar os erros visíveis 83
3.4.6.3 Mitigar os efeitos dos erros 84
3.4.7 Tácticas para reduzir os erros e os acidentes 84
3.4.7.1 Reduzir a complexidade 84
3.4.7.2 Optimização do processamento de informação 85
3.4.7.3 Automatização inteligente 85
3.4.7.4 Uso de constrangimentos 87
3.4.7.5 Atenuar os efeitos adversos provocados por uma alteração 87
3.4.8 Programas não punitivos para relatar os erros e os acidentes 88

3.5 Referências bibliográficas 89

4. AUTOMATIZAÇÃO DA ANÁLISE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS 91

4.1 Automatização com a técnica de Análise por Injecção Sequencial 91

4.2 Aplicação da técnica de Análise por Injecção Sequencial à análise farmacêutica 101

4.2.1 Determinação do teor de princípio activo em formulações farmacêuticas 103
4.2.1.1 Absorvância no Ultravioleta e Visível 103
4.2.1.2 Fluorimetria 108
4.2.1.3 Quimiluminescência 108
4.2.1.3 Electroquímica 109
4.2.2 Monitorização dos processos de produção de compostos farmacêuticos 115
4.2.3 Ensaios de dissolução de formulações farmacêuticas 118
4.2.4 Ensaios funcionais e rastreio de novos fármacos 122
4.3 Referências bibliográficas 127

5. ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS GERAIS DO TRABALHO 132

5.1 Referências bibliográficas 133

CAPÍTULO II- DETERMINAÇÃO DE CAPTOPRIL 134

CAPÍTULO III- DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO 144

3.1 – ELÉCTRODOS SELECTIVOS A CLAVULANATO 145

3.2 – SISTEMA DE ANÁLISE POR INJECÇÃO SEQUENCIAL PARA DETERMINAÇÃO DE CLAVULANATO 150

CAPÍTULO IV- DETERMINAÇÃO DE DICLOFENAC 158

CAPÍTULO V- DETERMINAÇÃO DE CLORETOS 170

CAPÍTULO VI- CONSIDERAÇÕES FINAIS 193

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação resultou de um trabalho de investigação que contou com vários apoios. É, para mim, um grande prazer enumerá-los:

- Prof.ª Doutora Maria da Conceição Montenegro, a quem manifesto o meu perene reconhecimento pela forma como orientou o meu trabalho. Penhoram-me as suas recomendações, a transmissão dos seus conhecimentos, assim como a cordialidade e disponibilidade com que sempre se dignou receber-me. Também a liberdade de acção que me concedeu na condução dos trabalhos foi decisiva para o desenvolvimento da minha aptidão científica e valorização pessoal;

- Prof. Doutor Alberto Araújo, a quem apresento o meu agradecimento pela forma prestável como sempre me ajudou. A sua co-orientação empenhada, criativa e inteligente foi uma nota dominante;

- Prof. Doutor José Luís Costa Lima, a quem agradeço todos os meios disponibilizados para a realização deste doutoramento, bem como o modo como me acolheu no laboratório;

- Fundação para a Ciência e para a Tecnologia, no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio, a quem agradeço a bolsa de doutoramento que me foi atribuída e todo o apoio financeiro, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho;

- Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, a quem agradeço ter-me aceite como estudante de doutoramento;

- Profs. Doutores: Salete Reis, Beatriz Quinaz, Rui Lapa, Agostinho Almeida, que me prestaram um grande auxílio nas mais diversas fases do trabalho;

- Prof. Doutor João Santos, a quem devo um agradecimento pelas suas apreciações críticas na elaboração dos artigos publicados;

- Prof.ª Doutora Lúcia Saraiva, a quem estou também muito grata pela boa vontade demonstrada ao disponibilizar-me as referências bibliográficas na área da análise em fluxo;

- Prof.ª Doutora Cristina Couto, a quem agradeço a amizade, paciência e a atenção que me dedicou, em especial no período em que mais precisei;

- Dr.ª Isabel Cardoso, a quem agradeço os inúmeros ensinamentos de vida, cuja enumeração não cabe no espaço desta tese, mas que foram igualmente valiosos. Estou-lhe igualmente grata pela amizade demonstrada e pelas suas mensagens nocturnas de incentivo;

- Grupo de investigação de Química Analítica da UNICAMP, em particular aos Prof. Doutores Célio Pasquini e Ivo Raimundo, a quem agradeço o apoio e hospitalidade durante a minha estada em Campinas (Brasil), e a ainda a possibilidade de poder contactar com outros métodos instrumentais de análise;

- Ex-alunos do laboratório de Química-Física: Rita Catarino, Rui Cerdeira, Ivone Valente, Paula Baptista, Carla Alves e Susana Teixeira, que são dignos do meu apreço por me terem auxiliado durante a fase inicial do meu doutoramento;

- Alunos do mesmo laboratório: João Prior, Paula Jerónimo, Paula Pinto, Cristophe Siquet, Cristina Lopes, Pedro Maia, Karine Marques, Marlene Lúcio e Helena Ferreira, a quem agradeço a boa disposição que trouxeram para o laboratório e a amizade que me têm demonstrado;

- Emília Santos, cuja participação nas conversas científicas dedicadas aos nossos eléctrodos, assim como a amizade com que me distinguiu durante estes anos de investigação merecem o meu reconhecimento;

- Néstor Zarate, que muitas saudades deixou no laboratório, a quem agradeço as chaves de fluxo, que amavelmente me emprestou, e também a sua participação nas discussões e lamentações que nos ajudavam a resistir às contrariedades do trabalho;

- D. Belmira Pereira, a quem agradeço a sua ajuda na construção dos eléctrodos e o apoio que me dispensou;

- À minha família, agradeço a paciência e resignação pelo aparente esquecimento a que foi votada nas minhas ausências prolongadas, a que a execução deste trabalho me obrigava. Obrigada por, mesmo assim, estarem sempre presentes;

- Por último, para o André: a sua compreensão e paciência ilimitada, aliadas ao seu carinho merecem toda a minha gratidão.

RESUMO

Neste trabalho fez-se uma abordagem teórica acerca das exigências colocadas à análise farmacêutica moderna. Os regulamentos relacionados com o controlo de qualidade de medicamentos passaram a exigir uma série de análises adicionais, que anteriormente não eram necessárias. Esta situação originou o desenvolvimento de metodologias analíticas a funcionar em grande escala e a obtenção de resultados rápidos e económicos. No entanto, estas características não garantem a credibilidade desses resultados. A qualidade dos resultados está dependente da existência de um programa de garantia de qualidade que assegure a qualidade das operações de um laboratório e de um controlo de qualidade que descreva as medidas individuais para controlar e avaliar uma operação analítica em particular. Nesta linha de pensamento, o objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento de sistemas analíticos para o controlo químico de formulações farmacêuticas que, de modo autónomo, garantissem a obtenção de resultados com qualidade. Explorando as vantagens de versatilidade, robustez, baixo custo de análise e simplicidade de operação dos sistemas de análise por injecção sequencial (SIA), propuseram-se montagens com dois sistemas de detecção, baseados em princípios de operação diferentes, para a determinação do mesmo princípio activo, proporcionando desta forma uma análise comparativa dos resultados em tempo real. Se os resultados obtidos pelas duas metodologias fossem concordantes, tinham a confiança requerida. Quando os resultados eram discordantes, indicavam uma falha no desempenho do sistema analítico, ou revelavam a presença, em determinadas amostras, de espécies interferentes que condicionavam o sinal analítico em pelo menos uma das metodologias, ou podiam ainda reflectir uma alteração química do analito monitorizado. Esta estratégia tinha como finalidade resolver os problemas de qualidade dos resultados analíticos, que frequentemente se colocam na análise de produtos farmacêuticos em rotina. Foi também objectivo do trabalho desenvolver metodologias analíticas automatizadas mais simples, económicas, que não necessitassem de extensos pré-tratamentos de amostra. Os resultados fornecidos pelas metodologias propostas foram comparados com os obtidos pelos métodos de referência, demonstrando não existir diferenças estatisticamente significativas. Os procedimentos desenvolvidos mostraram constituir alternativas reais às metodologias de cromatografia de alta resolução frequentemente propostas nos códigos oficiais que, embora confiáveis, são mais dispendiosas e mais exigentes na manutenção. As quatro montagens desenvolvidas possibilitavam a determinação de captopril, ácido

clavulânico, diclofenac e cloreto em formulações farmacêuticas e provaram ser úteis para as determinações em grande escala, exigidas no controlo de qualidade de produtos farmacêuticos. Além disso, tinham a vantagem de fornecer uma indicação acerca da qualidade dos resultados obtidos, em tempo real.

ABSTRACT

In this work a theoretical overview on the demands of modern pharmaceutical analysis is carried out. The restricted regulations surveying the quality control of pharmaceuticals determined a cluster of additional analysis that, in the past years, was not required. This new situation instigated the development of analytical methodologies able to large scale operation and the attainment of fast and inexpensive results. However, these characteristics are not directly related to reliability and accuracy guaranteeing the credibility of the results. Results quality is always dependent of a quality assurance program that supervises and certifies laboratory practices and of a quality control that described the individual measures that should be taken to control and evaluate any particular analytical operation. In this sense, the main goal of this work was the development of analytical systems for the chemical control of pharmaceutical formulations, which, in an autonomous mode would be able to guarantee the accomplishment of certified results. By exploiting the evident advantages associated to the versatility, robustness, low operational cost and implementation simplicity of sequential injection analysis (SIA) systems, distinct manifolds with two detection systems and based on different operational principles were proposed for the determination of the same analyte, which enabled a real time comparative evaluation of the obtained results.

When the results furnished by the two methodologies were comparable, reliability and accuracy were reinforced. On the other hand, when results were dissimilar they indicated either a malfunction of the analytical systems or the presence of interfering species that conditioned the analytical signal of, at least, one of the methodologies or they could as well reflect a chemical alteration of the analyte. This strategy was primarily aimed at solving eventual problems of quality of the results obtained in the routine analysis of pharmaceutical products. Additionally, the development of automated analytical methodologies simpler, economical and not requiring extensive sample pre-treatments was also taken into consideration. The results furnished by the proposed methodologies were comparatively evaluated with those furnished by the reference procedures and no significant statistical differences were established. The developed procedures demonstrated that they could be advantageous alternatives to the high performance chromatographic techniques frequently recommended by the reference monographies, which, although reliable, are much more expensive and more maintenance demanding. The four developed manifolds enabled the

determination of captopril, clavulanic acid, diclofenac and chloride in pharmaceutical formulations, and confirmed that they are especially useful in large scale analysis involving a significant number of samples, as is the case of routine quality analysis of pharmaceutical products. Moreover, and as an advantage, they are able to provide the quality of results in real time.

LISTA FIGURAS

Figura 1 - Etapas de desenvolvimento de um medicamento 11
Figura 2 - Relação entre os conceitos e práticas de qualidade 26
Figura 3 - Comparação da distribuição das causas de erro na medicina e na indústria petroquímica. 69
Figura 4 – Classificação do erro activo 74
Figura 5 - Os dois modos de controlo cognitivo: controlo consciente da memória operativa e controlo inconsciente da memória a longo termo. 75
Figura 6 - Modelo do queijo suiço explicando como pode ser criada uma trajectória de acidente ao longo das camadas de defesa de um sistema 80
Figura 7 - Classificação das variedades do erro humano 81
Figura 8 - Representação esquemática de um sistema básico de Análise por Injecção em Fluxo (FIA). 94
Figura 9 - Representação esquemática de um sistema básico de Análise por Injecção Sequencial (SIA). 96
Figura 10 - (a) Representação esquemática de um sistema de Análise por Injecção Sequencial em associação com a Análise por Injecção de Partículas (SI- BI). (b) Representação esquemática de um ciclo analítico 99
Figura 11 - Sistema de Micro Injecção Sequencial (LOV). 100

LISTA TABELAS

Tabela 1 - Antecedentes históricos das Leis e Regulamentos pelos quais se rege a indústria farmacêutica. 2
Tabela 2 - Principais áreas de intervenção da química analítica no programa de desenvolvimento de medicamentos 12
Tabela 3 - Elementos necessários para a validação de um ensaio [30] 32
Tabela 4 - Estratégias para demonstrar a exactidão de acordo com as normas propostas pela ICH [31,32] 37
Tabela 5 - Procedimentos para determinar o limite de detecção e quantificação [31,32][a] 43
Tabela 6 - Classificação do tipo de erros primários de acordo com a etapa cognitiva em que ocorrem [24] 78
Tabela 7– Sistemas de Análise por Injecção Sequencial para análise de teor princípio activo 111
Tabela 8 – Sistemas de Análise por Injecção Sequencial para monitorização de processos 117
Tabela 9 – Sistemas de Análise por Injecção Sequencial para ensaios dissolução 121
Tabela 10 – Sistemas de Análise por Injecção Sequencial para ensaios funcionais 126

ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A dissertação apresentada é composta por duas partes e foi organizada em capítulos, num total de seis. Na primeira parte, que constitui o capítulo I, foram abordados teoricamente os problemas colocados à análise farmacêutica, com o propósito de enquadrar o trabalho experimental realizado (capítulo II-V). A segunda parte da tese é formada pelos capítulos II a V e pelo capítulo VI, sendo este último destinado às conclusões finais.

No capítulo I fez-se uma reflexão sobre as necessidades do controlo de qualidade dos medicamentos, para depois serem tratados os métodos analíticos envolvidos nesta matéria. Seguidamente, analisou-se o estado do conhecimento e a evolução dos conceitos de garantia de qualidade analítica, procurando enfatizar a importância da obtenção de resultados confiáveis. Ainda neste contexto, e porque estão intrinsecamente associados com a qualidade dos resultados, foram tratados os erros envolvidos na análise química. Nesta secção, apresentam-se as propostas encontradas na literatura para a sua detecção e minimização. Finalmente, o conceito de automatização, na perspectiva da melhoria do desempenho das metodologias analíticas, é também abordado, atribuindo-se particular relevância à técnica de análise por injecção sequencial. Aqui, fez-se uma revisão dos trabalhos realizados em sistemas de análise por injecção sequencial aplicados à análise de produtos farmacêuticos, distinguindo-se as vantagens apresentadas por esta técnica.

Nos capítulos II a V são apresentados os trabalhos experimentais relativos ao desenvolvimento de procedimentos automatizados de análise para o controlo de medicamentos, na forma de compilação de artigos redigidos ao longo do período correspondente à realização desta investigação.

O capítulo VI é dedicado às considerações finais, destacando-se os aspectos mais relevantes de todo o trabalho desenvolvido, procurando demonstrar as potencialidades das soluções propostas para a análise de produtos farmacêuticos.

CAPÍTULO I- INTRODUÇÃO

1. CONTROLO QUALIDADE MEDICAMENTOS

1.1 Qualidade e segurança

Uma série de acontecimentos, alguns com consequências trágicas (Tabela1), relacionados com as adulterações e intoxicações alimentares, e com os efeitos secundários de medicamentos, motivou a reacção das administrações sanitárias. Através de um vasto conjunto de normas, directivas e recomendações, as autoridades reguladoras competentes passaram a exigir às indústrias o controlo cada vez mais rigoroso dos seus produtos [1].
Neste âmbito, a indústria farmacêutica mantém elevados os padrões de exigência em matéria de qualidade, segurança e eficácia, durante todo o processo de desenvolvimento,

fabrico e controlo de medicamentos. Estas exigências prendem-se com os aspectos morais e legais que, de modo inextricável, se relacionam com os medicamentos pois estes não deverão colocar em risco acrescido os doentes que deles se socorrerem.

Tabela 1 - Antecedentes históricos das Leis e Regulamentos pelos quais se rege a indústria farmacêutica.

ACONTECIMENTO	REACÇÃO
- Adulterações e falsificações de alimentos [2]	1906. Fundação da Food and Drug Administration (FDA). Ilegaliza a venda de alimentos e medicamentos adulterados ou falsificados [2]
- Intoxicações com preparações líquidas de sulfanilamida com dietilenoglicol causam a morte de 107 pessoas [2]	1938. FDA exige que se garanta a segurança (ausência de toxicidade) das formulações farmacêuticas [2]
- 300 mortes e lesões devido à distribuição de comprimidos de sulfatiazol contaminados com fenobarbital [3]	1941. FDA revê drasticamente a produção e controlo de qualidade, iniciando o que mais tarde se iria designar "Good Manufacturing Practices (GMPs)" [3]
- 60 pessoas são inoculadas com o vírus da poliomielite através de uma vacina com o vírus inactivado e 89 membros destas famílias contraem a poliomielite [4] - 10000 casos estimados de malformações em crianças associadas com a talidomida [2]	1962. Suplementos de Kefauver-Harris. Os produtores são obrigados a provar a eficácia dos produtos antes de serem comercializados e têm de garantir um controlo rigoroso durante os testes aos medicamentos [2]

Tabela 1 - Antecedentes históricos das Leis e Regulamentos pelos quais se rege a indústria farmacêutica (continuação)

ACONTECIMENTO	REACÇÃO
- Acidentes com a utilização de um dispositivo intrauterino [2]	1978. São finalmente publicadas as "current GMPs" para medicamentos e dispositivos médicos [5,6]. 1979. São publicadas as "Good Laboratory Pratices (GLPs)" para serem aplicadas nos laboratórios onde são realizados os estudos não-clínicos para a investigação e comercialização de medicamentos para uso humano ou animal, dispositivos médicos para humanos e produtos biológicos [7].
- 7 mortes causadas por cápsulas de acetaminofeno envenenadas com cianeto, pós-produção [8]. - 1500 casos, incluindo 38 mortes, de sindrome mialgia-eosinofilia associados com L-triptofano [9] - Escândalos de fraude e corrupção na indústria de genéricos [10,11]	1982. Revisão das GMPs com a incorporação das regras de embalagens com abertura inviolável [12] 1985. Última revisão das GMPs da CEE 1987. Introdução do conceito de validação de processos [13] 1992. Aplicação de multas em casos de corrupção e fraude envolvidos na abreviação ilegal de aplicações de novos medicamentos genéricos [10] 1992. Entrada em vigor em Portugal do Guia do Bom Fabrico de Medicamentos e das GMPs da CEE [14] 1996. Proposta de revisão das cGMPs para medicamentos e produtos biológicos, com a incorporação de pormenores de validação, uniformização, prevenção da contaminação cruzada, tratamento dos resultados dos testes de especificação [1] 1997. Estabelecimento de regras para controlo e protecção de dados electrónicos [1] 1998. Directrizes para a Indústria ("Guidance for Industry: Manufacturing, Processing, or Holding of Active Pharmaceutical Ingredients") [15]

Actualmente, a qualidade dos medicamentos é baseada no fabrico de acordo com normas recomendadas e também no controlo dos materiais de partida, durante o processo de fabrico e dos produtos acabados. As actualizadas Boas Práticas de Fabrico de Medicamentos, conhecidas como cGMP (do inglês: current Good Manufacturing Practice), são normas aceites internacionalmente que se destinam a oficializar um conjunto de regras a que o fabrico de medicamentos deve obedecer, e são consequência lógica da industrialização do seu processo de produção [5]. Exige-se que os medicamentos, as instalações e os controlos usados no seu fabrico, processamento, embalagem ou armazenagem estejam de acordo com práticas que asseguram que esses medicamentos cumprem a Lei em termos de segurança e que possuem a identidade, a potência, a qualidade e a pureza características esperadas. Neste sentido, os regulamentos das cGMPs preocupam-se com critérios específicos para o programa de garantia de qualidade, edifícios, equipamentos, pessoal, componentes, fórmulas magistrais e registos de produção de lotes, procedimentos de fabrico e controlo, embalagens de produtos, rotulagem, controlos laboratoriais, registos de distribuição, estabilidade, registos de reclamações, recolhas de produto e auto-inspecções.

O fenómeno da globalização dos mercados tem influenciado de forma decisiva a indústria de farmacêutica. Os novos medicamentos são desenvolvidos para mercados globais e, de uma forma geral, são comercializados globalmente. Aqui, as cGMP são também instrumentos indispensáveis para impulsionar a exportação dos produtos, pois a maioria dos países só aceita a sua importação e comercialização se tiverem sido produzidos segundo estas normas reconhecidas internacionalmente. Contudo, cada país tem autoridades reguladoras próprias que definem os requisitos necessários para testar os medicamentos, em termos controlo de qualidade, de especificações e de métodos. O cumprimento destes requisitos está na base da obtenção da autorização de comercialização. Tem sido feito um esforço enorme no sentido da harmonização mundial dos requisitos de qualidade, e foi com o estabelecimento da ICH (International Conference on Harmonization) que se iniciou, de uma forma decisiva, este processo de aproximação global. Este projecto conta com as autoridades reguladoras da Europa, Japão e Estados Unidos e ainda com peritos da indústria farmacêutica destas três regiões para discutir os aspectos científicos e técnicos do registo de produtos. A ICH pretende contribuir para uma harmonização na interpretação e aplicação das normas e requisitos do registo de produtos, de forma a reduzir ou obviar a necessidade de duplicar os testes efectuados durante a investigação e desenvolvimento de novos medicamentos. O objectivo é o uso mais económico das fontes humanas, animais e materiais, evitar atrasos desnecessários no desenvolvimento global e na disponibilidade de novos medicamentos, mantendo exactamente os mesmos padrões de qualidade, segurança e eficácia, e obrigações

reguladoras para proteger a Saúde Pública mundial. Os documentos publicados pela ICH tornaram-se a "prática corrente da indústria" em todos os países participantes [16,17].

Em Portugal, foi publicado em 1991 o "Guia para o Bom Fabrico de Medicamentos" (Anexo à Portaria n.º 42/92, de 23 de Janeiro), que se trata de uma adaptação de directrizes comunitárias sobre a matéria. A aplicação deste guia é recomendada a todos os processos de fabrico farmacêutico em grande escala, incluindo os efectuados nos hospitais [14]. De acordo com este guia, para que se alcance a fiabilidade do objectivo de qualidade, deve ser implementado um sistema credível de garantia de qualidade que inclua as práticas de bom fabrico e, consequentemente, um controlo da qualidade.

A garantia de qualidade (QA) (do inglês: Quality Assurance) é um conceito suficientemente abrangente para englobar todos os aspectos que individualmente ou colectivamente, influenciam a qualidade de um produto. O conceito de QA é definido como "um conjunto de acções organizadas que assegura que os medicamentos têm a qualidade exigida para o fim a que se destinam" [14]. As séries ISO 9000 (do inglês:International Standard Organization) fazem parte de um sistema de garantia de qualidade normalizado de aplicação generalizada nas empresas, criado para benefício do produtor e do consumidor. A incorporação das cGMP neste sistema de qualidade, melhora não só o próprio sistema de qualidade mas também todos os procedimentos gerais da empresa. Considera-se que a garantia de qualidade inclui as cGMP, que devem ser consideradas uma boa ajuda mas nunca um substituto de um programa de garantia de qualidade. As cGMP são a parte da garantia de qualidade que assegura que os produtos são produzidos e controlados com padrões de referência adequados. Dizem respeito fundamentalmente à produção, mas também englobam procedimentos típicos de controlo de qualidade. O controlo de qualidade é parte integrante das práticas de bom fabrico no que concerne à amostragem, às especificações e aos ensaios. Contempla igualmente aspectos relacionados com a organização, documentação e procedimentos que asseguram que nenhum dos materiais a utilizar no fabrico, e que nenhum dos medicamentos aprovados para a venda ou distribuição, sejam dispensados, até que a sua qualidade seja julgada satisfatória. Em última análise, o controlo de qualidade assegura a conformidade do medicamento com a especificações que lhe dizem respeito, e adicionalmente garante as características consistentes e reprodutíveis dos medicamentos, tanto quanto o possível, em todos os lotes, em todo o mundo e independentemente do fabricante que os produz, de forma a garantir similitude dos efeitos farmacodinâmicos em todos os doentes.

Até aos anos 40 do século passado, o controlo de qualidade circunscrevia-se unicamente à análise das matérias-primas activas de acordo com as Farmacopeias ou códigos oficiais. Com a crescentes preocupações de qualidade, a indústria farmacêutica passou a controlar não só as matérias-primas mas também os produtos finais.

Presentemente, o controlo dos produtos finais só é realizado após uma série de verificações durante o fabrico, designadas controlo em processo. Assim, enquanto que o controlo dos produtos finais apenas comprova que os produtos satisfazem ou não os requisitos pré-estabelecidos, o controlo em processo fornece indicações acerca do estado dos processos de produção e pode ser utilizado para efectuar correcções, se for caso disso, melhorando a consistência e qualidade dos lotes, e economizando tempo e matérias-primas. A filosofia em vigor nos dias de hoje preconiza a produção da qualidade e não apenas o seu controlo, ou seja, a monitorização da qualidade antes e ao longo do processo de fabrico garante a qualidade dos produtos finais, diminuindo o número de testes realizados sobre estes produtos.

1.2 Especificações de qualidade

Durante todo o processo de fabrico do medicamento o controlo de qualidade é o responsável pelo estabelecimento exacto das especificações de qualidade. É também da sua responsabilidade a definição dos testes apropriados para avaliação das especificações, assim como o estabelecimento dos seus limites de aceitação. As especificações descrevem, pormenorizadamente, as exigências a que os produtos, ou materiais utilizados durante o fabrico, devem obedecer e são as bases de apreciação da qualidade.

As especificações básicas para definir a qualidade de um produto encontram-se oficialmente compiladas nas monografias das Farmacopeias, que têm a responsabilidade legal de as publicar. Estas monografias descrevem os testes para as matérias-primas e para as formulações farmacêuticas. Desde testes de uniformidade de teor até ensaios de dissolução, e de testes de identificação até métodos de doseamento, cada secção descreve procedimentos específicos que são obrigatórios para o controlo adequado do produto. As especificações da Farmacopeia são concebidas de forma a que os testes e requisitos de aceitação sejam aplicados por todos os fabricantes de produtos farmacêuticos, e correspondem às normas mínimas às quais o produto deve obedecer durante o seu prazo de validade.

O cumprimento das especificações oficiais como única forma de julgar a qualidade de um produto pode não ser suficiente para as exigências da indústria farmacêutica. Com efeito, numa monografia oficial não é possível apresentar todos os testes que permitem detectar qualquer falha na qualidade de um produto. O fabricante pode ter necessidade de

estabelecer especificações com limites mais rigorosos ou acrescentar às especificações pré-estabelecidas mais testes de modo a poder garantir a segurança ou eficácia da forma farmacêutica final. Para avaliar as especificações de qualidade o fabricante pode ainda utilizar métodos alternativos mais exactos, específicos ou económicos do que os descritos na Farmacopeia. Não é obrigatório utilizar os métodos descritos na Farmacopeia oficial, desde que no final o seu produto obedeça aos requisitos legalmente impostos pela Farmacopeia. No entanto, no caso de haver uma acção judicial, os métodos da Farmacopeia são a base para determinar se o produto está de acordo com o estabelecido.

De um modo geral, as especificações definidas pelo controlo de qualidade devem permitir a manutenção de padrões de qualidade adequados e, ao mesmo tempo, permitir variações, dentro de intervalos razoáveis, no processo de fabrico, bem como intervalos razoáveis para os erros analíticos [18]. As especificações são tomadas como um padrão e devem ser suficientemente discriminatórias para diferenciar um material bom ou aceitável, doutro de qualidade inferior ou rejeitável. No entanto, as especificações devem ser práticas e realistas e devem reflectir os parâmetros necessários para definir o produto de forma a garantir o seu fabrico de um modo reprodutível e com um nível de qualidade adequado.

As características básicas de qualidade definidas pelas especificações são as seguintes:

- Identidade. Os ensaios de identificação garantem que a forma farmacêutica contém exactamente a substância activa que se deseja utilizar. São normalmente métodos químicos qualitativos e específicos, embora para alguns fármacos também possam ser utilizados métodos microbiológicos e farmacológicos. As medidas de constantes físicas apropriadas (ponto ou intervalo de fusão, índice de refracção, solubilidade em água e solventes orgânicos, massa específica, rotação óptica) são também consideradas úteis para a identificação e pureza de um composto. Os resultados são expressos como um intervalo de valores permitidos, para essa propriedade do fármaco.

- Pureza. Embora idealmente a substância activa deva ser isenta de contaminantes (impurezas), na prática tal não sucede e, por isso, as monografias das Farmacopeias estabelecem limites máximos toleráveis para impurezas, ou ausência de uma impureza ou contaminante específico. Os testes limite de impurezas podem ser quantitativos ou semi-quantitativos, e são concebidos para identificar e controlar pequenas quantidades de constituintes indesejáveis que podem eventualmente estar presentes. Uma lista de possíveis impurezas pode ser compilada a partir do conhecimento das matérias-primas utilizadas, do processo de fabrico (materiais de partida e intermediários ou subprodutos de síntese, reagentes, solventes, catalisadores e produtos de degradação) e da estabilidade do produto. A estas, devem ser adicionadas as impurezas que podem ter origem na contaminação física, ou que são resultado de condições inadequadas de armazenagem.

- Potência. O teor de princípio activo tem de ser determinado de forma quantitativa, existindo também limites estabelecidos entre o valor encontrado e o valor teórico declarado. Os testes de potência não são mais do que doseamentos que visam determinar a quantidade de uma substância activa num medicamento.

- Características gerais das formulações farmacêuticas, em particular as farmacotécnicas. São as características determinadas, de uma forma geral, por testes físicos com limites de aceitação, e que estão relacionadas com o desempenho do produto ou com a seu manuseamento (uniformidade de massa, testes de dureza e friabilidade de comprimidos).

- Estabilidade. Indica que o produto farmacêutico mantém as qualidades iniciais, dentro dos limites estabelecidos, durante o seu período de validade. Há razões legais, morais, económicas e competitivas, bem como de segurança e eficácia, que justificam a monitorização, previsão e avaliação da estabilidade de um medicamento. Os testes de estabilidade são normalmente realizados utilizando três combinações de temperatura/humidade distintas (4 °C/60 % humidade relativa; 25 °C/60 % humidade relativa; 40 °C/75 % humidade relativa). Estas experiências são realizadas colocando o fármaco em stress químico, para depois investigar a cinética da reacção, descrever a via de degradação, estabelecer, se possível, o mecanismo de decomposição e definir o prazo de validade recomendado e as condições de armazenagem a incluir no rótulo. Considera-se que o medicamento expirou o seu prazo de validade quando a eficácia clínica do ingrediente activo está comprometida, ou quando os níveis de produtos de degradação atingem um determinado limite.

- Eficácia. Significa que existe um princípio activo com uma acção farmacológica que actua produzindo um efeito com uma intensidade dentro de limites estabelecidos. Este tipo de estudos é realizado durante toda a fase de investigação de um novo medicamento. Os estudos são realizados primeiro nos ensaios pré-clínicos em animais, e depois, nos ensaios clínicos em humanos, onde também se estuda a sua biodisponibilidade.

- Segurança. Pretende estabelecer a dose correcta com o mínimo de efeitos secundários. Estabelece-se mediante estudos de toxicidade aguda e crónica em animais, na fase pré-clínica, e em seres humanos, nos estudos clínicos, para também conhecer as possíveis reacções adversas.

1.3 Controlo químico

Antes de qualquer demonstração directa das especificações de eficácia terapêutica e de segurança dos doentes através de ensaios clínicos, importa garantir que os medicamentos cumpriram todas as anteriores especificações de qualidade. Assim, a garantia de qualidade viabilizada por essas especificações poderá encurtar o tempo de aprovação de novos fármacos, evitar que problemas de qualidade deturpem resultados clínicos e ainda diminuir os custos globais do processo de produção. Significa que para além dos testes farmacológicos e toxicológicos indispensáveis para a avaliação da eficácia e segurança dos medicamentos, a indústria farmacêutica recorre a testes laboratoriais de carácter químico, físico e físico-químico para avaliar o cumprimento das especificações de qualidade.

Métodos analíticos altamente específicos, sensíveis e confiáveis desempenham um papel preponderante em todos os aspectos do controlo de qualidade, quer seja na avaliação das especificações das matérias-primas e excipientes, do controlo em processo, ou das especificações do produto acabado [19]. São igualmente importantes durante os ensaios clínicos, nos estudos farmacocinéticos e de biodisponibilidade, e ainda na monitorização terapêutica de medicamentos [20-22]. Com o objectivo de melhorar o controlo de qualidade de medicamentos, melhorando a eficácia e a segurança dos doentes, os métodos analíticos para testar as especificações estão a ser gradualmente substituídos por métodos cada vez mais selectivos. Esta tendência vem reflectida nas actualizações que as monografias das Farmacopeias têm vindo a sofrer.

A grande maioria dos métodos utilizados no controlo de rotina de qualidade descritos nas Farmacopeias baseia-se em metodologias bem estabelecidas como a espectrofotometria de ultravioleta (UV) e visível (VIS), espectrofotometria de infravermelho (IR), reacções de cor, determinação do ponto ou intervalo de fusão, titulação, cromatografia em camada fina (TLC), cromatografia de alta resolução (HPLC) e cromatografia gasosa (GC). Outros testes como o resíduo de ignição, perda por secagem e testes microbiológicos estão também bem estabelecidos. No entanto, podemos observar que os métodos tradicionais e convencionais de gravimetria e volumetria estão a ser suplantados pelos métodos instrumentais mais recentes.

As técnicas de HPLC, há muito tempo reconhecidas como técnicas superiores em termos de selectividade e sensibilidade em relação às técnicas de TLC, só nas últimas duas décadas foram definitivamente consideradas nas Farmacopeias. A mesma tendência pode ser observada nos dias de hoje em relação à electroforese capilar (CE), que foi

recentemente incorporada nas monografias da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP) [23] e na Farmacopeia Europeia (PhEur) [24]. Um outro exemplo é a aplicação bioanalítica da GC e da cromatografia líquida associada com espectrometria de massa (LC/MS) nos estudos farmacocinéticos. Estes são os métodos eleitos para a identificação qualitativa e quantitativa de fármacos e dos seus produtos de biodegradação, já que numa só análise é possível obter resultados com elevada precisão e exactidão. Estas técnicas tiveram um sucesso similar no controlo de qualidade utilizado para a quantificação de substâncias activas e dos seus produtos de degradação nas formulações farmacêuticas. A técnica MS, foi pela primeira vez descrita na PhEur, no suplemento 2000, e encontra-se também já incluída na Farmacopeia Portuguesa VII [25].

A espectrofotometria de infra vermelho próximo (NIR) é uma técnica analítica que só recentemente foi incorporada nas Farmacopeias, embora as suas enormes potencialidades tenham sido há muito evidenciadas na identificação de princípios activos em matérias-primas e em formulações farmacêuticas, de uma forma rápida, simples e não destrutiva [26, 27]. A espectrofotometria de absorção atómica (AAS), apesar de já ter sido utilizada em rotina no controlo de qualidade de formulações farmacêuticas para detectar a presença de metais pesados [26, 27], ainda não foi inscrita em nenhuma Farmacopeia.

Relativamente aos métodos microbiológicos continuam a ser aplicados testes muito morosos. Contudo, os métodos bioquímicos modernos (técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (PCR), e outras relacionadas) são cientificamente adequados e são usados na investigação e desenvolvimento de produtos biológicos. Estes testes têm um elevado potencial no controlo de qualidade pois facilitam e aceleram as investigações, encontrando-se já descritos na FP VII [25].

Os progressos das técnicas analíticas não são facilmente acompanhados pelas Farmacopeias. Analisando as suas actualizações, verifica-se que há sempre um intervalo de tempo entre a demonstração da fiabilidade de um novo método analítico e o seu reconhecimento e estabelecimento nos compêndios oficiais. Este espaço de tempo justifica-se porque a sua incorporação deve ser feita de modo gradual e equilibrado, tendo em conta o tempo de treino que é exigido aos técnicos que trabalham com estas técnicas cada vez mais sofisticadas. Além disso, as monografias das Farmacopeias são concebidas para serem aplicadas nas indústrias de fabrico de medicamentos, mas também têm a obrigação de serem aplicáveis nas farmácias de oficina, onde haja produção.

1.4 Métodos instrumentais de análise utilizados no desenvolvimento de medicamentos

O fabrico de medicamentos pode ser inserido no âmbito mais geral da indústria química, e assim compreende-se que os métodos analíticos desempenhem um papel importante em todas as fases de investigação, desenvolvimento, produção, armazenagem e uso clínico de medicamentos [28].

Na Figura 1 ilustram-se as etapas principais do desenvolvimento de um medicamento, depois de ter passado os ensaios preliminares efectuados sobre uma nova molécula com actividade terapêutica, e antes de ser libertado para os ensaios clínicos. Encontram-se resumidas na Tabela 2 as principais áreas de actuação da química analítica e os métodos instrumentais utilizados.

As técnicas analíticas acompanham todas as fases de um medicamento, desde a descoberta de uma nova molécula com actividade terapêutica, ao desenvolvimento de uma formulação, à sua produção e controlo, até ao uso clínico. A informação obtida com as técnicas analíticas é o suporte de importantes decisões tomadas durante todas estas fases que um medicamento tem de passar até ser comercializado.

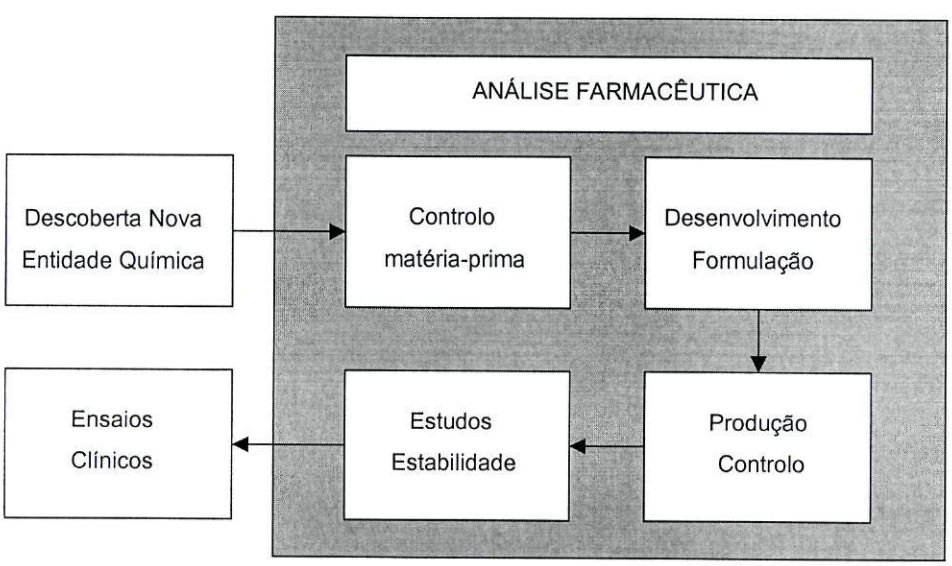


Figura 1 - Etapas de desenvolvimento de um medicamento

Tabela 2 - Principais áreas de intervenção da química analítica no programa de desenvolvimento de medicamentos

Síntese de uma nova entidade química com actividade terapêutica	Caracterização espectral; separação cromatográfica; caracterização de produtos intermediários; controlo em processo
Matérias-primas	Caracterização espectral (UV, IR, NMR, MS); caracterização cromatográfica (papel, TLC, HPLC, GC); avaliação pureza quiral; análise elementar; análise grupos funcionais; análise termoquímica; morfologia, polimorfismo, tamanho de partículas; testes de identificação; testes de pureza e testes de doseamento
Formulação	Estudos de pré-formulação; testes de dissolução; testes de uniformidade e de teor; testes de identificação e doseamento de substância activa
Estudos estabilidade	Identificação e quantificação dos produtos de degradação; ensaios de estabilidade; cinética de degradação; determinação do prazo de validade
Amostras biológicas	Estudos de biodisponibilidade, de bioequivalência, de farmacocinética e estudos metabólicos; monitorização de fármacos
Validação dos métodos analíticos	
Automatização	

1.4.1 Descoberta de uma nova molécula

Para se poder inferir o carácter medicamentoso de um nova molécula, são necessários concomitantemente diversos testes físico-químicos. A molécula deve ser exaustivamente caracterizada, para se extrair o máximo de informação em cada teste realizado. O novo produto a ser testado tem de ser caracterizado com a máxima precisão e a sua qualidade deve ficar claramente definida, para assim eliminar variações nas respostas terapêuticas e farmacológicas, e para poder identificar a origem de qualquer efeito tóxico. É também importante assegurar que os diversos lotes de material usados nos ensaios toxicológicos têm sempre o mesmo grau de qualidade, para ser possível estabelecer uma correlação entre os perfis analíticos obtidos com os materiais usados nos ensaios pré-clínicos (em animais), e os perfis analíticos obtidos com os materiais mais tarde utilizados nos ensaios clínicos (em humanos). Os testes realizados nesta fase vão permitir assegurar a qualidade do produto acabado, pois os processos de formulação e produção não acarretam genericamente a melhoria da qualidade de um material. Estes requisitos só podem ser satisfeitos através da identificação e quantificação da substância activa e também das potenciais impurezas presentes.

1.4.2 Análise farmacêutica

1.4.2.1 Controlo das matérias-primas

As matérias-primas utilizadas na produção de um medicamento têm de satisfazer uma série de requisitos impostos pelas especificações de qualidade, quer se trate das substâncias activas, dos excipientes, ou de quaisquer outros materiais. As características básicas que definem a qualidade são a identidade, pureza e a potência.

1.4.2.1.1 testes de identificação

Os ensaios de identificação são usados para confirmar a presença de um determinado composto nas matérias-primas utilizadas durante a produção de medicamento. A identificação dos produtos é normalmente realizada utilizando uma combinação de testes químicos em conjunto com a medida de constantes físicas adequadas.

Devido à sua grande especificidade estrutural a espectrofotometria de IR é uma técnica de uso comum nos procedimentos de identificação. A identificação de compostos com cromóforos apropriados, quando realizada com base nesta técnica, pode ser complementada com testes baseados nas características de absorção na região UV, que embora sejam menos específicos, são igualmente úteis. Em alguns casos particulares, quando a caracterização por estes testes é inadequada ou desapropriada, é possível recorrer à espectrofotometria de ressonância magnética nuclear (RMN).

A cromatografia TLC tem tido uma utilidade crescente na identificação de determinados compostos, principalmente quando é também usada para limitar a contaminação por substâncias relacionadas. Esta técnica é particularmente útil quando a substância activa a identificar se encontra em concentrações muito baixas. A cromatografia GC é utilizada em circunstâncias similares, com a vantagem de ser uma técnica mais sensível do que a TLC. Também a cromatografia de HPLC é útil para testes de identificação devido à sua enorme selectividade e sensibilidade, encontrado-se bem estabelecida nas monografias das Farmacopeias.

Existem ainda testes químicos que confirmam a presença de determinados grupos activos, onde se incluem: reacções de formação de cor, de precipitação, de decomposição, de formação de derivados e ainda as determinações analíticas inorgânicas de catiões e aniões. Estes testes nem sempre são suficientemente específicos para poderem ser utilizados isoladamente na identificação de um material, mas não deixam de ser relevantes quando são realizados em conjunto com outros testes, permitindo complementar a identificação de um produto.

As medidas das constantes físicas como o ponto ou intervalo de fusão, índice de refracção, solubilidade em água e solventes orgânicos, rotação específica, massa específica, pH, viscosidade, são propriedades características das substâncias que são utilizadas tanto para a sua identificação como para a determinação da sua pureza.

Outras características das substâncias, como por exemplo a cor, odor, aparência, também podem contribuir simultaneamente para a sua identificação e para a determinação do seu grau pureza.
Quando os testes de identificação são suficientemente específicos podem também ser usados como testes quantitativos de teor, ou como testes de determinação de limite de impurezas.

1.4.2.1.2 testes de pureza

O medicamento administrado ao doente é uma mistura que consiste na substância activa e num conjunto de substâncias inertes e de impurezas potencialmente activas. Consequentemente, embora a identificação do princípio activo seja de extraordinária importância, é necessário quantificar com exactidão as impurezas. Na maioria dos casos, as impurezas estão presentes em concentrações muito baixas, e por isso é necessário desenvolver testes individuais que sejam selectivos e ao mesmo tempo sensíveis.

No caso das impurezas inorgânicas, a grande maioria dos ensaios limite de impurezas descritos nas monografias é baseada na análise inorgânica quantitativa. Para a pesquisa de iões inorgânicos encontram-se descritos vários ensaios limite. Os testes utilizados nestes ensaios baseiam-se em reacções de cor e reacções de precipitação. Há ainda outros testes, menos específicos, que são descritos como ensaios limite e destinam-se a limitar um conjunto de impurezas similares como são exemplo a determinação de substâncias solúveis, substâncias voláteis, de solventes residuais, teor em água, perda por secagem, cinzas sulfatadas e a determinação do resíduo de ignição. É dada especial atenção às impurezas inorgânicas tóxicas como o níquel e a platina, que podem ter origem nos catalisadores e solventes utilizados no processo de síntese e cujo teor pode ser prontamente determinado por espectrofotometria de absorção atómica, ao nível de concentração de partes por milhão. Tanto os metais pesados referidos como outros elementos tóxicos (arsénio e antimónio) devem ser alvo de um controlo rigoroso, principalmente nos medicamentos de administração crónica como os antireumáticos e os antihipertensores, devido ao perigo de acumulação.

Para a determinação de impurezas orgânicas são descritos vários testes com base em reacções de precipitação e de coloração. Contudo, estas reacções são dependentes de factores como a concentração de soluto e de reagente precipitante, duração da reacção, temperatura de reacção e ainda pela presença de substâncias indesejáveis, e por isso não

têm a selectividade ou sensibilidade adequadas. Nestes casos, é usual o recurso a testes limite com base em técnicas cromatográficas como TLC, GC e HPLC, que permitem a rápida separação e identificação das impurezas através dos seus valores característicos de R_F, e dos seus tempos de retenção e eluição [29,30]. Outras técnicas separativas como a electroforese em papel e em gel são também utilizadas quando os testes limite por TLC se mostram ineficazes. As técnicas espectroscopicas continuam a ter um enorme peso tanto na identificação da substância activa como na identificação da estrutura química de cada uma das impurezas a pesquisar.

O controlo da pureza das substâncias quirais é particularmente importante pois a actividade farmacológica ou fisiológica dos enantiómeros individuais é altamente dependente da sua configuração molecular. Os métodos estereoespecíficos descritos nas monografias nas Farmacopeias para os isómeros ópticos baseiam-se na medida de rotação óptica ou ainda na técnica do dicroismo circular. Com o interesse crescente da determinação da pureza óptica de produtos farmacêuticos têm sido propostos outros métodos separativos, como as técnicas de HPLC, GC ou a CE com fase móvel ou estacionária quiral.

A avaliação da cor, aspecto, odor, pH da solução, solubilidade, índice de acidez ou alacalinidade, índice de peróxido, índice de saponificação são testes descritos, mesmo nas Farmacopeias mais antigas, que são também importantes para a determinação da pureza.

1.4.2.1.3 testes de potência

Depois de identificar o princípio activo e de conhecer a sua pureza torna-se indispensável determinar o teor de uma forma quantitativa e exacta. Idealmente, os métodos de ensaio para determinação da potência devem ser específicos para a substância a determinar. Esta situação ideal, nem sempre é compatível quando por exemplo se recorre às titulações ácido-base aconselhadas pelas monografias oficiais, uma vez que estas técnicas não oferecem a especificidade desejada. A análise colorimétrica ou no ultravioleta é também muito utilizada, mas geralmente também carece de selectividade. Estas técnicas estão actualmente a ser substituídas pelas técnicas cromatográficas de GC e HPLC, que além de excelentes técnicas separativas, são também técnicas de quantificação precisas.

1.4.2.2 Desenvolvimento da formulação

Depois da caracterização físico-química inicial do princípio activo, prossegue-se com o desenvolvimento da formulação final. A concepção de formas de dosagem apropriadas para novas entidades terapêuticas é um dos aspectos mais interessantes durante a fase de desenvolvimento de um medicamento. Nesta fase pretende-se obter uma boa estabilidade da formulação final e ainda desenvolver formulações que apresentem as características indispensáveis para a sua aceitação pelos doentes.

As características farmacotécnicas, avaliadas normalmente por testes físicos, são determinantes durante a fase de formulação, pois permitem avaliar o desempenho do produto final. Os testes mais frequentes são os ensaios de desagregação, ensaios de dissolução, uniformidade de massa, uniformidade de teor, testes de friabilidade e testes de dureza. São também avaliadas as características de identidade, pureza, potência e das novas formulações desenvolvidas, e ainda outras características que influenciam a sua eficácia. A solubilidade, o polimorfismo, o tamanho das partículas, ou o volume dispensado pelas gotas e a viscosidade são exemplos dessas características que se deseja controlar nesta fase.

As características do estado sólido dos ingredientes activos são especialmente relevantes para a eficácia das formulações farmacêuticas de dosagem oral, como os comprimidos, suspensões orais, preparações para uso tópico e aérossoles. Os compostos solúveis em água são libertados rapidamente para solução, ficando disponíveis para absorção sistémica. No entanto, as substâncias pouco solúveis, se não se apresentarem numa forma física apropriada, podem apresentar uma eficácia muito menor ou podem produzir respostas clínicas deficientes. O controlo do polimorfismo é um parâmetro crítico nos compostos que podem existir em duas formas polimórficas, e em que apenas uma delas é biologicamente activa. As técnicas de IR, a análise termogravimétrica (TGA) e a calorimetria de varrimento diferencial (DSC) são utilizadas na detecção e controlo do polimorfismo devido à sua grande sensibilidade.

O tamanho de partículas de compostos relativamente insolúveis é também um factor crítico que influencia a eficácia e a resposta consistente de compostos para administração oral, suspensões injectáveis e preparações de uso tópico. O controlo do tamanho de partículas é também, e independentemente da sua solubilidade, essencial na produção de aérossoles. A preparação de suspensões lipídicas para nutrição parenteral é também dependente do controlo adequado do volume da gota. O tamanho da partícula e a distribuição do tamanho das partículas podem ser determinados por métodos manuais simples, utilizando a microscopia ou a medida do volume de sedimento.

A medida do coeficiente de viscosidade é utilizado para controlar o tamanho molecular de compostos de elevado peso molecular. A viscosidade é uma medida importante no controlo das propriedades de fluxo de preparações semi-sólidas, como as pomadas e os cremes.

A avaliação das características de qualidade da formulação final, como a identidade, pureza, potência, é feita de igual modo à avaliação realizada sobre as matérias-primas. No entanto, os métodos analíticos utilizados nesta fase poderão ter de ser ajustados, ou até mesmo substituídos, devido à presença de compostos adicionais tais como excipientes, estabilizantes, sais de tampão, ou ainda no caso de formulações farmacêuticas de dosagem particular, como por exemplo as cápsulas, ampolas ou vacinas. Esta adaptação dos métodos analíticos justifica-se quando durante esta fase surgem problemas, como por exemplo: a insolubilização da formulação em condições analíticas, os excipientes interferem directamente com o método analítico, ou os sais de tampão catalisam reacções entre o solvente e o analito.

1.4.2.3 Produção e controlo

Os estudos de formulação têm como objectivo elaborar uma formulação ideal, para que se possa iniciar a produção das formas farmacêuticas em grande escala. Para garantir que os produtos finais possuem a identidade, pureza, a potência, qualidade e uniformidade pretendidas, os procedimentos de produção devem ser rigorosamente seguidos.

A produção é realizada seguindo exactamente os procedimentos de operacionais estabelecidos e é necessário, antes mesmo de iniciar a produção, verificar que todas matérias-primas utilizadas durante a produção cumpriram as especificações de qualidade previamente definidas.

Para assegurar que a produção decorreu como era esperado é necessário identificar os passos críticos do processo, verificar se estes foram convenientemente executados, e ainda avaliar se os padrões de qualidade do produto estão dentro dos limites previamente definidos. Esta estratégia é conhecida pelo controlo em processo, que não é mais do que uma série de testes concebidos para controlar os problemas que podem surgir durante a produção de uma forma farmacêutica, de forma a que uma acção correctiva e imediata possa ser considerada. O objectivo do controlo de qualidade em processo é monitorizar

todas as propriedades do produto que podem afectar a sua qualidade, podendo assim detectar variações em relação aos limites de tolerância de um produto.

Os testes ou as inspecções de controlo em processo são realizados em intervalos previamente definidos e o tipo de testes depende da forma farmacêutica produzida. O controlo de qualidade em processo a efectuar no caso de injectáveis inclui: 1) a verificação do teor da substância activa na solução a granel, antes do seu enchimento, 2) verificação do volume de enchimento de líquidos, durante o enchimento nos recipientes finais, 3) verificar o fecho das ampolas, 4) exame físico do produto, no que respeita à sua aparência, limpidez e contaminação com partículas, 5) exame dos indicadores de esterilidade. O controlo em processo para formas farmacêuticas sólidas inclui: 1) determinação do teor de princípio activo na formulação, 2) verificação da variação de massa, 3) verificação do tempo de desintegração e/ou dissolução, dureza e friabilidade, 4) exame por inspecção do produto. Para as preparações semi-sólidas, os controlos em processo a executar são os seguintes: 1) verificação da uniformidade e homogeneidade do teor de fármaco antes do enchimento, 2) determinação do tamanho das partículas, 3) verificação da aparência, viscosidade, massa específica, volume de sedimentação, 4) variação da massa durante a operação de enchimento, 5) prova de fecho das embalagens.

1.4.2.4 Estudo da estabilidade

Para avaliar a estabilidade a dos produtos farmacêuticos o método analítico escolhido deve ter a capacidade de distinguir o composto activo dos produtos de degradação, ou seja, deve ser suficientemente selectivo para fornecer resultados de qualidade. Existem ainda outras formas de avaliar a estabilidade de um produto através da monitorização da quantidade de um produto de decomposição.

Os métodos titrimétricos, os métodos de extracção com solventes e os métodos espectrofotométricos clássicos são bastante utilizados, embora careçam da especificidade desejada. A tendência actual é a substituição destes métodos por técnicas cromatográficas, que oferecem uma boa separação dos produtos de degradação e simultaneamente permitem a sua quantificação.

1.4.3 Ensaios clínicos

Os aspectos óbvios de qualidade, eficácia e segurança foram previamente demonstrados nos ensaios pré-clínicos efectuados em animais. O objectivo principal dos ensaios clínicos em humanos é evidenciar a eficácia e segurança clínica dos medicamentos quando administrados a seres humanos, pela via de administração proposta, com a dose indicada para a aplicação pretendida.

Nos ensaios clínicos, são realizados testes toxicológicos como os testes de toxicidade crónica, carcinogenicidade, teratogenicidade e estudos de fertilidade. A investigação da biodisponibilidade, do metabolismo, da farmacocinética, e o estudo dos efeitos adversos dos fármacos são também parte integrante dos ensaios clínicos.

Estes estudos são conduzidos inicialmente em animais (na fase pré-clínica) e ao longo do programa são transpostos para os ensaios clínicos, primeiro em seres humanos voluntários e depois em doentes em tratamento. Os ensaios conduzidos em animais são normalmente realizados utilizando compostos marcados radioactivamente para determinar o grau de distribuição do fármaco nos tecidos, o nível de concentração sanguínea atingido e as vias de excreção pelos pulmões, fígado e rim. Nos estudos metabólicos e farmacocinéticos humanos é inaceitável a exposição à radioactividade, por isso é necessário desenvolver métodos que permitam separar e quantificar fármacos e os seus metabolitos em níveis de concentração da ordem dos microgramas, nanogramas ou picogramas/mL. Nesta fase, é essencial o uso de técnicas sensíveis e altamente selectivos como a CG, CE, HPLC, especialmente quando acopladas com detectores de alta resolução como a o "diode-array" e espectrometria de massa. Estes sistemas são muito úteis por serem extremamente versáteis, mas têm o inconveniente de serem muito dispendiosos. Por este inconveniente outras técnicas menos sofisticadas e versáteis, mas igualmente sensíveis, são utilizadas como é o caso da espectrofotometria UV, espectrofluorimetria e polarogarfia. Os ensaios imunológicos, pela sua rapidez e simplicidade, são usados nos estudos de monitorização de fármacos.

1.5 Referências bibliográficas

[1] B. K. Immel, BioPharm, 13, 23, 2000.

[2] Office of Women´s Health, FDA Milestones in Women´s Health: Looking Back as We Move into the New Millennium (FDA, Rockville, MD, 2000), www.fda.gov/womens/milesbro.html.

[3] Center for Drug Evaluation and Research, Time Line: Chronology of Drug Regulation in the United States (FDA, Rockville, MD), /www.fda.gov/cder/about/history/default.htm.

[4] I. B. Stehlin, "Assessing Risks With Polio Vaccines", FDA Consumer 29 (10), (1995), www.fda.gov/fdac/features/095_vacc.html.

[5] Code of Federal Regulations (CFR), Title 21, Food and Drugs, "Current Good Manufacturing Practice in Manufacturing, Processing, Packing, or Holding of Drugs", Part 210-211 (US Printing Office, Washington, DC, revised April 2000).

[6] Code of Federal Regulations (CFR), Title 21, Food and Drugs, "Medical Devices: Current Good Manufacturing Practices (cGMP) Final Rule", Part 820 (US Printing Office, Washington, DC, revised April 1999).

[7] Code of Federal Regulations (CFR), Title 21, Food and Drugs, "General: Good Laboratory Practice for non Clinical Laboratory Studies", Part 58 (US Printing Office, Washington, DC, revised April 2000).

[8] T. Kaplan, "The Tylenol Crisis: How Effective Public Relations Saved Johnson & Johnson" (Penn State University Personal Web pages, PA, 1998), www.personal.psu.edu/users/w/x/wxk116/tylenol/crisis.html.

[9] Center for Food Safety and Applied Nutrition, FDA Talk Paper: Impurities Confirmed in Dietary Supplement 5-Hydroxy-L-Tryptophan (FDA, Washington, DC, 1998)

[10] T. Nordenberg, "Inside FDA: Barring People from the Drug Industry", FDA Consumer 31 (2), www.fda.gov/ora/conpliance_ref/default.htm.

[11] Office of Regulatory Affairs Compliance Reference: Debarment List (FDA, Rockville, MD), www.fda.gov/ora/compliance_ref/debar/default.htm.

[12] "Milestones in US Food and Drug Law History", FDA Backgrounder: Current and Useful Information from the Food and Drug Administration (FDA, Rockville, MD, 1995), www.fda.gov/opacom/backgrounders/miles.html.

[13] Center for Drug Evaluation and Research, Guideline on General Principles of Process Validation (FDA, Rockville, MD, 1987), www.fda.gov/cder/guidance/pv.htm.

[14] Guia Para o Bom Fabrico de Medicamentos, Ministério da Saúde, Direcção-Geral de Assuntos Farmacêuticos, Imprensa Nacional-Casa da Moeda, 1992.

[15] Center for Biologics Evaluation and Research, Draft Guidance for Industry: Manufacturing, Processing, or Holding of Active Pharmaceuticals Ingredients (FDA, Rockville, MD, 1998), www.fda.gov/cber/gdlns/active.pdf.

[16] International Conference on Harmonization, "Guide for Industry: E6, Good Clinical Practice - Consolidation Guidance", Federal Register, 62 (90), 25691-25709 (1997), www.fda.gov/cder/guidance/959fnl.pdf.

[17] Draft Guidance for Industry: Investigation Out-of-Specification (OOS) Test Results for Pharmaceutical Production, (FDA, Rockville, MD), 1998, www.fda.gov/cder//guidance/1212dft.pdf.

[18] J. Ermer, J. Pharm. Biomed. Anal., 24, 755, 2001.

[19] J. C. Berridge, J. Pharm. Pharmacol., 45 (Suppl. 1), 361, 1993.

[20] A. C. Mehata, Anal. Proc., 32, 347, 1995.

[21] D. R. A. Uges, P. Bouma, H. Pietersma, J. Meijer-Koens, Eur. Hosp. Pharm., 2, 4,1996.

[22] C. K. Lai, T. Lee, K. M. Au, A. Y. W. Chan, Clin. Chem., 43, 312, 1997.

[23] United States Pharmacopeia XXIV, National Formulary, XIX, Rockville, MD, The United States Pharmacopeial Convention, 1998.

[24] European Pharmacopoeia 4th Edition, European Pharmacopoeia Commission, 2003.

[25] Farmacopeia portuguesa VII, 7ª edição, Instituto Nacional de Farmácia e do Medicamento, 2002.

[26] R. K. Gilpin, L. A. Pachala, Anal. Chem., 69, 145R-163R, 1997.

[27] R. K. Gilpin, L. A. Pachala, Anal. Chem., 73, 2805-2816, 2001.

[28] C. E. Hammer, Drug Development, CRC Press, Boca Raton, 1986.

[29] J. C. Berridge, J. Pharm. Biomed. Anal., 14, 7, 1995.

[30] J. Ermer, J. Pharm. Biomed. Anal., 18, 707, 1998.

2. GARANTIA DE QUALIDADE ANALÍTICA

2.1 Princípios de qualidade

Todos os dias, inúmeras medidas analíticas, envolvendo uma grande variedade de actividades socio-económicas, são efectuadas em milhares de laboratórios por todo o mundo. As medidas analíticas são o suporte de muitas decisões que regem e regulamentam as sociedades modernas e são utilizadas, por exemplo, para verificar a conformidade de mercadoria com os limites instituídos, avaliar a qualidade da água de consumo, solucionar investigações criminais, e ainda como suporte de decisões de Saúde, segurança alimentar e protecção ambiental.

Estas decisões têm um forte impacto económico, social e político, e por isso, a credibilidade dos resultados analíticos assume uma importância crucial. Quando resultados pouco confiáveis são a base de acções oficiais e governamentais o risco de tomar decisões erradas é elevado, trazendo também consequências económicas. Os estados membros da União Europeia gastam mais de 6% do seu PIB (Produto Interno Bruto) em medidas e as perdas económicas devido a análises incorrectas são inaceitáveis [1]. Um estudo realizado nos Estados Unidos em 1975 estimou que 10% das análises clínicas efectuadas tiveram de ser repetidas, a um custo anual de 900 milhões de dólares [2]. Para evitar situações semelhantes à descrita, em qualquer um dos sectores de actividade da química analítica é agora uma exigência formal, por vezes legislativa, a indicação da qualidade dos resultados. No caso particular dos sectores envolvidos em actividades comerciais internacionais, existe uma pressão crescente para demonstrar a qualidade dos resultados, com o intuito de diminuir as barreiras técnicas de comercialização, num mercado cada vez mais global. O conceito "uma vez testado, aceite em qualquer lugar" é extremamente importante e a necessidade de provar que os resultados são confiáveis e que podem ser comparados ao longo do tempo e do espaço, nunca foi tão grande.

Na indústria farmacêutica, a qualidade analítica é um factor chave no sucesso dos programas de desenvolvimento, produção e controlo de qualidade de medicamentos. Os resultados analíticos são ajudas valiosas no acompanhamento da síntese de uma nova molécula, suportam os estudos de novas formulações, estabelecem os prazos de validade apoiados nos estudos de estabilidade, e têm ainda a importante missão de avaliar a conformidade dos materiais com as especificações de qualidade instituídas. É com base nos

resultados analíticos que se distingue um produto bom ou aceitável de um outro de qualidade inferior ou rejeitável. Seria inadmissível aceitar ou rejeitar um produto com base numa análise incorrecta, o que poderia originar, em casos extremos, um diagnóstico ou tratamento errado. Resultados dúbios ou pouco credíveis implicam trabalho adicional na repetição da análise e acarretam maiores custos e atrasos no processo de produção de um medicamento.

Para poder decidir correctamente, com confiança, e evitar as consequências de uma decisão errada, há uma necessidade emergente, não só legislativa, de garantir a qualidade dos resultados analíticos.

Tradicionalmente os laboratórios provam a qualidade dos seus resultados analíticos demonstrando de forma evidente que estes satisfazem os níveis de precisão e exactidão para o fim a que se destinam [3]. Para concretizar este objectivo existem várias práticas de qualidade que se encontram minuciosamente descritas na literatura e nos protocolos, padrões e directrizes dedicados à garantia de qualidade.

As medidas de controlo de qualidade estabelecidas compreendem uma colecção de práticas quasi-independentes, que foram criadas e implementadas pelos químicos analíticos para lidar com situações específicas. São exemplos de práticas estabelecidas e utilizadas há já alguns anos a utilização de métodos validados, o controlo de qualidade interno, a análise de materiais de referência certificados, a indicação da incerteza e rastreabilidade dos resultados, e o controlo de qualidade externo. Estas práticas foram evoluindo de forma diferente e nos diferentes sectores de actividade analítica foi-lhes conferida uma importância relativa à sua utilidade na implementação da qualidade. Esta situação resultou num conjunto de conceitos e práticas que torna difícil, mesmo para os peritos em qualidade, avaliar quando é que aquelas são insuficientes ou redundantes, ou quando é que a colecção de práticas é considerada completa ou incompleta. Por vezes a aplicação de uma prática de qualidade fornece informação que serve outra prática, e é frequente estas práticas apoiarem-se e completarem-se mutuamente, para atingir o objectivo comum de melhoraria da qualidade analítica.

Para evitar a duplicação de esforços para atingir a qualidade surgiu a necessidade de criar um programa de garantia de qualidade coerente que defina, com clareza, quais as práticas a aplicar em cada situação particular. Existe igualmente um consenso generalizado a nível internacional no sentido de seleccionar aquelas que o programa deve incluir [4-10]. Habitualmente as práticas integradas num programa de garantia de qualidade devem incluir, ou utilizar:

1) Pessoal competente, qualificado e devidamente treinado para executar a tarefa
2) Utilizar equipamentos e materiais calibrados
3) Definir o fim a que se destinam os resultados
4) Utilizar métodos validados
5) Utilizar materiais de referência
6) Quantificar a incerteza e rastreabilidade dos resultados
7) Controlo de qualidade interno bem definido
8) Controlo de qualidade externo
9) Acreditação e certificação

Para formalizar este consenso foram recentemente identificados seis princípios básicos de qualidade para a prática analítica, que surgiram de uma iniciativa destinada a promover as boas práticas de medida analítica [11]:

1) As medidas analíticas devem satisfazer um objectivo definido
2) As medidas analíticas devem ser efectuadas utilizando métodos e equipamentos que foram testados de maneira a garantir que são adequados para o fim a que se destinam (validação).
3) O pessoal que executa as análises deve ser qualificado e competente para desempenhar a tarefa.
4) Deve ser feita uma avaliação independente regular para o desempenho técnico de um laboratório.
5) As medidas analíticas feitas num local devem ser consistentes com outras realizadas noutro local qualquer.
6) As organizações que efectuam medidas analíticas devem definir concretamente os procedimentos de controlo e garantia de qualidade.

2.2 Programa de garantia de qualidade

Com a crescente preocupação com as questões de qualidade surgiu uma necessidade de a expressar como um todo coerente, num programa de garantia de qualidade, em que cada componente anteriormente referido é apenas uma parte integrante desse vasto colectivo (Fig.2) [12]. O conceito de garantia de qualidade (do inglês Quality Assurance (QA)) é definido como "o conjunto de todas as medidas que um laboratório utiliza para garantir a qualidade das suas operações" [13].



Figura 2 - Relação entre os conceitos e práticas de qualidade

Estes requisitos globais de qualidade foram formalizados em publicações na forma de protocolos e padrões. Os padrões mais reconhecidos e utilizados nos laboratórios analíticos dividem-se em três grupos e são aplicados de acordo com as suas necessidades individuais. Esses três grupos são:

1) ISO/IEC 17025:1999 [14]. Este padrão é dirigido à competência técnica dos laboratórios para executar testes específicos e calibrações. É um conjunto de requisitos necessários para a acreditação laboratorial, que é utilizado pelas autoridades reguladoras, por todo o mundo.

2) ISO 9001:2000 e os seus equivalentes nacionais e internacionais [15]. Estes padrões dedicam-se primariamente à gestão da qualidade. Dirigem-se às instalações de produção ou de fornecimento de serviços, incluindo a análise química.

3) OECD Principles of Good Laboratory Practices (GLP:1998) e os seus equivalentes nacionais e sectoriais [16]. Estas directrizes dizem respeito aos processos organizacionais e às condições em que são conduzidos os estudos laboratoriais relacionados com um determinado trabalho regulador.

Estes padrões tiveram origem nos conceitos de qualidade há muitos anos utilizados pela gestão industrial. A adopção destes princípios tem tido sucesso na comunidade analítica, pois trouxe a enorme vantagem de garantir a qualidade dos resultados produzidos pelos laboratórios. O programa de QA compreende todos os aspectos relacionados com as operações laboratoriais, o que inclui: limpeza do laboratório, os fornecedores, manutenção dos registos, treino e orientação dos analistas, colheita das amostras, documentação e apresentação dos resultados. Além de definir as medidas de qualidade analítica, o programa de QA permite aos laboratórios demonstrar que têm instalações, materiais e equipamentos apropriados para executar uma análise química, e que este trabalho é executado por pessoal competente e de uma forma controlada, seguindo um método documentado e validado. Por isso, antes de implementar medidas de qualidade a um procedimento analítico, é necessário demonstrar que a infra-estrutura e gestão laboratorial são de qualidade.

A qualidade dos resultados analíticos depende das potencialidades do equipamento, mas também está dependente da experiência profissional do seus utilizadores. Para obter resultados confiáveis os instrumentos devem ser utilizados por operadores qualificados e treinados, usando procedimentos operacionais (do inglês: Standard Operation Procedures (SOP)) escritos de forma clara. A gestão laboratorial deve definir qual o nível exigido de qualificação e experiência do pessoal, para cada tarefa. Os procedimentos de segurança de um laboratório vão mais além do que o simples talento de um analista, sendo importante atribuir-lhes tempo de treino para as diferentes actividades de um laboratório, nomeadamente para a manipulação de amostras, análise estatística, documentação e apresentação dos resultados. Os registos de treino individuais devem ser mantidos e actualizados para cada membro da equipa de analistas, com o objectivo de demonstrar que cada um deles foi devidamente treinado e que ficou provada a sua competência para executar uma tarefa particular. As deficiências de treino dos operadores são muitas vezes responsáveis pela produção de resultados sem qualidade [17].

Na escolha de equipamentos é importante assegurar que estes são adequados para o fim a que se destinam, e que o seu desempenho está de acordo com as especificações instituídas [18]. Outros aspectos a ter em consideração são o custo, as facilidades de

utilização, a manutenção pós venda e os aspectos relacionados com a segurança e Saúde Pública. Os procedimentos de operação dos equipamentos devem ser escritos de uma forma clara. Os instrumentos devem também ser calibrados com materiais de referência adequados, rastreáveis a um padrão nacionalmente aceite. As operações de manutenção devem ser realizadas periodicamente e por técnicos especializados.

A qualidade dos materiais de laboratório como o material de vidro, reagentes e padrões é outro aspecto a ter em consideração num programa de garantia de qualidade. Para trabalho quantitativo aconselha-se o material de classe A e reagentes de qualidade analítica. As substâncias activas de referência devem ser adquiridas recorrendo a fornecedores certificados. Os materiais devem ser adequadamente armazenados para manterem a sua integridade, e os laboratórios mantidos limpos para evitar qualquer tipo de contaminação. Podem ser exigidas áreas restritas quando estão em causa análises que requerem condições particulares (explosivos, materiais radioactivos, carcinogénios, técnica de PCR, análise vestigial). As condições ambientais de temperatura e pressão também devem ser controladas.

O conceito QA permite ter uma visão global de todo o sistema envolvido numa análise, com o intuito de melhorar significativamente a qualidade. Neste contexto, são ainda incluídos, na definição de qualidade, a adequação dos resultados para o fim a que se destinam, a amostragem conveniente que precede uma análise, o registo adequado dos resultados e os seus custos financeiros [19].

É importante também referir que o QA não garante que 100% dos seus resultados individuais são confiáveis. O QA assume que um sistema analítico está sob controlo, fornecendo, no entanto, pouca informação acerca da probabilidade e magnitude dos erros grosseiros. São exemplos de erros grosseiros: o erro ao executar um procedimento, a troca de resultados de duas amostras, erros de cálculo ou de transcrição de um resultado, uma bolha de ar numa célula de fluxo de um espectrofotómetro, ou a utilização de um método validado mas fora do contexto da sua validação. Considera-se que num laboratório com um sistema de qualidade a frequência deste tipo de erros é muito baixa, mas é impossível admitir que seja nula. Este tipo de erros tem sido subestimado no trabalho diário de um laboratório, e pela sua importância ser-lhe-á dado destaque numa secção posterior (secção 3.4). Também a literatura publicada e o estado da arte dos aspectos individuais das práticas de qualidade de um programa de QA serão analisados nas secções seguintes.

2.3 Validação de métodos analíticos

A validação é definida como o processo de demonstrar que os resultados obtidos numa medida analítica são adequados para o fim a que se destinam. Este exercício confere robustez e qualidade aos métodos analíticos, permitindo conhecer e estabelecer o desempenho global dum procedimento analítico.

Os conceitos e estratégias que definem o processo de validação encontram-se descritos em artigos, protocolos e relatórios publicados por utilizadores de métodos analíticos, pelos comités industriais e pelas autoridades reguladoras. Várias autoridades internacionalmente reconhecidas na área da análise química, como a International Standard Organization (ISO) [3], a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) e a Association of Official Analytical Chemists (AOAC) [20-25], a EURACHEM – A focus for analytical chemistry in Europe, em cooperação com The Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry (CITAC) [26], e a United States Environmental Protection Agency (US EPA) [27], publicam regularmente textos actualizados sobre a matéria. A grande maioria das definições recomendadas por estas autoridades são concordantes, o que torna o processo cada vez mais fácil de estabelecer, em qualquer área de aplicação da química analítica.

Na indústria farmacêutica, o processo de validação tornou-se oficial com a incorporação da secção "validação de métodos" nos regulamentos das cGMP [28]. A USP também publicou directrizes para a validação de métodos, tornando-se obrigatório a utilização de métodos documentados e validados para o registo e autorização de comercialização de novos medicamentos [29,30]. O consenso mundial na validação de métodos analíticos utilizados na indústria farmacêutica surgiu definitivamente após a publicação das directrizes da ICH [31,32].

Os procedimentos utilizados para avaliar os produtos farmacêuticos asseguram a sua identidade, potência e pureza, e têm de satisfazer determinados requisitos impostos legalmente. De acordo com os princípios das cGMPs, os métodos que avaliam a conformidade dos produtos farmacêuticos com as especificações legalmente impostas devem satisfazer os padrões adequados de exactidão e de confiança. Os ensaios e as especificações das monografias das Farmacopeias constituem os padrões legais de avaliação dos produtos farmacêuticos, e em conformidade com estes regulamentos os utilizadores dos métodos descritos nas referidas monografias não são obrigados a avaliar a exactidão e credibilidade destes métodos, apenas precisam de verificar que são apropriados para as condições actuais de utilização. No entanto, sempre que são propostos novos

métodos, ou quando é apresentada uma proposta de revisão de um método compendial, é exigido a exposição de dados laboratoriais que documentem a sua validação.

A validação é uma parte integrante dum programa de garantia de qualidade analítica e é considerada uma estratégia central para aceder à qualidade analítica [12,26]. As estratégias de validação propostas na literatura podem ser distinguidas em duas categorias independentes [33-36]: a validação interna e a validação interlaboratorial. A primeira, consiste numa série de estudos de parâmetros de desempenho de um método analítico, conduzidos num único laboratório, com o propósito de validar um novo método desenvolvido por esse laboratório [26,37,38]. Este será o tipo de validação mais conveniente e utilizado pela indústria farmacêutica quando desenvolve um método para testar um novo medicamento, pois tem a vantagem de ser flexível, fornecer resultados rapidamente, e de não exigir a colaboração com outros laboratórios concorrentes [33, 39-50]. Tem a desvantagem de reduzir a quantidade de informação que é possível extrair, restringindo principalmente a comparação interlaboratorial. A segunda estratégia consiste na realização de estudos de validação interlaboratoriais, existindo vários protocolos publicados com ela relacionados [20-25]. Esta categoria de validação tem a desvantagem de ser morosa, mas é também a melhor maneira de testar exaustivamente um procedimento analítico. É a situação ideal quando o método se destina a ser publicado como um procedimento padrão e que vai ser utilizado por vários laboratórios.

2.3.1 Adequação da validação de métodos na análise de produtos farmacêuticos

No passado, a validação estava concentrada na tarefa de avaliação de uma lista exaustiva de parâmetros de desempenho de um método analítico, com a intenção de demonstrar que os resultados obtidos por esse método eram de qualidade. Esta ideia tem sido abandonada, e a validação tem evoluído no sentido de provar que os resultados obtidos são adequados para a aplicação pretendida [26,19]. Este conceito "validação para o fim a que se destinam os resultados" entra em consideração com a incerteza associada à medida necessária para a aplicação pretendida e com os constrangimentos financeiros e de tempo de análise. A tendência actual é considerar a validação como uma prova de que os resultados são suficientemente credíveis para a aplicação pretendida, e que qualquer decisão técnica baseada nestes é tomada com confiança.

O processo de validação aplica-se a todos os procedimentos analíticos envolvidos na produção de medicamentos. Os métodos utilizados na análise dos materiais, desde as matérias-primas, produtos intermediários, excipientes, substâncias activas, até aos produtos formulados, devem ser validados. Na perspectiva da validação todos os procedimentos analíticos são de igual importância, ou seja, todos devem ser validados, quer estes sejam utilizados para o controlo em processo, para a aceitação ou rejeição de lotes, ou de produtos acabados, quer para os ensaios de estabilidade.

Para cada um destes procedimentos analíticos pode ser utilizado uma grande variedade de técnicas e tecnologias analíticas, e é lógico que as exigências de desempenho dependem da aplicação pretendida. Significa que um procedimento analítico deve ser validado individualmente e orientado para a aplicação pretendida. A par do conceito de "validação para o fim a que se destinam", a ICH e a USP publicaram directrizes que recomendam quais os parâmetros que devem ser validados para cada tipo de teste [30-32].

Os ensaios descritos nas Farmacopeias variam entre ensaios altamente selectivos e análises de atributos subjectivos, necessitando cada um deles de diferente informação analítica. As categorias de ensaio mais comuns são classificadas pela USP [30]:

1) Categoria I – Métodos analíticos utilizados para quantificar as substâncias activas na matéria-prima, ou nos produtos farmacêuticos formulados.

2) Categoria II – Métodos analíticos para determinar impurezas, ou produtos de degradação, na matéria-prima ou nos produtos farmacêuticos formulados. Estes métodos incluem os testes quantitativos e os testes limite de impurezas. Ambos pretendem reflectir de uma forma exacta as características de pureza da amostra, no entanto, as características de validação são mais exigentes para os testes quantitativos.

3) Categoria III – Métodos analíticos para determinar características específicas de desempenho (ex, testes de dissolução, de libertação de fármaco). Estes métodos devem ser altamente selectivos e sensíveis, pois têm de determinar o analito na presença de excipientes, impurezas e compostos de degradação.

4) Categoria IV – Testes de identificação. Estes testes garantem a identidade de um analito numa amostra e são normalmente uma comparação apropriada (espectro, comportamento cromatográfico, reactividade química) entre uma propriedade da amostra e a mesma propriedade de um padrão de referência.

Na Tabela 3, apresentam-se os parâmetros analíticos que são normalmente exigidos para cada categoria de ensaios.

Tabela 3 - Elementos necessários para a validação de um ensaio [30]

Características analíticas	Categoria ensaio I	Categoria ensaio II		Categoria ensaio III	Categoria ensaio IV
		Quantitativo	Testes limite		
Exactidão	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Limite detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não

*Pode ser um requisito necessário, dependendo da natureza do teste

2.3.2 Validação interna

A validação interna consiste num protocolo de estudo do desempenho de parâmetros de um método, que é realizado num único laboratório. Algumas organizações, como a EURACHEM e a International Laboratory Accreditation (ILAC), publicaram documentos específicos para a validação interna [26,38]. Na área de aplicação farmacêutica existem também vários documentos publicados dedicados à estratégia de validação interna [39-50].

De acordo com estas publicações, os protocolos de validação devem indicar claramente qual a aplicação do método analítico e o procedimento analítico deve ser escrito

de forma completa e suficientemente pormenorizada para poder ser replicado por uma pessoa experiente na área. No relatório de validação devem ser incluídos todos os parâmetros operacionais importantes e instruções específicas como a preparação de reagentes, desempenho dos testes de adequação de sistema, descrição dos brancos utilizados, precauções específicas a ter em conta, e as fórmulas de cálculos utilizadas. Nos protocolos de validação interna é conferida especial atenção às diferentes características de desempenho: exactidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, intervalo de medida, linearidade, rigidez e selectividade.

2.3.3 Características de validação

Como já foi referido, a validação não pretende ser uma mera lista de verificação de uma série de parâmetros de desempenho analítico de um método. Para demonstrar que os resultados obtidos são válidos a técnica analítica utilizada, ou a aplicação pretendida, é que vão ditar quais os parâmetros que necessitam de ser avaliados. Seguidamente, serão apresentados os diferentes parâmetros de validação de um método, o que não implica que todos tenham de ser avaliados.

2.3.3.1 Exactidão

A exactidão de um método analítico é definida como a proximidade entre os resultados obtidos pelo método e os resultados considerados verdadeiros [3]. Antes de iniciar a tarefa de avaliação deste parâmetro, deve ser especificado objectivamente qual a exactidão máxima admissível, tendo sempre em mente o fim a que se destina a análise. A exactidão deve ser estabelecida para o intervalo de concentração especificado no procedimento, considerando-se habitualmente que o intervalo de interesse se situa entre 80-120% do valor que se pretende medir [31,32].

A determinação deste parâmetro de validação é uma das tarefas mais complicadas de executar, devido à enorme dificuldade em conhecer o resultado considerado verdadeiro. Na literatura são consideradas quatro estratégias para avaliar a exactidão de um método

[42,51-53]: análise de um material de concentração conhecida, comparação dos resultados obtidos com um método de referência, estudos de recuperação numa amostra branco e estudo de recuperação através do método da adição padrão.

Na primeira estratégia, a exactidão pode ser aferida através da análise de um material de referência, que são amostras bem caracterizadas e com uma concentração conhecida [54-56].

Há duas classes de materiais de referência reconhecidos pela International Organization for Standardization/Committee for Reference Materials (ISO/REMCO): os materiais de referência certificados (do inglês certified reference materials: CRMs), e os materiais de referência (do inglês reference materials: RMs). Os RMs são considerados de menor qualidade do que os CRMs, já que estes últimos possuem a sua rastreabilidade bem estabelecida. Os materiais de referência produzidos pela Community Bureau of Reference (na Comunidade Europeia), e pela National Institute of Standards and Technology, NIST (nos Estados Unidos), são equivalentes aos CRMs produzidos pela ISO/REMCO. Estão também disponíveis comercialmente materiais de referência que vêm acompanhados por um certificado, indicando a rastreabilidade aos padrões de referência nacionais de uma instituição metrológica.

A exactidão do método analítico é avaliada comparando, através de testes estatísticos, o valor de concentração estimado da amostra de referência, com o valor de concentração da amostra de referência considerado verdadeiro. O teste *t* de Student é descrito para avaliar o significado estatístico da diferença entre estes dois resultados [57].

Quando se pretende avaliar a exactidão de resultados obtidos num intervalo alargado de concentrações é usual aplicar o método da regressão linear [57]. Os resultados de concentração obtidos para cada amostra (Cf) são traçados no eixo do y, contra os resultados de concentração considerada verdadeira (Co) no eixo do x, sendo depois calculada a recta de regressão linear, que é do tipo:

$$Cf = A + S * Co$$

O método é considerado não tendencioso quando o declive da recta (S) for igual a um e a ordenada na origem (A) for igual a zero. Quando forem obtidos valores de S diferentes de um e/ou valores de A diferentes de zero, deve ser aplicado o teste *t* de Student para investigar se essas diferenças são estatisticamente significativas.

Apesar dos méritos incontestáveis dos materiais de referência na avaliação da exactidão, estes apresentam algumas limitações. Na prática, a grande maioria das combinações analito-matriz-concentração são raras vezes representadas por estes materiais. O número de analitos, que estão disponíveis em materiais de referência, é limitado, e a maioria das

amostras de referência só existe a um nível de concentração, o que impossibilita a validação da exactidão num intervalo de concentrações alargado. Um outro problema pode surgir quando a matriz da amostra e a matriz dos padrões de referência não são equivalentes. Outro grande inconveniente destes materiais são os preços, que restringem a sua utilização. Esta estratégia é impossível de aplicar na análise de produtos farmacêuticos sempre que não estejam disponíveis materiais de referência, como por exemplo, quando uma nova molécula é descoberta por uma indústria.

Uma outra estratégia possível para a avaliação da exactidão é a comparação dos resultados com um método de referência bem estabelecido e cuja exactidão é conhecida [26]. Os resultados obtidos pelos dois procedimentos são depois comparados, através do teste estatístico referido anteriormente, para avaliar a exactidão do novo procedimento a validar. Este processo é frequentemente aplicado em algumas áreas de análise onde um grande variedade de amostras do mesmo tipo são analisadas (por exemplo, análises clínicas). Contudo, esta estratégia não é exequível quando não existem métodos de referência disponíveis para a comparação de resultados.

A terceira estratégia disponível é a realização de ensaios de recuperação, e é um dos procedimentos mais utilizados pela indústria farmacêutica para avaliar a exactidão, quando as duas estratégias acima referidas são impraticáveis [31,32]. Os ensaios de recuperação são realizados adicionando uma quantidade exactamente conhecida de analito a uma amostra branco (por vezes designada placebo) e determinando-se depois a percentagem de analito adicionado que foi recuperado [58,59]. As amostras branco são obtidas artificialmente, e são uma matriz exactamente igual às amostras a analisar, mas que não contém o analito que se pretende quantificar. Este tipo de amostras branco são normalmente fáceis de preparar na área farmacêutica porque a matriz das amostras é perfeitamente conhecida.

Os ensaios de recuperação são normalmente realizados em triplicado e a vários níveis de concentração, acima e abaixo da concentração a determinar (0, 50, 75, 100, 125%). A percentagem de recuperação (R(%)) é utilizada como um índice de exactidão e é calculada pela equação:

$$R\ (\%) = (\ Cf\ /\ CA\ ) * 100$$

Em que Cf é a quantidade encontrada para a concentração fortificada e CA corresponde à quantidade da concentração conhecida adicionada.

Os ensaios de recuperação têm a vantagem de permitir avaliar a exactidão a vários níveis de concentração, o que nem sempre é possível com os materiais de referência. No entanto, são apontados alguns inconvenientes. A primeira grande desvantagem é a dificuldade em

conseguir preparar as amostras branco, o que em algumas áreas da química analítica se torna definitivamente impossível. Outro inconveniente apontado é o facto de se assumir que o analito adicionado ao placebo se comporta quantitativamente da mesma maneira, à sua forma nativa, na matriz da amostra real. A recuperação do analito adicionado à amostra fortificada pode não simular a recuperação do analito nativo na amostra real. Na prática, quando as amostras são líquidas e/ou totalmente digeríveis este problema não se coloca, contudo, podem surgir problemas quando se tratam de sólidos para os quais é exigida uma extracção. Por exemplo, quando se fortifica uma amostra com um analito, este encontra-se livre e disponível à superfície das partículas da amostra. No entanto, o analito nativo pode encontrar-se fortemente adsorvido às partículas da amostra, e por isso, a sua extracção pode ser muito mais lenta do que a do analito fortificado.

Por fim, quando não é possível obter amostras branco isentas de analito a determinar, utiliza-se a técnica de adição padrão para a avaliação da exactidão de um método analítico [58,59]. Este procedimento inicia-se com a análise de uma amostra real para quantificar o analito. Depois, adiciona-se a essa amostra uma quantidade exactamente conhecida de analito, seguindo-se a sua análise para determinar a quantidade total de analito. A diferença entre os resultados obtidos com e sem o constituinte adicionado, deve ser igual à quantidade do constituinte adicionada. A percentagem de recuperação pode ser calculada pela fórmula:

$$R\ (\%) = [\ (Cf - Cu) / CA\ ] * 100$$

Em que Cf representa a quantidade encontrada para a concentração fortificada, Cu é a quantidade encontrada para a concentração não fortificada, e CA corresponde à quantidade conhecida da concentração adicionada. Outra forma de aplicar este método é fazer uma série de adições padrão e determinar o declive da recta de adição padrão. Este é depois comparado com o declive da recta de calibração obtida com as soluções aquosas dos padrões. O método é considerado não tendencioso se ambos os declives forem semelhantes. É descrito o teste *t* de Student para examinar se a diferença entre os declives é estatisticamente significativa [57].

A grande desvantagem deste procedimento é só poder ser aplicado quando a concentração é linearmente relacionada com a intensidade do sinal.

No caso particular da análise de produtos farmacêuticos, existem directrizes que definem quais as estratégias que podem ser utilizadas para avaliação da exactidão dos diferentes tipos de análises quantitativas (Tabela 4).

Tabela 4 - Estratégias para demonstrar a exactidão de acordo com as normas propostas pela ICH [31,32]

Princípio activo	Aplicação do procedimento analítico a um material de referência
	Comparação dos resultados com um segundo procedimento bem caracterizado
Produto formulado	Aplicação do procedimento analítico a misturas sintéticas de componentes do produto formulado
	Fortificar o produto formulado com analito
	Comparação dos resultados com um segundo procedimento bem caracterizado
Impurezas	Fortificar o princípio activo ou o produto formulado com impureza
	Comparação dos resultados com um segundo procedimento bem caracterizado

A exactidão dos métodos analíticos usados na análise de produtos farmacêuticos é expressa em percentagem de recuperação do ensaio, quando uma quantidade conhecida de analito é adicionada à amostra, ou ainda pela diferença entre a média dos resultados e o valor aceite como verdadeiro, conjuntamente com os intervalos de confiança utilizados.

A exactidão deve ser avaliada utilizando um mínimo de nove determinações, com um mínimo de três níveis de concentração, abrangendo o intervalo especificado do método analítico (três concentrações e três replicatas de cada concentração).

2.3.3.2 Precisão

A precisão de um método analítico define-se como o grau de dispersão dos resultados obtidos a partir de análises múltiplas de uma amostra homogénea [3]. Os estudos de precisão devem ser realizados seguindo os procedimentos operacionais e utilizando o mesmo tipo de amostras que irão ser utilizadas no método final, para que o valor de precisão calculado seja representativo das condições autênticas. Os critérios de aceitação do nível de precisão de um método analítico dependem do tipo de análises e da aplicação pretendida. Este parâmetro analítico expressa-se geralmente como um desvio padrão, ou como um desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. A precisão pode variar com o intervalo de concentração do ensaio, e por isso, é importante determiná-la nos extremos inferiores e superiores e também no ponto médio do intervalo de linearidade do método [60]. Como a precisão é dependente da concentração da amostra é mais fácil comparar precisões quando estas são apresentadas em termos de coeficiente de variação.

Para o cálculo da precisão há algumas precauções que devem ser consideradas uma vez que a maioria dos cálculos se baseia na suposição de que os valores experimentais só são influenciados pela variabilidade aleatória, isto é, consideram uma distribuição normal dos valores experimentais. No entanto, os resultados que não satisfazem esta suposição, e que normalmente resultam de problemas com instrumentos, erros de pesagem ou diluição, erros grosseiros, poderão afectar a precisão calculada. Para poder eliminar estes valores, antes de efectuar os cálculos, é necessário identificá-los através de testes de rejeição [3, 61]. Deve ser evitada a rejeição de valores que pertencem à mesma distribuição. Quando é identificado um "outlier", a magnitude absoluta do desvio padrão deve ser considerada para avaliação. Quando este parâmetro (calculado incluindo o "outlier" suspeito) se situar no intervalo normal esperado, todos os valores devem ser retidos. Os testes de rejeição devem ser aplicados cuidadosamente e só os valores desviantes devem ser eliminados.

Para o caso dos procedimentos analíticos utilizados para avaliar produtos farmacêuticos, recomenda-se que a precisão seja determinada utilizando um mínimo de nove determinações abrangendo o intervalo específico do procedimento (três concentrações e três replicatas de cada concentração), ou então, usando um mínimo de seis determinações de uma solução com concentração igual 100% da concentração especificada no ensaio.

A medida da precisão pode ser determinada a três níveis: repetibilidade, precisão intermédia ou reprodutibilidade [31,32]. A repetibilidade, também designada precisão intra-

ensaio, é calculada utilizando o mesmo equipamento, o mesmo analista, no mesmo laboratório, e num curto período de tempo e é, normalmente, o critério exigido para os procedimentos analíticos utilizados na análise de produtos farmacêuticos. A precisão intermédia e/ou a reprodutibilidade são consideradas durante a padronização de um procedimento analítico para a sua inclusão nas monografias das Farmacopeias. A precisão intermédia reflecte as variações aleatórias dentro de um laboratório. A extensão com que as variáveis afectam a dispersão dos resultados deve ser investigada em função da aplicação pretendida para o procedimento analítico. Os acontecimentos aleatórios que devem ser investigados incluem analistas, dias, equipamentos e reagentes diferentes. Para evitar o estudo de cada um destes efeitos isoladamente, é encorajado a utilização de uma matriz experimental. Os resultados da precisão intermédia devem ser usados para identificar quais os factores que contribuem para a variabilidade do resultado final. Preferencialmente, os estudos de precisão intermédia devem ser estendidos por um período de tempo suficiente para obter uma medida da variabilidade que seja representativa da utilização do método em rotina. Este é um parâmetro especialmente relevante quando as investigações analíticas se prolongam por alguns anos, como é o caso dos ensaios de estabilidade. A reprodutibilidade é uma medida de precisão que é obtida testando amostras homogéneas em vários laboratórios, geralmente incluídos num estudo colaborativo. As variáveis que afectam a reprodutibilidade de um método analítico incluem: temperatura e humidade, equipamentos, solventes, reagentes, materiais e experiência dos operadores.

A precisão foi até agora descrita para procedimentos analíticos quantitativos em termos de desvio padrão ou coeficiente de variação. Quando se trata de uma análise qualitativa a precisão já não pode ser apresentada nestes termos. A análise qualitativa é uma medida que nos permite afirmar se estamos ou não perante um determinado nível de concentração de analito. Estas afirmações são do tipo sim/não, e a precisão pode ser expressa em termos do quociente entre resultados verdadeiros e resultados falsos positivos (ou falsos negativos) [12,26]. Estes quocientes devem ser determinados na fronteira acima e abaixo do nível de concentração do analito que se pretende avaliar. Sempre que exista um método de comparação adequado para confirmar estes resultados (se são verdadeiros ou falsos), deve ser usado, e se não existir, devem ser analisadas amostras branco e amostras branco fortificadas. A precisão de um ensaio qualitativo pode ser calculada pelas duas expressões:

% falsos positivos = falsos positivos * 100/ total de negativos conhecidos

% falsos negativos = falsos negativos * 100/ total de positivos conhecidos

2.3.3.3 Especificidade

Tem havido alguma controvérsia acerca do termo técnico que deve ser usado para esta característica de validação. Algumas autoridades utilizam o termo especificidade, enquanto que outras, de reputação internacional, preferem o termo selectividade.

A selectividade de um método define-se como a extensão com que um analito numa mistura complexa pode ser determinado, sem a interferência dos outros componentes da mistura [62].

A especificidade de um método analítico é definida como a capacidade de avaliar inequivocamente um analito, na presença de componentes cuja presença é esperada na amostra, como por exemplo impurezas, produtos de degradação, e os componentes da matriz [31,32,63].

Uma discussão pormenorizada acerca destes dois conceitos foi publicada por Vessman [64], e embora estes sejam definidos com pouca objectividade, ambos reflectem o modo como o método responde a um único analito. Em contraste com a falta de objectividade na definição deste parâmetro, a sua importância é indiscutível, sendo considerado universalmente a base crítica de cada procedimento. Se os efeitos dos potenciais interferentes de um método não são conhecidos, então de nada serve conhecer os outros parâmetros de validação.

A maioria dos métodos utilizados na análise de produtos farmacêuticos não são procedimentos isolados, são apenas uma parcela de uma soma de vários testes de controlo que servem para avaliar um produto. Ao invés da especificidade ser expressa individualmente, deve ser utilizada a especificidade combinada destes testes de avaliação de um produto. Sempre que não seja possível demonstrar que um método analítico é específico para um analito particular, recomenda-se a combinação de um ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível de discriminação desejado.

A especificidade é avaliada comparando a resposta do método numa solução contendo apenas o analito com a resposta obtida em soluções contendo o analito conjuntamente com os outros componentes da amostra (formulação placebo, intermediários de síntese, produtos de degradação, impurezas de processo, análogos estruturais). Outros potenciais componentes da amostra são obtidos expondo o analito a condições de stress. As condições típicas de stress são: calor (50 °C), luz (600 FC), presença de ácido (0,1 N HCl), base (0,1 N NaOH) e oxidante (3% H_2O_2). Para produtos formulados são utilizados o calor, luz e humidade (85%) [42]. Os ensaios de degradação sob stress devem ser realizados com precauções. Deve ser evitada a degradação exagerada pois resultaria na formação produtos de degradação secundários, que não têm relevância prática. A

degradação deve ser restringida a 10% da pureza do analito. As misturas resultantes deste ensaio são depois analisadas e comparadas com as soluções contendo apenas o analito no estado nativo. Se este método se revelar específico, então poderá ser utilizado nos testes de estabilidade. Outros investigadores aconselham também a inclusão de estudos de stress de placebos para provar que a decomposição dos excipientes não interfere com a medida do analito de interesse.

Na análise de produtos farmacêuticos, as repercussões da especificidade de um método dependem do tipo de testes. Os procedimentos utilizados para verificar a especificidade de um método dependem do tipo de testes [31,32].

No caso de análises qualitativas utilizadas para os testes de identificação, deve ser demonstrada a capacidade de discriminação entre o analito e os compostos de estrutura relacionada, cuja presença seja provável. A discriminação de um procedimento é confirmada obtendo resultados positivos (por comparação com uma substância de referência) com amostras contendo o analito, juntamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contêm o analito, e confirmando que o resultado positivo não é obtido com materiais de estrutura similar ao analito.

No caso do procedimento analítico ser utilizado para testar impurezas, a especificidade pode ser estabelecida fortificando a solução de princípio activo, ou a solução do produto formulado, com níveis apropriados de impurezas, e demonstrando que essas impurezas são determinadas com exactidão e precisão convenientes.

Quando os métodos analíticos são usados nos ensaios de determinação quantitativa de princípio activo, a especificidade é verificada provando que o procedimento é específico, mesmo na presença de impurezas, ou de excipientes. Na prática, a especificidade é provada fortificando as amostras de ingrediente activo, ou as amostras da fórmula farmacêutica, com quantidades convenientes de impurezas ou excipientes, e demonstrando que na presença destes componentes os resultados dos ensaios se mantêm inalterados. Quando os padrões de impurezas ou os produtos de degradação não estão disponíveis, a especificidade pode ser demonstrada comparando os resultados dos testes com as amostras contendo impurezas, ou produtos de degradação, com um segundo procedimento bem caracterizado (um procedimento descrito numa Farmacopeia, ou procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras armazenadas em condições de stress relevantes, referidas anteriormente.

No caso particular das técnicas cromatográficas, para demonstrar o seu grau de especificidade, os documentos publicados pela ICH recomendam a apresentação de cromatogramas representativos, com os picos devidamente assinalados [31,32]. A pureza dos picos (utilizando detectores "diode-array" ou espectrometria de massa) pode ser útil para provar que o pico cromatográfico do analito não é atribuído a mais do que um componente [65].

2.3.3.4 Limite de detecção e quantificação

Nas últimas décadas tem havido uma enorme preocupação com a nomenclatura, definição, determinação e interpretação destas duas características de validação. Os artigos publicados na literatura tentam aclarar estes conceitos, mas, apesar destes esforços, ainda permanece alguma polémica internacional [62,66-77]. Estes parâmetros causam dificuldades aos químicos analíticos porque os valores calculados dependem do método utilizado, o que torna a sua interpretação particularmente difícil. Além disso, são extremamente dependentes dos equipamentos usados, das condições actuais de operação e da matriz das amostra analisadas.

De acordo com a ICH, o limite de detecção é definido como a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, nas condições experimentais estabelecidas [31,32].

A mesma organização define o limite de quantificação como a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser determinado, com níveis de precisão e exactidão previamente definidos, nas condições experimentais estabelecidas [31,32].

Estes dois limites são indiscutivelmente úteis quando se pretende determinar quantidades vestigiais de analito numa amostra. São, por isso, importantes na análise vestigial de produtos farmacêuticos, como são exemplos: os testes limite/quantitativos de impurezas quando são avaliados próximo do limite de detecção/quantificação dos métodos analíticos, os ensaios de teor de uniformidade para fórmulas contendo pequenas quantidades de princípio activo, e ainda os ensaios de dissolução.

Por vezes, é mais útil avaliar se estes limites são suficientes para as condições em que o método vai ser aplicado, do que calcular experimentalmente os seus valores. Se for necessário detectar uma impureza a um nível de concentração de 0,1 %, é suficiente demonstrar, através de análises de amostras contendo a impureza acima e abaixo deste

valor de concentração, que o procedimento origina resultados de confiança. De forma idêntica, se for necessário quantificar um princípio activo a um nível de 0,1 mg por comprimido, é suficiente demonstrar que o método o irá quantificar com a precisão e exactidão previamente definidas.

Os procedimentos utilizados na análise de produtos farmacêuticos para determinar estes parâmetros encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Procedimentos para determinar o limite de detecção e quantificação [31,32][a]

Procedimento	Limite detecção	Limite quantificação
Avaliação visual	Nível mínimo detectável	Nível mínimo quantificável
Relação sinal : ruído	3 : 1 ou 2 : 1	10 : 1
Desvio padrão da resposta (σ)[b] e do declive (S)	$3{,}3 \times \sigma / S$	$10 \times \sigma / S$

[a] Verificação com um número adequado de amostras.
[b] Desvio padrão do branco, desvio padrão residual da recta de calibração, desvio padrão da intercepção.

Estes procedimentos são baseados na análise de brancos, ou na dispersão (variabilidade) dos sinais obtidos na gama de concentrações mais baixas.

Utilizando os procedimentos de análise de brancos, os limites são calculados multiplicando o valor de branco por um factor de 3,3 ou 10, para o limite de detecção ou de quantificação, respectivamente.

O valor calculado para o limite de detecção ou de quantificação pode representar o valor do sinal branco, o desvio padrão do branco, ou a intercepção da recta de calibração (correspondente ao branco extrapolado). Nos dois últimos casos, o sinal analítico é transformado numa concentração através do declive da recta de calibração [31,32]. Utilizando directamente a recta de calibração, o limite de detecção ou de quantificação são calculados multiplicando os factores anteriormente referidos (3,3 ou 10, respectivamente) pelo quociente entre o desvio padrão residual da recta de calibração e o seu declive (correspondente ao erro padrão do declive). Os limites calculados ou extrapolados por estes

procedimentos devem ser verificados através da análise de amostras nos intervalos de concentração correspondentes aos respectivos limites.

O limite de quantificação pode ainda ser obtido directamente a partir de estudos de precisão [62]. Neste procedimento, são analisadas repetidamente amostras com concentrações decrescentes de analito. O coeficiente de variação obtido para cada concentração é traçado contra a respectiva concentração. O limite de quantificação é definido como a concentração mais baixa de analito, cujo coeficiente de variação não excede aquele previamente estabelecido.

2.3.3.5 Linearidade e intervalo

A linearidade de um método analítico é a sua capacidade de originar sinais que são directamente, ou através de uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração de analito, num determinado intervalo [31,32].

A dependência linear do sinal é certamente o caso mais conveniente e o mais utilizado na análise de produtos farmacêuticos. Contudo, há procedimentos analíticos com respostas não lineares, como são exemplo a cromatografia em camada fina e os ensaios imunológicos. Por esta razão, alguns autores consideram o termo "resposta analítica" mais apropriado para esta característica de validação. Nestes casos, a resposta analítica deve ser descrita por uma função apropriada que relacione o sinal analítico com a concentração do analito na amostra.

A linearidade é inicialmente avaliada por inspecção visual dos sinais obtidos traçados em função da concentração de analito. Se existir uma aparente relação linear, os resultados devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados (ex., cálculo da recta de regressão obtida pelo método dos mínimos quadrados). Os dados obtidos são úteis porque fornecem estimativas matemáticas do grau de linearidade do método. Devem ser apresentados os seguintes dados: coeficiente de correlação, a intercepção na ordenada, o declive da recta de regressão, e a soma dos quadrados residuais.

O intervalo de um método analítico corresponde ao intervalo de concentrações (incluindo os extremos) no qual o método origina resultados com níveis aceitáveis de precisão, exactidão e linearidade.

Para estabelecer o intervalo de um método deve ser usado um mínimo de cinco soluções padrão com diferentes concentrações. O intervalo exigido depende da aplicação

pretendida para o método, e por isso, na análise de produto farmacêuticos está depende do tipo de testes a realizar. Assim, para a determinação quantitativa de princípio activo o intervalo do método deve situar-se entre 80 - 120 % da concentração que se pretende determinar, enquanto que na determinação de impurezas, o intervalo deve situar-se entre 50 - 120 % do valor especificado por esse teste. Já nos testes de teor de uniformidade, o intervalo deve situar-se entre 70 - 130 % da concentração a determinar, a não ser que um intervalo mais apropriado, dependendo da natureza da forma de dosagem (inaladores com doseador), seja justificado. Para os ensaios de dissolução considera-se o intervalo situado entre ± 20 % da especificação do ensaio. Se, por exemplo, a especificação para um produto de libertação controlada cobrir uma região de 20 %, após uma hora, e acima de 90 %, após 24 horas, então o intervalo validado deve estar compreendido entre 0 e 110 % do valor declarado.

2.3.3.6 Robustez/rigidez

Esta característica de validação tem sido definida na literatura com ambiguidade, sendo por vezes designada por robustez e outras vezes por rigidez.

A robustez de um método analítico é uma medida da capacidade deste se manter inalterado após a introdução de pequenas, mas deliberadas, variações nos parâmetros do método [31,32].

Os testes de rigidez fazem parte de um estudo intralaboratorial, que pretende avaliar a influência de pequenas variações nas condições ambientais ou operacionais, no comportamento do processo analítico [71].

A partir destas duas definições podemos concluir que estes dois termos se diferenciam mais no aspecto semântico do que na sua aplicação prática. Alguns autores consideram tratar-se do mesmo parâmetro, com o mesmo significado prático, mas com duas denominações diferentes [26].

As variações introduzidas nos testes de rigidez/robustez pretendem reflectir aquelas que são normalmente esperadas durante a execução do procedimento analítico quando este é transferido para outro laboratório, ou quando vai ser executado por diferentes analistas ou utilizando diferentes instrumentos. Pode ser necessário incluir um grande número de parâmetros neste estudo mas, como muitos têm um efeito negligenciável nos resultados, é normalmente possível, através de um desenho experimental adequado, estudar vários

parâmetros ao mesmo tempo. Os parâmetros que podem influenciar os resultados e que são normalmente incluídos no estudo são: os analistas, os instrumentos, os lotes e fornecedores de reagentes, os tempos de extracção ou de mistura, e no caso particular das técnicas cromatográficas devem ainda ser considerados a composição e pH da fase móvel, temperatura das colunas, volume de injecção, caudal, lotes e fornecedores de colunas. De acordo com a USP, a rigidez/robustez de um método pode ser expressa como o grau de reprodutibilidade dos resultados obtidos analisando a mesma amostra em condições operacionais e ambientais variáveis, mas que ainda se encontram dentro dos limites especificados pelo ensaio.

Diz-se que um método é rígido/robusto quando origina resultados confiáveis mesmo introduzindo pequenas alterações variações nos parâmetros do procedimento analítico, que podem ocorrer durante a utilização em rotina. Estes testes têm o mérito de poder estimar a precisão interlaboratorial através de uma experiência interna [72]. Se cada um dos parâmetros estudados for levado ao extremo permitido pelo protocolo, a precisão obtida aproxima-se àquela obtida num estudo colaborativo envolvendo vários laboratórios. Esta é sem dúvida uma possibilidade interessante, caso seja utilizada, porque permite reduzir os custos e o tempo que envolvem um estudo interlaboratorial.

2.3.3.7 Testes de adequação do sistema

Os testes de rigidez/robustez permitem identificar os parâmetros críticos que influenciam os resultados e permitem também definir os seus limites de operação. Uma das consequências destes estudos é o estabelecimento de uma série de testes de adequação de sistema (do inglês: System Suitability tests (SSt)), cujo objectivo é confirmar que os parâmetros do sistema estão a operar dentro dos limites previamente definidos. Os testes de adequação de sistema ajudam a responder à questão: "Num determinado dia, quão bom e fiável é um sistema analítico?". Neste contexto, sistema analítico refere-se a todos os componentes considerados em conjunto, incluindo os analistas, "hardware", solventes, equipamento, componentes electrónicos, operações analíticas, amostras a analisar. Assim, confirmam que o sistema analítico está a operar satisfatoriamente, numa ocasião específica.

Os testes de adequação de sistema a estabelecer para um procedimento analítico dependem do tipo de método a ser avaliado. Estes testes são particularmente importantes

no caso dos métodos cromatográficos. Informações adicionais acerca destes testes podem ser encontradas na literatura [73-75] e nas Farmacopeias [76].

Os SST não devem ser confundidos com o processo de validação de métodos. A validação é feita durante o desenvolvimento do método, enquanto que os SSt avaliam o desempenho de um determinado sistema, num determinada ocasião.

2.3.3.8 Revalidação

Como foi referido, o processo de validação de um método analítico é realizado com o objectivo de demonstrar que os resultados obtidos com esse procedimento são aceitáveis para a aplicação pretendida. Por isso, quando for introduzida uma modificação no procedimento analítico ou quando for alterada a matriz das amostras a analisar, é conveniente a sua revalidação.

Na análise de produtos farmacêuticos a revalidação é necessária sempre que se introduzem alterações nos procedimentos analíticos, nas substâncias activas (alteração na síntese), ou nos produtos formulados (alteração da composição) [31,32]. Este processo deve ser conduzido de maneira a garantir que o procedimento analítico mantém as suas características, e que continua a assegurar a identidade, potência, qualidade da substância activa e do produto formulado, e a biodisponibilidade deste último. O grau de revalidação depende da natureza da alteração introduzida, podendo requerer a validação total do processo sempre que as modificações sejam muito drásticas, nomeadamente quando durante a utilização de um procedimento analítico este só satisfaz os requisitos de adequação do sistema após repetidos ajustes às condições de operação declaradas no procedimento analítico.

2.4 Controlo de qualidade

2.4.1 Controlo de qualidade interno

O controlo e a garantia de qualidade são termos cujos significados variam de acordo com o contexto. Em termos práticos, a garantia de qualidade descreve as medidas gerais implementadas pelo laboratório para assegurar e regular a qualidade, enquanto que o controlo de qualidade descreve as medidas individuais para monitorizar e controlar uma operação analítica em particular [12].

O controlo de qualidade interno (do inglês internal quality control (IQC)) e, sempre que possível, a participação em testes de competência (controlo de qualidade externo do inglês external quality control (EQC)), devem fazer parte do sistema de qualidade de um laboratório pois permitem monitorizar o seu desempenho analítico de dia para dia e de lote para lote de análises.

O controlo de qualidade interno corresponde a uma série de procedimentos efectuados pelo pessoal do laboratório para monitorizar de forma contínua as operações analíticas e os resultados das medidas, permitindo ao analista decidir quando é que os resultados são suficientemente confiáveis para poderem ser publicados [71,77,78]. O IQC não permite o acesso aos aspectos interlaboratoriais, mas proporciona uma informação pormenorizada acerca de desempenho dentro do laboratório.

A validação de um método permite ter uma noção das suas capacidades e limitações de desempenho, quando está a operar sob controlo. Em rotina, as amostras analisadas são de concentração desconhecida o que impede a avaliação da estabilidade do sistema analítico. Um controlo conveniente pode ser aplicado medindo continuamente amostras de concentração exactamente conhecida, permitindo ao analista determinar quando é que as respostas obtidas reflectem verdadeiramente as amostras analisadas, ou se ocorreu alguma alteração indesejável ou inesperada no desempenho do método. Na prática, como parte do processo de qualidade, uma amostra de concentração conhecida é analisada em cada lote de amostras. O nível e o tipo de controlo de qualidade depende do criticismo e da natureza da análise, da frequência e volume dos lotes, do grau de automatização, da dificuldade e confiabilidade do teste.

O tipo de IQC adoptado deve ser suficiente para garantir a validação dos resultados. Diferentes tipos de controlo de qualidade podem ser usados para monitorizar diferentes tipos de variação no processo. O IQC pode assumir uma grande variedade de formas

incluindo o uso de brancos, calibradores, amostras fortificadas, amostras cegas, análises replicadas e amostras de controlo de qualidade (QC) [26]. As amostras QC, analisadas em cada lote analítico, indicam se há uma variação do sistema; os brancos indicam quais são os contributos, para além do analito, para o sinal instrumental; as análises duplicadas, assim como as amostras cegas, verificam a repetibilidade do sistema.

As amostras QC são amostras típicas, que devem ser suficientemente homogéneas e estáveis para originar o mesmo resultado analítico (sujeito a variação aleatória), e devem estar disponíveis em quantidade suficiente para permitir análises replicadas. A variação aleatória do desempenho analítico pode ser monitorizada assinalando os resultados obtidos da análise de amostras QC em cartas de controlo de qualidade [79-85]. Antes de iniciar a construção destas cartas, é necessário efectuar às amostras QC um número de análises significativo, para calcular a média e o desvio padrão. Depois de conhecidos estes valores, são assinalados, na carta de controlo, os limites de aviso e de acção (convencionalmente os limites de aviso são colocados a ± duas vezes o desvio padrão da média do valor, e os limites de aviso são colocados a ± três vezes o desvio padrão da média do valor). Uma vez iniciada a análise de um lote de amostras, o resultado da análise das amostras QC é assinalado no eixo vertical (y), contra o tempo de análise, ou o número de análises consecutivas, no eixo do (x). Sempre que os resultados das amostras QC se situarem dentro dos limites fixados, considera-se que o sistema analítico está sob controlo, isto é, os valores das amostras de QC são aceitáveis e é muito provável que os resultados obtidos com as amostras do mesmo lote sejam também confiáveis. Um resultado fora do limite de acção, ou dois resultados consecutivos fora do limite de aviso e na mesma direcção, devem ser encarados como um indicação de que a análise está fora de controlo estatístico, e que o sistema requer uma medida correctiva [86].

Para estabelecer os limites de aviso e de correcção realísticos, os cálculos iniciais da média e do desvio padrão devem reflectir o modo como o método é usado em rotina. As leituras devem mimetizar todas as variações possíveis nas condições de operação. Se assim não for, o desvio padrão será ilusoriamente pequeno, e os limites fixados na carta de controlo não poderão ser cumpridos durante o uso do método em rotina.

As cartas de controlo de qualidade são uma excelente ferramenta para garantir a estabilidade do processo e são também uma medida eficaz para a avaliação da repetibilidade interna. Contudo, não fornecem qualquer indicação acerca da exactidão dos resultados, a não ser que as amostras de QC sejam materiais de referência certificados. Estes materiais são geralmente muito dispendiosos para serem utilizados para este propósito, mas, se estão disponíveis, e se forem usados apenas ocasionalmente são um boa medida para avaliar não só o desempenho em relação à precisão como também em relação à exactidão.

A utilização de vários tipos amostras branco permite ao analista garantir que os cálculos para a determinação do analito podem ser corrigidos, removendo qualquer contributo para a resposta que não seja atribuído ao analito.

As análises replicadas permitem detectar alterações de precisão que poderiam afectar um resultado de forma adversa. As replicatas podem ser colocadas consecutivamente num lote, ou podem ser colocadas aleatoriamente.

A análise de amostras cegas é uma medida eficaz para monitorizar a precisão. Nesta análise as porções de testes replicados são colocados no lote analítico, pelo supervisor do laboratório, e são depois analisadas. As amostras são designadas cegas porque o analista desconhece a sua identidade ou desconhece que os testes são replicatas, e desta forma, não tem uma ideia preconcebida de que os resultados se devem relacionar.

Os padrões e calibradores, colocados em intervalos num lote analítico, verificam se a resposta ao analito é estável.

É da responsabilidade da gestão laboratorial estabelecer e justificar qual o nível apropriado de controlo de qualidade. Um nível de controlo de qualidade de 5% foi identificado como razoável para análise de rotina, isto é, 1 em cada 20 análises deve ser uma amostra QC. Contudo, para métodos de rotina robustos ou com elevada frequência de amostragem um nível menor de QC pode ser razoável. Para procedimentos mais complexos, um nível de 20% não é invulgar, e há ocasiões onde pode ser necessário um nível de 50%.

2.4.2 Controlo de qualidade externo

2.4.2.1 Estudos colaborativos

De uma forma geral, é reconhecido que um método só fica completamente validado se tiver sido submetido a um estudo do seu desempenho através da participação num estudo colaborativo. A validação interna só permite a validação parcial de um método, já que a reprodutibilidade só pode ser estabelecida através de um estudo interlaboratorial (controlo de qualidade externo).

Muitos artigos e protocolos dedicados aos estudos colaborativos têm sido publicados na literatura [20-25]. Recentemente, a AOAC introduziu um programa de verificação de métodos em pares, para a validação de métodos por laboratórios que colaboram com apenas um ou dois laboratórios [87]. Tem sido feito um esforço para a harmonização dos estudos interlaboratoriais, e o padrão desenvolvido pela ISO [3], ou os padrões equivalentes desenvolvidos pela IUPAC/ISO/AOAC, são aqueles que internacionalmente são reconhecidos [21-23,25]. Alguns milhares de métodos analíticos têm sido validados por estudos colaborativos, principalmente no sector alimentar, agrícola e farmacêutico, permitindo estabelecer não só a repetibilidade mas também a reprodutibilidade [88].

A forma como um estudo é conduzido depende do propósito a que se destina, já que pode servir mais do que um: determinação dos atributos de desempenho do método (validação), avaliação da competência dos analistas, comparação de métodos, ou ainda a determinação do valor de referência de um material.

Os estudos colaborativos, também designados por estudos de desempenho de um método, exigem normalmente a adesão a um protocolo de análise. Estes estudos envolvem a análise de duplicatas cegas, de um número de materiais estáveis e homogéneos, que são distribuídos pelos laboratórios participantes [71]. Permitem estimar a repetibilidade e reprodutibilidade dos métodos de uma forma não tendenciosa. Horwitz e os seus colaboradores estabeleceram um função empírica que relaciona a reprodutibilidade, calculada através de um estudo colaborativo, com a concentração do analito [89,90].

Quando as amostras do estudo são materiais de referência, a exactidão do método pode também ser avaliada. Alternativamente, aquela pode ser avaliada se forem estudados, em paralelo, o método de referência e o método em estudo. Os grandes inconvenientes dos estudos colaborativos é serem demasiado morosos e dispendiosos, o que os torna quase proibitivos quando são utilizados materiais de referência. O preço actualizado de um estudo colaborativo típico é de cerca de 45 000 euros, quando o método já se encontra na fase final de avaliação [91].

2.4.2.2 Testes de competência

Quando os resultados gerados pelos testes interlaboratoriais são usados para avaliar, de forma contínua, a competência dos laboratórios participantes, são denominados por testes de competência (do inglês: Proficiency tests (PT)) [92-96].

Estes testes são conduzidos por um coordenador independente, que distribui periodicamente os materiais teste (geralmente porções de um lote homogéneo), aos laboratórios participantes. Estes recebem a amostra, analisam-na e devolvem o resultado ao coordenador, que posteriormente avalia os resultados obtidos por cada laboratório, e elabora um relatório informando todos participantes dos resultados obtidos neste estudo.

Infelizmente, os primeiros testes interlaboratoriais revelaram uma ausência de concordância entre os resultados obtidos pelos diferentes laboratórios, mesmo quando eram determinados componentes simples como o teor de humidade ou de hidratos de carbono [98]. Após terem sido realizados cada vez mais estudos, chegou-se à conclusão que a inicial variabilidade do desempenho dos participantes é uma característica dos PT. Uma melhoria significativa do desempenho dos laboratórios é observada nas rondas seguintes e, só mais tarde, é atingido um nível estacionário satisfatório nas rondas posteriores. A melhoria dos resultados é atribuída à instalação de medidas de garantia de qualidade.

Os testes de competência, assim como os testes colaborativos, são considerados uma importante maneira de avaliar a rastreabilidade a nível nacional e internacional, ou seja, uma forma de avaliar se os resultados obtidos pelos diferentes laboratórios são comparáveis. As autoridades de acreditação reconhecem a enorme utilidade destes esquemas e encorajam fortemente a participação dos laboratórios nestes tipo de teste. Em algumas áreas da química analítica, a participação em estudos de PT periódicos é um requisito exigido pelas autoridades de acreditação, que os consideram uma das medidas de um programa de garantia de qualidade.

Tratando-se de um programa externo e independente, os testes de competência proporcionam ao laboratório e aos seus clientes, uma garantia de que o trabalho realizado por um laboratório é, pelo menos, comparável ao realizado pelos outros laboratórios participantes (geralmente laboratórios acreditados).

2.4. 2.3 Auditoria

Os elevados custos financeiros podem desencorajar a participação dos laboratórios num plano de acreditação, ou num teste de competência. Nestas situações, é útil conduzir uma auditoria interna do sistema de gestão da qualidade, pelo menos uma vez por ano [12]. As auditorias devem abranger todos os aspectos relacionados com a prática laboratorial, desde a colheita das amostras, até ao relatório dos resultados, e não apenas o desempenho analítico de um procedimento. Os auditores devem ser independentes das actividades do laboratório que vão ser sujeitas a avaliação e devem ser coordenados pela gestão laboratorial. Numa primeira fase, o sistema deve ser examinado para garantir que está suficientemente bem documentado, que permite a sua a concretização de uma forma consistente, e que o pessoal está a cumprir o sistema de qualidade documentado. Esta verificação é conhecida como auditoria (em oposição à auditoria externa ou a avaliação feitas pelas autoridades de certificação ou acreditação). Numa segunda fase, o sistema é avaliado para verificar se satisfaz os requisitos do laboratório, ou dos seus clientes. Esta segunda fase é designada por revisão, e permite avaliar uma série de informações, entretanto recolhidas, o que inclui: os resultados de auditorias internas, estudos de controlo de qualidade internas, tendências de mercado, acções correctivas e preventivas, queixas e reclamações apresentadas por clientes, etc.

2.5 Acreditação e certificação

A acreditação é o procedimento através do qual uma autoridade reconhece formalmente que um laboratório é competente para desempenhar calibrações ou testes específicos. As referências para a acreditação laboratorial correspondem ao padrão ISO:17025:1999 [14]. Os seus requisitos devem ser implementados pelos laboratórios, e acreditados pelas autoridades de acreditação.

A certificação é o procedimento através do qual uma terceira parte fornece uma garantia, por escrito, de que o produto, processo, ou serviço está em conformidade com os requisitos especificados [99]. A certificação difere primariamente da acreditação por não estar direccionada para a competência técnica do laboratório.

2.6 Incerteza de uma medida

A tendência actual dos programas de garantia de qualidade, no campo da química analítica, é a introdução de novos conceitos metrológicos, como a incerteza e rastreabilidade de medida. Os requisitos de qualidade para a produção, certificação e uso de materiais de referência certificados são exemplos práticos da aplicação destes conceitos. A incerteza e a rastreabilidade são duas medidas indispensáveis para a garantia de qualidade analítica.

Os conceitos e métodos para determinar a incerteza de uma medida têm sido alvo de interessantes discussões, que podem ser encontradas em algumas exposições na literatura [72, 100-104]. Apesar do conceito de incerteza ser há muito conhecido pelos químicos analíticos, foi a publicação em 1993 do guia para a expressão da incerteza da medida pela ISO que estabeleceu formalmente as regras gerais para avaliar e exprimir a incerteza de uma vasta gama de medidas [105]. A EURACHEM publicou recentemente um documento que mostra como se podem aplicar estes conceitos às medidas químicas [106].

A incerteza é formalmente definida como um parâmetro associado ao resultado de uma medida, que caracteriza a dispersão dos valores que podem, com razoabilidade, ser atribuídos ao que se pretende medir. O parâmetro pode, por exemplo, ser um desvio padrão, ou a largura de um intervalo de confiança [106].

Uma questão que se coloca é como é que na prática se calcula a incerteza. Os exemplos fornecidos pelas directrizes publicadas parecem, à primeira vista, incrivelmente complicados. A avaliação da incerteza requer que o analista se debruce cuidadosamente sobre todas as fontes possíveis de incerteza. Porém, e apesar de tal estudo requerer um esforço considerável, é essencial que não seja desmesurado. Na prática, um estudo preliminar identificará rapidamente as fontes mais significativas de incerteza e o valor obtido para a incerteza total é praticamente controlado pelas contribuições maioritárias. Concentrando o esforço nas contribuições mais elevadas pode-se alcançar uma boa estimativa da incerteza. Mais, uma vez avaliada para um dado método, usado num determinado laboratório, a estimativa obtida para a incerteza pode ser aplicada, com confiança, a resultados posteriormente obtidos pelo mesmo laboratório, desde que seja justificado pela relevante informação de controlo de qualidade.

Os procedimentos introduzidos pelo laboratório para estimar a incerteza da medida devem ser integrados com as medidas de qualidade existentes, dado que estas fornecem grande parte da informação necessária para o cálculo da incerteza. O conceito de incerteza é indissociável das práticas de qualidade anteriormente referidas. Os estudos de validação

(validação interna ou estudos interlaboratoriais) produzem informação sobre o desempenho total e sobre factores individuais, que pode ser aplicada à avaliação da incerteza associada ao método no seu uso normal. A pressão crescente para a demonstração da adequação dos resultados para o fim a que se destinam, dando uma medida de confiança que neles se pode depositar, implica a inclusão da medida da incerteza. As medidas de garantia de qualidade asseguram que é atingido um nível aceitável de incerteza, e o controlo de qualidade interno demonstra que esse nível de incerteza é actualmente atingido. A incerteza da medida não implica que se coloquem dúvidas sobre a validade de uma medida, antes pelo contrário, o conhecimento da incerteza confere uma confiança acrescida na validação de um resultado de uma medida.

2.7 Rastreabilidade de uma medida

Para comparar os resultados analíticos no espaço (em laboratórios diferentes) e no tempo (em ocasiões diferentes) com confiança, é essencial relacionar os resultados das medidas analíticas com uma referência comum estável, ou com uma medida padrão. Os resultados podem ser comparáveis através da sua relação com estas referências.

Esta estratégia de relacionar os resultados com uma referência é designada por rastreabilidade. Esta tão ansiada comparação universal de resultados encontra-se reflectida em recentes publicações [107-111]. A EURACHEM também publicou um documento onde são definidos os conceitos e o modo de conseguir a rastreabilidade de uma medida [112].

A rastreabilidade é formalmente definida como a propriedade do resultado de uma medida ou do valor de um padrão, pela qual ele pode ser relacionado com determinadas referências, geralmente padrões nacionais ou internacionais, através de uma cadeia ininterrupta de comparações, todas com incertezas associadas. A cadeia ininterrupta de comparações, conduzindo a um valor de referência conhecido, fornece a rastreabilidade em relação a um ponto de referência comum, garantindo que diferentes operadores estão a usar as mesmas unidades de medida. Esta definição implica também um esforço a nível nacional e internacional para fornecer padrões de referência aceites largamente, e a nível de cada laboratório individual um esforço para demonstrar a relação entre resultados obtidos e esses padrões.

A rastreabilidade do resultado de um procedimento analítico completo deve ser estabelecido pela combinação dos seguintes procedimentos de qualidade: uso de padrões

rastreáveis para calibrar o equipamento de medida, comparação dos resultados obtidos com um método primário, uso de um material de referência, uso de um procedimento definido com pormenor e aceite.

A rastreabilidade e a incerteza são duas medidas de qualidade que estão intimamente relacionadas. A rastreabilidade fornece os meios para poder relacionar todas as medidas, numa escala consistente de medidas, enquanto a incerteza garante a força entre elos da cadeia ininterrupta de comparações, e a concordância entre os laboratórios efectuando medidas semelhantes.

2.8 Referências bibliográficas

[1] J. Fetzer, Anal. Bioanal. Chem., 376, 279, 2003.

[2] J. P. Cali, Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Bio., 34, 2123, 1975.

[3] International Standards Organization, Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results, ISO 5725, ISO, Geneva, 1994.

[4] A. C. Mehta, Analyst, 122, 83R, 1997.

[5] R. J. Mesley, W. D. Pocklington, R. F. Walker, Analyst, 116, 975, 1991.

[6] R. C. Schothorst, R. W. Stephany, Analyst, 123, 2555, 1998.

[7] D. G. Holcombe, B. Neidhart, P. Radvila, W. Steck, W. Wegscheider, Anal. Chim. Acta, 393, 157, 1999.

[8] K. Davies, D. Burnett, Analyst, 122, 297, 1997.

[9] J. K. Taylor, Anal. Chem., 53, 1588A, 1981.

[10] K. Byrialsen, J. Kristiansen, J. M. Christensen, Analyst, 123, 7, 1998.

[11] The Manager's Guide to VAM, UK Department of Trade and Industry, Valid Analytical Measurement Programme.

[12] Guide to Quality in Analytical Chemistry- An Aid to Accreditation: 2002, (CITAC/EURACHEM), www.eurachem.ul.pt/.

[13] ISO 8402:1994 Quality – Vocabulary.

[14] ISO/IEC 17025:1999 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

[15] ISO 9000:2000 Quality Management Systems – Fundamentals & Vocabulary.

[16] OECD Principles of Good Laboratory Practice: 1998 (Code: ENV/MC/CHEM (98) 17, www1.oecd.org/ehs/ehsmono/01E88455.pdf).

[17] B. E. Broderick, W. P. Cofino, R. Cornelis, K. Heydorn, W. Horwitz, D. T. E. Hunt, R. C. Hutton, H. M. Kongston, H. Muntau, R. Baudo, D. Rossi, J. G. Van Raaphorst, T. T. Lub, P. Schramel, F. T. Smith, D. E. Wells, A. G. Kelly, Mikrochim. Acta, II, 523, 1991.

[18] C. Burgess, R. D. McDowall, LC-GC Int, 10, 87, 1997.

[19] M. Thompson, T. Fearn, Analyst, 121, 275, 1996.

[20] W. Horwitz, Pure Appl. Chem., 60, 855, 1988.

[21] W. Horwitz, J. AOAC Int., 75, 368, 1992.

[22] M. Thompson, R. Wood, Pure Appl. Chem., 65, 2123, 1993.

[23] M. Thompson, J. AOAC Int., 76, 926, 1993.

[24] W. Horwitz, Pure Appl. Chem., 66, 1903, 1994.

[25] W. Horwitz, Pure Appl. Chem., 67, 331, 1995.

[26] The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics: 1998 (EURACHEM).

[27] US EPA, Guidance for methods development and methods validation for the Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) Program, Washington, 1995.

[28] US FDA, 21 CFR Part 211, Current Good Manufacturing Pratice of Certain Requirements for finished Pharmaceuticals, Rockville, 1997.

[29] Guidelines for Submitting Samples and Analytical Data for Methods Validation, US Department of Health and Human Services, FDA, Maryland, USA, 1987.

[30] General Information <1225 >, Validation of compendial methods, United States Pharmacopeia XXIV, National Formulary, XIX, Rockville, MD, The United States Pharmacopeial Convention, 1998.

[31] International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Text on Validation of Analytical Procedures, ICH – Q2A, Geneva 1995.

[32] International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures: Methodology, ICH – Q2B, Geneva 1996.

[33] D. L. Massart, J. Smeyers, B. Vandeginste, Analusis, 22, M14, 1994.

[34] H. Van der Voet, J. A. H. van Rhijn, H. J. Van Wiel, Anal. Chim. Acta, 391, 159, 1999.

[35] M. Feinberg, N. Raguenes, Anal. Chim. Acta, 391, 239, 1999.

[36] J. M. Christensen, Mikrochim. Acta, 123, 231, 1996.

[37] B. Julicher, P. Gowik, S. Uhlig, Analyst, 123, 173, 1998.

[38] ILAC C3, WG6, Guide to Validation of Test Methods, draft, 1998

[39] E. L. Inman, J. K. Frischman, P. J. Jimenez, G. D. Winkel, M. L. Persinger, B. S. Rutherford, J. Chromatogr. Sci., 25, 252, 1987.

[40] J. Ermer, J. Pharm. Biomed. Anal., 24,755, 2001.

[41] J. K. Taylor, Anal. Chem, 55, 600A, 1983.

[42] J. M. Green, Anal. Chem., 68, 305A, 1996.

[43] M. M. Smith, D. R. Rudd, Acta Pharm. Jugosl., 40, 7, 1990.

[44] L. Galan, Analusis, 22, M17, 1994.

[45] G. S. Clarke, J. Pharm. Biomed. Anal., 12, 643, 1994.

[46] P. A. D. Edwarson, G. Bhaskar, J. E. Fairbrother, J. Pharm. Biomed. Anal., 8, 929, 1990.

[47] G. P. Carr, J. C. Wahlich, J. Pharm. Biomed. Anal., 8, 613, 1990.

[48] A. R. Buick, M. V. Doig, S. C. Jeal, G. S. Land, R. D. McDowall, J. Pharm. Biomed. Anal., 8, 629, 1990.

[49] T. D. Wilson, J. Pharm. Biomed. Anal., 8, 389, 1990.

[50] G. C. Hokason, Pharm. Technol., 18, 118, 1994.

[51] M. J. Cardone, J. Assoc. Off. Anal. Chem, 66, 1257,1983.

[52] W. Penninckx, Analusis, 22, M22, 1994.

[53] F. M. Garfield, E. Klesten, J. Husch, AOAC International – Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories – 3rd edn., 2000.

[54] The Selection and Use of Reference Materials: A Basic Guide For Laboratories and Accreditation Bodies (EEE/RM/062): 2002 (EURACHEM), www.eurachem.ul.pt/.

[55] ILAC Guidelines for the Competence of Reference Materials Producers, ILAC G12, (2000); www.ILAC.org.

[56] ISO/IEC Guide 33:1989. Use of certified Reference Materials.

[57] J. C. Miller, J. N. Miller, E. Horwood, Statistics for Analytical Chemistry, 3rd edition, Ellis Horwood Professional Technical Reference Prentice Hall, London, 1993.

[58] Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement: 1998; EURACHEM/IUPAC/ISO/AOACI.

[59] M. Thompson, S. L. R. Ellison, A. Fajgeli, P. Willets, R. Wood, Pure Appl. Chem., 71, 337, 1999.

[60] M. Thompson, Analyst, 113, 1579, 1988.

[61] Analytical Methods Committe, Analyst, 114, 1693, 1989.

[62] WELAC Guidance Document No. WG D2, 1st edition., EURACHEM/WELAC chemistry, Teddington, 1993.

[63] G. D. Christian, Analytical Chemistry, 5th edn, John Wiley, New York, 1994.

[64] J. Vessman, J. Pharm. Biomed. Anal., 14, 867, 1996.

[65] D. Marr, P. Horvath, B. J. Clark, A. F. Fell, Anal. Proceed, 23, 254, 1986.

[66] L. A. Curie, Pure Appl. Chem., 67, 1699, 1995.

[67] L. A. Curie, W. Horwitz, Analusis, 22, M24, 1994.

[68] M. Thompson, Analyst, 123, 405, 1998.

[69] L. A. Curie, Anal. Chim. Acta, 391, 103, 1999.

[70] L. A. Curie, Anal. Chim. Acta, 391, 127, 1999.

[71] W. J. Youden, E. H. Steiner, Statistical Manual of the AOAC, Association of Official Analytical Chemists, 1975.

[72] M. Thompson, Analyst, 125, 2020, 2000.

[73] G. P. Carr, J. Wahlich, J. Pharm. Biomed. Anal., 8, 619, 1990.

[74] J. C. Wahlich, G. P. Carr, J. Pharm. Biomed. Anal., 8, 613, 1990.

[75] R. D. McDowall, LC-GC Int., 8,196, 1995.

[76] Chromatography < 621 >, United States Pharmacopeia XXIV, National Formulary, XIX, Rockville, MD, The United States Pharmacopeial Convention, 1998.

[77] M. Thompson, W. Roger, Pure Appl. Chem, 67, 649, 1995.

[78] M. Thompsosn, Anal. Proc, 29, 190, 1992.

[79] B. G. M. Vandeginste, J. F. A. Quadt, Analusis, 22, M30, 1994.

[80] E. Mullins, Analyst, 119, 369, 1994.

[81] E. Mullins, Analyst, 124, 433, 1999.

[82] ISO 7870, Control Charts, Geneve, 1993.

[83] ISO 7873, Control Charts for Arithmetic Means and Warning Limits, Geneve, 1993.

[84] ISO 7966, Acceptance Control Charts, Geneve, 1993.

[85] ISO 8258, Shewhart Control Charts, Geneve, 1991.

[86] Analytical Methods Committee, Analyst, 114, 1497, 1989.

[87] AOAC International, AOAC Peer-verified Methods Program, Arlington VA 22201-3301, USA, 1993.

[88] M. Thompson, P. J. Lowthian, J. AOAC Int., 80, 676, 1997.

[89] R. Albert, W. Horwitz, Anal. Chem. 69, 789, 1997.

[90] M. Thompson, P. J. Lowthian, Analyst, 120, 271, 1995.

[91] P. Lowthian, M. Thompson, R. Wood, Analyst, 121, 977, 1996.

[92] D. G. Bullock, Anal. Proc., 29, 189, 1992.

[93] Analytical Methods Commitee, Analyst, 117, 97, 1992.

[94] ILAC G15: 2001 Guidance for Accreditation to ISO/IEC 17025.

[95] ISO/IEC Guide 43: 1997, Proficiency testing by interlaboratory comparisons.

[96] IUPAC, Pure Appl. Chem, 62, 149, 1990.

[98] M. Thompson, P. J. Lowthian, Analyst, 118, 1495, 1993.

[99] ISO Guide 2: 1996, Standardization and Related activities, General Vocabulary.

[100] Analytical Methods Committee, Analyst, 120, 2303, 1995

[101] A. R. C. Hill, C. Von Holst, Analyst, 126, 2044, 2001.

[102] W. Horwitz, R. Albert, Analyst, 122, 615, 1997.

[103] M. Buzoianu, Fresenius J. Anal. Chem., 370, 170, 2001.

[104] A. Maroto, J. Rui, R. Boqué, F. X. Rius, Anal. Chim. Acta, 391, 173, 1999.

[105] BIPM,IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML, Guide to the Expression of uncertainty in measurement, ISO, Geneva, 1993.

[106] Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement: 2000 (CITAC EURACHEM).

[107] M. Thompson, Analyst, 121, 285, 1996.

[108] K. Byrialsen, J. Kristiansen, J. M. Christensen, Analyst, 123, 7, 1998.

[109] B. King, Analyst, 122, 197, 1997.

[110] M. Válcarcel, A. Ríos, Analyst, 120, 2291, 1995.

[111] M. Thompson, Analyst, 122, 1201, 1997.

[112] Traceability in Chemical Measurement: A Guide to Achieving Comparable Results in Chemical Measurement: 2003 (CITAC EURACHEM).

3. O ERRO NA ANÁLISE QUÍMICA

3.1 Erro experimental

Os resultados da análise farmacêutica são informações valiosas que permitem tomar decisões importantes. A indústria farmacêutica tem investido consideravelmente no controlo de qualidade analítica com o objectivo de obter resultados exactos, precisos e cujo erro inerente seja conhecido [1]. Os resultados experimentais cuja qualidade é desconhecida não são desejáveis. Por um lado, quando se desconhece a precisão e exactidão os resultado são inúteis, por outro lado, os resultados que não são particularmente exactos podem ser úteis para uma dada aplicação, se os seus limites de incerteza forem conhecidos.

Os resultados analíticos são medidas experimentais de uma propriedade física ou química da matéria, e por conseguinte estão sujeitos a erro. Para extrair a verdadeira informação de um resultado é importante conhecer a magnitude do erro e as suas causas de modo a poder controlá-lo, escolhendo condições experimentais que garantam a sua minimização. Por vezes estes conceitos de erro são difíceis de entender pelos leigos em análises químicas. Por exemplo, quando um advogado de defesa de um caso famoso de homicídio, perguntou a uma testemunha qual era a percentagem de erro de uma determinada análise ao sangue, a testemunha contestou que nos seus laboratórios não se conhecia a percentagem de erro, porque "não se cometem erros" [2].

Não é possível eliminar por completo a incerteza de medida, daí que não se conhece o valor verdadeiro de uma quantidade medida. Contudo, quase sempre é possível estimar a magnitude de erro de uma medida, e assim, dentro de um determinado nível de probabilidade, é possível definir os limites entre os quais se pode encontrar o valor verdadeiro de uma quantidade medida.

O controlo dos erros de uma análise tem sido objecto de estudo da química analítica, sendo dada particular atenção aos erros inerentes ao procedimento analítico utilizado. Os erros experimentais são classificados e analisados, pelos livros de química analítica em erros aleatórios e erros sistemáticos [3].

3.2 Erro aleatório

Os erros aleatórios, também designados por indeterminados, resultam, tipicamente, de variações imprevisíveis que influenciam o resultado. Estas variações, de causas não conhecidas exactamente, são, em geral, irregulares e pequenas. Possíveis causas poderão ser alterações ligeiras de variáveis não controladas (ou não controláveis) pelos operadores, como por exemplo: temperatura, humidade, iluminação, reagentes, velocidade de aquecimento ou arrefecimento, estabilidade dos instrumentos.

Muitos factores podem contribuir para a componente aleatória, mas nenhum se pode identificar ou medir com certeza, já que individualmente são tão pequenos, que não é possível detectá-los. Contudo, o efeito cumulativo faz com que os resultados de uma série de medidas repetidas flutuem ao acaso em volta de um valor médio, e dada a natureza aleatória é possível estabelecer um modelo matemático da distribuição estatística destes erros [4].

Os erros aleatórios de um resultado analítico têm igual probabilidade de serem positivos ou negativos, e não podem ser alvo de compensação. Não obstante, os erros aleatórios podem, geralmente, ser reduzidos aumentando o número de observações. A magnitude dos erros aleatórios determina a precisão de um conjunto de resultados, ou do método aplicado.

3.3 Erro sistemático

O erro sistemático é definido como uma componente do erro que no decurso de um número de análises do mesmo analito, permanece constante, ou varia de uma forma previsível. É independente do número de medidas feitas, e não pode ser minimizado através do aumento do número de análises executadas nas mesmas condições.

Os erros sistemáticos, também designados por erros determinados, têm um valor definido e é lhes atribuída uma causa. Estes erros dão lugar a um inviesamento da técnica de medida e afectam os resultados sempre no mesmo sentido, por excesso ou por defeito, o que permite detectá-los e estimar a sua magnitude. O erro é calculado subtraindo o valor médio de um resultado pelo valor considerado verdadeiro. A magnitude dos erros sistemáticos determina a exactidão de um conjunto de resultados, ou do método aplicado.

São identificados três fontes de erros sistemáticos [3]: 1) erros de instrumento, que resultam de imperfeições dos equipamentos de medida e por oscilações no fornecimento de energia, 2) erros de método, devem-se comportamento físico ou químico não ideal dos sistemas analíticos, 3) erros pessoais, que resultam da falta de cuidado, distracção ou pouca destreza do analista.

3.3.1 Erros instrumentais

Todos os instrumentos de medida são fontes de erros sistemáticos. Por exemplo, os materiais de vidro calibrados podem reter ou devolver volumes ligeiramente diferentes do que a sua graduação indica. Estas diferenças podem dever-se a erros na calibração original, ao facto destes materiais serem usados a temperaturas significativamente diferentes da temperatura de calibração original, a distorções nas paredes destes recipientes quando são submetidos a aquecimento, ou ainda à presença de contaminantes nestes materiais. A maior parte destes erros sistemáticos são eliminados pela calibração.

Os equipamentos electrónicos estão sujeitos a erros sistemáticos instrumentais cuja origem é muito variada. Uma causa de erro é a diminuição, pelo uso, da voltagem que alimenta um aparelho que funciona com pilhas. Também há erros resultantes do aumento da resistência nos circuitos devido a um mau contacto eléctrico. As oscilações de temperatura causam variação na resistência e nas fontes de voltagem comuns. Outro exemplo de um erro instrumental é a retenção acidental de amostra nos instrumentos de medida, que se designa por efeito de memória.

Os erros instrumentais podem detectar-se facilmente e corrigir-se por calibração com padrões adequados. A calibração periódica dos instrumentos é sempre desejável porque a sua resposta varia com o tempo, como consequência da corrosão ou do tratamento inadequado. Normalmente os manuais dos instrumentos fornecem informação acerca da frequência com que devem ser realizadas e de como é que devem ser feitas as calibrações.

3.3.2 Erros pessoais

Os erros pessoais são aqueles imputáveis ao analista, estando associados com as intervenções humanas nas operações de análise. Em muitas medidas é necessária a apreciação pessoal, como por exemplo, para fazer uma estimativa da posição de um ponteiro entre duas divisões de uma escala, da cor da solução no ponto final de uma titulação, ou do nível de líquido em relação à graduação de uma pipeta ou bureta. É comum que este tipo de apreciações estejam sujeitas a erros sistemáticos unidireccionais. Por exemplo, uma pessoa pode ler sistematicamente a posição da agulha mais alta, ao passo que outra pode ser ligeiramente mais lenta a carregar num cronómetro. Uma outra pessoa pode ser menos sensível às alterações de cor, e por isso, tende a usar um excesso de reagente numa análise volumétrica.

Uma fonte universal de erro pessoal sobejamente conhecida pelos analistas é o preconceito. Os analistas, independentemente da sua honestidade, têm uma tendência natural para estimar as leituras de uma escala numa direcção que tende a melhorar a precisão de uma série de resultados, ou podem ter uma ideia preconcebida do valor verdadeiro para a medida, pelo que inconscientemente fazem com que os resultados caiam muito próximo deste valor. A tendência numérica é outro preconceito responsável por erros sistemáticos pessoais. Esta tendência varia consideravelmente de pessoa para pessoa, a mais comum é verificada na estimativa da posição de um ponteiro numa escala, onde se verifica uma clara preferência pelos dígitos 0 e 5. Também é comum uma preferência para dígitos pequenos em detrimento de números grandes, e para dígitos pares sobre impares.

São ainda considerados erros pessoais aqueles que são resultado da distracção, falta de experiência, ou falta de conhecimentos do analista para executar um procedimento analítico. Incluem-se neste tipo de erros: amostragem não representativa, pesagem incorrecta, perda de amostra em manipulações, introdução de interferentes junto com os reagentes, não corrigir o branco, não utilizar números significativos nos cálculos, bolhas de ar nas buretas, erros nas leituras da escala das buretas, uso de quantidades excessivas de indicador.

Este tipo de erros tem sido subestimado pela literatura. Alguns livros de química analítica fazem uma abordagem superficial, mas não apresentam nenhuma estratégia ou plano global que permita a sua detecção ou minimização. Este tipo de erros será objecto de uma análise mais pormenorizada noutra secção (secção 3.4).

3.3.3 Erros de método

O comportamento físico ou químico não ideal dos reagentes e das reacções que se utilizam numa análise introduzem frequentemente erros sistemáticos num método. Este comportamento não ideal pode atribuir-se à lentidão ou não efectivação das reacções, à instabilidade de algumas espécies, perdas por volatilização, à pouca especificidade da maioria dos reagentes, ou a possíveis reacções laterais que interferem com o processo de medida. Nos métodos volumétricos, é comum que o erro de método se deva a um pequeno excesso de reagente necessário para que o indicador experimente a variação de cor que evidencia o ponto final da reacção, daí que a exactidão deste tipo de análise esteja restringida pelo mesmo fenómeno que torna possível a titulação.

Os erros inerentes a um método são difíceis de detectar, pelo que são os mais graves dos três tipos de erro.

3.3.3.1 Efeitos dos erros de método nos resultados analíticos

Os erros de método podem, em princípio, ser detectados através de técnicas estatísticas, as suas grandezas podem ser quantitativamente determinadas, e os seus valores podem ser usados para corrigir os resultados analíticos [5-13]. Embora algumas das técnicas sejam conhecidas e utilizadas pelos analistas há muitos anos, as publicações dedicadas ao tratamento dos erros sistemáticos são escassas.

Wilson [14] foi talvez o primeiro investigador a estudar os erros sistemáticos com rigor científico, identificando os que estavam na origem de calibrações tendenciosas (por exemplo devido à contaminação dos padrões, suposição incorrecta da relação entre o sinal analítico e a concentração da espécie a determinar, tratamento incorrecto dos resultados) e os erros sistemáticos que resultavam de interferências directas na amostra (por exemplo, deficiente resolução entre o pico do analito e o da interferência, ou quando uma interferência exibe o mesmo grupo funcional da espécie a determinar). Este tipo de erros foi classificado alguns anos mais tarde por Cardone [5] como incorrigíveis, e por isso, a sua detecção deve ser efectuada pelo analista, com base nos conhecimentos adquiridos durante a fase de desenvolvimento do método, e têm de ser resolvidos antes de executar a medida. Os erros sistemáticos passíveis de correcção foram classificados, pelo mesmo autor, em duas categorias: os erros constantes, cuja magnitude não depende quantidade medida, e os erros

proporcionais, que aumentam ou diminuem em proporção com o tamanho da amostra que se analisa.

3.3.3.2 Erros constantes ou aditivos

O erro constante é devido a uma resposta relativa, positiva ou negativa, não atribuída à espécie de interesse. Este erro pode ser medido directamente ou pode ser matematicamente relacionado com uma propriedade físico-quimica do sistema sob investigação, e é independente do tamanho da amostra. Os erros constantes tornam-se mais graves quando se reduz a quantidade medida. Este comportamento ilustra-se com o exemplo típico de como a diminuição da solubilidade de um precipitado afecta uma análise gravimétrica. Supondo que se perde 0,50 mg de precipitado como consequência da sua lavagem com 200 mL de líquido. Se o precipitado pesa 500 mg, o erro relativo devido a esta perda por solubilização é – 0,1%. A perda da mesma quantidade num precipitado que pesa 50 mg origina um erro relativo de –1%. Daí que o erro relativo que resulta de um erro absoluto constante torna-se maior quando a quantidade medida é mais pequena. O excesso de reagente necessário para que se altere a cor numa titulação é outro erro constante. Este volume, que é de uma forma geral pequeno, é o mesmo independentemente do volume total de reagente necessário para a titulação. Novamente, o erro relativo torna-se mais importante à medida que o volume total de amostra diminui. Uma maneira de reduzir ao mínimo o efeito do erro constante é utilizar uma amostra tão grande quanto seja possível.

3.3.3.3 Erros proporcionais

Os erros proporcionais resultam de uma variação relativa na resposta da espécie de interesse, por unidade de concentração. Este erro, positivo ou negativo, é atribuído a um parâmetro de sistema de medida, do procedimento, ou do método. Por outras palavras, o erro proporcional depende da grandeza absoluta da amostra e aumenta ou diminui proporcionalmente ao seu tamanho, de tal modo que o erro relativo permanece aproximadamente constante.

Uma causa frequente de erros proporcionais, se não forem previamente e completamente eliminados, é a presença de contaminates que interferem com uma amostra. O exemplo figurativo frequentemente ilustrado nos livros de química analítica refere-se a um método usado para a determinação de cobre que se baseia na reacção do ião cobre (II) com o iodeto de potássio. Neste método, mede-se a quantidade de iodo libertado na reacção, que é proporcional à quantidade de cobre. O ferro (II), se está presente, também liberta iodo, por reacção com o iodeto de potássio. A menos que se tomem precauções necessárias para evitar esta interferência, os resultados vão obter altas percentagens de cobre devido ao facto de que o iodo produzido ser uma medida da quantidade de cobre (II) e de ferro (II) presentes na amostra. A magnitude deste erro estará determinada pela fracção de ferro contaminante, independentemente do tamanho da amostra tomada para ensaio. Se o tamanho da amostra for aumentado para o dobro, a quantidade de iodo libertado pelo cobre e ferro contaminante também será o dobro. Por isso, a percentagem de cobre encontrado será independente do tamanho da amostra.

3.3.3.4 Detecção dos erros sistemáticos de método

Apesar da dificuldade de detecção de alguns tipos de erros sistemáticos, são apresentadas na literatura algumas maneiras práticas de verificar a sua influência e extensão [3-13].

As estratégias para detectar e corrigir um erro sistemático numa análise são identificados: análise de um material de referência ou análise por um método independente, ensaios de recuperação, método da adição padrão (secção 2.3.3.1), determinações de branco e variação do tamanho da amostra.

A determinação de branco é talvez o método de correcção de erro sistemático do tipo constante mais conhecido e utilizado. A determinação do branco deve ser processada em paralelo com as amostras reais. Dois tipos de branco fazem parte do sistema de resposta analítica: o branco do sistema, que pode ser exemplificado pela referência óptica em espectrofotometria, e o branco do sinal, exemplificado pelo ruído num cromatograma ou num espectro. O branco químico é a resposta obtida a partir de uma solução isenta da amostra, enquanto que o branco do método é a resposta de uma amostra sem conter a espécie de interesse. Em ambos os casos, o procedimento analítico deve ser seguido rigorosamente. As determinações de branco descobrem os erros devido a contaminantes

nos reagentes e nos recipientes utilizados na análise e os seus resultados são usados para corrigir as medidas.

Os erros constantes podem também ser detectados aumentando o tamanho da amostra, já que o erro constante diminui ao aumentar a magnitude do que se vai medir.

3.4 Erro humano

3.4.1 Considerações gerais

A forma clássica de abordar os erros na análise química tem ajudado a enfatizar aqueles que provêm dos métodos analíticos, descurando outros factores que se localizam muito para além desses. A origem dos erros não pode ser atribuída somente à execução do procedimento analítico porque outros factores externos são também causas de erro. O procedimento analítico não é um acto isolado, e deve ser enquadrado num sistema formado por uma série de elementos, que vão desde o método analítico em si, aos seus executores, aos equipamentos por eles utilizados, aos programas informáticos, até ao ambiente de trabalho onde estes elementos estão inseridos, e que interactuam com a finalidade de atingir um objectivo comum, ou seja, a obtenção de resultados confiáveis. Neste sentido, considerando as operações analíticas executadas, ou pelo menos controladas, por seres humanos é de prever, como em qualquer tarefa que envolva a actividade do ser humano, o seu contributo para o erro de uma análise química.

Quando se aborda o erro humano é frequente associá-lo com os acidentes ocorridos na indústria de transportes, na indústria petrolífera, ou na indústria nuclear como o caso de Chernobyl, que fazem as primeiras páginas dos jornais e o tema de abertura dos telejornais. Estes acidentes com origem no erro humano, felizmente pouco frequentes, atraem a atenção da opinião pública pelo impacto visivelmente catastrófico e dramático, envolvendo geralmente a perda massiva de vidas humanas.

O impacto destes acidentes, contabilizado não só pelo número de vidas humanas mas também pelas perdas económicas, tem sensibilizado estas indústrias onde o erro humano é um factor crítico [15,16]. Nas últimas décadas, estas indústrias investigaram as causas dos acidentes, chegando à conclusão que em média 60-80 % dos acidentes

envolvem o erro humano [17]. Depois de conhecido o envolvimento humano nos acidentes, foram implementados programas onde os erros são detectados, relatados e analisados com o objectivo de descobrir as suas origens e quais as causas mais propícias para a sua ocorrência, tentando preveni-los, ou pelo menos, reduzi-los [18,19]. Estes programas também prevêem estratégias para mitigar os efeitos adversos quando as medidas implementadas para evitar os erros falharem.

O sucesso destes programas foi transposto para outras áreas onde os erros humanos se manifestam de uma forma menos visível e dramática, mas que têm um impacto igualmente importante. A área da Saúde é um destes exemplos representativos, pois quando os acidentes acontecem afectam apenas um só indivíduo de cada vez, ao contrário das indústrias de elevado risco onde os acidentes afectam várias pessoas de uma só vez. Após adopção destes programas pela área da Saúde foram realizados estudos comparativos da distribuição das causas de erro em medicina e na indústria petroquímica [20]. Os resultados daí obtidos, representados na Figura 3, evidenciam que estas duas áreas partilham as mesmas causas de erro, concluindo-se que o erro e as suas causas regem-se por padrões semelhantes, independentemente do domínio da actividade humana, mesmo tratando-se de duas áreas tão diferentes e remotas como a medicina e a indústria petroquímica.

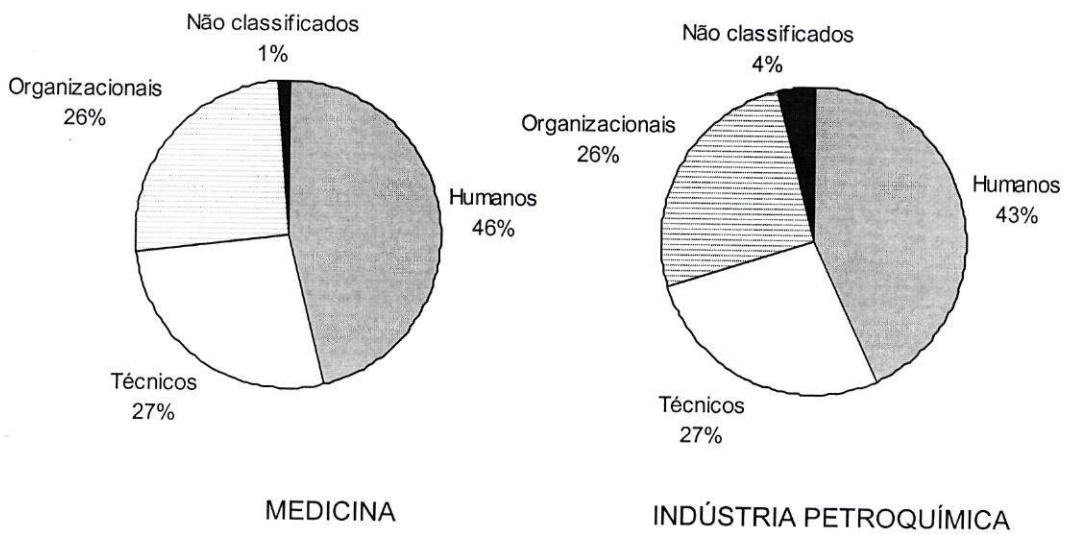


Figura 3 - Comparação da distribuição das causas de erro na medicina e na indústria petroquímica.

O problema do erro humano na análise química farmacêutica permanece por investigar, não existindo nenhum estudo publicado que permita avaliar a verdadeira dimensão do problema. Tal alheamento deve-se, provavelmente, ao facto dos erros não surgirem de uma forma tão abrupta, serem esporádicos e por isso permanecerem dissimulados. Além destes factores, os laboratórios de análise química encontram-se inseridos num sistema de garantia de qualidade que funciona como uma forte barreira para a ocorrência dos erros e que permite também a detecção e correcção de alguns destes tipos de erros. Porém, não significa que o erro humano não esteja presente na análise química, pelo contrário, os laboratórios lidam diariamente com ele e com as suas consequências tentando preveni-lo ou remediá-lo, embora todo este processo se realize muitas vezes de uma forma inconsciente.

A análise química faz parte de um sistema tecnológico, não somente operado por humanos, mas também por eles projectado, construído, organizado, gerido, mantido e regulado. Por isso, tal como em todas as actividades que envolvem o ser humano, o erro é inevitável. Muitos acidentes irão resultar de um erro cometido por uma pessoa que é capaz de realizar uma tarefa de forma segura, que já a realizou inúmeras vezes com sucesso no passado, mas que mesmo assim vai cometer um erro. A expressão latina "*errar hummanum est*" continua a definir a condição humana de forma actual. Os erros resultam das limitações fisiológicas e psicológicas dos humanos e por isso são esperados. Embora não seja possível alterar os aspectos cognitivos humanos que originam o erro, é possível desenhar sistemas que reduzam a sua frequência e tornem as actividades que deles dependem cada vez mais seguras e confiáveis.

3.4.2 Classificação dos erros humanos

As causas dos erros humanos têm sido identificadas e classificadas pela literatura dedicada ao seu estudo, e de acordo com um prestigiado psicólogo investigador na área, James Reason, estes podem ser divididos em activos e latentes [21].

São considerados erros activos as falhas cometidas pelos indivíduos que estão em contacto directo com a tarefa em execução. As suas acções e decisões falhadas tem normalmente um impacto visível e imediato na tarefa que estão a executar. Os erros activos são também conhecidos como a "ponta afiada do processo".

Os erros latentes são as falhas cometidas pelos administradores, gestores e responsáveis pela estrutura do sistema, cujas acções e decisões afectam a política técnica,

organizacional ou de recursos humanos. As suas acções e decisões erradas podem permanecer dormentes por muitos anos até ao momento em que se tornarem evidentes. Os erros latentes são de visualização difícil e estão localizados longe, no espaço e no tempo, do controlo directo do operador que executa a tarefa, e por isso, são também conhecidos como a "ponta arredondada" do processo.

3.4.3 Erros activos

Reason [21] define o erro activo como um termo genérico, que engloba as situações, nas quais uma sequência da actividade mental ou física planeada, falha na obtenção do resultado esperado, considerando que esta falha não pode ser atribuída à intervenção do acaso. A taxonomia do erro humano proposta por Reason representa uma classificação conceptual que atribui os erros activos aos mecanismos cognitivos humanos (Fig.4). A sua classificação é profundamente influenciada pelo trabalho desenvolvido por outro investigador que centralizou a sua atenção nos erros activos. Segundo esse investigador, Jens Rasmussen [22,23], os erros activos poderiam ser subdivididos de acordo com comportamentos humanos baseados na habilidade, em regras e no conhecimento.

Os erros comportamentais baseados na habilidade ocorrem quando as pessoas falham o desempenho de uma tarefa de rotina que normalmente exige um pequeno esforço consciente. A grande maioria das tarefas por nós desempenhadas no dia a dia são realizadas com base na destreza ou capacidade adquirida para as realizar. São tarefas essencialmente senso-motoras, accionadas automaticamente por situações de rotina, que são executadas segundo um modelo mental interno previamente adquirido. São acções desenvolvidas de forma fácil e rápida porque se situam no plano subconsciente, o que torna possível realizá-las em paralelo com outras actividades. Também são designados por conhecimento do procedimento, por se tratar de um conhecimento difícil de transcrever e ensinar, precisamente por se encontrar no plano subconsciente.

Os erros cometidos ao executar este tipo de tarefas surgem quando a rotina é quebrada ou interrompida, como é o caso de uma distracção,ou quando se deposita um excesso de atenção neste tipo de tarefas, resultando, por isso, melhor quando são deixadas decorrer em "piloto automático". Um exemplo deste tipo de erro ocorre quando um analista adiciona um reagente a uma série de tubos colocados numa fila e é interrompido por uma chamada telefónica. Quando volta, retoma a tarefa um tubo à frente, ficando um dos tubos sem o reagente.

Ao nível das habilidades, Reason classificou os erros em equívocos e lapsos, que são resultantes de acções que se desviam da intenção prévia, devido a uma falha de execução e/ou armazenagem de uma sequência de acção. O equívoco é uma acção que não está de acordo com a intenção prévia, ou seja, o plano idealizado era bom mas a execução não é realizada de acordo com esse plano. Os lapsos ocorrem quando há um plano correcto previamente definido mas, devido a uma falha temporária de memória, não é possível executá-lo.

Os erros comportamentais, baseados em regras, surgem nas situações em que se falha a execução de um procedimento correcto, ou quando o procedimento escolhido não é o correcto. Nesta classe de comportamentos são incluídas as sequências de acção utilizadas na gestão de situações familiares, e que são controladas por regras memorizadas pela aprendizagem. Esta classe de comportamento é definido por conhecimento declarativo porque é facilmente transmitido por ser composto por códigos e normas. Estas regras são baseadas em experiências anteriores ou em instruções explícitas, e são do tipo: se ocorre x então acontece y. O indivíduo examina e interpreta a situação e elege uma regra, dentro de um leque gerado e coordenado pelo seu sistema cognitivo, com a finalidade de resolver o problema exposto da forma mais correcta. As regras que foram úteis em situações passadas são consideradas regras "boas", no entanto estas regras podem transformar-se em regras erradas quando não se adequam às circunstâncias actuais. As regras "boas" são designadas também por "fortes" se foram utilizadas com frequência e com sucesso, no passado. Numa hierarquia, as regras de carácter mais geral são mais fortes do que as mais específicas. As regras "fortes" vão ser aplicadas de forma errada no primeiro encontro com a excepção à regra, nos casos em que as pistas contextuais indicativas da excepção à regra são ambíguas ou vagas, ou ainda nos casos de sobrecarga de informação. A aplicação de um regra "forte" num contexto errado foi designada por Reason como regras fortes mas erradas. As regras "más" são aquelas que são baseadas em observações erróneas, ou são generalizadas, ou não foram aprendidas de uma forma conveniente. A falha na selecção ou na execução de uma regra correcta resulta da avaliação incorrecta das situações, da falta de qualificação da pessoa que desempenha a tarefa, da falta de comunicação entre os membros da equipa de trabalho, ou ainda do mau planeamento ou má execução da tarefa. Um exemplo de um erro baseado em regras consiste na selecção de um protocolo errado ou na execução do protocolo correcto de uma forma errada (um analista dissolve um reagente com o auxílio do calor, quando a sua dissolução é difícil, sendo esse procedimento desaconselhado para o reagente em causa).

Os erros comportamentais baseados no conhecimento ocorrem quando as pessoas falham por aplicação inadequada dos seus conhecimentos, quando enfrentam situações novas. Estas situações ocorrem quando não existem regras pré-estabelecidas, ou quando

as regras existentes não são adequadas e, por isso, o comportamento baseado nas regras não soluciona o problema. Tanto o processo baseado em regras como o comportamento baseado no conhecimento são processos conscientes e o Homem tende a preferir as soluções baseadas em regras porque exigem um menor esforço cognitivo. Os erros baseados no processo do conhecimento devem-se à capacidade limitada da memória ou a um conhecimento insuficiente ou tendencioso de todos os dados do problema. O erro baseado no conhecimento pode ser ilustrado pela incapacidade de resolver um problema complexo de interferência num ensaio de doseamento, por um técnico experiente e treinado. Os erros situados no nível dos conhecimentos e das regras foram identificados por Reason como enganos. Os enganos resultam de acções que se desenvolvem de acordo com a intenção prévia e de acordo com a plano estabelecido, sendo esse plano inadequado para atingir o resultado esperado.

Na sua classificação dos erros humanos Reason, inclui ainda as violações, que são um outro tipo de erros que só podem ser definidos num contexto social. Enquanto que os erros descritos anteriormente podem ser definidos com base nos processos cognitivos individuais, as violações são descritas num ambiente social, no qual o comportamento humano não é planeado e executado num acto isolado, mas é regulado pelos valores organizacionais escritos e orais, procedimentos de operação, códigos de prática, códigos de ética e regras, etc. As violações representam desvios deliberados das práticas socialmente aceites como correctas e são divididas de acordo com a intenção premeditada de causar estragos na organização. Assim, as sabotagens são as violações em que há uma intenção clara e preconcebida para causar dano no sistema por razões que só são compreendidas num contexto social. No entanto, as violações não planeadas são aquelas em que não há intenção prévia de causar dano no sistema. Aqui incluem-se as violações de rotina, que são quebras habituais de regras resultantes da tendência natural do ser humano de seguir pelo caminho que oferece menor resistência, ou que surgem como resposta a um ambiente de trabalho onde não existem práticas de punição por comportamento incorrecto, ou onde não existem recompensas por comportamentos exemplares. As violações excepcionais são também violações não planeadas, que ocorrem na execução de determinadas tarefas, que estão de tal maneira estruturadas pelo sistema e que tornam as violações inevitáveis.

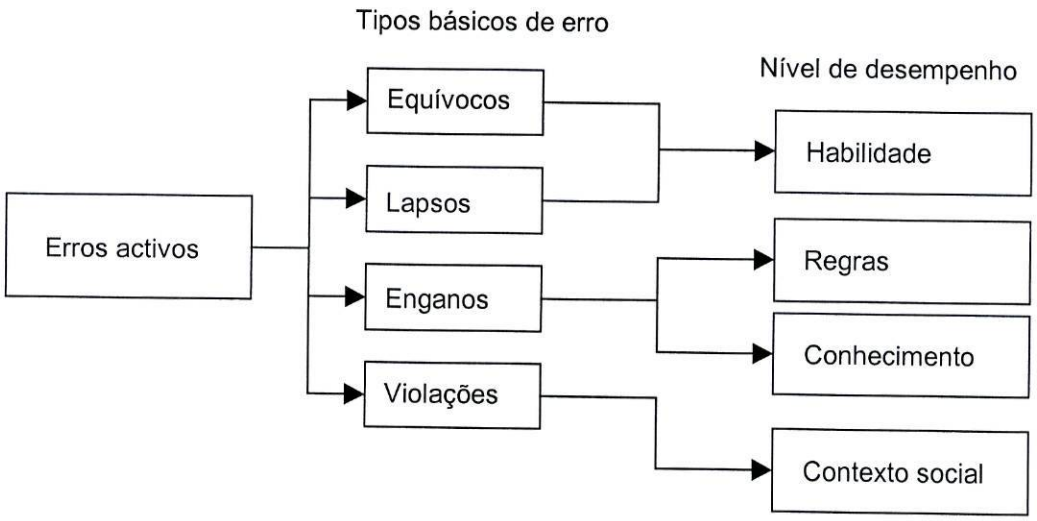


Figura 4 – Classificação do erro activo

3.4.3.1 Origem dos erros activos

Os erros humanos activos resultam dos processos cognitivos básicos. As teorias contemporâneas da psicologia cognitiva assentam num modelo que divide a memória humana em duas estruturas básicas: a memória operativa e a memória a longo prazo (Fig. 5). Estas duas estruturas diferem nas características de funcionalidade, e são estas diferenças que permitem compreender o erro humano [21].

A memória operativa é a actividade consciente que tem características funcionais limitadas, em relação à atenção e à capacidade computacional disponível. As entradas nesta memória têm de ser selectivas pois a sua capacidade limitada permite apenas armazenar, em média, sete itens. Neste espaço mental a informação é guardada em série e a sua operação é sequencial, exaustiva e lenta, por isso, quantos mais itens guardados mais lenta se torna a sua recuperação. A duração da informação contida neste espaço é muito pequena e o decaimento acontece dentro de aproximadamente 15 segundos. Esta memória contém a informação para a qual nós estamos conscientemente informados e funciona

como uma estação central para a memória a longo prazo, inserindo e retirando elementos da memória a longo prazo. O ensaio, ou seja, a repetição consciente de informações da memória operativa permite manter o item neste espaço e ao mesmo tempo copiá-lo ou transferi-lo para a memória a longo prazo.

A memória a longo prazo corresponde a uma actividade inconsciente e tem uma capacidade aparentemente ilimitada. A sua operação é rápida, automática e requer um pequeno esforço de consciência mental e a informação contida neste espaço pode ser guardada de forma permanente. Este espaço funciona como armazém de memórias, conceitos, habilidades, percepções e imagens, que constituem a base dos nossos conhecimentos. Por outro lado, os conhecimentos estão organizados por categorias e dentro destas categorias encontram-se os itens que correspondem a um conhecimento específico. Os itens quando estão armazenados de forma permanente na memória a longo prazo, podem ser codificados através de tabelas indexadas, que permitem que estes itens sejam activados sob o estímulo correcto. Quando estes conhecimentos são activados, os dados de saída são transferidos de uma forma consciente (na forma de imagens, formas, ou pensamentos), para o mundo exterior (sob a forma de gestos, discursos, acções). As tabelas indexadas são específicas para cada categoria de itens, e encontram-se associadas a um contador de frequência que indica o número de vezes que um item particular foi activado no passado.

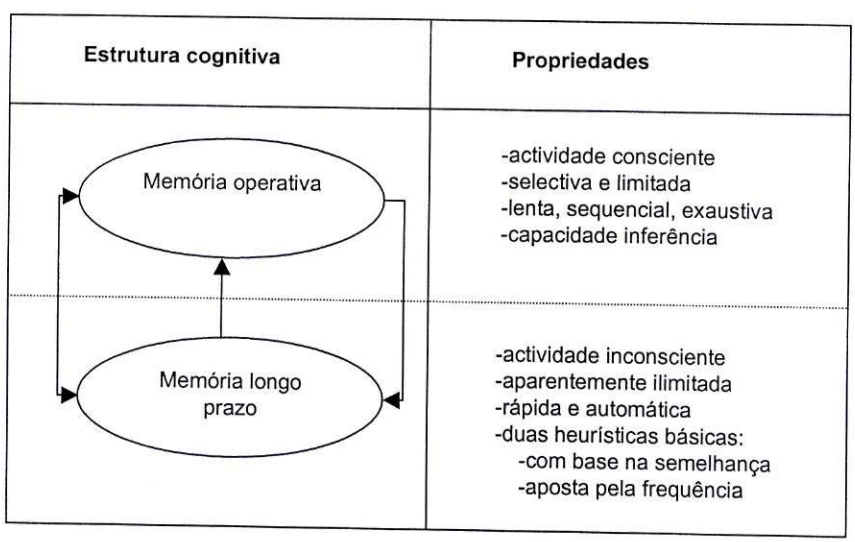


Figura 5 - Os dois modos de controlo cognitivo: controlo consciente da memória operativa e controlo inconsciente da memória a longo termo.

O processo de recuperação de conhecimentos envolve três tipos de actividade cognitiva com a participação destes dois espaços distintos de memória, como se pode observar na Figura 5, e é o responsável pela origem universal dos erros humanos activos.

A primeira etapa corresponde à avaliação metacognitiva que permite examinar a probabilidade do item inquirido estar disponível nos conhecimentos da nossa memória. Este trabalho é realizado pela memória operativa e é conhecido como a consciencialização epistémica, ou ainda como a sensação de ter consciência dos conhecimentos que se possui (de saber o que sabemos). Se o item inquirido for reconhecido, o processo de procura na memória a longo prazo é iniciado.

As pistas das condições de chamada são entregues à memória a longo prazo, que executa a processo de recuperação dos conhecimentos. Este processo é realizado procurando um ajuste, com base na semelhança, entre as pistas fornecidas pelas condições de chamada e os itens que se encontram armazenados na estrutura do conhecimento. As pistas activam automaticamente os itens armazenados que possuem os atributos que se ajustam totalmente, ou parcialmente, com as condições de chamada. Este processo é conhecido como heurística com base no ajuste por semelhança, e é um dos mecanismos computacionais primitivos de recuperação da memória, porque é um processo primário de recuperação de conhecimentos operando de uma forma automática, rápida e inconsciente. Quando esta procura com base na relação de semelhança é bem sucedida é designada por recordação.

Quando as pistas de recuperação são fornecidas de uma forma pouco específica, ou quando os conhecimentos armazenados são incompletos, o processo de recuperação com base num ajuste total por semelhança não tem êxito. Nestas situações, são activados os itens que apresentarem apenas um ajuste parcial com as pistas fornecidas. Os conflitos criados pelo ajuste parcial entre as pistas fornecidas e os vários itens candidatos que se encontram armazenados são resolvidos apostando em favor do item que se encontra melhor classificado no contador de frequência do tabulador. A selecção dos vários itens armazenados é feita de forma tendenciosa em favor do item que mais vezes foi activado com sucesso no passado. Este processo é conhecido como heurística com base na aposta pela frequência, e é o segundo mecanismo computacional primitivo de recuperação da memória.

Depois de terminado o processo automático de procura, os resultados são entregues à memória operativa. Neste espaço de trabalho consciente, a memória utiliza a sua capacidade de inferência para avaliar se o item é apropriado ou não. O trabalho realizado pela memória operativa pode ainda estabelecer conexões conscientes entre as condições de chamada e os itens armazenados, e ainda graças à sua capacidade de dedução, pode

ajudar a completar os elementos que estão em falta num conhecimento que se tenha revelado incompleto durante a procura.

A memória operativa só é capaz de estabelecer estas conexões se tiver disponíveis recursos computacionais suficientes. Estes tornam-se limitados em condições de stress e de sobrecarga de trabalho. Consequentemente, sob condições de sobrecarga cognitiva, as duas actividades computacionais primitivas vão exercer uma influência desproporcional em todos os tipos de desempenho humano. O ajuste por semelhança irá predominar sempre que as condições de chamada especificarem um único item de conhecimento e quando há um grande número de itens armazenados. A aposta pela frequência irá predominar quando as pistas são insuficientes ou quando há poucos itens armazenados.

3.4.3.2 Tipos e formas de erros activos

Embora o tipo de erros humanos possa parecer infinito, na realidade os erros assumem poucas formas. As formas de erro são variedades recorrentes da falibilidade humana e aparecem em todos os tipos de actividade cognitiva, independentemente do tipo de erro. As formas de erro são previsíveis porque têm origem na estrutura cognitiva humana universal, isto é, resultam por um lado das limitações computacionais da memória operativa, e por outro lado, da natureza automática do processo computacional primitivo de recuperação do conhecimento (o ajuste por semelhança e a aposta pela frequência). Compreendendo o modo como se realiza o controlo dos processos cognitivos é possível não só explicar um correcto desempenho, mas também prever as variedades da falibilidade humana.

Os tipos de erros têm origem nas etapas envolvidas na concepção e execução de uma sequência de acção, e podem ser entendidos através das interacções entre a memória operativa e a memória a longo prazo. Uma sequência de acção pode ser descrita em quatro etapas: planeamento, armazenagem, execução e contexto social. O planeamento refere-se ao processo de identificar um objectivo e decidir qual o meio para o atingir, envolvendo a análise consciente da memória operativa dos itens armazenados no conhecimento. O armazenamento é necessário quando os planos não podem ser executados imediatamente, ficando estes guardados na memória a longo prazo. A etapa de execução corresponde à

realização do plano armazenado, e assenta nos padrões de habilidade que estão guardados na forma de programas automáticos, na memória a longo prazo. A última etapa corresponde ao contexto social da acção, que reflecte o significado atribuído à acção pelo indivíduo e pelo ambiente social que o rodeia.

De acordo com estes estados cognitivos, é possível classificar os tipos de erro primários (Tabela 6). Os enganos são definidos por erros de planeamento, os lapsos são considerados erros de armazenagem e os equívocos são os erros de execução. As violações são erros definidos pelo contexto social, ou seja, são as acções consideradas moralmente erradas no contexto de grupo.

Tabela 6 - Classificação do tipo de erros primários de acordo com a etapa cognitiva em que ocorrem [24]

Etapa cognitiva	Tipo erro primário
Planeamento	Engano
Armazenagem	Lapso
Execução	Equívoco
Contexto social	Violação

3.4.4 Erros latentes

Os gestores, que se encontram distanciados da linha da frente dos operadores, são os responsáveis pelas condições latentes do sistema. As suas decisões estratégicas incluem a gestão dos recursos humanos, o planeamento das instalações, a escrita dos procedimentos operacionais, a escolha dos equipamentos, bem como todas as outras decisões que definem a estrutura do sistema.

Todas estas decisões têm o potencial de introduzir "patogénios" no sistema e são uma ameaça para a sua segurança porque são indutores de múltiplos erros activos [21]. Os

erros latentes podem criar condições que induzem os erros activos no local de trabalho (pressão no trabalho, falta de pessoal, horário de trabalho pouco razoável, equipamentos sem manutenção, procedimentos com falhas, falta de comunicação entre a equipa de trabalho, falta de treino) e podem ainda criar lacunas nas camadas de defesas erguidas contra o erro (alarmes duvidosos, deficiências de construção).

Normalmente os operadores que trabalham no sistema não visualizam estes erros, porque se mantêm dissimulados na estrutura organizacional e os indivíduos aprendem e habituam-se a lidar e trabalhar com eles. As falhas latentes podem permanecer dormentes no sistema por muitos anos sem causar nenhum acidente, até à altura em que se combinam com uma falha activa e originam uma oportunidade de acidente.

Os erros latentes são classificados em erros técnicos e erros organizacionais. Os erros técnicos estão relacionados com os problemas dos itens físicos do sistema, como o equipamento, "software", e outros tipos de materiais. Um exemplo de um erro técnico é um "software" desenhado com falhas. Os erros organizacionais resultam de problemas criados pelos elementos da organização como as decisões de liderança, cultura do sistema, orientação dada aos empregados e procedimentos operacionais. Um exemplo de um erro organizacional é um procedimento operacional escrito de uma forma ambígua.

3.4.5 Os erros de um sistema e o modelo do queijo suiço

Para a construção de sistemas mais seguros e confiáveis é importante identificar e eliminar os erros. Não menos importante, é a criação de barreiras, defesas e contramedidas que permitam preveni-los os e remediar os seus efeitos adversos. As barreiras criadas pelo sistema são obstáculos fortes para a ocorrência de erros e, por isso, os sistemas tecnológicos apresentam muitas camadas de defesas, algumas programadas (alarmes, barreiras físicas, fecho automático), outras dependentes de pessoas (dupla verificação), e ainda outras dependentes de controlo administrativo ou de procedimento.

A maioria das barreiras desempenha as suas funções com eficiência, no entanto, algumas delas, apresentam determinadas fraquezas. Embora num sistema ideal estas camadas de defesa permaneçam intactas, na prática tal não sucede e é costume comparar as defesas de um sistema a um queijo suiço [25].

Segundo este modelo (Fig. 6), as camadas de defesa assemelham-se às fatias de um queijo suiço contendo numerosos orifícios, embora, ao contrário do queijo suiço, estes orifícios estejam constantemente a abrir e a fechar, e a alterar a sua posição na fatia. Normalmente a presença destes orifícios numa fatia não causa nenhum acidente, este só acontece quando os orifícios de todas as camadas momentaneamente se alinham e criam uma trajectória de acidente. Os orifícios nas fatias do queijo representam os erros humanos, tanto os latentes como os activos, e quase todos os acidentes têm origem numa combinação destes. Consequentemente, quantas mais camadas de segurança forem erguidas ao longo do sistema menor é a probabilidade do erro ocorrer.

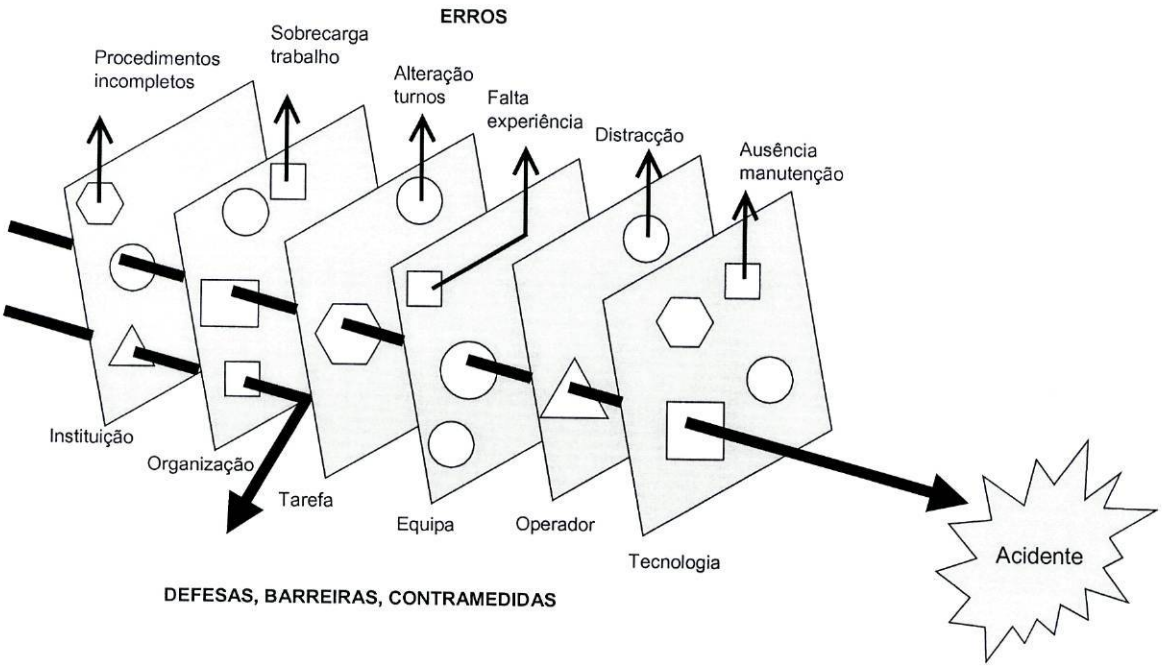


Figura 6 - Modelo do queijo suiço explicando como pode ser criada uma trajectória de acidente ao longo das camadas de defesa de um sistema

3.4.6 Gestão do erro

A gestão dos erros humanos deve ser abordada tendo em consideração a classificação das variedades de erro humano (Fig. 7).

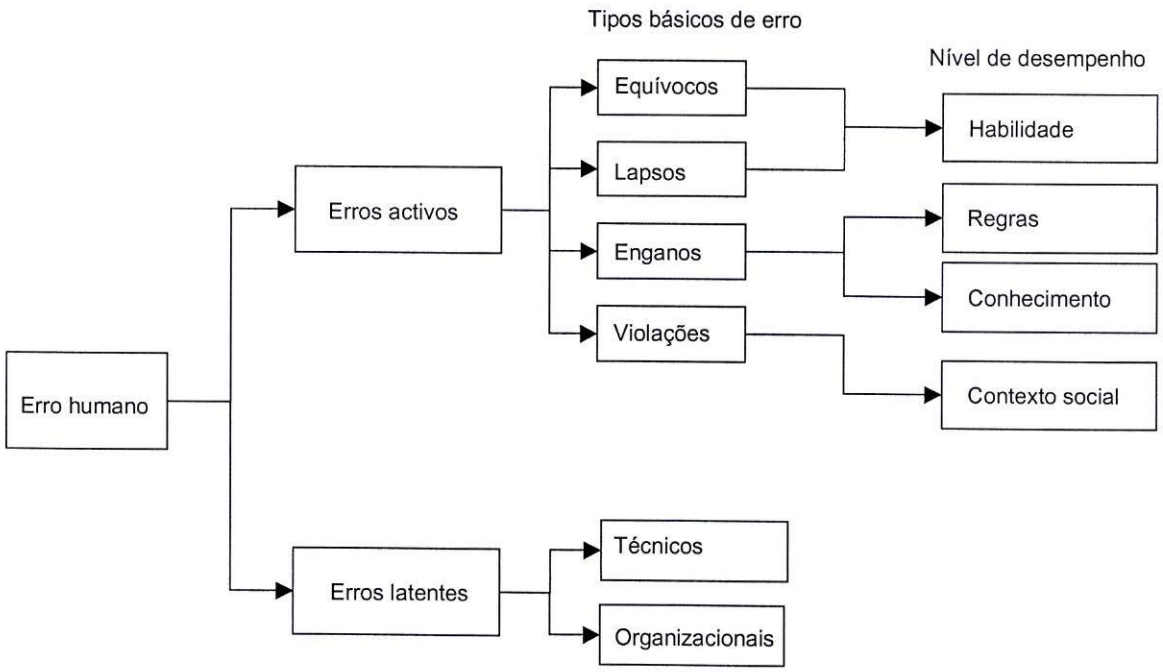


Figura 7 - Classificação das variedades do erro humano

Como já foi referido, os erros activos têm origem nas características cognitivas humanas e a sua ocorrência é previsível. As suas causas são conhecidas e incluem: fadiga, ansiedade, medo, tédio, habituação, interrupções, ruído, distracções, pressão de tempo e sobrecarga de trabalho [26]. A resposta encontrada pelos responsáveis de alguns sistemas para diminuir a incidência dos erros é a punição dos indivíduos que se encontram na "ponta afiada" do processo, conferindo mais importância aos erros activos do que aos erros latentes, que muitas vezes estão na origem dos primeiros. Embora uma resposta punitiva possa parecer uma medida eficaz e apropriada (por exemplo no caso de uma sabotagem), raras vezes diminui a incidência dos erros porque os erros activos são apenas a "ponta do iceberg" em todo o processo. Os seres humanos são falíveis e os erros são de esperar

mesmo com os indivíduos mais competentes que trabalham nas organizações melhor estruturadas. A cultura punitiva revela-se pouco eficaz e a atenção dada aos erros activos faz com que os erros latentes permaneçam dormentes no sistema, tornado-o mais susceptível a falhas futuras.

Descobrir e atentar nos erros latentes tem provavelmente um efeito maior na construção de sistemas mais seguros do que esforços para minimizar os erros activos no ponto onde estes ocorrem. Como não é possível alterar a condição humana que está na origem dos erros activos, é de esperar maior êxito na diminuição da incidência alterando as condições onde os seres humanos trabalham e construindo sistemas mais seguros que minimizem as condições que podem originar erros [27].

A gestão do erro reconhece a sua inevitabilidade e adopta uma cultura não punitiva quando o enfrenta. As três estratégias consideradas essenciais na gestão dos erros e na construção de sistemas mais seguros são: construção de sistemas que previnem os erros, arquitectar procedimentos que os tornem visíveis de maneira a poder interceptá-los, e desenhar procedimentos para a sua mitigação quando não forem detectados ou interceptados [28,29].

3.4.6.1 Prevenir os erros

Na prevenção dos erros é importante conhecer os factores que influenciam a percentagem de erro em todo o sistema. Estes factores incluem: o contexto institucional, gestão organizacional, ambiente de trabalho, equipa, membros individuais da equipa e a tarefa a executar [30]. As causas dos acidentes são geralmente resultado duma combinação destes factores. Para a prevenção eficaz dos erros, os sistemas devem ser construídos tendo em consideração estes factores e a forma como estes se relacionam.

Os sistemas antecipam os acidentes e equipam-se eles próprios de medidas para lidar com o erro em todos os níveis da organização. A prevenção não se detém somente nas falhas isoladas, tanto humanas como técnicas, mas também tenta compreender as relações entre todos os factores que contribuem para erro, e actua construindo sistemas de forma mais simples, mais robusta e praticável.

3.4.6.2 Tornar os erros visíveis

Os sistemas construídos de forma segura incluem procedimentos e atributos que tornam os erros visíveis, para estes poderem ser corrigidos antes de causarem um acidente. As medidas existentes para tornar os erros visíveis são de três tipos: monitorização auto-orientada, monitorização orientada pelo ambiente e monitorização orientada por um observador externo.

A monitorização auto-orientada é a mais eficaz ao nível fisiológico (proprioceptiva, postural, e auto monitorização nociceptiva) e ao nível de desempenho de habilidades. Estudos industriais mostraram que aproximadamente três em cada quatro dos erros cometidos no local de trabalho são corrigidos pelas pessoas que os cometeram. Os erros baseados na habilidade (equívocos e os lapsos) são auto-detectados mais habitualmente do que os erros baseados em regras e no conhecimento, porque a retroalimentação deste tipo de erros tende a ser mais imediata e porque a heurística responsável pelos erros baseados no conhecimento tende a alterar o julgamento imediato da situação, quer ele tenha ocorrido ou não. As condições para maximizar a oportunidade de auto-correcção de erro incluem as condições óptimas de trabalho, motivação dos empregados para se manterem ao nível máximo de alerta, minimização da fadiga e o treino de técnicas de auto-monitorização, quando for possível [31].

A monitorização orientada pelo ambiente são os sinais de aviso, também chamados de campainhas ou apitos, que estão colocados no ambiente de trabalho e que proporcionam ao operador uma retroalimentação, em tempo real, acerca do seu desempenho. Há determinadas sequências de acção em que alguns passos (tarefas obrigatórias) terão que ser obrigatoriamente executados em determinada altura, para que a sequência possa prosseguir correctamente, pois, caso contrário, bloqueiam o processo. As tarefas obrigatórias são de longe as pistas ambientais mais eficazes, pois evitam que uma sequência de acção progrida enquanto o problema não for resolvido. Aquelas são inerentes à natureza física de determinados processos, mas podem também ser tarefas criadas artificialmente para tornar os erros visíveis e prevenir a sua progressão. Por exemplo, em sequências de acção computadorizadas podem ser criadas tarefas obrigatórias, como campos de preenchimento obrigatório ou dados de entrada não aceitáveis, que têm de ser executadas para se fazer o processamento. Outros tipos de pistas ambientais, em sequências de acção computadorizadas, incluem as mensagens de aviso, o encorajamento de entrada de dados adicionais, as correcções feitas pelo computador e os diálogos operador- computador.

A monitorização orientada por um observador externo, também conhecida como dupla verificação, ou "um par de olhos frescos", é uma estratégia adoptada por muitos laboratórios, e é a única forma de muitos erros serem visualizados.

3.4.6.3 Mitigar os efeitos dos erros

Mitigar os efeitos adversos dos erros é uma estratégia indispensável na construção de sistemas seguros, pois nem todos os erros podem ser detectados e interceptados antes de provocarem um acidente. Quando o erro permanece por detectar é necessário processos que permitam reverter rapidamente o dano causado por ele.

3.4.7 Tácticas para reduzir os erros e os acidentes

As tácticas disponíveis para prevenir, reduzir e atenuar os efeitos adversos dos erros podem ser divididas em cinco categorias: redução da complexidade do sistema, optimização do processamento de informação, automatização inteligente, uso constrangimentos, e mitigação dos efeitos adversos provocados por uma alteração [29,32]. Estas tácticas podem ser desenvolvidas para apoiar qualquer uma das três componentes estratégicas de prevenção, detecção e mitigação do erro.

3.4.7.1 Reduzir a complexidade

Reduzir a complexidade é uma medida inteligente, pois a complexidade é uma causa intrínseca de erro [33,34]. Os investigadores avaliaram a complexidade de uma tarefa através de elementos que incluem: número de operadores envolvidos, número de passos envolvidos, número de escolhas possíveis, duração da execução, conteúdo de informação, padrões de intervenção, e pela concentração exigida para a executar. Para diminuir a

complexidade de uma tarefa individual ou de um processo que envolve tarefas múltiplas há que considerar esta lista de elementos. A complexidade é inerente a alguns sistemas, mas deve ser simplificada ao máximo, não esquecendo outros factores que também contribuem para a complexidade como são os atrasos no processo de informação, informação controversa, falta de informação, ausência de clareza na cadeia de informação, pouca clareza nos procedimentos e outros problemas nos procedimentos. A complexidade dos sistemas pode ser reduzida desenhando correctamente a organização do sistema e as tarefas realizadas por cada equipa, simplificando e padronizando os procedimentos, construindo em redundância, desenvolvendo sistemas que exigem confirmação e que criam oportunidades de recuperação de erros.

3.4.7.2 Optimização do processamento de informação

O objectivo da optimização do processamento de informação é aumentar a compreensão das tarefas para reduzir a dependência da memória humana. A redução da dependência na memória tem o efeito de preservar a memória operativa para as tarefas essenciais, para as quais ela é indispensável. Para um processamento óptimo de informação são utilizadas ferramentas básicas como as listas de verificação, protocolos, agendas e outros lembretes. Estas ajudas preciosas têm a vantagem adicional de resguardar a memória operativa, de carácter limitado, deixando-a disponível para a resolução de problemas e para tomar decisões estratégicas.

3.4.7.3 Automatização inteligente

A aplicação da automatização inteligente nos laboratórios actuais é resultado dos enormes avanços tecnológicos e do grande número de vantagens apresentadas pelos autómatos quando comparados com a actividade humana. De uma forma geral, a automatização dos processos aumenta a produtividade, reduz o tempo de execução das tarefas, os custos económicos e os erros humanos. Estes sistemas automatizados são mais

eficazes e confiáveis, e não têm as limitações de memória dos seres humanos, o que faz diminuir a oportunidade do ser humano errar.

Apesar das vantagens oferecidas, a automatização por vezes origina sistemas mais complexos do que os anteriores e pode ainda introduzir novos tipos de erros, difíceis de detectar [34-37]. Anteriormente à era da automatização, os operadores eram intervenientes físicos nos sistemas e tinham uma compreensão global do seu modo de funcionamento. O processo de automatização trouxe como consequência o distanciamento físico dos operadores das tarefas em execução e tornou os sistemas mais opacos para as pessoas que os gerem, que os mantêm e que neles operam. A "opacidade" de um sistema automatizado exprime dois aspectos relacionados com o envolvimento do seres humanos nestes ambientes que é, por um lado, não saber realmente o que se está a passar num determinado momento, e por outro não compreender verdadeiramente as tarefas que o sistema executa [38].

Num ambiente automático, em operação normal, as tarefas dos operadores passam pela monitorização do desempenho do sistema, no entanto, quando ocorrem falhas nos sistemas, é necessário que a sua gestão seja feita de modo manual. Acontece, que à medida que estes sistemas se tornam cada vez mais confiáveis, as oportunidades para os operadores exercitarem e treinarem a gestão manual são progressivamente menores. O controlo manual é um exercício que envolve uma actividade com base na habilidade, que requer treino e prática, e com base no conhecimento, que requer uma compreensão profunda do processo. Nos ambientes automatizados estes dois níveis de desempenho estão praticamente ausentes, pois os operadores estão muito mais habituados a resolver os problemas da monitorização do sistema em condições de operação automática do que em condições de operação manual. A automatização eliminou muitos erros humanos mas também criou novas situações que originam novos tipos de erro. À medida que os sistemas se tornam cada vez mais automatizados o número de seres humanos envolvidos é menor, mas ironicamente o preço do erro humano é cada vez mais crítico.

Um dos princípios básicos de uma automatização inteligente é utilizá-la com o objectivo de melhorar o desempenho do sistema e não apenas automatizar tudo o que é tecnologicamente exequível. A automatização inteligente deve utilizar a tecnologia para apoiar o operador humano e não para o suplantar. Durante a fase do desenho e da implementação é importante reconhecer e reduzir as novas exigências cognitivas requisitadas pela tecnologia, principalmente em alturas críticas ou em alturas onde as tarefas são executadas sob pressão de tempo.

3.4.7.4 Uso de constrangimentos

Os constrangimentos, que poderão ser físicos, procedimentais e culturais, restringem determinadas acções que resultariam em erro, sendo por isso uma das melhores formas de prevenir os erros.

Os constrangimentos físicos tiram proveito das propriedades físicas do mundo, e são usados com frequência para prevenir erros associados com o uso de equipamentos. Como exemplo de um constrangimento físico podemos considerar uma ficha eléctrica com três orifícios utilizada no Reino Unido, cuja utilização em Portugal é impossível porque as tomadas têm apenas dois orifícios. Os constrangimentos de procedimento aumentam a dificuldade de desempenhar uma acção que resultaria em erro. Outro tipo de constrangimentos de procedimento são as tarefas que só podem ser executadas com um número limitado de opções. São por exemplo os programas de computador que não permitem a entrada de dados considerados absurdos. Os constrangimentos culturais são as convenções que definem os comportamentos considerados moralmente aceitáveis e são parte integrante dos sistemas, influenciando decisivamente os comportamentos humanos. Muitos programas de segurança industrial baseiam-se em constrangimentos sociais que definem as acções consideradas erradas e censuram rigidamente aqueles que as cometem. Por exemplo, alterar constantemente os turnos de trabalho de um operador é uma prática considerada culturalmente inaceitável.

3.4.7.5 Atenuar os efeitos adversos provocados por uma alteração

Os sistemas têm melhorado o seu desempenho mantendo-se a par do desenvolvimento da ciência e da tecnologia, provocando alterações na sua estrutura, recorrendo a novos procedimentos, novas técnicas, novos equipamentos e novos sistemas de informação. Embora o objectivo seja a melhoria global do sistema, estas alterações têm o potencial de provocar efeitos adversos.

Durante o período de implementação de uma alteração no sistema, as oportunidades de erro e acidente estão aumentadas, sendo necessário fornecer aos operadores tempo de aprendizagem e de treino suficiente para que a mudança de rotinas familiares tenha sucesso, devendo assim ser fomentadas estratégias para atenuar os efeitos adversos de

uma alteração. Uma medida a ter em consideração antes da alteração ser implementada é fazer um estudo que preveja as oportunidades de erro e de acidente, eliminando-as, se possível, ou minimizando os efeitos adversos com planos de contingência e de treino. Em primeiro lugar, deverá ter-se a precaução de testar as alterações numa escala reduzida e com um risco mínimo, e depois dos problemas identificados, deve ser arquitectado um novo o processo de alteração, com os ajustes necessários. A monitorização dos erros, dos acidentes e dos seus efeitos adversos durante o período de teste e implementação é ainda uma medida que pode atenuar os efeitos adversos de uma mudança.

3.4.8 Programas não punitivos para relatar os erros e os acidentes

As indústrias onde o erro humano é um factor crítico, como a indústria petroquímica, do aço e as plantas nucleares, cedo se aperceberam da sua importância e estabeleceram programas para relatar e analisar os erros e acidentes, que fazem parte integrante de um sistema pré-existente de gestão da qualidade [18,19]. A adopção de uma cultura punitiva dos erros faz com que estes sejam escondidos por quem os comete, com receio de represálias. No entanto, a cultura não punitiva, adoptada por estes programas, permite relatar os erros e os acidentes de uma forma confidencial, incentivando a sua exposição. Os erros, quer tenham provocado um acidente ou não, são depois analisados de uma forma crítica, permitindo examinar as condições e as causas que os provocam para tentar compreender onde se encontram as falhas e fraquezas do sistema e onde devem ser erguidas mais barreiras de defesa. O objectivo é a melhoria de qualidade dos sistema e não a punição de quem comete os erros. Punir os erros não vai diminuir a sua incidência, mas a sua identificação é importante para aprender a reconhecer e a corrigi-los, já que errar é também parte do processo de aprendizagem.

A adopção deste tipo de programas, inserido num programa de garantia de qualidade já bem estabelecido, permitiria aos laboratórios de análise química determinar as percentagens e as causas de erro. Em teoria, estes programas ajudariam também a construir sistemas cada vez mais confiáveis, e desta forma, seria possível colaborar mais intensamente com um programa de garantia de qualidade.

3.5 Referências bibliográficas

[1] D. G. Watson, Pharmaceutical Analysis, London, Curchill Livingstone, 1999.

[2] San Francisco Chronicle, p. 4, Jun. 1994.

[3] D. C. Harris, Quantitative Chemical Analysis, New York, Freeman, 1998.

[4] J. C. Miller, J. N. Miller, Analyst, 113, 1351, 1988.

[5] M. J. Cardone, J. Assoc. Chem., 66, 1257, 1983.

[6] M. J. Cardone, J. Assoc. Chem., 66, 1283, 1983.

[7] M. J. Cardone, J. G. Lehman, J. Assoc. Chem., 68, 1257, 1985.

[8] M. J. Cardone, Anal. Chem., 58, 433, 1986.

[9] M. J. Cardone, Anal. Chem., 58, 438, 1986.

[10] M. J. Cardone, Anal. Chem., 59, 2818, 1987.

[11] J. C. Andrade, Química Nova, 10, 159, 1987.

[12] J. N. Miller, Analyst, 116, 3, 1991.

[13] R. C. Castells, M. A. Castillo, Anal. Chim. Acta, 423, 179, 2000.

[14] A. L. Wilson, Talanta, 21, 1109, 1974.

[15] M.G. Bissell, CLMA National Affairs Committee, Clin. Lab. Management Rev., 8, 27, 1994.

[16] P. Crosby, Quality is Free, New York, McGraw Hill, 1979.

[17] D. O´Hare, M. Wiggins, R. Batt, D. Morrison, Ergonomics, 37, 1855, 1994.

[18] The Development of the NASA Aviation Safety Reporting System. National Aeronautics and Space Administration Science and the Technical Information Branch (NASA Reference Publication 1114). Moffet Field, CA: Battelle´s Columbus Laboratories, 1986.

[19] T.W. Van der Schaff, D. A. Lucas, A. R. Hales, Near miss report as a safety tool, Oxford: Butterworth and Heinemann, 1991.

[20] H. S. Kaplan, J. B. Battles, T. W. Van der Schaff, C. E. Shea, S. Q. Mercer, Transfusion, 38, 1071, 1998.

[21] J. Reason, Human error, Cambridge, Cambridge University Press, 1990.

[22] J. Rasmussen, K. Ducan, J. Leplat, New technology and human error, London, Willey, 1987.

[23] J. Rasmussen, Information processing and human-machine interaction: an approach to cognitive engineering, New York, Elsevier, 1986.

[24] J. Rasmussen, IEEE Transactions: Systems, Man and Cybernetics, SMC-13, 1983.

[25] J. Reason, BMJ, 320, 768, 2000.

[26] R.L. Helmereich, A. C. Merritt, Culture at work: national, organizational and professional influences, Aldershot, Ashgate, 1998.

[27] L. Leape, JAMA, 272, 824, 1994.

[28] J. Reason, Managing the risks of organizational accidents, Aldershot, Ashgate, 1997.

[29] T. W. Nolan, BMJ, 320, 771, 2000.

[30] C. Vincent, S. Taylor-Adams, N. Stanhope, BMJ, 316, 1154, 1998.

[31] B. Adelson, J. Exp. Psych., 10, 483, 1984.

[32] L. Leape, D. Bates, D. Cullen, J. Cooper, H. J. Demonaco, T. Gallivan, JAMA, 274, 35, 1995.

[33] S. Murray, B. Caldwell, Human Factors, 38, 323, 1996.

[34] B. Fraass, K. Lash, G. Matrone, S. K. Volkman, D. L. McShan, M. L. Kessler, Int. J. Radiation Oncol. Biol. Phys, 42, 651, 1998.

[35] N. B. Sarter, D. D. Woods, Int. J. Aviation Psycol., 4, 1, 1992.

[36] N. G. Leveson, C. S. Turner, IEEE Computer, 26, 18, 1993.

[37] D. W. Bates, J. M. Teich, J. Lee, J. Am. Information Soc., 6, 13, 1993.

[38] R. Anthony, Human Reliability in Nuclear Power, London, IBC Technical Services, 1987.

4. AUTOMATIZAÇÃO DA ANÁLISE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS

4.1 Automatização com a técnica de Análise por Injecção Sequencial

A automatização é definida como o "emprego de meios mecânicos, eléctricos, electrónicos... que permitem a realização de determinadas operações, reduzindo ao mínimo a intervenção humana" [1]. Este conceito eclodiu no seio das indústrias, pois era nesta área que as exigências de aumento do rendimento dos processos eram maiores. A automatização trouxe inúmeros benefícios e instalou-se definitivamente não só nas indústrias, mas também noutras áreas da vida moderna, conferindo vantagens competitivas significativas às empresas que melhor as souberam explorar. As vantagens exibidas incluem o aumento da produtividade, a melhoria dos padrões de qualidade dos processos, a diminuição global dos custos económicos, a redução do tempo de execução das tarefas, a diminuição da intervenção humana e, como consequência desta, a atenuação dos erros humanos. Ao longo do tempo, os sistemas automáticos tornaram-se cada vez mais eficazes e confiáveis, executando as tarefas de uma forma rápida, precisa e contínua, 24 horas por dia e todos os dias do ano.

Apesar das vantagens enumeradas, o processo de automatização apresenta alguns problemas de natureza social e económica, como são exemplos: o aumento do consumo de energia, a padronização da produção, e ainda a facilidade de deslocalização da produção, que pode estar na origem de desequilíbrios económicos entre regiões. Outros inconvenientes apontados são o excesso de confiança depositado pelos operadores neste tipo de sistemas, diminuindo o espirito crítico sob a forma como as operações são executadas, e ainda o distanciamento físico das tarefas em execução, que faz com que os operadores não compreendam verdadeiramente as tarefas que o sistema executa, desconhecendo o que se está a passar num determinado momento.

Aceita-se que a automatização, com algumas consequências negativas, tem um resultado final claramente positivo e, por isso, avança rapidamente em todas as áreas da vida, adquirindo o carácter de um fenómeno natural, inevitável, desejável e um símbolo do progresso.

A implementação da automatização na análise química é mais recente em relação ao que sucedeu a nível da indústria, onde este conceito teve origem. Este processo iniciou-se na década de cinquenta do século passado com o desenvolvimento de uma grande variedade de técnicas automáticas para a análise química [2]. A automatização tem contribuído para a melhoria dos parâmetros de desempenho, como a exactidão, precisão, sensibilidade, selectividade, a segurança e os custos de análise das metodologias analíticas. A redução destes últimos foi conseguida graças à diminuição do consumo de reagentes e de amostra, ao aumento da frequência de amostragem e ao aumento do número de espécies analisadas por amostra. Outro factor decisivo para a redução dos custos de análise é a diminuição da intervenção humana e do grau de especialização dos operadores destes sistemas, pois o tempo de formação e de treino exigido é geralmente encurtado. A diminuição da intervenção humana tem ainda consequências na redução dos erros de um procedimento analítico. Nos sistemas automatizados, as dificuldades em controlar as condições de ensaio que afectam a precisão e exactidão dos resultados são menores, pois estes são capazes de executar movimentos de forma exacta e precisa, jamais comparável com a intervenção humana. A qualidade dos resultados deixa de ser tão dependente da habilidade, treino ou destreza dos operadores. Por exemplo, para detectar o ponto de equivalência de uma titulação manual é necessário habilidade do operador, mas esta limitação não se coloca num sistema de titulação automático, que é capaz de determinar o ponto de equivalência de uma forma muito mais precisa, originando resultados mais exactos e sobretudo mais precisos. Estes sistemas não se comportam da mesma forma e não têm as limitações de memória dos seres humanos, estando os erros humanos envolvidos na análise diminuídos. Assim, não estão sujeitos aos erros inerentes à condição humana como distracções, interrupções, habituação, comportamentos tendenciosos, omissões de tarefas, erros de execução incorrecta devido à ausência de conhecimentos, ou de regras mal aprendidas, ou ainda àqueles propiciados pelas condições do local de trabalho. Apesar desta inegável vantagem de redução dos erros humanos, os sistemas automatizados foram criados e são operados por seres humanos, e por isso, dão lugar a outro tipo de erros, que foram anteriormente discutidos noutra secção (secção 3.4.7.3).

A automatização tem também resolvido alguns problemas associados com as análises clássicas, nomeadamente no que se refere ao reduzido volume de amostra, à complexidade de amostras, à elevada ou reduzida concentração da espécie a analisar, à presença de interferentes, à adição de múltiplos reagentes, à adição de reagentes tóxicos ou instáveis, e ainda aos aspectos técnicos envolvidos na análise como o controlo do tempo, temperatura, agitação e extracção.

Os progressos crescentes das novas tecnologias, aliadas à automatização, melhoraram as técnicas instrumentais e, como resultado, as metodologias analíticas são cada vez mais

sofisticadas, robustas e sensíveis. Além disso, as metodologias analíticas automatizadas libertam a informação analítica em tempo real. Neste aspecto, os avanços informáticos, particularmente visíveis ao nível da medida, transdução, aquisição e processamento do sinal analítico, tiveram um papel decisivo.

Com o objectivo de auferir as vantagens da automatização dos procedimentos químicos, Ruzicka e Hansen criaram, em 1975, uma técnica de Análise por Injecção em Fluxo, conhecida pela sigla FIA (do inglês Flow Injection Analysis) [3]. A introdução desta técnica veio revolucionar o conceito de automatização em análises químicas ao propor a realização de medidas instrumentais na ausência de equilíbrio físico (sem a homogeneização da amostra com o transportador/reagente) e químico (sem completar as reacções) [4-7]. O seu modo de operação baseia-se na intercalação rápida de volumes pequenos e reprodutíveis de amostra, num fluxo contínuo, não segmentado, de uma solução transportadora em movimento. Uma configuração FIA típica (Fig. 8) compreende uma unidade de propulsão, uma válvula injectora, um detector e tubagem adequada que permite unir os diferentes componentes do sistema e onde o gradiente de concentrações é modulado. A unidade propulsora é usada para bombear um ou mais líquidos até ao detector através de tubagem de pequeno diâmetro (geralmente com diâmetro interno entre 0.5-0.8mm). A válvula injectora permite a introdução periódica de pequenos volumes de amostra no fluxo transportador. Nesta configuração, a amostra desloca-se, por transporte laminar ao longo da tubagem, em direcção ao detector, dispersando-se fisicamente de uma forma reprodutível, produzindo uma zona bem definida que é detectada sob a forma de um sinal transitório. A altura, ou a área, desses sinais é proporcional à concentração da espécie a determinar, e é utilizada para a sua quantificação por comparação com amostras de concentração conhecida. Noutras configurações, no decurso do processo de transporte para o detector a amostra pode reagir com um ou mais constituintes do fluido transportador originando uma espécie detectável, igualmente sob a forma de um sinal transitório. Estas configurações constituem apenas os casos mais simples de automatização de um procedimento analítico, podendo outras incorporar passos de processamento de amostra tais como: adição de mais reagentes, diluição ou concentração de amostra, extracção de solventes, modificação de matriz, permeação de gases, diálise, etc [4-7].

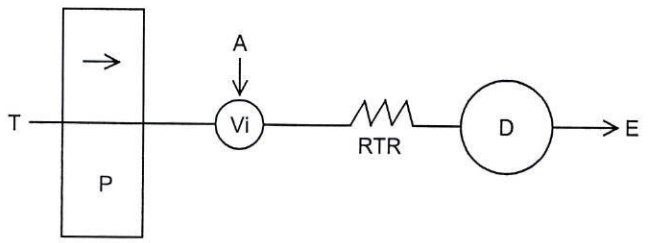


Figura 8 - Representação esquemática de um sistema básico de Análise por Injecção em Fluxo (FIA).

A – amostra; T – solução transportadora, P – dispositivo de propulsão; Vi – Válvula injectora; RTR – reactor de transporte/reacção; D – detector; E – esgoto.

Na década de 70 do século passado, a FIA ganhou popularidade pois era uma técnica que possibilitava uma redução do consumo de amostra e fornecia elevados ritmos de determinação, tornando-se numa ferramenta muito útil para as análises de rotina. Esta não foi certamente a única utilidade nela encontrada, e foi também explorada noutras áreas da análise química, como por exemplo no estudo dos aspectos cinéticos e mecanísticos das reacções químicas no sentido de melhorar a selectividade de determinações analíticas [8,9], e ainda no desenvolvimento de novos procedimentos químicos, enzimáticos, imunológicos e em estudos de células vivas [10,11].

Desde a data da criação da FIA, com 28 anos de idade, as publicações científicas não pararam de crescer, registando-se até ao momento mais de 11 000 artigos científicos [12], o que confirma o seu definitivo estabelecimento como técnica de automatização em análises químicas. A sua utilidade na realidade prática foi igualmente demonstrada pela comercialização de analisadores baseados neste conceito de automatização [13].

Apesar das potencialidades em termos de versatilidade, reprodutibilidade, fiabilidade e facilidade de utilização, esta técnica não está isenta de desvantagens quando se considera a sua utilização em rotina. A necessidade de impulsão contínua do transportador implica um grande consumo de solução de transportador de amostra. Outro inconveniente, nas determinações que exigem diversas etapas analíticas, é a exigência de um canal para alojar cada solução, o que torna as montagens demasiado complicadas. Tem ainda a desvantagem de apresentar uma reduzida autonomia relativamente ao operador, uma vez

que é necessária a reconfiguração física da montagem para cada determinação analítica. A construção e manutenção destas montagens exige alguma experiência e se não forem efectuadas adequadamente podem afectar a confiabilidade do sistema durante a sua utilização prolongada. O facto dos sistemas FIA serem, por norma, monoparamétricos, torna-os inadequados quando a concentração e a matriz das espécies a determinar são variáveis. Outro condicionamento é a automatização de reacções químicas de cinética lenta, já que sendo tempo de reacção definido pelo caudal e pelo tamanho do reactor obriga, nestes casos, a uma a reconfiguração física do sistema, nem sempre com sucesso garantido. A automatização com esta técnica foi desenvolvida numa época em que a automatização informática não estava acessível e, por isso mesmo, era difícil de compatibilizar. Esta era uma alternativa de automatização a baixo custo, mas que mesmo assim não dispensava a presença do operador.

Para colmatar as deficiências de autonomia, robustez, simplicidade e versatilidade apresentadas pela técnica FIA, foi proposto por Ruzicka e Marshall, em 1990, uma segunda geração da análise em fluxo, designada por Análise por Injecção Sequencial, também conhecida pela sigla SIA (do inglês: Sequencial Injection Analysis) [14]. Salienta-se que o seu aparecimento e desenvolvimento foi facilitado pela a proliferação de computadores e pela possibilidade do seu interfaciamento com unidades de propulsão e com as válvulas automáticas, que são os componentes cruciais para a sua implementação [15]. Esta é uma técnica monocanal, de fluxo contínuo não segmentado, com escoamento intermitente, cujo modo de funcionamento se baseia no conceito de fluxo programado e ainda nos mesmos princípios de dispersão controlada e manipulação reprodutível do conceito FIA. Um sistema SIA básico (Fig. 9) é constituído por um dispositivo propulsor bidireccional, um reactor de armazenagem, uma válvula selectora de fluidos, um detector, tubagem adequada para unir os diferentes componentes do sistema, e um microcomputador. Este componente possibilita o controlo sincronizado do dispositivo de propulsão e da válvula selectora de fluidos de modo a definir o volume, sentido e direcção de escoamento das diferentes soluções.

Num ciclo analítico típico, são aspirados sequencialmente volumes precisos de amostra e regentes, através da válvula selectora de fluidos, para o reactor de armazenagem. Por comutação da válvula selectora e por inversão do sentido de escoamento cria-se uma zona composta de sobreposição das zonas de amostra e reagente para a qual também contribuem os processos de dispersão radial e axial. Quando esta zona de sobreposição é encaminhada para o detector, é obtido um sinal transitório, de magnitude proporcional à concentração da espécie monitorizada.

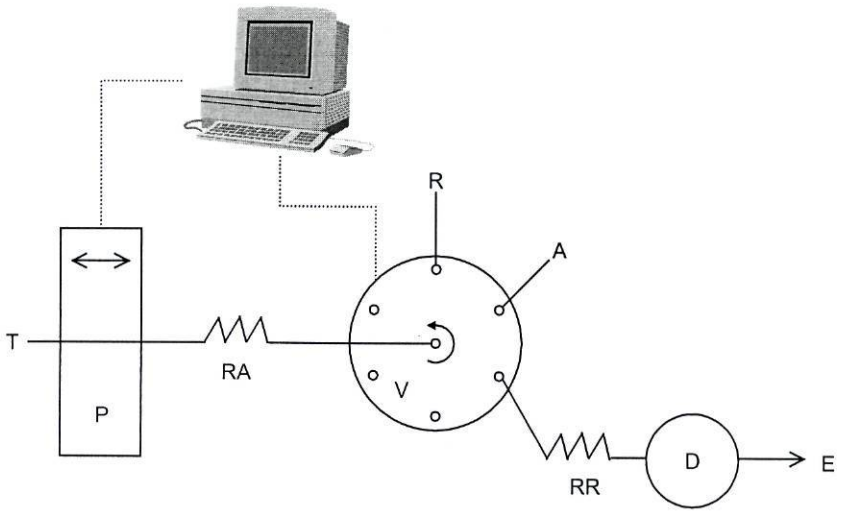


Figura 9 - Representação esquemática de um sistema básico de Análise por Injecção Sequencial (SIA).

T – solução transportadora; P – dispositivo de propulsão bidireccional; RA – reactor de armazenagem; R – reagente; A – amostra; V – válvula selectora de fluidos; RR – reactor de reacção;D – detector; E – esgoto.

A introdução da SIA marcou uma nova era no desenvolvimento da análise em fluxo, contornando algumas limitações importantes da FIA sem, no entanto, alterar os seus princípios básicos de funcionamento [14]. Comparativamente com a FIA, a economia de reagentes e a redução do desperdício de soluções é uma das vantagens do SIA, porque deixa de ser necessário um fluxo permanente de solução transportadora e também porque os reagentes e as amostras são utilizados de uma forma mais eficiente, já que só os volumes estritamente necessários são processados. A economia de reagentes aliada aos elevados ritmos de amostragem, embora estes últimos sejam menores comparativamente com a FIA, fazem desta técnica uma ferramenta adequada quando se pretende realizar medidas analíticas em grande escala. A SIA pode igualmente ser aplicada, com sucesso, nos estudos de cinética de reacções químicas, pois os factores que afectam a precisão dos volumes e os tempos de reacção são rigorosamente controlados [16]. O modo cómodo como os parâmetros experimentais podem ser alterados e controlados pelo computador, o conhecimento dos perfis dos caudais e a selecção criteriosa do binómio tempo/caudal utilizando apenas uma unidade propulsora, tornam estes sistemas simples, robustos, estáveis a longo prazo e com poucas exigências de manutenção. A simplicidade de

configuração é uma das suas características, não requerendo grandes reconfigurações físicas sempre que se altere a determinação analítica, ou as condições em que esta é realizada. Assim, qualquer alteração das condições experimentais como: volume de injecção, tipo de reacção, diluição de amostra, relação reagente/amostra, é conseguida através duma alteração da instrução introduzida pelo teclado do computador. Desta forma, ao contrário das complexas montagens FIA, não há necessidade de reconfiguração física do percurso do fluxo. A robustez destas configurações é de grande utilidade quando se pretende fazer determinações durante longos períodos de tempo, como por exemplo durante a monitorização dos processos industrias [17,18]. A versatilidade exibida possibilita a automatização de vários passos de um procedimento analítico, como são exemplos: a diluição de amostra [19], a calibração automática [20], a difusão gas-líquido [21], a extracção líquido-líquido [22], a diálise [23], e a digestão em linha [24]. É também uma técnica adequada para determinações multiparamétricas, pois diferentes determinações analíticas podem ser facilmente implementadas na mesma configuração [25].

A grande desvantagem apontada, em relação à técnica FIA, é a redução dos ritmos de determinação em cerca de 30-50%, pois o tempo requerido para a análise de uma determinada amostra é resultado não só do tempo de reacção e de medida, mas também do tempo consumido na aspiração das diferentes soluções. Embora os ritmos de determinação sejam menores, este não é um factor importante quando se aplica a situações reais, e de um modo geral as vantagens sobrepõem-se às desvantagens.

Num espaço de treze anos, a SIA tem demonstrado ser um instrumento poderoso e versátil para a automatização de diversos procedimentos analíticos. Mais de três centenas de artigos foram publicados e as suas vantagens são frequentemente citadas em artigos de revisão e tendência na área da química analítica [26-46]. Esta técnica tem sido associada a uma grande variedade de detectores incluindo a espectrofotometria de UV-VIS, fluorescência, turbidimetria, electroquímica, espectrofotometria de absorção e emissão atómica, espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier, quimiluminescência, espectrometria de massa com plasma de rádio-frequência e aplicada a áreas tão diversas da química como a análise ambiental, farmacêutica, alimentar, bioctecnológica, radioquímica e metalúrgica, estudos de cinética das reacções químicas, estudos quimiométricos, e ainda na monitorização dos processos industriais [47]. Demonstrando a sua aplicabilidade na prática, encontram-se disponíveis cinco analisadores, comercializados por três empresas, a Global FIA (FloPro 9P e FloPro 4P) [48], a FIAlab Instruments (FIAlab-3000 e FIAlab-3500) [12] e ainda pela Arctic Instruments (SIAmate) [49].

Em ciência, quando uma nova técnica é criada não permanece intocável por muito tempo, pois a criatividade dos investigadores procura o seu constante aperfeiçoamento. A técnica SIA, também esta resultante de uma evolução do conceito FIA, não é uma excepção

e, como seria previsível, tem sido alvo de sucessivos melhoramentos, que são por norma acompanhados dos progressos da tecnologia e dos avanços nas unidades injectoras, válvulas automáticas, unidades propulsoras e de detecção. Ruzicka, o percursor das técnicas de fluxo, ordenou cronologicamente estes desenvolvimentos da análise em fluxo [15]. A técnica FIA foi considerada a primeira geração das técnicas de injecção em fluxo, o conceito SIA foi considerado a segunda geração, a Injecção de Partículas (BI) (do inglês: Bead Injection) a terceira geração e por fim, introduzida recentemente no ano 2000, o "Lab on Valve" (LOV) a quarta geração.

A BI foi descrita por Ruzicka e Scampavia em 1999 como a terceira geração das técnicas de fluxo e foi desenvolvida para acomodar a química de fase sólida na análise em fluxo [42]. O modo de operação baseia-se na manipulação de um volume de partículas suspensas, que funcionam como transportadores de fase sólida de reagentes, grupos reactivos ou até mesmo células vivas. A grande inovação introduzida é a renovação automática da superfície de reacção, que é um parâmetro crítico quando os ensaios de superfície se tornam contaminados ou disfuncionais pelo uso repetido. Com o auxílio de uma célula de fluxo apropriada, geralmente uma célula em configuração "jet ring", são manipulados pequenos volumes de suspensão de partículas, formando microcolunas que funcionam como superfícies de reacção descartáveis [50]. Um ciclo analítico envolve os seguintes passos (Fig. 10): 1) aspiração de um volume exacto de suspensão de partículas, 2) aprisionamento das partículas na célula, 3) perfusão das partículas com transportador, reagentes auxiliares, amostra e detecção do analito directamente na superfície das partículas ou no eluato, 5) descarte das partículas utilizadas. As reacções químicas que ocorrem à superfície das partículas imobilizadas podem ser monitorizadas em tempo real directamente na sua superfície ou na fase líquida do eluato. Esta técnica também possibilita a determinação multiparamétrica através da monitorização simultânea das alterações na fase sólida e na fase líquida. A BI pode ser utilizada com a FIA, embora o veículo perfeito seja a SIA, pois permite a manipulação das partículas em suspensão de uma forma precisa e fiável. Esta técnica foi inicialmente desenvolvida para análises inorgânicas [51,52], mas mais tarde foi aplicada, com sucesso, nos ensaios de interacção de bioligandos em superfícies renováveis [53,54]. Presentemente, as aplicações relatadas estão centralizadas na área da biologia, biotecnologia e no rastreio de novos fármacos [55,56]. Nesta última área, a BI tem sido utilizada para avaliar as respostas de células vivas quando estas são expostas a diferentes substâncias, tendo essas respostas sido avaliadas através de medidas de pH intra e extracelular [57], consumo de oxigénio [58] e variações na concentração de cálcio intracelular [59,60].

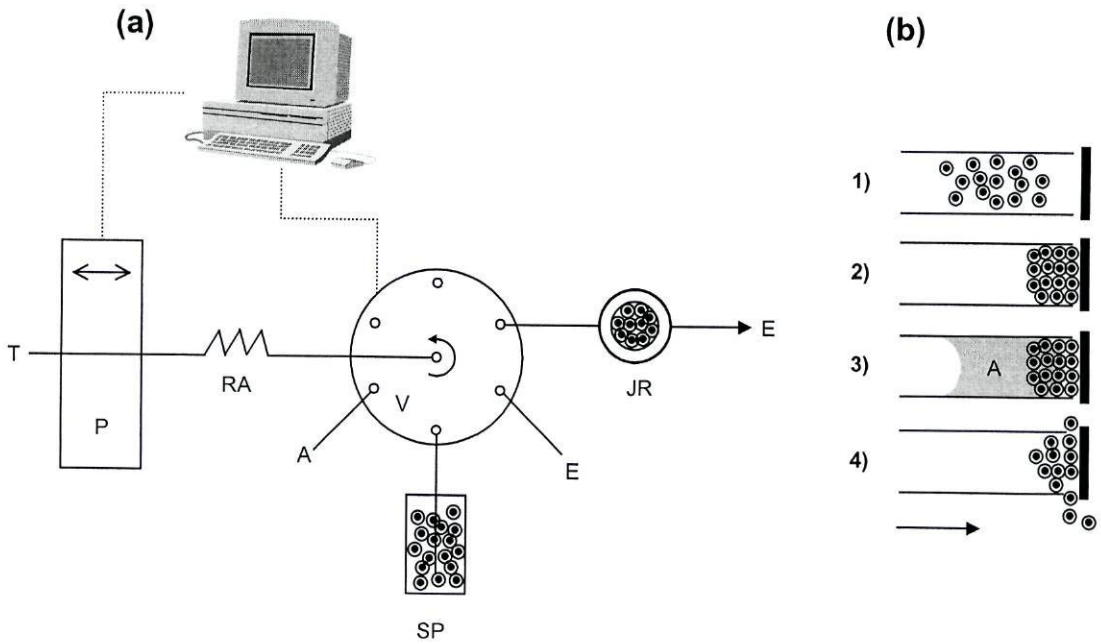


Figura 10 - (a) Representação esquemática de um sistema de Análise por Injecção Sequencial em associação com a Análise por Injecção de Partículas (SI- BI). (b) Representação esquemática de um ciclo analítico

(a): T – solução transportadora; P – dispositivo de propulsão bidireccional; RA – reactor de armazenagem; A – amostra; V – válvula selectora de fluidos; SP- suspensão de partículas; JR- célula de fluxo em configuração "jet ring"; E – esgoto.

(b): 1) aspiração de um volume exacto de suspensão de partículas, 2) aprisionamento das partículas na célula, 3) perfusão das partículas com transportador, reagentes auxiliares, amostra e detecção do analito directamente na superfície das partículas ou no eluato, 5) descarte das partículas utilizadas.

O grande progresso da SIA surgiu recentemente com a sua possibilidade de miniaturização, introduzida pelo conceito "Lab on Valve" [61]. A miniaturização é conseguida utilizando um componente monolítico que é colocado sobre uma válvula selectora de fluidos de uma montagem SIA (Fig. 11). O coração dos sistemas LOV é esta peça, designada por Unidade de Processamento Central da Amostra (CSPU, do inglês Central Sample Processing Unit), que foi estrategicamente desenhada integrando uma porta de injecção de amostra, canais de acesso para reagentes e um célula de fluxo que possibilita a detecção em várias configurações, como por exemplo absorvância, reflectância e fluorescência. A CSPU permite que a diluição da amostra, a adição de reagentes, a mistura, a incubação, a medida da velocidade de reacção, sejam realizadas sob o controlo de um computador, num regime de fluxo em modo de propulsão/aspiração ou parado.

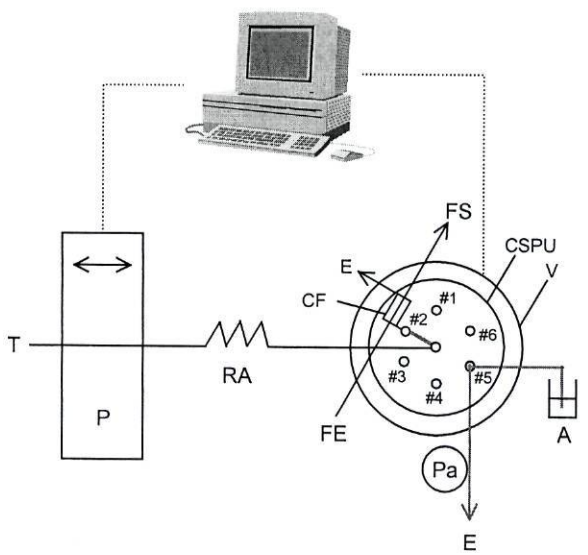


Figura 11 - Sistema de Micro Injecção Sequencial (LOV).

O sistema é formado por uma unidade de propulsão (P) e uma outra unidade propulsora auxiliar (Pa), que serve a porta de amostragem em fluxo (# 5). A Unidade de Processamento Central da Amostra (CSPU), integrando a célula de fluxo (CF), é colocada sobre uma válvula de seis posições (V). A unidade de propulsão (P) funciona em sequência de fluxo aspiração-paragem-propulsão, para introduzir a amostra (A) na porta # 5, e os reagentes (#3,4) no reactor de armazenagem (RA). A reversão do fluxo é utilizada para direccionar a mistura da reacção para a célula de fluxo (CF) na porta #2. A célula de fluxo (CF) é apresentada na configuração de absorvância, utilizando duas fibras ópticas (FE – feixe de entrada; FS – feixe de saída). T representa a solução transportadora e E o esgoto.

Apesar de não alterar o conceito de análise sequencial, esta simples invenção tem algumas implicações importantes. Os microensaios tornam-se possíveis porque os elementos chave, tais como as portas de reagentes e amostras, reactores de mistura, colunas de reacção, e detectores de fluxo, estão centralizados e os percursos do fluxo são minimizados. Qualquer método de injecção sequencial pré-existente pode ser rapidamente adaptado a uma configuração LOV, com redução drástica do consumo de reagentes e da geração de desperdício. Esta é uma característica importante quando estão disponíveis pequenas quantidades de amostra e reagente, como por exemplo nos bioensaios. A instrumentação compacta e as montagens simples são aspectos importantes quando o objectivo é a monitorização dos processos em linha. O LOV, com canais de diâmetro considerável e com percursos de fluxo curtos, é também perfeito para a manipulação de microfluidos com matéria suspensa, podendo ser um veículo óptimo para a BI. As configurações em modo LOV servem-se dos mesmos materiais e hardware desenvolvidos para as técnicas de fluxo, sendo por isso, facilmente implementadas. Estas características têm sido demonstradas nos três últimos anos, através de exemplos em estudos de interacções de bioligandos [62], em associação com o conceito BI [63,64], na monitorização de processos de fermentação em linha [65,66] e na separação de aniões em associação com a electroforese capilar [67].

A par destas gerações de técnicas de fluxo, têm sido apresentadas na literatura outras, que não serão aqui descritas, com propostas de novos modos de operação em fluxo, ou que surgiram como resultado de melhoramentos instrumentais [41,68].

4.2 Aplicação da técnica de Análise por Injecção Sequencial à análise farmacêutica

Os regulamentos relacionados com o controlo de qualidade de medicamentos tornaram-se cada vez mais rigorosos, exigindo à análise farmacêutica moderna resultados rápidos, confiáveis e económicos. Também outros atributos como a simplicidade, robustez, facilidade de operação e elevados ritmos de determinação conduziram à automatização da análise farmacêutica.

A técnica FIA tem dado um contributo importante para o desenvolvimento da automatização nesta área, e as suas vantagens encontram-se bem documentadas em artigos de revisão [69-74] e até mesmo numa monografia especializada [75]. Apesar das vantagens apresentadas e de ser bastante utilizada em investigação, as suas aplicações

analíticas em situações reais não tiveram a aceitação previsível. Na indústria farmacêutica as suas potencialidades não têm sido convenientemente exploradas, sendo pontualmente utilizada como um substituto económico da cromatografia para as análises em grande escala [15]. Esta situação tem sido perpetuada pelas configurações FIA utilizadas, construídas internamente utilizando peças velhas de equipamento cromatográfico, originando sistemas com desempenhos fracos devido aos artefactos introduzidos pela instrumentação deficiente (elevada pressão, pulsação, mistura insuficiente, controlo pouco eficiente do fluxo).

Como foi referido anteriormente, a introdução da SIA contornou alguns obstáculos da FIA e despertou o interesse da comunidade científica para a automatização na área farmacêutica. Num dos primeiros trabalhos publicados dedicados à SIA, Christian previu um futuro radioso para a esta técnica nesta área de aplicação [28]. Desde essa data, vários artigos dedicados à análise farmacêutica foram publicados, incluindo um artigo de revisão [76], aplicando a análise sequencial a uma grande variedade de matrizes, como comprimidos, cápsulas, xaropes, injectáveis, batons, produtos solares, e abrangendo vários princípios activos, com diferentes actividades terapêuticas. Usufruindo das vantagens de economia de reagentes e dos elevados ritmos de determinação, a maioria das aplicações são dedicadas à determinação de princípios activos para controlo de qualidade de formulações farmacêuticas. Para além das análises em grande escala, outros artigos descrevem a sua utilização em ensaios cinéticos, pois o controlo rigoroso dos volumes e dos tempos e das condições de reacção permite realizar as medidas de velocidade de reacção com elevada repetibilidade. Outras aplicações servem-se das características de robustez e elevada eficiência por períodos prolongados para a monitorização contínua dos processos de produção de compostos farmacêuticos e para os ensaios de dissolução. Associando a SIA com a BI foram recentemente descritos ensaios funcionais, que são importantes durante a fase de investigação de novos produtos farmacológicos. As vantagens e potencialidades destas aplicações serão descritas e discutidas pormenorizadamente nas secções seguintes. As capacidades de automatização da técnica SIA na análise farmacêutica são bastantes óbvias. Contudo, as suas potencialidades, principalmente na área de investigação de novos fármacos, nos testes farmacológicos e nos estudos de tecnologia farmacêutica, ainda não foram totalmente exploradas. Talvez uma demonstração mais evidente nestas áreas tenha um impacto maior na indústria farmacêutica. Provavelmente, a miniaturização, que é já uma realidade com o conceito recente LOV, e a comercialização de sistemas portáteis com protocolos de ensaio definidos irá possibilitar o seu estabelecimento definitivo na realidade prática.

4.2.1 Determinação do teor de princípio activo em formulações farmacêuticas

Um dos testes de controlo de qualidade de formulações farmacêuticas é a determinação do teor de princípio activo. Os métodos analíticos quantitativos utilizados devem ser selectivos, precisos e exactos. Além disso, exige-se que estas análises, em grande escala, sejam económicas e com elevados ritmos de determinação. A automatização com a técnica SIA satisfaz todos estes requisitos e tem sido explorada utilizando a detecção espectroscopica, luminescente, electroquímica (Tabela 7).

4.2.1.1 Absorvância no Ultravioleta e Visível

A maioria das determinações dos princípios activos em formulações farmacêuticas descritas baseia-se em reacções cromogénicas ou nas características específicas de absorção de luz pelos analitos. As configurações SIA para este tipo de reacções são, por norma, muito simples, envolvendo a adição de um ou mais reagentes cromogénicos e a detecção com espectrofotómetros, que são equipamentos económicos e de utilização generalizada nos laboratórios.

O grupo de investigação de Salah Sultan, o primeiro a descrever um método SIA aplicado à análise de produtos farmacêuticos, propôs uma série de métodos para a determinação de princípios activos em formulações farmacêuticas baseados em reacções de complexação de iões metálicos com os princípios activos [77-84].

A trimeprazina e a perfanazina foram determinadas após complexação com o paládio (II), na presença de ácido clorídrico, e monitorização espectrofotométrica dos complexos formados a 515 nm, no caso da trimeprazina, e a 560 nm para a determinação da perfenazina [77]. Estes métodos foram aplicados com sucesso na determinação destes princípios activos em amostras que simulavam a composição de preparações farmacêuticas. O controlo rigoroso dos volumes e dos tempos de reacção também permitiu determinar a estequeometria destas duas reacções pelo método de Job.

O mesmos autores descreveram uma aplicação da SIA para uma investigação completa da cinética de uma reacção, que conduziu à determinação da ordem de reacção em relação a cada um dos reagentes, à determinação da energia cinética e ainda à postulação de um mecanismo de reacção. A reacção estudada envolvia a complexação do bromazepam com

o ferro (II), em meio clorídrico, e a determinação da absorvância do complexo formado a 585 nm [78]. Depois de conhecidos os parâmetros cinéticos, foi desenvolvido um método cinético para a determinação de bromazepam.

Uns anos mais tarde, Sultan *et al.* desenvolveram uma optimização quimiométrica da técnica anteriormente descrita [79]. Nessa nova proposta, foram determinadas as condições óptimas de operação, tanto do sistema como das variáveis químicas. As condições de análises eram as mais adequadas e a sensibilidade para o analito era maior do que a obtida anteriormente. No entanto, este sistema apresentava uma redução drástica do ritmo de determinação.

Suliman e Sultan determinaram dois antibióticos da família das fluoroquinolonas, a ciprofloxacina e a norfloxacina, com base na reacção de complexação com o ferro (III), em meio sulfúrico, e na medida das respectivas absorvâncias dos complexos corados a 447 e a 430 nm [80]. A estequeometria e a constante de formação destas reacções foram determinadas e foi desenvolvido um método para a determinação quantitativa destes antibióticos.

Um método SIA com as mesmas potencialidades do anteriormente descrito foi apresentado para a determinação da prometazina [81]. A reacção química deste sistema era baseada na reacção da prometazina com o paládio (II), em meio clorídrico, e na medida da absorvância a 504 nm. Os parâmetros de desempenho do método proposto foram superiores aos encontrados com outros métodos FIA descritos baseados na mesma reacção, e foi aplicado com sucesso a amostras reais.

Suliman e Sultan utilizaram um desenho quimiométrico para optimizar a determinação do oxoprenolol [82]. Esta determinação era baseada na oxidação do oxoprenolol, pelo cério (IV) em meio sulfúrico, com monitorização da absorvância do fármaco oxidado a 480 nm. Este método foi aplicado a amostras reais e apresentou uma percentagem de recuperação de 99.45%, tendo sido considerado superior em relação a outros métodos descritos pela sua simplicidade e rapidez.

Sultan e Desai investigaram a cinética da reacção química de oxidação da vitamina C e, com base nos dados da ordem de reacção em relação a cada um dos reagentes envolvidos, estabeleceram o mecanismo de reacção [83]. Nesta reacção, o ferro (III) era usado como oxidante, a 1,10-fenatrolina como indicador e o complexo resultante era monitorizado espectrofotometricamente a 510 nm. Foi desenvolvida uma determinação cinética que foi aplicada à análise de produtos farmacêuticos. Os resultados obtidos por esta determinação cinética foram estatisticamente comparados com os obtidos com o método de referência da Farmacopeia Britânica, não tendo sido observadas diferenças significativas. Este sistema incluía uma câmara de mistura e permitia uma ritmo de determinação de 20 amostra por

hora. Contudo, o ritmo de amostragem poderia ter sido aumentado, sem perda de fiabilidade, eliminando a câmara de mistura do sistema.

Em 1999, Sultan *et al.* foram os primeiros a descrever uma titulação espectrofotométrica empregando a técnica SIA [84]. Neste trabalho inovador, a vitamina C era determinada com base na sua oxidação com o cério (IV) em meio sulfúrico, medindo a diminuição de absorvância do cério (IV) a 410 nm. O modo de operação deste sistema foi optimizado por um desenho quimiométrico e após determinar as condições óptimas foi aplicado a amostras reais. Comparativamente com o método de titulação convencional e com o método de referência da Farmacopeia Britânica, esta proposta era superior em termos de precisão e de autonomia do operador. A frequência de determinação deste sistema era consideravelmente maior, comparativamente com a determinação anterior.

Recentemente, foi proposto um sistema de titulação numa configuração SIA para a determinação de vitamina C [85]. Este sistema era baseado na reacção de oxidação-redução entre o ácido ascórbico e o permanganato de potássio, em meio acídico, e na medida da diminuição de absorvância do permanganato de potássio a 525 nm. A titulação foi utilizada com sucesso na determinação da vitamina C em comprimidos comercializados.

Newcombe *et al.* incorporaram um óptodo numa célula de fluxo de um sistema SIA para a determinação de vitamina C [86]. O sensor óptico foi construído incorporando um indicador redox, tris(1,10-fenantrolina)-ferro(II), numa membrana de Nafion. Os resultados analíticos desta aplicação eram concordantes com os resultados obtidos com uma titulação iodimétrica convencional. Esta proposta permitia a automatização de uma titulação de uma forma económica mas, segundo os autores, era necessário uma posterior optimização do sensor e das condições de operação do sistema para melhorar a sensibilidade do procedimento e o ritmo de determinação.

Chisvert *et al.* exploraram a alteração batocrómica do máximo de absorção da oxibenzona, na presença de níquel e amónia, para a sua análise quantitativa em cinco protectores solares [87]. Duas metodologias, uma FIA e uma SIA, com base nesta reacção foram comparadas. A frequência de determinação da configuração FIA era três vezes superior, mas a proposta SIA era mais económica no que diz respeito ao consumo de reagentes. Os resultados obtidos com estas duas propostas eram concordantes com um outro procedimento de HPLC.

Ainda no mesmo ano, os mesmos autores propuseram um procedimento semelhante para análise da oxibenzona em batons. Este protocolo de análise exigia um pré-tratamento da amostra, fora do sistema, para a extracção do analito [88].

Recentemente, Chisvert *et al.* determinaram simultaneamente a concentração de dois filtros solares [89]. O sistema incorporava uma microcoluna SAX e possibilitava a extracção em fase sólida da 4-benzofenona e do ácido fenilbenzimidazole sulfónico, em linha. Estas duas

determinações espectofotométricas eram baseadas na eluição selectiva, conseguida pela variação do pH. Esta metodologia não apresentava a interferência de outros compostos presentes nas amostras e foi aplicada com sucesso na análise de vários protectores solares. Ainda para a análise de filtros solares foi desenvolvido um sistema SIA para a determinação espectrofotométrica do ácido p-aminobenzoico [90]. O método baseava-se na diazotização do analito, na posterior complexação com 8-hidroxiquinolona, e monitorização do complexo formado. Este método não exigia qualquer pré-tratamento de amostra e foi validado utilizando um procedimento de HPLC.

Para a análise de paracetamol em formulações farmacêuticas foi proposto por Van Staden e Tsanwani um método que envolvia a sua oxidação com hexacianoferrato (III) de potássio e a posterior reacção com fenol, na presença de amónia [91]. Os resultados obtidos eram concordantes com um procedimento FIA baseado na mesma reacção. A configuração SIA era mais económica pois a redução de consumo de amostra e reagentes era menor.

Os mesmos autores descreveram um sistema SIA para a determinação de boro, na forma de ácido bórico, em soluções para lentes de contacto [92]. O método era baseado na reacção de complexação entre o ácido bórico seguida da reacção com o laranja de metilo. Os resultados obtidos eram comparáveis aos utilizando um procedimento de referência espectrofotométrico.

Recentemente, foi desenvolvido um sistema SIA com um detector espectrofotométrico "diode-array" para determinar a amoxicilina em preparações farmacêuticas [93]. Aplicando uma série de técnicas quimiométricas, este sistema avaliava a presença de interferente em amostras desconhecidas. Quando não eram observados interferentes, ou quando estes não interferiam na área selectiva do espectro de determinação da amoxicilina, o analito era rapidamente determinado monitorizando a absorvância a 250 nm. Neste trabalho, não foi possível determinar o analito na presença de interferentes e para a sua determinação com êxito os autores sugeriram uma calibração multivariada.

Erustes *et al.* determinaram o iodeto em formulações farmacêuticas e em águas de consumo com base no efeito catalítico do analito na reacção de oxidação-redução entre o Ce (IV) e o As (III) [94]. A curva de calibração foi construída medindo a diminuição da absorvância do Ce (IV) em função da concentração do iodeto. Esta reacção apresentava interferência com os iões fluoreto, cloreto, brometo, prata e mercúrio, e, por isso, era necessário utilizar a curva de adição padrão para eliminação dos efeitos de matriz. As formulações farmacêuticas que continham ácido ascórbico e/ou glucose tinham de ser sujeitas a pré-tratamento pois estes componentes eram também interferentes nesta reacção.

A determinação de cálcio em água, urina e amostras farmacêuticas baseada na sua complexação com a cresolftalina e com detecção espectrofotométrica do complexo formado

a 573 nm foi proposta por Van Staden e Taljaard [95]. Estes autores conseguiram eliminar o ruído da linha de base causado pelas espécies de reagente coradas, optimizando a sequência de amostra e reagentes. Os resultados da análise de amostras reais eram concordantes com o método de referência de espectrofotometria de absorção atómica

Van Staden e Tsanwani determinaram o zinco em suplementos dietéticos com base na reacção do analito com o laranja de xilenol e na monitorização espectrofotométrica do complexo formado a 568 nm [96]. A interferência do cobre (II) e do chumbo (II) era mascarada aspirando uma solução de tiosulfato de sódio, antes da detecção do complexo corado. Não era possível eliminar a interferência do níquel, mas foi possível a aplicação desta metodologia a seis amostras com sucesso, uma vez que a presença do níquel nestas amostras era negligenciável.

Para a determinação do ferro (III), Van Staden *et al.* incorporaram uma unidade de diálise num sistema SIA para separar os interferentes colorimétricos e turbidimétricos presentes em amostras farmacêuticas [97]. Após diálise em linha, o ferro (III) era complexado com tiron e o complexo resultante era monitorizado espectrofotometricamente a 667 nm. Esta metodologia permitiu a determinação do ferro total sob forma de ferro (III), pois o ferro (II) era oxidado a ferro (III), antes das amostras serem introduzidas no sistema. Comparativamente com um sistema de fluxo convencional este sistema apresentava uma frequência de amostragem menor.

Van Staden e Naidoo apresentaram mais uma proposta para a determinação de ferro total em amostras farmacêuticas, mas desta vez sob a forma de ferro (II) [98]. O sistema incorporava um reactor em fase sólida que era construído com gránulos de cádmio e era utilizado para a redução em linha do ferro (III) a ferro (II). O ferro (II) reagia com a 1,10-fenantrolina e o complexo formado era monitorizado a 515 nm. Este sistema apresentava uma frequência de determinação de 24 amostras por hora, no entanto, era necessário um pré-tratamento excessivamente moroso da amostra (mais de 12 horas).

Oliveira e Masini propuseram uma metodologia para a determinação de ferro (II) em formulações farmacêuticas sem turbidez [99]. A determinação era baseada na reacção do ferro (II) com 2,2-bipiridil e monitorização do complexo formado. O único pré-tratamento exigido para as amostras não turvas era uma diluição apropriada, antes da introdução no sistema e os ritmos determinação obtidos eram de 100 determinações por hora.

Recentemente, Mulaudzi *et al.* apresentaram um sistema que permita a análise do ferro com especiação deste [100]. O método proposto era utilizado para discriminar quantitativamente as duas espécies de ferro, o ferro (II) e o ferro (III), presentes em amostras farmacêuticas. Inicialmente, o ferro (III) era determinado por complexação com o tiron e monitorização do complexo formado. Depois, o ferro total era determinado na forma de ferro (III), após oxidação do ferro (II) a ferro (III) pelo peróxido de hidrogénio. O ferro (II) podia ser

determinado subtraindo a quantidade do ferro (III) calculada inicialmente à quantidade de ferro total. Essa proposta era bastante mais simples do que as anteriormente descritas e apresentava ritmos de determinação superiores.

4.2.1.2 Fluorimetria

Tang *et al.* propuseram um sistema SIA para a determinação de varfarina explorando o fenómeno de aumento de fluorescência que se observa quando esta molécula forma um complexo de inclusão com a β-ciclodextrina [101]. Os ritmos de amostragem eram na ordem das 180 determinações por hora e foi aplicado à análise de amostras fortificadas.

4.2.1.3 Quimiluminescência

Paseková e Polásek utilizaram um sistema SIA para a determinação de procaína, benzocaína e tetracaína com detecção quimiluminescente [102]. A quimiluminescência era emitida durante a oxidação dos analitos pelo permanganato de potássio em meio sulfúrico. A monitorização das respectivas cinéticas de reacção revelaram diferentes perfis de intensidade-tempo para os três analitos, sendo a sensibilidade das medidas maior para a procaína e benzocaína. A determinação destes dois analitos foi aplicada à análise de formulações farmacêuticas.

Subsequentemente, Paseková *et al.* relataram a quimiluminescência do permanganato para a determinação de uma série de sulfonamidas [103]. Neste trabalho foi estudado o efeito de vários intensificadores utilizados nos ensaios de quimiluminescência com o permanganato de potássio, tendo sido seleccionado para os ensaios posteriores o glutaraldeído. Estes autores apresentaram metodologias de determinação de várias sulfonamidas, mas apenas a determinação da sulfacetamida e sulfafurazol foram aplicadas a amostras reais.

Polásek e Jambor determinaram o trimetoprim com base na sua reacção de oxidação com o permanganato de potássio [104]. Esta reacção era acompanhada pela emissão de quimiluminescência, lida a 370 nm. As sulfonamidas eram fortes interferentes e a sua presença nas amostras impossibilitava a determinação do trimetoprim. Na maioria das

formulações apresentadas no mercado este princípio activo encontra-se em associação com sulfonamidas e, por isso, esta metodologia só foi aplicada com sucesso na análise de formulações contendo apenas o trimetoprim como princípio activo.

4.2.1.3 Electroquímica

Kubiak *et al.* desenvolveram um sistema SIA com detecção por voltametria de redissolução com adsorção para a determinação da vitamina B_2 em comprimidos, baseado na adsorção desta molécula no eléctrodo de mercúrio [105]. O mesmo sistema foi utilizado para estudar o processo de fotodegradação dessa vitamina em soluções aquosas.

Van Staden *et al.* utilizaram um eléctrodo selectivo a fluoreto para a determinação deste ião em dentífricos e águas de consumo [106]. Neste sistema SIA, foram avaliadas quatro configurações amostra/tampão (tampão-amostra, amostra-tampão, tampão-amostra-tampão, amostra-tampão-amostra). As melhores características de desempenho da metodologia foram obtidas com a configuração tampão amostra. Quando era utilizado um sistema tampão adequado, a configuração "sandwich" era mais conveniente para as determinações de amostras com reduzida concentração de analito.

Fernandes *et al.* determinaram a vitamina B_6 em formulações farmacêuticas utilizando um eléctrodo selectivo de ião [107]. O sistema SIA foi construído com uma válvula solenóide de três vias acoplada a uma das portas laterais da válvula selectora e possibilitava a automatização de uma série de procedimentos analíticos relacionados com a utilização de detectores potenciométricos. As potencialidades desse sistema incluíam: calibração, procedimentos de caracterização dos eléctrodos, técnica da adição padrão e uma titulação potenciométrica. Os procedimentos, totalmente automatizados, eram executados a partir uma única solução padrão e não necessitavam de nenhuma reconfiguração física do sistema.

Num artigo de revisão, Stefan *et al.* analisaram o estado da arte do processo de construção e utilização de sensores enantioselectivos em sistemas de análise em fluxo para análise de produtos farmacêuticos [108]. Os mesmos autores, descreveram um biosensor amperiométrico baseado no L-amino ácido oxidase (L-AAOx) imobilizado num eléctrodo de pasta de grafite para a determinação enantioselectiva do S-captopril [109]. As recuperações para este analito na presença de quatro equivalentes molares de R-captopril, prolina ou

polivinilpirrolidina eram na ordem dos 100%. Este sistema foi aplicado na análise de comprimidos.

No mesmo ano, os referidos autores utilizaram o mesmo detector anteriormente descrito e um outro biosensor baseado no D-amino ácido oxidase (D-AAOx), para a determinação simultânea de S- e R-captopril [110]. Este sistema determinava o princípio activo (S-captoril) e também uma das suas impurezas de síntese (R-captopril, sem actividade farmacológica). Segundo os autores, este sistema podia ser utilizado para a monitorização em linha do processo de síntese deste fármaco quiral.

Ainda no mesmo ano, estes autores apresentaram mais um sistema com detecção simultânea de S- e R-captoril [111]. Nesse trabalho, utilizaram um eléctrodo com um membrana enantioselectiva baseada numa maltodextrina para a detecção potenciométrica de S-captopril e o sensor amperiometrico anteriormente descrito para a determinação de R-captopril.

Em 2002, utilizaram dois biosensores amperiométricos semelhantes (baseados em D e L-amino ácido oxidase) para a determinação simultânea de S- e R-perindopril [112]. Estes dois detectores foram incorporados em dois sistemas de análise em fluxo (FIA e SIA). A configuração SIA foi considerada mais eficiente devido à maior precisão e exactidão e também porque o consumo de amostra e transportador era menor.

Tabela 7– Sistemas de Análise por Injecção Sequencial para análise de teor princípio activo

Analito	Matriz	Detecção	Resposta analítica	RSD (%)	Ritmo determinação (h^{-1})	Ref.
Acido bórico	Colírios	S (520 nm)	0 – 12 mg / l	< 0,6	30	[92]
Ácido p-aminobenzoico	Protectores solares; amostras fortificadas	S (500 nm)	0 - 25μg / l	2 – 6	13,8	[90]
Amoxicilina	Comprimidos	S (250 nm)	10 – 120 mg / l	9 - 16	20	[93]
4-Benzofenona Ácido fenilbenzimidazole sulfónico	Protectores solares	S (286 nm) S (300 nm)	20 – 120 μg / l 50 - 80 μg / l	1 – 12 1 - 6	20 20	[89]
Bromazepam	Comprimidos	S (585 nm)	$5 \times 10^{-4} – 1,5 \times 10^{-3}$ mol / l 300 – 11000 ppm	< 1,2 0,33	36 3	[78] [79]
Cálcio	Comprimidos; águas consumo; urina	S (573 nm)	0 – 20 mg / l	< 1,4	43	[95]
S-Captopril	Comprimidos (ref.109); amostras fortificadas (ref.110,111)	Biosensor amperiométrico (ref. 109,110) ESI (ref.111)	0,05 – 1,59 μmol / l 0,4 – 1,6 μmol / l 1 – 1000 μmol / l	< 0,22 < 0,1 < 0,1	80 34 38	[109] [110] [111]

Tabela 7 – Sistemas de Análise por Injecção Sequencial para análise de teor princípio activo (continuação)

Analito	Matriz	Detecção	Resposta analítica	RSD (%)	Ritmo determinação (h^{-1})	Ref.
R- Captopril	Amostras fortificadas	Biosensor amperiométrico	120 – 950 nmol / l 100 – 1000 nmol / l	< 0,1 < 0,1	34 38	[110 [111]]
Ciprofloxacina Norfloxacina	Comprimido; xaropes	S (447 nm) S (430 nm)	50 – 500 ppm 50 – 400 ppm	< 0,9 < 0,9	60	[80]
Ferro (II)	Formulações farmacêuticas Comprimidos; cápsulas; águas consumo	S (523 nm) S (515 nm)	5 – 40 mg / l 1 – 60 mg / l	3 – 4 < 2,5	100 24	[99] [98]
Ferro (III) Ferro (III) + Ferro (II)	Cápsulas; comprimidos Formulações farmacêuticas	S (667 nm) S (667 nm)	100 – 1000 mg / l 0,15 – 100,00 mg / l (ferro III) 0,30 – 80,00 mg / l (ferro II)	< 1,5 < 1,3 < 0,8	8 30 30	[97] [100]
Fluoreto	Dentífricos; águas	ESI	10^{-5} – 10^{-1} mol / l 10^{-8} – 10^{-6} mol / l 10^{-10} – 10^{-6} mol / l (dependente ordem aspiração amostra e tampão)	< 0, 003	30	[106]
Iodero	Comprimidos; xaropes; águas consumo	S (410 nm)	0,002 – 0,5 mg / l	< 3,6	15	[94]
Oxibenzona	Protectores solares Batons	S (376 nm) S (376 nm)	8 40 μg /l 8 40 μg /l	3 – 8 6 - 12	24 24	[87] [88]

Tabela 7 – Sistemas de Análise por Injecção Sequencial para análise de teor princípio activo (continuação)

Analito	Matriz	Detecção	Resposta analítica	RSD (%)	Ritmo determinação (h^{-1})	Ref.
Oxoprenolol	Comprimidos	S (480 nm)	50 – 400 ppm	0.88	120	[82]
Paracetamol	Formulações farmacêuticas	S (630 nm)	0 – 60 mg / l	1,2	27	[91]
S- perindopril R- Perindopril	Amostras fortificadas	Biosensor amperiométrico	60 – 800 nmol / l 60 – 900 nmol / l	< 0,1 < 0,1	30 30	[112]
Procaína Benzocaína Tetracaína	Solução oral Injectáveis ---	QL (≥ 390 nm)	0,5 – 50 μg / ml 0,5 – 25 μg / ml 0,2 – 25 μg / ml	< 3,8	120	[102]
Prometazina	Comprimidos, xaropes; elixires	S (504 nm)	50 – 400 ppm	0,92	200	[81]
Sulfanilamida Sulfacetamida Sulfatiazole Sulfadimidina Sulfafurazol Sulfametoxipiridazina Sulfaguanidina	Amostras fortificadas Colírio Amostras fortificadas Amostras fortificadas Comprimido Amostras fortificadas Amostras fortificadas	QL (≥ 390 nm)	0,015 – 1,50 mmol / l 0,012 – 1,20 mmol / l 0,009 – 0,92 mmol / l 0,035 – 0,87 mmol / l 0,009 – 0,88 mmol / l 0,019 – 0,95 mmol / l 0,010 – 1,00 mmol / l	< 2,3	120	[103]

Tabela 7 – Sistemas de Análise por Injecção Sequencial para análise de teor princípio activo (continuação)

Analito	Matriz	Detecção	Resposta analítica	RSD (%)	Ritmo determinação (h^{-1})	Ref.
Trimeprazina Perfenazina	Amostras fortificadas	S (515 nm) S (560 nm)	50 – 400 ppm 50 – 500 mg / l	< 1 < 1	50 50	[77]
Trimetoprim	Comprimido	QL (370 nm)	0,5 – 100 μg / ml	< 1	120	[104]
Varfarina	Amostras fortificadas	F (λ_{ex} 310nm; λ_{em} 385 nm)	0,1 – 1 μg / ml	1,5	180	[101]
Vitamina B_2	Comprimidos	VAR	0,0 – 0,8 mmol / l	3	34	[105]
Vitamina B_6	Comprimidos, xaropes; injectáveis	ESI	1×10^{-4} - 1×10^{-2} mol / L	< 0, 47	50	[107]
Vitamina C	Formulações farmacêuticas Formulações farmacêuticas Comprimidos Comprimidos; xaropes	S (510 nm) S (410 nm) S (525 nm) óptodo	20 – 300 ppm 30 – 200 ppm 0 – 1200 mg / l $2,50 \times 10^{-3} – 1,00 \times 10^{-1}$ mol / L	< 1,2 < 1,2 2,9 < 2	20 120 60 17	[83] [84] [85] [86]
Zinco	Formulações farmacêuticas	S (568 nm)	10 – 60 mg / ml	< 1	30	[96]

RSD – desvio padrão relativo; S – espectrofotometria; ESI – eléctrodo selectivo ião; QL – quimiliminescência; F – fluorimetria, VRA – voltametria de redissolução com adsorção

4.2.2 Monitorização dos processos de produção de compostos farmacêuticos

As determinações analíticas efectuadas na monitorização de reacções químicas e bioquímicas envolvidas nos processos de produção devem fornecer sistematicamente medidas quantitativas dos vários parâmetros que controlam essas reacções [113,114]. Estas determinações devem eliminar, ou pelo menos minimizar, os passos de preparação de amostra para assim obter rapidamente um relatório do estado do processo de produção. A obtenção desta informação química em tempo real é extremamente útil para melhorar a consistência, qualidade e quantidade dos processos produtivos. O controlo em processo pode ser utilizado para efectuar correcções aos processos produtivos, se for caso disso, sendo de vital importância para o uso eficiente da energia, do tempo e das matérias-primas. Pela sua robustez, capacidade de colher a amostra directamente do meio de reacção e possibilidade de determinação de diferentes espécies, a técnica SIA tem-se revelado adequada para o controlo dos processos de produção industrial [38, 115]. Os sistemas SIA foram também aplicados na monitorização dos processos de produção de alguns fármacos (Tabela 8).

Rong *et al.* demonstraram as potencialidades da SIA na monitorização do processo fermentativo utilizado para a produção de penicilina [116]. O sistema SIA foi desenvolvido para a monitorização da glucose, penicilina e ácido láctico nas culturas do fungo filamentoso *Penicillium chrysogenum*. Estes eram os três parâmetros cruciais do processo de produção, pois a glucose actuava como fonte de carbono e energia e tinha de ser mantida em níveis controlados durante a longa fase de produção, o ácido láctico era um critério importante para o controlo da biocultura e a penicilina era o produto que se desejava obter. Para a determinação da glucose e ácido láctico, a glucose oxidase (GOD) e a lactato oxidase (LOD) foram imobilizadas em reactores enzimáticos para catalisar a oxidação da β-D-glucose e do ácido láctico a β-D-glucono-δ-lactona e a piruvato, respectivamente. Estas duas reacções originavam concomitantemente a formação de peróxido de hidrogénio, que era detectado por quimiluminescência após adição de luminol e de $K_3Fe(CN)_6$. A determinação da penicilina era baseada na formação do ácido peniciloico através da sua hidrólise catalítica num reactor imobilizado de penicilase. O ácido penicilinoico reagia com o iodo e extinguia parcialmente o sinal obtido pela a reacção de quimiluminescência gerada entre o iodo e o luminol. O sistema monitorizava continuamente as culturas de fungos no decurso de 140 horas, mas não foi explorado em toda a sua potencialidade, pois a colheita de amostra era realizada fora do sistema. As medidas obtidas eram comparáveis às obtidas com a aplicação do método de HPLC. Os tempos de análise eram consideravelmente maiores aos obtidos com os mesmos procedimentos numa configuração FIA. Apesar desta

desvantagem, foram considerados vantajosos e aceitáveis para a análise em escala industrial. Numa tentativa de melhorar o sistema anteriormente proposto, estes autores descreveram uma montagem que permitia a análise em linha da glucose e da penicilina [117]. A glucose e a peniclina foram determinados pelos mesmos métodos anteriormente mencionados, e a penicilina foi ainda analisada através da reacção do ácido penicilinoico com o iodo e medida do consumo deste último, pela diminuição de absorvância do complexo iodo-amido. Neste sistema, as amostras eram introduzidas directamente, e não era necessário nenhum passo de diluição da amostra pois os volumes podiam ser automaticamente ajustados. A fiabilidade do sistema a longo prazo permitiu determinar a peniclina por mais de 400 horas de fermentação. Os resultados das três determinações em linha eram concordantes com os obtidos por um procedimento de HPLC, fora de linha, mas o método iodimétrico de determinação da penicilina era mais simples e originava melhores resultados.

Barnet *et al.* descreveram dois sistemas SIA para monitorizar e controlar o processo de produção de morfina [118,119]. A produção deste alcaloide consistia na sua extracção a partir da planta *Papaver somniferum* e envolvia uma série de extracções em vários solventes aquosos e não aquosos. O controlo da concentração de morfina nestes extractos influenciava directamente a eficiência do processo e foi determinada com base na sua reacção de quimiluminescência com o permanganato de potássio acídico, na presença de hexametafosfato. A emissão de quimiluminescência era monitorizada a 610 nm transferindo a luz da célula de fluxo, com uma fibra óptica, para um detector fotomultiplicador. No primeiro sistema apresentado [118], a morfina foi determinada em extractos aquosos e os resultados obtidos foram comparados com um procedimento independente de HPLC. Os resultados de alguns extractos eram concordantes enquanto que outros revelaram alguns efeitos de matriz. Dois anos mais tarde, os mesmos autores determinaram a concentração de morfina em extractos não aquosos [119]. Esta metodologia SIA apresentava uma fraca repetibilidade, em comparação com a metodologia de HPLC, devido à natureza heterogénea da mistura de reacção. Ainda assim, os resultados eram comparáveis e os ritmos de determinação eram muito superiores aos conseguidos com a metodologia de HPLC utilizada no controlo industrial. Contudo, estes autores falharam na exploração das potencialidades da SIA, pois as medidas eram efectuadas fora de linha, exigindo um pré-tratamento manual da amostra antes de serem introduzidas no sistema.

Tabela 8 – Sistemas de Análise por Injecção Sequencial para monitorização de processos

Analito	Matriz	Detecção	Resposta analítica	RSD (%)	Ritmo determinação (h^{-1}) / duração ensaio (h)	Ref.
Morfina	Extractos aquosos *Papaver somniferum*	QL (250-650 nm)	$2,5 \times 10^{-6} – 3,0 \times 10^{-5}$ mol / l	1,4	100 / 144	[118]
Morfina	Extractos não aquosos *Papaver somniferum*	QL (250-650 nm)	0,001 – 0,1 % m/v	6	120 / 144	[119]
Penicilina Glucose Ácido láctico	Culturas *Penicillium chrysogenum*	QL	0,010 – 1,200 g / l 0,010 – 7,000 g / l 0,0050 – 5,000 g / l	2,06 2,56 2	30 / 160 20 / 160 20 / 160	[116]
Penicilina Glucose	Culturas *Penicillium chrysogenum*	QL / S QL	0,10 – 1,8 g / l (QL) 0,10 – 1,8 g / l (S) 0,010 – 7,000 g / l	--- --- ---	--- / 425 --- / 350 --- / 45	[117]

RSD – desvio padrão relativo; S – espectrofotometria; QL - quimiluminescência

4.2.3 Ensaios de dissolução de formulações farmacêuticas

Os ensaios de dissolução de formulações farmacêuticas são importantes para o controlo de qualidade dos medicamentos. Quando estes testes fornecem uma informação detalhada das características dinâmicas do processo dissolução são também úteis para acompanhar os estudos de desenvolvimento de novas formas de dosagem. A maioria dos ensaios oficiais descritos nas Farmacopeias são baseados na recolha manual de amostra do meio de dissolução durante alguns, ou apenas um, períodos de tempo pré-determinados. A informação analítica assim obtida é insuficiente para descrever o processo cinético de dissolução, impossibilitando uma contribuição nos estudos de concepção e avaliação de novas formas de dosagem. Além disso, os procedimentos manuais de análise discreta apresentam baixos ritmos de determinação, são pouco práticos e particularmente difíceis, ou até mesmo impossíveis de executar, quando vários testes estão a decorrer em paralelo nos vasos de multi-dissolução (geralmente seis).

A monitorização contínua dos princípios activos nos meios de dissolução exige, por isso, a sua automatização. As características de um teste de dissolução automático ideal foram identificadas [44]:

1) Elevada eficiência no pré-tratamento e determinação em linha da amostra, permitindo a monitorização em tempo real.
2) Elevada frequência de amostragem para obter uma elevada resolução do perfil de dissolução.
3) Baixo consumo de amostra para que a introdução de distúrbio no volume do meio de dissolução seja mínimo, particularmente quando estão envolvidas elevadas frequências de amostragem.
4) Testes em paralelo nos vasos de multi-dissolução com um único detector.
5) Determinação simultânea de multi-componentes numa forma de dosagem.
6) Elevada estabilidade do pré-tratamento da amostra e do sistema detector em condições de operação contínua por períodos prolongados.
7) Monitorização contínua da linha de base e da re-calibração em linha do sistema de detecção.
8) Reduzido consumo de reagentes.

Os sistemas SIA podem reunir estas características e as vantagens de colheita directa de amostra do meio de dissolução (através da filtração em linha), a realização de testes em paralelo nos vasos de multi-dissolução, a aplicação de métodos quimiométricos para a determinação de multi-componentes, foram recentemente exploradas (Tabela 9).

O primeiro sistema SIA utilizado para os ensaios de dissolução foi descrito por Liu e Fang, e foi utilizado para avaliar os perfis de dissolução de ibuprofeno em comprimidos convencionais, cápsulas de libertação sustentada e comprimidos de matriz de libertação controlada [120]. Neste sistema, as amostras eram colhidas, após filtração em linha, e o ibuprofeno era determinado monitorizando a absorvância a 222 nm. O sistema executava seis testes de dissolução em paralelo, com um ritmo de amostragem de12 amostras por hora. O consumo de amostra durante um período de 12 horas representava apenas 1,6% do volume total do vaso de dissolução. A excelente precisão a longo prazo (desvio padrão relativo de 2,18%) demonstrou a estabilidade e robustez deste sistema automatizado.

Subsequentemente, estes autores serviram-se da versatilidade e flexibilidade desse sistema para monitorizar simultaneamente a aspirina, fenacitina e cafeína em ensaios de dissolução de comprimidos de aspirina compostos [121]. Para a determinação simultânea destes três compostos foi utilizada a técnica dos mínimos quadrados parciais. Quando a aliquota de amostra atingia o detector, o fluxo parava e era iniciado o varrimento do espectro na região entre 220-310 nm. O ritmo de determinação era de 15 amostras por hora e o consumo de amostra era de 0,2 mL por cada determinação. Este sistema não requeria a separação dos analitos, era rápido, facilmente adaptável à monitorização de vários vasos de dissolução e permitiu a obtenção de resultados em tempo real, com elevada resolução da cinética de dissolução dos três analitos.

Paseková *et al.* utilizaram um eléctrodo selectivo a salicilato para determinação do ácido acetilsalicílico, após a sua hidrólise em linha, em formulações farmacêuticas e em ensaios de dissolução [122]. Os resultados obtidos nos ensaios de doseamento de ácido acetilsalicílico em várias formulações farmacêuticas, incluindo formulações multi-componentes e comprimidos efervescentes, eram concordantes com a metodologia de referência de HPLC. A mesma metodologia foi aplicada para avaliar os perfis de dissolução de comprimidos de aspirina convencionais ou compostos (30 minutos de ensaio, e 10 determinações) e foi ainda testado um comprimido de libertação sustentada (90 minutos de ensaio e 9 determinações). Os perfis obtidos eram comparáveis aos obtidos com o ensaios de dissolução descritos na Farmacopeia Americana. Estes duas metodologias determinavam selectivamente o ácido acetilsalicílico mesmo na presença de outras substância activas.

Recentemente Legnerová *et al.* descreveram um sistema SIA para a monitorização dos ensaios de dissolução de tartarato de ergotamina em formulações farmacêuticas [123]. As

amostras eram colhidas para o interior do sistema e a ergotamina era detectada por fluorescência (λ_{ex} = 236 nm e λ_{em} = 390 nm). Estes ensaios de dissolução tinham uma duração de 20 minutos, a frequência de amostragem era de 120 amostras por hora e o consumo de amostra por medida era de 50 μL. Foram realizados vários ensaios de dissolução de comprimidos de ergotamina e os resultados obtidos foram concordantes com a metodologia de referência da Farmacopeia Britância.

Tabela 9 – Sistemas de Análise por Injecção Sequencial para ensaios dissolução

Analito	Matriz	Detecção	Resposta analítica	RSD (%)	Ritmo determinação (h^{-1}) / duração ensaio (min.)	Ref.
Ácido acetil salicílico	Comprimidos convencionais Comprimidos libertação sustentada	ESI	0,05 – 10 mmol / l	< 2	20 / 30 6 / 9	[122]
Aspirina Fenacitina Cafeína	Comprimidos multi-componentes	S (220 – 310 nm)	44 – 220 mg / l 30 – 1500 mg / l 10 – 50 mg / l	0,5 0,4 0,7	15 / 60	[121]
Ergotamina	Comprimidos convencionais	F (λ_{ex} 236nm; λ_{em} 390 nm)	0,03 – 0,61 mg / l	< 0,86	120 / 20	[123]
Ibuprofeno	Comprimidos convencionais; Cápsulas de libertação sustentada; comprimidos de matriz libertação controlada	S (222 nm)	0 – 0,12 g / l 0 – 0,35 g / l	0,5 0,3	42 / 80 42 / 720	[120]

ESI – eléctrodo selectivo ião; S – espectrofotometria; F - fluorimetria

4.2.4 Ensaios funcionais e rastreio de novos fármacos

A investigação de moléculas com actividade farmacológica dá origem a um sem número de compostos potenciais candidatos a fármacos e é necessário testar rapidamente a sua eficácia. Estes testes, designados por ensaios funcionais, são utilizados numa fase inicial de identificação e caracterização de um novo fármaco, classificando-o em agonista ou antagonista, consoante invoca ou inibe uma resposta biológica. Se a ligação do fármaco ao receptor induz uma resposta celular, esta pode ser avaliada monitorizando parâmetros adequados como o cálcio intracelular, o pH intracelular, a extrusão acídica, a extrusão de lactato, o consumo de glucose, consumo de oxigénio ou até mesmo o potencial da membrana. Estes estudos são importantes em farmacologia especialmente durante a fase de investigação de novas moléculas, no rastreio de fármacos, ou na classificação da potência de vários fármacos.

Os ensaios funcionais realizados pelas técnicas manuais são geralmente conduzidos expondo repetidamente os mesmos materiais biológicos a diferentes concentrações de fármacos e utilizando tempos de exposição excessivamente prolongados. Esta situação pode corromper as respostas fisiológicas das células, dessensibilizar os receptores ou até mesmo destruir os materiais biológicos.

Uma alternativa a estas técnicas manuais surgiu recentemente com a automatização dos ensaios biológicos pela técnica de fluxo SI-BI [42, 55, 56,124]. Uma série de ensaios funcionais têm sido desenvolvidos utilizando várias linhas celulares e medindo vários parâmetros de avaliação da resposta celular, demonstrando que esta é uma técnica ideal para a automatização dos ensaios biológicos (Tabela 10). As células utilizadas nestes ensaios são adsorvidas à superfície das micropartículas e é possível obter uma amostragem representativa utilizando um volume pequeno e reprodutível de um meio com estas partículas em suspensão. Desta forma, é possível eliminar a variabilidade biológica que se observa quando as células utilizadas nas medidas são obtidas a partir de diferentes locais de cultura. Em cada ensaio, os estimulantes actuam em dosagens uniformes e por períodos de exposição controlados, sendo as respostas muito reprodutíveis. Além disso, porque os estimulantes actuam em células frescas a variabilidade biológica, que se observa quando as células sujeitas a uma série de medidas se tornam aclimatadas aos agonistas, é eliminada. Outra grande vantagem da BI é fornecer informação cinética, que não é possível obter quando os estimulantes são adicionados manualmente às culturas celulares. Com base no comportamento cinético da interacção fármaco-receptor (interacção inicial, velocidade inicial, duração e resposta máxima) é possível diferenciar, classificar, e determinar a eficácia dos diferentes agonistas.

Hodder e Ruzicka desenvolveram um modelo experimental baseado num ensaio funcional de receptores muscarínicos agonistas utilizando células de ovário de hamster que expressam o receptor muscarínico do tipo M1 (CHO M1) [60]. Estas células foram cultivadas em micropartículas, incubadas com uma prova fluorescente de cálcio intracelular (fura-2-am) e finalmente suspendidas num meio tampão. O sistema BI-SI aspirava e aprisionava automaticamente um pequeno volume desta suspensão de partículas para uma célula de fluxo em configuração "jet-ring". As células aprisionadas na microcoluna eram depois perfundidas com os fármacos. As respostas provocadas pelos fármacos eram avaliadas monitorizando a libertação transitória do cálcio citosólico, resultante da estimulação do receptor, com um detector de fluorescência. Na etapa final de cada ciclo analítico, as células eram automaticamente descartadas e o ensaio podia ser novamente repetido utilizando células frescas. Foram estudadas as respostas celulares a várias concentrações de dois agonistas (acetilcolina e pilocarpina) e um anatgonista (atropina). As curvas de dose-resposta construídas a partir destes ensaios discriminavam os agonistas parciais (pilocarpina) dos agonistas plenos (acetilcolina), permitindo classificar estes fármacos de acordo com as suas propriedades farmacológicas. Este sistema também avaliava a influência de anatgonistas muscarínicos na resposta do cálcio intracelular. Isso era conseguido ensaiando uma série de amostras que consistiam numa mistura de acetilcolina, a uma concentração constante, e antagonista a concentração variável. A diminuição da resposta do cálcio intracelular era dependente da dose de antagonista e a sua eficácia também podia ser determinada. Os resultados dos parâmetros farmacológicos avaliados eram comparáveis com os descritos na literatura. Estes ensaios são úteis para a descoberta de novos medicamentos neurológicos e gastrointestinais, já que os receptores muscarínicos são alvos farmacológicos importantes deste grupo de medicamentos.

No mesmo ano, Lahdesmaki *et al.* propuseram um sistema SI-BI para medir as respostas celulares causadas pela exposição de fármacos, avaliando o consumo de oxigénio [58]. O oxigénio tem um papel central no metabolismo aeróbio das células, funcionando como aceitador final de electrões na via aeróbia de oxidação, e as medidas de consumo podem ser utilizadas para estudar os eventos bioquímicos quando a via aeróbia é afectada. O consumo de oxigénio é também útil para avaliar as respostas celulares quando estão sujeitas a estímulos químicos. O consumo de oxigénio é monitorizado medindo a sua concentração extracelular, ou seja doseando a solução que envolve as células. O sistema proposto, foi utilizado para estudar o efeito do amobarbital e da acetilcolina nas células CHO M1 através da monitorização do consumo de oxigénio. O sistema sensor de oxigénio era baseado na capacidade do oxigénio alterar a fosforescência de um complexo de porfirina-Pt, que havia sido imobilizado à superfície das micropartículas utilizadas para cultivar as células. Este trabalho demonstrou que a estimulação dos receptores muscarínicos das

células aumenta o consumo de oxigénio, reflectindo uma perturbação no metabolismo energético causado por alguns fármacos.

Lahdesmaki *et al.* apresentaram um sistema SI-BI semelhante para medir as respostas celulares causadas pela exposição de fármacos, avaliando o pH intracelular e a extrusão acídica [57]. A geração de produtos acídicos faz parte do processo energético metabólico de todas as células vivas. Consequentemente, a extrusão ácida e a medida de pH intracelular podem ser monitorizadas para estudar os eventos que perturbam o metabolismo celular, como por exemplo durante a estimulação das células por uma agente químico. No trabalho apresentado, era possível medir estes dois parâmetros usando o mesmo sistema. Para a avaliação do pH intracelular, as células eram cultivadas em micropartículas e depois carregadas com um indicador de pH intracelular fluorescente. Estas micropartículas eram depois aprisionadas numa microculuna através do sistema BI, e expostas ao estimulante. As alterações na intensidade de fluorescência eram proporcionais às variações de pH intracelular. Para a avaliação da extrusão acídica, era imobilizado um indicador fluorescente insolúvel à superfície das micropartículas e só depois se cultivavam células nestas partículas marcadas. Estas micropartículas eram inseridas de modo semelhante no sistema BI e a resposta da extrusão acídica era monitorizada por detecção fluorescente. Não era necessário nenhuma alteração física do sistema para efectuar estas duas medidas, a única diferença era a colocação do indicador: ora no interior das células para medir o pH intracelular, ora no exterior, adjacentemente à membrana externa das células para medir a extrusão acídica. O estudo foi realizado com células de CHO M1 e utilizando como estimulante o carbacol. A exposição ao carbacol resultava num aumento subtil da extrusão acídica e numa acidificação transitória no citosol. As duas alterações eram dependentes da dose, sendo possível construir as curvas dose-resposta. Subsequentemente, foi determinada a eficácia do carbacol como estimulante das células CHO M1. O valor de concentração efectiva a 50% (EC_{50}) calculado, era comparável com o valor obtido utilizando outro procedimento descrito na literatura.

Recentemente, Schulz e Ruzicka demonstraram que o conceito Lab on Valve pode também ser associado à BI, para a avaliar o consumo de glucose de células vivas [64].

A glucose é a principal fonte de carbono e energia utilizada pelas células vivas e a determinação do seu consumo pode ser utilizada para avaliar o estado metabólico das células após estimulação química ou para estudar as alterações metabólicas antes, durante e depois de ocorrer um evento hipóxico nas células (como por exemplo durante a hipoxia dos miócitos nos enfartes do miocárdio). Nesta primeira aplicação do LOV a ensaios biológicos, as células de hepatócitos de murino (TABX2S) foram cultivadas em micropartículas, e depois aprisionadas e perfundidas numa microcoluna com um microbioreactor, em condições de temperatura controladas. A glucose consumida era

determinada avaliando a sua concentração no líquido perfundido através de uma análise enzimática que decorria na célula de fluxo equipada com fibras ópticas. O doseamento da glucose era baseado numa reacção enzimática, que decorria em dois passos, e originava como produto de reacção o NADH que era monitorizado a 340 nm. Estes ensaios foram também realizados na presença de azida, que é um inibidor do citocromo C oxidase envolvido nos processos de degradação da glucose pela via aeróbia. Na presença de azida, a glucose só podia ser degradada pela via anaeróbia e por isso, as células aumentavam o consumo de glucose para compensar o menor rendimento energético obtido por esta via. Estes resultados validaram os anteriormente obtidos.

Ainda no mesmo ano, Schulz *et al.* propuseram um sistema LOV associado à BI, para a determinação do consumo de glucose e da extrusão de lactato [63]. A informação do consumo de glucose combinada com a velocidade de extrusão do lactato (produto da degradação da glucose por via anaeróbia), são dois parâmetros importantes para avaliar o regime metabólico de uma cultura celular. Comparando estes valores pode ser feita uma estimativa da porção de energia que está a ser gerada por metabolismo anaeróbio e aeróbio. As duas informações daí decorrentes podem ser utilizadas para classificar os regimes metabólicos de diferentes linhas celulares. De uma forma semelhante, os regimes metabólicos podem ser utilizados para distinguir culturas primárias de culturas secundárias, uma vez que as primeiras tendem a ser mais aeróbias, ou ainda para elucidar o efeito de compostos químicos em culturas celulares. Os efeitos de agentes químicos no metabolismo celular podem ser avaliados comparando o consumo de glucose e a extrusão de lactato no estado basal e na presença destes composto. Estes estudos também podem ser utilizados para estudar os efeitos ambientais que induzem perturbações metabólicas. Por exemplo, um evento isquémico (como acontece nos enfartes e nas paragens cardíacas) pode ser simulado num sistema BI desgasificando o transportador. O sistema desenvolvido por Schulz *et al.* foi utilizado para comparar o regime metabólico de duas linhas de células de hepatócito de murino diferentes, as células TABX2S, que hiper expressam a proteína Bcl-xL, e as células TABX1A que não expressam essa proteína. As células eram cultivadas, aprisionadas e perfundidas para um microcoluna com um microbioreactor, de forma idêntica à descrita anteriormente. O regime metabólico era avaliado monitorizando a glucose consumida e o lactato extrusado no líquido perfundido, através de ensaios quantitativos que utilizam o mesmo tipo de química enzimática (envolvida com a produção de NADH). Os resultados dos ensaios demostraram que as células TABX2S, comparativamente com células TABX1A, consumiam glucose e extrusavam lactato a velocidades superiores. Estes ensaios foram também efectuados na presença de azida. Os resultados dos consumo de glucose e a extrusão do lactato nos dois tipos de linhas celulares eram superiores na

presença deste composto, pois o metabolismo da glucose era deslocado para a via anaeróbia.

Tabela 10 – Sistemas de Análise por Injecção Sequencial para ensaios funcionais

Analito	Matriz	Detecção	Resposta analítica	Duração ensaio	Ref.
Cálcio intracelular	Células CHO M1 exposta a acetilcolina, pilocarpina, atropina	Medida fluorescência fura-2	NA	500 s	[60]
Glucose	Células TABX2S em metabolismo basal e na presença de azida	S (340 nm)	0,1 – 5,6 mmol / l	2 min.	[64]
Glucose Lactato	Células TABX2S e TABX1A em metabolismo basal e na presença de azida	S (340 nm)	0,1 – 5,6 mmol / l 0,05 – 1,00 mmol / l	10 s 30 s	[63]
Oxigénio	Células CHO M1 exposta a amobarbital	Medida fosforescência complexo Pt-porfirina	NA	3 min.	[58]
pH intracelular Extrusão acídica	Células CHO M1 exposta a carbacol	Medida fluorescência BCECF-AM	NA	700 s	[57]

S – espectrofotometria; NA não aplicável

4.3 Referências bibliográficas

[1] Dicionário da Língua Portuguesa Contemporânea, Academia das Ciências de Lisboa e Editorial Verbo, Braga, 2001.

[2] M. Valcárcel, M. D. Luque de Castro, Automatic Methods of Analysis, Elsevier, Amsterdam.

[3] J.Ruzicka, E. H. Hansen, Anal. Chim. Acta, 78, 145, 1975.

[4] J. Ruzicka, E. H. Hansen, Flow Injection Analysis, 2 nd Edition, John Wiley & Sons, New York, 1988.

[5] M. Valcárcel, M. D. Luque de Castro, Flow Analysis. Principles and Applications, Ellis Horwood, Chichester, 1987.

[6] B. Karlberg, G. W. Pacey, Flow Injection Analysis. A Practical Guide, Elsevier, Amsterdam, 1989.

[7] Z. Fang, Flow Injection Separation and Preconcentration, Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1992.

[8] F. Lázaro, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Anal. Chim. Acta, 165, 177, 1984.

[9] F. Lázaro, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Anal. Chem., 59, 950, 1987.

[10] J. Ruzicka, Analyst, 119, 1925, 1994.

[11] J. Ruzicka, W. Lindberg, Anal. Chem., 64, 537A, 1992.

[12] FIAlab Instruments Leaders in Flow Injection Technology, Formerly Alitea Instruments USA, www.flowinjection.com/.

[13] A. Newman, Anal. Chem., 68, 203A, 1996.

[14] J. Ruzicka, G. D. Marshall, Anal. Chim. Acta, 237, 329, 1990.

[15] J. Ruzicka, E. H. Hansen, Anal. Chem., 72, 212A, 2000.

[16] J. F. Van Staden, R. I. Stefan, Anal. Bioanal. Chem., 374, 3, 2002.

[17] S. C. Chung, G. D. Christian, J. Ruzicka, Process Control Quality, 3, 115, 1992.

[18] P. J. Baxter, G. D. Christian, J. Ruzicka, Chem. Anal., 40, 455, 1995.

[19] J. F. Van Staden, R. E. Taljaard, Fresenius J. Anal. Chem., 357, 577, 1997.

[20] A. Baron, M. Guzmán, J. Ruzicka, G. D. Christian, Analyst, 117, 1839, 1992

[21] F. V. Silva, A. R. A. Nogueira, G. B. Souza, G. M. Cruz, Anal. Sci., 16, 361, 2000.

[22] K. L. Peterson, B. K. Logan, G. D. Christian, J. Ruzicka, Anal. Chim. Acta, 337, 99, 1997.

[23] J. F. Van Staden, H. Plessis, R. E. Taljaard, Anal Chim. Acta, 357, 141, 1997.

[24] C. C. Oliveira, E. A. Zagatto, A. N. Araújo, J. L. F. C. Lima, Anal Chim. Acta, 371, 57, 1998.

[25] M. Guzman, B. J. Compton, Talanta, 40, 1943, 1993.

[26] J. Ruzicka, Anal. Sci, 7, 635, 1991.

[27] J. Ruzicka, Anal. Chim. Acta, 261, 3, 1992.

[28] G. D. Christian, J. Pharm. Biomed. Anal., 10, 769, 1992.

[29] G. D. Christian, J. Ruzicka, Anal. Chim. Acta, 261, 11, 1992.

[30] C. H. Pollema, J. Ruzicka, A. Lernmark, G. D. Christian, Microchem. J., 45, 121, 1992.

[31] M. Silva, Analyst, 118, 681, 1993.

[32] G. D. Christian, Analyst, 119, 2309, 1994.

[33] G. D. Christian, Anal. Chem., 67, 532A, 1995

[34] J. Ruzicka, Anal. Chim. Acta, 308, 14, 1995.

[35] O. Thomas, F. Theraulaz, V. Cerdà, D. Constant, P. Quevauviller, Trends Anal. Chem., 16, 419, 1997.

[36] J. Ruzicka, E. H. Hansen, Trends Anal. Chem., 17, 69, 1998.

[37] J. W. Grate, O. B. Egorov, Anal. Chem., 70, 779A, 1998.

[38] L. Olsson, U. Schulz, J. Nielsen, Trends Anal. Chem., 17, 88, 1998.

[39] R. E. Taljaard, J. F. Van Staden, Lab. Robot. Autom., 10, 325, 1998.

[40] J. F. Van Staden, Trends Anal. Chem., 1, 89, 1998.

[41] V. Cerdà, J. M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, P. Stijar, Talanta, 50, 695, 1999.

[42] J. Ruzicka, L. Scampavia, Anal. Chem., 71, 257A, 1999.

[43] Z. L. Fang, Anal. Chim. Acta, 400, 233, 1999.

[44] Z. L. Fang, Q. Fang, X. Z. Liu, H. W. Chen, C. L. Liu, Trends Anal. Chem., 18, 261, 1999.

[45] N. W. Barnett, C. E. Lenehan, S. W. Lewis, Trends Anal. Chem., 18, 346, 1999.

[46] F. R. P. Rocha, J. A. Nóbrega, O. F. Filho, Green Chem., 3, 216, 2001.

[47] C. E. Lenehan, N. W. Barnett, S. W. Lewis, Analyst, 127, 997, 2002.

[48] GLOBALFIA, Supplier of FIA/SIA instruments and components, www.globalfia.com.

[49] N. Kullberg, M. Vilén, P. Sund, M. Talaslahti, R. Sara, Talanta, 49, 961, 1999.

[50] J. Ruzicka, C. Pollema, K. Scudder, Anal. Chem., 65, 3566, 1993.

[51] O. Egorov, J. Ruzicka, Analyst, 120, 1959, 1995.

[52] D. A. Holman, G. D. Christian, J. Ruzicka, Anal. Chem., 69, 1763. 1997.

[53] J. Ruzicka, A. Ivaska, Anal. Chem., 69, 5024, 1997.

[54] J. Ruzicka, Analyst, 123, 1617, 1998.

[55] I. Lahdesmaki, J. Ruzicka, A. Ivaska, Analyst, 125, 1889, 2000.

[56] L. D. Scampavia, P. S. Hodder, I. Lahdesmaki, J. Ruzicka, Trends in Biotech., 17, 443, 1999.

[57] I. Lahdesmaki, C. Beeson, G. D. Christian, J. Ruzicka, Talanta, 51, 497, 2000.

[58] I. Lahdesmaki, L. Scampavia, C. Beeson, J. Ruzicka, Anal. Chem., 71, 5248, 1999.

[59] J. Ruzicka, P. J. Baxter, O. Thastrup, K. Scudder, Analyst, 121, 945, 1996.

[60] P. S. Hodder, J. Ruzicka, Anal. Chem., 71, 1160, 1999.

[61] J. Ruzicka, Analyst, 125, 1053, 2000.

[62] A. D. Carroll, L. Scampavia, J. Ruzicka, Analyst, 127, 1228, 2002.

[63] C. M. Schulz, L. Scampavia, J. Ruzicka, Analyst, 127, 1583, 2002.

[64] C. M. Schulz, J. Ruzicka, Analyst, 127, 1293, 2002.

[65] C. H. Wu, L. Scampavia, J. Ruzicka, B. Zamost, Analyst, 126, 291, 2001.

[66] C. H. Wu, L. Scampavia, J. Ruzicka, Analyst, 126, 1947, 2002.

[67] C. H. Wu, L. Scampavia, J. Ruzicka, Analyst, 127, 898, 2002.

[68] M. A. Segundo, A. O. S. S. Rangel, J. Flow Injection Anal., 19, 3, 2002

[69] R. Karlicek, P. Solich, M. Polasek, J. Flow Injection Anal., 11,45, 1994.

[70] J. M. Calatayud, S. S. Vives, F. S. Roches, Quim. Anal., 9, 1, 1990.

[71] J. M. Calatayud, J. V. G. Mateo, Pharm. Technol. Internat., 4, 17, 1992.

[72] J. M. Calatayud, J. V. G. Mateo, Pharm. Technol. Internat., 4, 30, 1992.

[73] M. I. Evgen´ev, S. Y. Garmonov, L. S. Shakirova, J. Anal. Chem., 56, 312, 2001.

[74] P. Fletcher, K. N. Andrew, A. C. Calokerinos, S. Forbes, P. J. Worsfold, Luminescenece-Chichester, 16, 1, 2001.

[75] J. M. Calatayud, Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals. Automation in the Laboratory, Taylor & Francis, London, 1996.

[76] X. Z. Liu, Z. L. Fang, Lab. Robot. Autom., 12, 60, 2000.

[77] S. M. Sultan, F. E. O. Suliman, B. B. Saad, Analyst, 120, 561, 1995.

[78] S. M. Sultan, F. E. O. Suliman, Analyst, 121, 617, 1996.

[79] S. M. Sultan, Y. A. M. Hassan, K. E. E. Ibrahim, Talanta, 50, 841, 1999.

[80] F. E. O. Suliman, S. M. Sultan, Talanta, 43, 559, 1996.

[81] S. M. Sultan, N. I. Desai, Analyst, 122, 911, 1997.

[82] F. E. O. Suliman, S. M. Sultan, Microchem. J., 57, 320, 1997.

[83] S. M. Sultan, N. I. Desai, Talanta, 45, 1061, 1998.

[84] S. M. Sultan, Y. A. M. Hassan, K. E. E. Ibrahim, Analyst, 124, 917, 1999.

[85] N. Lenghor, J. Jakmunee, M. Vilen, R. Sara, G. D. Christian, K. Grudpan, Talanta, 58, 1139, 2002.

[86] D. T. Newcombe, T. J. Cardwell, R. W. Cattrall, S. D. Kolev, Lab. Robot. Autom., 12, 200, 2000.

[87] A. Chisvert, A. Salvador, M. C. P. Martí, J. G. March, Fresenius J. Anal. Chem., 369, 684, 2001.

[88] A. Salvador, S. Chisvert, A. Camarasa, M. C. P. Martí, J. G. March, Analyst, 126, 1462, 2001.

[89] A. Chisvert, M. T. Vidal, A. Salvador, Anal. Chim. Acta, 464, 295, 2002.

[90] A. Chisvert, J. V. Izquierdo, A. Salvador, Anal. Bioanal. Chem., 374, 963, 2002.

[91] J. F. Van Staden, M. M. Tsanwani, Talanta, 58, 1095, 2002.

[92] J. F. Van Staden, M. M. Tsanwani, Talanta, 58, 1103, 2002.

[93] A. Pasamontes, M. P. Callao, Anal. Chim. Acta, 485, 195, 2003.

[94] J. A. Erustes, R. Forteza, V. Cerdà, J. AOAC Internat., 84, 337, 2001.

[95] J. F. Van Staden, R. E. Taljaard, Anal. Chim. Acta, 323, 75, 1996.

[96] J. F. Van Staden, M. Tsanwani, Fresenius J. Anal. Chem., 371, 376, 2001.

[97] J. F. Van Staden, Anal. Chim. Acta, 357, 141, 1997.

[98] J. F. Van Staden, E. B. Naidoo, S. Afr. J. Chem., 53, 3, 2000.

[99] P. C. C. Oliveira, J. C. Masini, Anal. Lett., 34, 389, 2001.

[100] L. V. Mulaudzi, J. F. Van Staden, R. I. Stefan, Anal. Chim. Acta, 467, 35, 2002.

[101] L. X. Tang, F. J. Rowell, Anal. Lett., 31, 891, 1998.

[102] H. Paseková, M. Polásek, Talanta, 52, 67, 2000.

[103] H. Paseková, M. Polásek, J. F. Cigarro, J. Dolejsová, Anal. Chim. Acta, 438, 165, 2001.

[104] M. Polásek, M. Jambor, Talanta, 58, 1253, 2002.

[105] W. W. Kubiak, R. M. Latonen, A. Ivaska, Talanta, 53, 1211, 2001.

[106] J. F. Van Staden, R. I. Stefan, S. Birghila, Talanta, 52, 3, 2000.

[107] R. N. Fernandes, M. G. F. Sales, B. F. Reis, E. A. Zagatto, A. N. Araújo, M. C. B. S. M. Montenegro, J. Pharm. Biomed. Anal., 25, 713, 2001.

[108] R. I. Stefan, J. Van Staden, H. Y. A. Enein, Combinatorial Chem. & High Troughput Screening, 3, 445, 2000.

[109] R. I. Stefan, J. Van Staden, H. Y. A. Enein, Anal. Chim. Acta, 411, 51, 2000.

[110] R. I. Stefan, J. Van Staden, H. Y. A. Enein, Biosens. & Bioelectron., 15, 1, 2000.

[111] R. I. Stefan, J. Van Staden, H. Y. A. Enein, Talanta, 51, 969, 2000.

[112] R. I. Stefan, J. Van Staden, L. V. Mulaudzi, H. Y. A. Enein, Anal. Chim. Acta, 467, 189, 2002.

[113] P. MacLaurin, K. J. Parker, A. Townshend, P. J. Worsfold, N. W. Barnett, M. Crane, Anal. Chim. Acta, 238, 171, 1990.

[114] P. MacLaurin, P. J. Worsfold, A. Townshend, N. W. Barnett, M. Crane, Analyst, 116, 701, 1991.

[115] P. J. Baxter, G. D. Christian, Acc. Chem. Res., 29, 515, 1996.

[116] R. W. Min, J. Nielsen, J. Villadsen, Anal. Chim. Acta, 312, 149, 1995.

[117] R. W. Min, J. Nielsen, J. Villadsen, Anal. Chim. Acta, 320, 199, 1996.

[118] N. W. Barnett, S. W. Lewis, D. J. Tucker, Fresenius J. Anal. Chem., 355, 591, 1996.

[119] N. W. Barnett, C. E. Lenehan, S. W. Lewis, D. J. Tucker, K. M. Essery, Analyst, 123, 601, 1999.

[120] X. Z. Liu, Z. L. Fang, Anal. Chim. Acta, 358, 103, 1998.

[121] X. Z. Liu, S. S. Liu, J. F. Wu, Z. L. Fang, Anal Chim. Acta, 392, 273, 1999.

[122] H. Pasékova, M. G. Sales, M. C. Montenegro, A. N. Araújo, M. Polásek, J. Pharm. Biomed. Anal., 24, 1027, 2001.

[123] Z. Legnerová, H. Sklenárová, P. Solich, Talanta, 58, 1151, 2002.

[124] I. Lahdesmaki, J. Ruzicka, Fresenius J. Anal. Chem., 362, 67, 1998.

5. ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS GERAIS DO TRABALHO

As imposições económicas e de Saúde Pública colocadas ao controlo químico de medicamentos resultaram no desenvolvimento de metodologias analíticas cada vez mais sensíveis, selectivas e confiáveis. As vantagens da automatização dos procedimentos analíticos estão bem patentes principalmente na redução dos erros de análise, na diminuição do consumo de reagentes e geração de desperdícios, nos elevados ritmos de determinação e ainda na obtenção de informação analítica em tempo real. Contudo, mesmo nos sistemas automatizados, é necessário tomar medidas eficazes para garantir a qualidade dos resultados. A exactidão é um dos parâmetros periodicamente utilizado para avaliar a qualidade dos resultados fornecidos e as estratégias mais frequentemente usadas pela indústria farmacêutica são: a comparação dos resultados com um método de referência, análise de um material de concentração conhecida ou através de ensaios de recuperação.

A proposta apresentada para a aferição da exactidão dos resultados decorrentes da análise de uma formulação farmacêutica não se baseia em nenhuma destas estratégias. Propõem-se o recurso simultâneo a duas metodologias, independentes e baseadas em princípios de operação diferentes, para a determinação do mesmo parâmetro químico num sistema automatizado, proporcionando, desta forma, uma análise comparativa dos resultados fornecidos em tempo real. Antes da aplicação desta estratégia em rotina, o par de metodologias independentes era testado contra um método de referência bem estabelecido, garantindo-se assim a qualidade dos resultados. Em rotina laboratorial, o analito era determinado por duas metodologias e se os resultados fossem concordantes, concluía-se que havia uma forte evidência que o inviesamento dos resultados estava ausente, e que os resultados tinham o grau de confiança requerido. Nesta situação, a média dos resultados obtida pelos dois procedimentos era intrinsecamente mais exacta porque os erros aleatórios eram minimizados e a natureza dos erros sistemáticos era diferente, já que se utilizavam dois métodos analíticos baseados em princípios de operação distintos. A aplicabilidade deste conceito poderia ainda constituir uma solução simples e de baixo custo para o controlo de qualidade interno, pois a obtenção de duas medidas do mesmo analito possibilitava a monitorização, de forma contínua e em tempo real, das operações e dos resultados analíticos, concedendo a oportunidade ao analista de decidir se seriam suficientemente confiáveis. Nas situações em que surgissem resultados discordantes, e por isso não confiáveis, indicavam uma falha no desempenho do sistema analítico, ou revelavam a presença, em determinadas amostras, de espécies interferentes que condicionavam o sinal analítico em pelo menos uma das metodologias, ou podiam ainda

reflectir uma alteração química do analito monitorizado. Este conceito pode também colocar em evidência erros grosseiros ou fortuitos, que por vezes são difíceis de detectar, como por exemplo: erro ao executar um dos procedimentos, troca de resultados de duas amostras, erros de transcrição de um resultado, uma bolha de ar numa célula de fluxo de um dos detectores, um detector com problemas, etc, permitindo ao analista ter mais controlo sobre as condições de ensaio.

Esta proposta para a aferição da exactidão foi pela primeira vez apresentada na literatura por Oliveira *et al.* num sistema de análise em fluxo baseado no conceito de multicomutação, para a determinação de cloretos em águas de rio [1]. Mais tarde, Zagatto *et al.* propuseram um sistema de análise em fluxo, bastante mais simples, para exploração do conceito de aferição da exactidão [2]. O sistema era baseado no conceito SIA e foi utilizado para a determinação de alumínio em extractos de solo.

Para a demonstração deste conceito na análise de rotina de princípios activos em formulações farmacêuticas, com relevância terapêutica, foram desenvolvidas montagens SIA acopladas com dois sistemas de detecção diferentes. Para que as montagens não resultassem complexas, nem aumentassem o custo de determinação, procurou-se utilizar técnicas de determinação que fossem simples, económicas e adaptadas facilmente, de uma forma robusta, aos sistemas de fluxo, destacando-se, em particular, o desenvolvimento de novos sensores potenciométricos e ópticos. Assim, foi objectivo associar o conceito de exactidão aferida com a versatilidade, robustez, economia de reagentes, baixo custo e simplicidade dos sistemas de análise por injecção sequencial. Esta estratégia tinha como finalidade resolver os problemas de qualidade dos resultados analíticos, que frequentemente se colocam na análise de produtos farmacêuticos em rotina.

5.1 Referências bibliográficas

[125] C. C. Oliveira, R. P. Sartini, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, Anal. Chim. Acta, 350, 31, 1997.

[126] E. A. G. Zagatto, S. Vicente, C. C. Oliveira, R. P. Sartini, J. L. F. C. Lima, J. Flow Injection Anal., 15, 226, 1998.

CAPÍTULO II- DETERMINAÇÃO DE CAPTOPRIL

SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS OF CAPTOPRIL BASED ON COLORIMETRIC AND POTENTIOMETRIC DETECTION

ANALYTICA CHIMICA ACTA: 438 (2001), 31 - 38

ELSEVIER

Analytica Chimica Acta 438 (2001) 31–38

ANALYTICA CHIMICA ACTA

www.elsevier.com/locate/aca

Sequential injection analysis of captopril based on colorimetric and potentiometric detection

Adriana M. Pimenta, Alberto N. Araújo, Maria Conceição B.S.M. Montenegro*

CEQUP/Departamento de Química-Física, Faculdade de Farmácia U.P., Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050 Porto, Portugal

Received 11 July 2000; received in revised form 30 October 2000; accepted 1 November 2000

Abstract

The development of an analytical procedure based on the sequential injection analysis (SIA) concept for the analytical control of captopril in pharmaceutical formulations is described. The robustness of the proposed system is established by accuracy assessment that consists in yielding a versatile manifold for the carryout of two quasi-independent analytical determinations. One of the captopril determination procedures is based on the colorimetric measurement of the captopril–palladium complex in acid media at the 400 nm. No interference from other compounds usually contained in the samples was found, even when its concentration was 25 times higher than that of the analyte. The other procedure involves the potentiometric titration of captopril with a 10^{-3} mol/l Ag(I) solution used as titrant and the application of the Gran's method for ascertaining the equivalence point. Accuracy of the proposed approach was attained by developing an in-line calibration procedure for the assessment of the electrode slope and performing titration in four different titrant/analyte mixtures. Precision of the developed procedures was better than 1.3%, being similar to that of the reference chromatographic method. The results attained were statistically similar to those given by the reference method and, thus, the accuracy assessment concept may be used for the determination of failures of the analytical procedure when performing large-scale analysis. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: SIA; Accuracy assessment; Captopril; Colorimetric determination; Gran's potentiometric titration

1. Introduction

It is well-known that quality control carried out by pharmaceutical industry promotes better therapeutic uniformity of pharmaceutical formulations. Efficacy of the control procedure depends upon suitable combination of information processing, chemometric data interpretation and use of robust analytical techniques in chemical assays. The latter usually imposes the selection of chromatographic procedures or hyphenated techniques owing to quality evaluation of the results obtained, being more distinctive and accurate [1]. Alternative automatic procedures based on continuous flow techniques have been widely proposed, since they enable fast and precise results in addition to the cheaper maintenance and handling of the analytical set-ups [2]. However, the general purpose procedures allow only the determination of a single parameter per run and hence their application to routine analysis requires a periodic evaluation of stability of the operating features or results accuracy. Oliveira et al. [3] exploited the high sampling rate that characterises the continuous flow techniques for the

* Corresponding author. Tel.: +351-22087132; fax: +351-22003977.
E-mail address: mcbranco@mail.ff.up.pt (M.C.B.S.M. Montenegro).

0003-2670/01/$ – see front matter © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.
PII: S0003-2670(00)01307-6

accommodation of two quasi-independent analytical methods in a single system, aiming the determination of a chemical parameter. Therefore, the assessment of the results accuracy was continuous and performed in real time, thus proving useful for the detection of biased results either because of interference with one or both procedures used or momentary and systematic operational failures of the system under continuous operation. The joint use of the accuracy assessment concept proposed as referred before and the application versatility of the systems based on sequential injection analysis (SIA) [4] may represent an extremely robust and fairly economical alternative procedure in the control of the pharmaceutical formulations.

Captopril, 1-[(2s)-3-mercapto-2-methylpropionil]-L-proline, is a specific inhibitor of the angiotensine converting enzyme which is widely used in the treatment of hypertension [5]. It can be administrated separately or combined with diuretic thiazides, such as hidrochlorothiazide, or with digoxin in patients with moderate cardiac failure [6]. Several methods for the quantitative determination of captopril including colorimetric, potentiometric and condutimetric titrations [7,8], amperometry [9], stripping voltammetry [10], spectrophotometry [11–13], chemiluminescence [14], fluorimetry [15–17], gas chromatography [18], gas chromatography coupled to mass spectrometry [19,20] and high performance liquid chromatography [21,22] were proposed. Amongst these methods, the chromatography based procedures are usually selected in the extended routine use since they ensure a better constancy of the results at moderate costs. The alternative proposal of a sequential injection analysis procedure comprising colorimetric and potentiometric, in order to accomplish accuracy assessment concept is described in this work for the determination of captopril in pharmaceutical formulations. The selection of these techniques was ascribed to the fact that they are easily and widely used in laboratory analysis in addition to being economical in terms of their implementation and maintenance. The sequential injection analysis of captopril with colorimetric detection is based on complex formation with palladium in acid media [23]. Furthermore, a potentiometric titration procedure based on the use of a $Ag(I)/Ag_2S$ ion selective electrode and the precipitation reaction of the analyte with Ag(I) was developed being the equivalence point determined by Gran's method.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All solutions were prepared with deionised water (conductivity <0.1 μS) and analytical grade reagents.

A stock solution containing 1.00×10^{-2} mol/l captopril (Sigma, ref. C-4042) was daily prepared by dissolving 0.2173 g in 100 ml of water. Calibrating solutions presenting captopril concentrations ranging from 2.00×10^{-4} to 1.40×10^{-3} mol/l were prepared from the stock solution by careful dilution with water. Solutions containing 5.75×10^{-4} mol/l in captopril and, respectively hydrochlorothiazide, lactose, fructose, glucose, saccharose, starch, phthalate or carboxymethylcelulose up to the concentration of 1.44×10^{-2} mol/l were prepared for interference assessment.

The colour developing reagent, palladium(II), was prepared by dilution of 5.32 ml of palladium dichloride commercial stock solution (Merck, ref. 1.07289) in 50 ml of a solution containing 0.12 mol/l nitric acid.

The potentiometric procedure determined the use of a 10^{-1} mol/l sodium nitrate prepared in 10^{-3} mol/l nitric acid solution as carrier stream in the analytical set-up.

A 10^{-1} mol/l silver nitrate stock solution for the potentiometric determinations was prepared from Titrisol vials (Merck ref. 1.09990) by careful dilution with water. The least concentrated ones were further diluted with the carrier.

In the trials performed by HPLC, the mobile phase was composed of a filtered and degassed mixture of 550 ml methanol and 450 ml of a 1.6×10^{-2} mol/l phosphoric acid solution. Moreover, a captopril solution presenting a concentration of 1 mg/ml was used in these trials by dissolution in the mobile phase.

Samples from the different pharmaceutical formulations were prepared after fine powdering of 20 tablets, followed by weighing a portion of this powder equivalent to 25 or 50 mg of captopril and dissolving it in 200 or 250 ml of water, respectively, upon stirring for about 10 min. Aiming colorimetric determination, the solutions thereby obtained were filtered before analysis. The reference procedure was carried out according to the methodology described in the US Pharmacopoeia [24], which recommends the ultrasonic dissolution of 25 mg of captopril in 25 ml of the

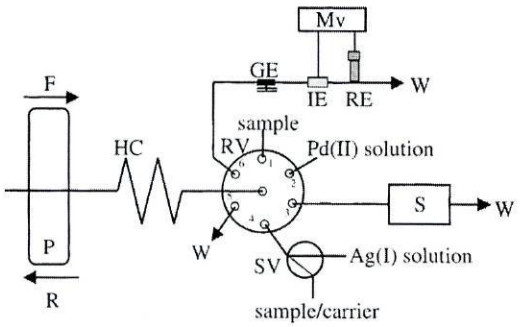


Fig. 1. Schematic representation of the developed SIA system. P = peristaltic pump; RV = multiposition rotatory valve; SV = three way solenoid valve; HC = holding coil; GE = grounding electrode; IE = indicating electrode; RE = reference electrode; Mv = decimilivoltimeter; S = spectrophotometer; W = waste.

mobile phase for 15 min, followed by centrifugation. Only the clear supernatant was used in the assays.

2.2. Apparatus

The developed system (Fig. 1) comprised a 6-port rotary valve (RV) from Valco Instruments, model Cheminert C15-3186E (Houston, USA) and a Gilson Minipuls three peristaltic pump (Villier-le-Bel, France) as propulsion device. The last was equipped with 1.00 mm i.d. PVC propulsion tubing of the same brand. All tubular paths were made of 0.8 mm i.d. PTFE tubing. The holding coil (HC) between the peristaltic pump and the rotary valve was 400 cm long and was coiled over a plastic net. Port 4 of the RV was connected to a NResearch 161 T031 (Stow, USA), three-way solenoid valve by means of a 5 cm tube, whereas port 3 was connected by means of a 100 cm tube to a Pye Unicam SP6-350 spectrophotometer, that was equipped with a Hellma 178712 QS flow cell presenting an optical volume of 18 μl. The potentiometric detection unit was connected to port 6 with a 80 cm tube and comprised a Ag(I)/Ag_2S tubular electrode, constructed according to Ferreira et al. [25] linked to a double-junction reference electrode from Russell, model 90-0029, containing a KNO_3 solution in the outer compartment. A Crison micropH 2002 pHmeter was used for the attainment of the potentiometric signal. The remainder inlets of the RV and SV were fitted with 12 cm PTFE tubing. Every device was started by computer through an Advantech PCL 711B interface card and the home-made software for the control of the system and acquisition of the signal was developed in QuickBasic language.

The analysis of the samples by the method proposed in the USP was carried out in a Merck Hitachi chromatographic system comprising a model 7100 pump, a Rehodyne 7725i injector (loop of 20 μl), and a Lichrocart RP 18 column (250 mm × 4 mm) packed with Lichrosorb 5 μm beads. A diode array system, model 7000, was used as detector and the data were processed by the software of the same brand, model D7000.

2.2.1. Methods

Firstly HC and the conveyance paths between RV and the detection systems were filled with carrier solution by selecting the ports 3 and 6, respectively and positioning the peristaltic pump in the propulsion mode. This configuration was kept until the achievement of a stable baseline. The opening of port 4 and actuation of SV enabled to fill the inlet channel with $AgNO_3$, 1.00×10^{-3} mol/l aiming titration and estimation of the electrode slope. When SV was inactive, the channel of the passive port either was filled with the carrier solution to promote the calibration of the potentiometric detection unit, or with the sample solution to enable the potentiometric titration.

The analytical cycle established for the colorimetric determinations of captopril is given in Table 1 and comprised five steps. The first two steps were performed every time the solution under analysis was replaced and were optimised to prevent the cross contamination between solutions analysed consecutively. Afterwards, 430 μl of sample and 215 μl of reagent were sequentially aspirated into the holding coil and sent to the detector at a 2.7 ml/min flow rate on step 5.

In the potentiometric determinations, the analytical cycle also indicated in Table 1 consisted in a prior calibration of the electrode, aiming the determination of its slope under flow conditions, followed by titration of one or more samples. In order to prevent the risk of contamination during the potentiometric determinations, the solution positioned at the passive port was aspirated to HC and discarded to waste through port 5. The determination of the electrode slope was accomplished in 4 cycles that involved the use of

Table 1
Selected conditions for the determination of captopril in pharmaceutical formulations[a]

MsV	SV state	Volume (μl)	Flow rate (ml/min)	Flow direction	Event
Colorimetric determination					
1	–	130	1.3	R	New sample
5	–	270	2.7	F	
1	–	430	1.3	R	Sample volume
2	–	215	1.3	R	Reagent volume
3	–	2700	2.7	F	Measurement
Electrode calibration					
4	ON	260	1.3	R	Stock Ag(I) solution
4	OFF	260	1.3	R	Carrier
5	–	600	4.1	F	
4	ON (25, 50, 75, 100%)	450	1.3	R	In-line standard preparation
6	–	6750	2.7	F	Measurement
Potentiometric titration					
4	OFF	260	1.3	R	New sample
5	–	410	4.1	F	
4	ON (60, 70, 80, 90%)	450	1.3	R	Titrant addition
6	–	6750	2.7	F	Measurement

[a] R = reverse; F = forword; RV = rotatory valve; SV = solenoid valve.

RV ports 4 and 6. In each of these cycles, solutions containing 2.50×10^{-4}, 5.00×10^{-4}, 7.50×10^{-4} and 1.00×10^{-3} mol/l of captopril were prepared inside the system by means of on/off cycles of SV. To accomplish this task, small aliquots of the silver solution were aspirated to HC by actuating SV (SV on) and intercalated with aliquots of the carrier solution (SV off). The mutual dispersion between the aliquots of both solutions throughout aspiration to HC and sending of both to the detector allowed to simulate the intercalation of solutions with the concentrations, as referred before. To attain the four concentration levels, SV was actuated for 25, 50, 75 and 100% of the time determined for each on/off cycle of SV (about 2 s). The selection of a flow rate of 1.3 ml/min enable the aspiration of 425 μl of solution (corresponding to 12 on/off cycles), being this plug sent to the detection system with a flow rate equal to 2.7 ml/min. The titration cycle was carried out by selecting port 4 and filling SV passive port channel with the sample solution. Then titrant aliquots intercalated with sample aliquots were inserted into HC as it happened in the calibration procedure. Titration was accomplished by actuating SV at each of the four consecutive modes of ports 4 and 6 for 60, 70, 80 and 90% of each on/off cycle series of SV, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Spectrophotometric determination of captopril

This colorimetric determination was implemented using the complex forming reaction with palladium dichloride in acid media owing to the affinity of this metal for its linking to sulphidril groups [23]. The resulting captopril–palladium complex, at a molar ratio 2:1, presents a yellow colour and may be determined spectrophotometrically at 400 nm. The system was optimised by the univariant method including the sample and reagent aspiration volumes and the reagent and acid concentration in the carrier. It was found that with sample volumes varying from 100 to 550 μl, there was a significant increase in the intensity of the transient signal until a volume of 350 μl was reached (Fig. 2). This behaviour derives from the increase of the available analyte volume and its reduced dispersion in the carrier throughout the aspiration step. After the sample volume was set to about 430 μl and its concentration to 6.00×10^{-4} mol/l, the effect of the reagent volume on the analytical signal was assessed. As shown in Fig. 2, the highest analytical signal was obtained with a volume around 220 μl. The absorbance increased

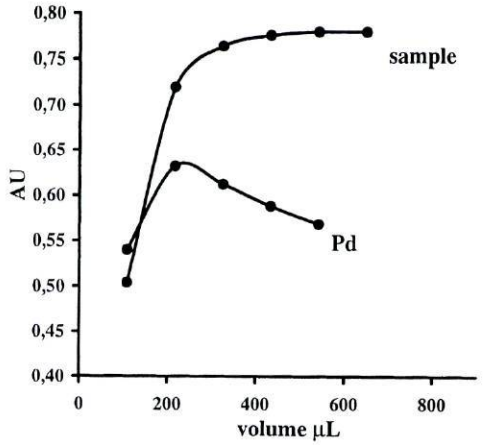


Fig. 2. Effects of sample and reagent volumes on the absorbance signal. A 6×10^{-4} mol/l in captopril solution and a 8×10^{-4} mol/l Pd(II) in 0.12 mol/l nitric acid solution were used, respectively as sample and colour developing reagent.

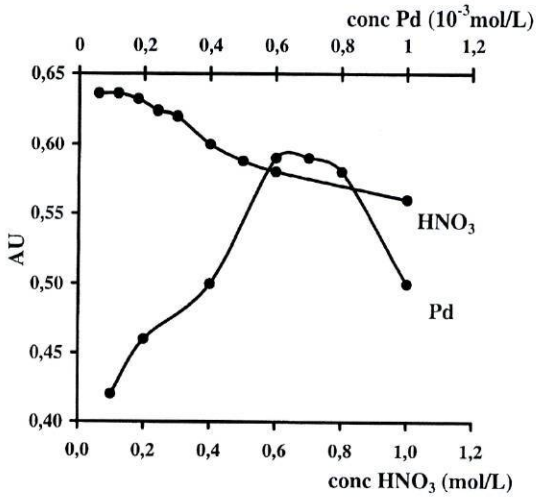


Fig. 3. Effects of palladium(II) concentration and nitric acid concentration in colour developin reagent. A 6×10^{-4} mol/l in captopril solution was used as sample, being the sample and reagent volumes kept in 430 and 200 µl, respectively.

proportionally with the reagent volume which could be explained either by the increasing dispersion of the reagent in the sample during the time interval of the aspiration step and by the amount of available palladium. Selecting higher reagent volumes proved that the increase in dispersion of the colour product overlapped the effect described before, thus resulting in a decrease of the analytical signal intensity. The effect of palladium concentration was also studied in the range between 1.00×10^{-4} and 1.00×10^{-3} mol/l (Fig. 3). It was found that within the 6.00 to 8.00×10^{-4} mol/l concentration range, the intensity of the analytical signal was maximum. Furthermore, the influence of nitric acid concentration on the reaction extension was also assessed by addition of this to the reagent up to a concentration of 1 mol/l (Fig. 3). This study proved the usefulness of the acid, though concentrations higher than 0.15 mol/l produced analytical signal decrease. The results obtained thereby allowed to establish the operating conditions of the proposed system aiming the analysis of captopril in pharmaceutical formulations. Thus, sample and reagent volumes of 430 and 220 µl, respectively, palladium(II) concentrations of 8.00×10^{-4} mol/l and acid concentrations of 0.12 mol/l were selected. These conditions enabled the attainment of a linear relationship between absorbance and captopril concentration expressed in the equation Abs (AU) $= 0.10 \pm 0.05 + 1120 \pm 40$ [captopril] (mol/l) that was valid in the concentration range from 2.00×10^{-4} to 1.40×10^{-3} mol/l ($r = 0.997$, $n = 8$). The sensitivity of the procedure to other compounds present in the pharmaceutical formulations was assessed by testing solutions of 5.75×10^{-4} mol/l captopril containing increasing concentrations of hydrochlorothiazide, lactose, fructose, glucose, saccharose, starch, phthalate and carboxymethylcelulose. No change on the analytical signal intensity occurred even when the concentration of these species was 25 times higher than that of the analyte.

3.2. *Potentiometric determination of captopril*

The thiol group present in the captopril molecule promotes the quantitative reaction with Ag(I) cation in acid media, resulting in the formation of a precipitate under stoichiometric conditions [7]. This aspect enables the determination of captopril by potentiometry using a crystalline membrane Ag(I)/Ag_2S electrode. The titration equivalence point was ascertained by the use of Gran's method [26], being the readings taken with an excess of titrant in order to avoid the non-linear response of the electrode. Accuracy of the

results obtained thereby also required both the occurrence of a considerable potential variation over the determination process and the knowledge of the actual slope of the detection unit used. In order to ensure the former requirement, the titrant concentration should be of the same order of magnitude as that expected for the analyte. Since, linearity of the colorimetric determination was found until a concentration of 1.40×10^{-3} mol/l, the titrant concentration was set to a close level, namely 10^{-3} mol/l. The accuracy of the results is further limited by the slope of the detection unit used. Hence, the attainment of the actual slope value requires the calibration of the electrode under the same conditions as those used in the titration procedure. Therefore, the SV passive channel was filled with the carrier solution and the active channel with the cation solution. To implement the calibration procedure, the control software of the system was changed so that when the sequence of ports 4 and 6 were tracked, this would be repeated four-fold automatically. On every sequence and after selection of port 4, the solenoid valve was actuated running consecutive 2 s on/off cycles. At the end of each detection step (selection of port 6) the time spent on the SV on increased 25%. Therefore, the ratios of Ag(I) solution/carrier achieved were 25/75, 50/50, 75/25 and 100/0, that were used to simulate silver calibrating solutions with concentrations of 2.50×10^{-4}, 5.00×10^{-4}, 7.50×10^{-4} and 1.00×10^{-3} mol/l, respectively. In order to ensure the detection under the suitable conditions of the silver solution, dispersion in the carrier, the number of cycles required as well as the aspiration flow rate of both solutions was evaluated. It was found (Fig. 4) that the increase in the number of cycles produced a decrease in the estimated slope value from 80 mV per decade (4 on/off cycles) to a value near the theoretical 59 mV (10 on/off cycles), beyond which no significant variation occurred. This can be explained by the increase of dispersion of the carrier in the Ag(I) solution when longer aspiration intervals were used. This effect was independent of the aspiration flow rate within the 1.3–3.1 ml/min range. After setting the flow rate to 1.3 ml/min and the selection time of RV port, 4–25 s (corresponding to 12 on/off SV cycles), a slope of 58.1 ± 0.2 mV per decade was attained.

The implementation of the titration procedure was similar to that of the electrode calibration procedure. The addition of the titrant to the analyte was accomplished automatically by aspirating small aliquots of both solutions alternatively in consecutive cycles of SV actuation. Considering, that in the determination of the equivalent point by Gran's method, the potential variation over the titration procedure affects the sensitivity, SV actuation cycles ensuring titrant/analyte ratios varying 10%, namely 60/40, 70/30, 80/20 and 90/10, on selection of RV port 4 were used. The time required for the titration procedure was 11 min. In Table 2, the features of merits of both procedures are presented.

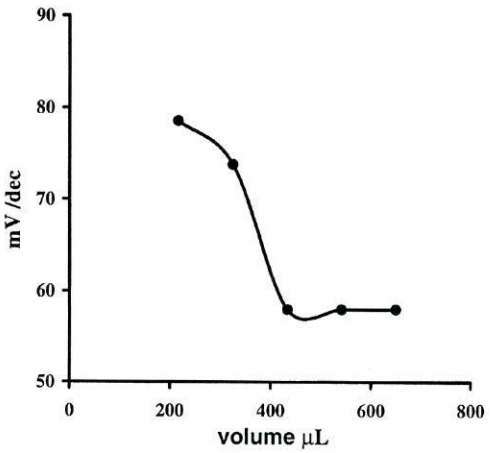


Fig. 4. Slope of electrode has function of the number of on/off cycles applied to SV during aspiration through the selection of the fourth port of RV. The flow rates were fixed at 1.3 ml/min during the aspiration step and in 2.7 ml/min during the propulsion towards the potentiometric detector located at port 6 of RV.

3.3. Analysis of pharmaceutical formulations

The developed SIA system was applied to the determination of captopril in the different pharmaceutical

Table 2
Features of merits of the developed procedures

	Potentiometry	Spectrophotometry
Sample filtration	Not required	Required
Sampling throughput	Low	High
Reagent and sample consumption	High	Low
Standard solution preparation	On-line	Off-line

Table 3
Obtained results of captopril pharmaceuticals formulations (mg captopril per tablet)

Samples	Reference method[a]	Developed potentiometric method[a]	R.D. (%)[b]	Developed colorimetric method[a]	R.D. (%)[b]
Carencil25	26.08 ± 0.23	26.83 ± 0.12	2.88	26.01 ± 0.20	−0.27
Capoten25	24.46 ± 0.31	25.22 ± 0.04	3.11	25.41 ± 0.01	3.88
Convertal25	24.48 ± 0.18	24.88 ± 0.27	1.63	24.87 ± 0.12	1.59
Capoten50	50.22 ± 0.19	49.72 ± 0.61	−1.00	50.90 ± 0.47	1.35
Convertal50	50.48 ± 0.16	50.78 ± 0.24	0.59	51.40 ± 0.49	1.82
Lopiretic	50.06 ± 0.29	50.59 ± 0.14	1.06	51.27 ± 0.13	2.42

[a] Average of three determinations ± standard deviation.
[b] Relative deviation to the reference method.

preparations commercially available, which were both determined by colorimetry and potentiometry. The slope of the potentiometric device was assessed at the beginning of a set of trials by means of a software subroutine, which enabled the slope estimation after regression of the potential in the concentration logarithm by use of the method of minimum squares of deviations. The evaluation of the same formulations was simultaneously carried out according to the method recommended by the USP Pharmacopoeia for the assessment of accuracy of the results given by the developed procedure. The results attained (Table 3) showed a precision better than 1.3% in all cases that conformed to the reference procedure. Moreover, no statistically significant deviations were found for the results provided by both proposed procedures, by performing a bilateral paired t-test at 95% confidence level ($t = 0.107$ for potentiometric/reference procedures; $t = 0.015$ for colorimetric/reference procedures). After analysis of the relative errors provided by the analysis of each sample, one can conclude that the average result of both procedures can be more accurate, since random errors are minimised. All this considered, the arise of inconsistent results indicates a failure of one of the procedures and hence the need to review the system implemented.

4. Conclusions

By using two distinct detection processes, it was possible to establish a simple, economic, fast and low reagents consumption sequential injection based analytical system.

The developed system enable the simultaneous determination of captopril by means of two independent analytical methodologies, with minor sample pretreatment even when the samples showed a high matrix complexity. Moreover, the sample analytical information was obtained on real time.

Acknowledgements

Praxis/P/QUI/10109/1998 project supported this work. One of us (A.M.P.) is grateful to the Praxis Program for a PhD grant (Praxis/BD/19739/99).

References

[1] A.C. Mehata, Analyst 122 (1997) 83R.
[2] J.M. Calatayud, Flow Analysis of Pharmaceuticals: Automation in the Laboratory, Taylor and Francis Ltd., London, 1996.
[3] C.C. Oliveira, R.P. Sartini, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, Anal. Chim. Acta 350 (1997) 31.
[4] E.D. Christian, Analyst 119 (1994) 2309.
[5] R.C. Heel, R.N. Brogdon, T.M. Speight, G.S. Averey, Drugs 20 (1980) 409.
[6] The Captopril-Digoxin Multicenter Research Group, J. Am. Med. Assoc. 259 (1989) 539.
[7] M.E. Mohamed, H.Y. Aboul-Enein, E.A. Gad-kariem, Anal. Lett. 16 (1983) 45.
[8] M.S. Rizk, F. Belal, M.M. Eid, Acta Pharm. Hung. 63 (1993) 313.
[9] Z. Koricanac, T. Jovanovic, B. Stankovic, Pharmazie 550 (1995) 299.
[10] P. Passamonti, V. Bartocci, F. Pucciarelli, J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem. 230 (1987) 99.
[11] H.T. Askal, Talanta 38 (1991) 1115.
[12] M.A. Raggi, V. Cavrini, A.M. Di Pietra, D. Lacche, Pharm. Acta Helv. 63 (1988) 19.
[13] J. Emnanuel, S.D. Halankar, Indian Drugs 26 (1989) 319.

[14] Z. Xinrong, W.R. Baeyens, G. Van-Der-Wekan, A.C. CaloKerinos, K. Nakashima, J. Pharm. Biomed. Anal. 13 (1995) 425.
[15] K. Imai, T. Toyoka, Y. Watanabe, Anal. Biochem. 128 (1983) 471.
[16] E. Ivashkiv, J. Pharm. Sci. 73 (1984) 1427.
[17] V. Cavrini, R. Gatti, P. Roveri, M.R. Cesaroni, Analyst 113 (1988) 1447.
[18] Y. Matasuki, K. Fukuhara, T. Ito, H. Ono, N. Ohara, T. Yui, T. Nambara, J. Chromatogr. 188 (1980) 177.
[19] A.I. Cohen, R.G. Devlin, E. Ivashkiv, P.T. Funke, T. Mc Cormick, J. Pharm. Sci. 71 (1982) 1251.
[20] O.H. Prummer, B. Jarrot, W.J. Louis, J. Chromatogr. 305 (1984) 83.
[21] T. Ito, Y. Matsuki, H. Kuribara, T. Nambara, J. Chromatogr. 417 (1987) 79.
[22] B. Lin Ling, W.R.G. Baeyens, B. del Castillo, K. Imai, P. de Moerloose, K. Stragier, J. Pharm. Biomed. Anal. 7 (1989) 1663.
[23] M.I. Albero, C. Sánchez-Petreño, M.S. Garcia, V. Ródenas, J. Pharm. Biomed. Anal. 11 (1993) 887.
[24] U.S. Pharmacopeia 24 National Formulary 19, The United States Pharmacopeia Convention, Inc., Rockville, 1999, p. 296.
[25] I.M.P.L.V.O. Ferreira, J.L.F.C. Lima, A.O.S. Rangel, Food Chem. 50 (1994) 423.
[26] E.P. Serjeant, Potentiometry and Potentiometric Tritations, Wiley, USA, 1984.

CAPÍTULO III- DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO

3.1 – ELÉCTRODOS SELECTIVOS A CLAVULANATO

CLAVULANATE-SELECTIVE ELECTRODES – APPLICATION TO PHARMACEUTICAL FORMULATIONS

FRESENIUS JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY: 371 (2001), 400 - 403

Fresenius J Anal Chem (2001) 371 : 400–403
DOI 10.1007/s002160100931

SHORT COMMUNICATION

Adriana M. Pimenta · Cristina M. C. M. Couto
Alberto N. Araújo · M. Conceição B. S. M. Montenegro

Clavulanate-selective electrodes – application to pharmaceutical formulations

Received: 14 February 2001 / Revised: 4 May 2001 /
Accepted: 13 May 2001 / Published online: 9 August 2001
© Springer-Verlag 2001

Abstract The construction and assessment of a clavulanate anion-selective electrode and its application to the analysis of pharmaceutical formulations by direct potentiometry are described. The electrode, prepared without inner reference solution, was fabricated by use of a PVC membrane, with bis(triphenylphosphoranylidene)ammonium clavulanate as ion-exchanger dissolved in 2-nitrophenyl octyl ether as intermediate solvent and *p-t*-octylphenol as additive. The response of the electrode was linearly dependent on concentration within the range 2.4×10^{-3}–1×10^{-1} mol dm^{-3} (ionic strength adjusted to 0.1 mol dm^{-3}); the slope of the calibration plot was -59.4 ± 0.9 mV decade^{-1} and the reproducibility ±0.6 mV day^{-1}. The response time was less than 20 s. Relative errors were <3.5% when results from analysis by direct potentiometry were compared with those from the reference method.

Introduction

Clavulanic acid, *Z*-(2*R*,5*R*)-3-(2-hydroxyethylidine)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid, is a powerful inhibitor of β-lactamases and is generally available commercially in formulations containing amoxicillin.

Spectrophotometric [1, 2, 3, 4, 5], fluorimetric [6], and polarographic [7] methods and HPLC techniques with spectrophotometric [8, 9, 10] or chemiluminescence [11] detection have been proposed for the determination of clavulanic acid in pharmaceutical formulations. The official method recommended by USP XXIV is based on chromatographic separation with spectrophotometric detection at λ=220 nm [12].

Spectrophotometric or fluorimetric methods [1, 2, 3, 4, 5, 6], although highly sensitive, are time-consuming and relatively expensive. The polarographic method [7], on the other hand, is less selective and, because it requires the use of mercury, is seldom used because of its toxicity.

Selective analytical methodologies, which are easily operated and involve harmless reagents and cost-effective equipment have, therefore, been proposed as alternative to standard methods. Although it has been shown that potentiometry with ion-selective electrodes (ISE) is very useful in the analytical control of pharmaceutical products [13], to the best of our knowledge the literature contains no references to the preparation of clavulanate-sensitive electrodes and their analytical application.

Previous experience has shown that quaternary ammonium salts, when used with appropriate plasticizing intermediate solvents in the preparation of ionic sensors for organic products with pharmaceutical interest, have enabled the preparation of electrodes with better reproducibility (≤1 mV day^{-1}), analytical interval, and durability (>4months) [14, 15, 16, 17, 18]. The inclusion of *p-t*-octylphenol on the membrane has contributed to one or two orders of magnitude increase in selectivity, already demonstrated for a sensitive carboxylate electrode [19]. Clavulanate anion-selective electrodes with a membrane containing bis(triphenylphosphoranylidene) clavulanate, with 2-nitrophenyl octyl ether as plasticizer, and *p-tert*-octylphenol as additive were prepared. Their analytical usefulness was evaluated by direct potentiometric determination of clavulanic acid in commercial antibacterial products.

A.M. Pimenta · A.N. Araújo · M.C.B.S.M. Montenegro (✉)
CEQUP/Dep. Química-Física, Fac. de Farmácia,
Rua Aníbal Cunha, 164, 4050 Porto, Portugal
e-mail: mcbranco@mail.ff.up.pt

C.M.C.M. Couto
Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte;
Rua Central da Gandra, 1317, 4580 Gandra PRD, Portugal

Experimental

Instrumentation and electrodes

A Crison micropH model 2002 pH meter was used to measure differences between a Russel model 90–0029 double junction AgCl/Ag reference electrode and the indicator electrode. The outer compartment of the reference electrode contained 0.033 mol dm^{-3} aqueous ammonium sulfate solution.

When necessary, the pH was measured by means of a Phillips single glass electrode, model GAH 110.

Sample analysis according to the method recommended by USP XXIV [12] were conducted by use of a Merck–Hitachi chromatograph comprising a model 7100 pump, a Rheodyne 7725i injector (20-μL loop), a Lichrocart RP 18 column (250 mm× 4 mm) packed with Lichrosorb 5-μm beads, and a model 7000 diode-array detector. Data were processed using the same brand software, model D 7000.

Reagents and solutions

All solutions were prepared in deionized water (conductivity <0.1 μS cm^{-1}) and all chemicals used were of analytical-grade or similar, and used without further purification.

Electrode membranes were prepared with bis(triphenylphosphoranylidene)ammonium chloride (Aldrich, #12403CS), 2-nitrophenyl octyl ether (Fluka, #73732), *p-t*-octylphenol (Fluka, #75070), PVC (Fluka, #81392), and tetrahydrofuran (Merck, #1.09731).

Potassium clavulanate (Cipan 370.70H011) and pharmaceutical formulations were stored in a dry cool place (below 4 °C).

Stock potassium clavulanate solution (0.1 mol dm^{-3}) was prepared daily by careful weighing of 1.1865 g of the solid and diluting it to 50.0 cm^3 with a 0.033 mol dm^{-3} ammonium sulphate solution in a volumetric flask. Calibration solutions were prepared by appropriate dilution of the stock solution.

Potassium clavulanate was determined in samples of pharmaceutical formulations with ionic strength adjusted by addition of ammonium sulfate (I=0.1 mol dm^{-3}).

Table 1 Membrane composition (% m/m) of the several types of clavulanate-selective electrode

	Type A	Type B	Type C
Ion-exchanger	1.3	1.3	1.2
2-Nitrophenyl octyl ether	66.7	64.5	60.1
4-*t*-Octylphenol	1.0	3.2	7.7
PVC	31.0	31.0	31.0

Table 2 Clavulanic acid determination in pharmaceutical preparations by use of type B clavulanate-selective electrodes or the corresponding USP monograph method

Pharmaceutical preparation	Proposed method[a]	USP method[a]	Relative error (%)
Augmentin500/125	134.0±2.5	136.8±0.6	–2.0
Betamox 500/125	139.0±1.6	143.9±0.5	–3.4
Clavamox 500/125	128.6±3.8	125.2±1.6	2.7
Penilan 500/125	116.1±1.6	113.3±0.6	2.4
Clavamox susp. 250/62.5	73.8±0.7	75.4±0.1	–2.0

[a]Mean (mg clavulanic acid per unit)±standard deviation for n=4

Preparation of the electrode membranes

The ion-exchanger was prepared by use of bis(triphenylphosphoranylidene)ammonium clavulanate obtained by precipitation of aqueous 1×10^{-1} mol dm^{-3} potassium clavulanate solution (50 cm^3) with 1×10^{-2} mol dm^{-3} bis(triphenylphosphoranylidene)ammonium chloride (100 cm^3). The precipitate was then filtered, thoroughly washed with deionized water, dried in an atmosphere of nitrogen, and stored in the dark in a desiccator below 4 °C.

The sensor solutions (types A, B, and C) were prepared by dissolution of the ion-exchanger with 2-nitrophenyl octyl ether and addition of different amounts of *p*-*t*-octylphenol as additive.

The electrode membranes (Table 1) were prepared by mixing 0.4 cm^3 of the corresponding sensor solution with 0.18 g PVC, previously dissolved in 6 cm^3 tetrahydrofuran. The electrodes were constructed according to the procedure previously described [20], and the different sensor solutions were applied dropwise to a conductive support prepared from epoxy resin (Araldite) mixed with graphite powder [16]. After solvent (tetrahydrofuran) evaporation successive applications of the sensor solutions were performed until a membrane 1 mm thick was obtained. After complete drying of the membranes the electrodes were placed in 1×10^{-2} mol dm^{-3} potassium clavulanate conditioning solution; they were left in this solution between trials.

Sample pretreatment

Five commercial pharmaceutical formulations containing clavulanic acid were analyzed (Table 2).

Sample stock solutions were prepared by finely powdering 20 tablets or two oral suspensions units then weighing a portion of the powder equivalent to 237.3 mg potassium clavulanate into a 25.00-mL volumetric flask. Sample stock solutions were dissolved in water and then stirred in an ultrasonic bath for 10 min.

After filtration of the stock solutions, potentiometric analysis was conducted on one aliquot with adjusted ionic strength and a clavulanate concentration of approximately 1×10^{-2} mol dm^{-3}.

Reference analyses [12] were performed on an aliquot of the filtered stock solution, which was diluted with water to furnish a 9.8×10^{-4} mol dm^{-3} clavulanate solution.

Results and discussion

Electrode behavior

The general working characteristics of the electrodes were determined by performing regular calibrations within the concentration range 10^{-5} to 10^{-1} mol dm^{-3} using potassium clavulanate solutions with an ionic strength adjusted to 0.1 mol dm^{-3}.

Table 3 shows the calibration data obtained; results are averages from evaluation of three electrodes of each type. The different electrodes behaved similarly with regard to lower limit of linear response (2.4×10^{-3} mol dm^{-3}) and detection limit (8.0×10^{-4} mol dm^{-3}). The addition of *p*-*t*-octylphenol was found to influence the working characteristics of the electrodes, specifically the slopes of the calibration plots. Deficient behavior was observed for electrode units constructed without additive on the membrane – slopes were 16 mV decade^{-1} and the potentials were irreproducible. It was found that the additive contributed

Table 3 General working characteristics of the clavulanate electrodes

Characteristics	Type A[a]	Type B[a]	Type C[a]
PLD (mol dm^{-3})	8.0×10^{-4}	8.0×10^{-4}	8.0×10^{-4}
LLLR (mol dm^{-3})	2.4×10^{-3}	2.4×10^{-3}	2.4×10^{-3}
Slope (mV decade^{-1})	–45.4±0.8	–59.4±0.9	–66.2±1.2
Reproducibility (mV day^{-1})	±1.1	±0.6	±1.2
pH working range[b]	4.8–7.1	4.8–7.1	5.1–6.7
Response time (s)[c]	<20	<20	<20
Lifetime (months)	>4	>4	>4

PLD – practical limit of detection; LLLR – lower limit of linear response
[a]Ionic strength adjusted to 0.1 mol dm^{-3} with $(NH_4)_2SO_4$
[b]In 5×10^{-3} mol dm^{-3} potassium clavulanate solution
[c]Determined according to IUPAC recommendations [24]

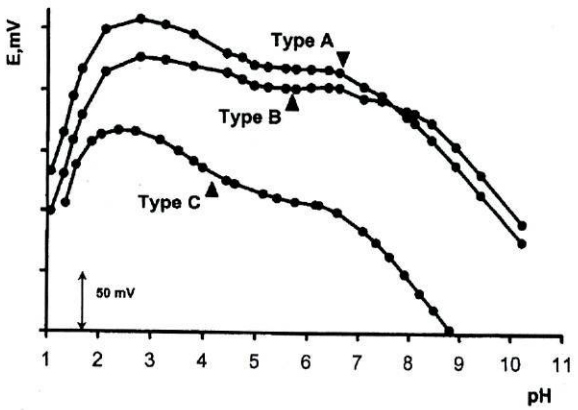


Fig. 1 Reilley diagram for type A, B, and C electrodes in 5×10^{-3} mol dm^{-3} potassium clavulanate solutions (I=0.1 mol dm^{-3})

Table 4 Potentiometric selectivity coefficients (log K^{POT})[a]

Interferent	Concentration (mol dm^{-3})	Electrode type		
		A	B	C
Sulfate	5×10^{-3}	−1.74 (0.08)	−1.48 (0.04)	−1.89 (0.07)
	2×10^{-2}	−2.01 (0.06)	−2.05 (0.04)	−2.03 (0.05)
Chloride	5×10^{-3}	+0.20 (0.08)	+0.30 (0.09)	+0.09 (0.03)
	2×10^{-2}	+0.17 (0.07)	−0.02 (0.11)	−0.16 (0.04)
Nitrate	5×10^{-3}	+1.75 (0.03)	+1.54 (0.13)	+1.06 (0.03)
	2×10^{-2}	+1.69 (0.04)	+1.55 (0.09)	+0.93 (0.02)
Phosphate	5×10^{-3}	+2.07 (0.07)	+2.98 (0.10)	+2.16 (0.04)
	2×10^{-2}	+2.19 (0.08)	+2.94 (0.10)	+2.21 (0.02)
Amoxicillin	5×10^{-3}	+0.08 (0.01)	+0.02 (0.06)	+0.28 (0.05)
	2×10^{-2}	+0.42 (0.07)	+0.06 (0.11)	+0.41 (0.04)
Ampicillin	5×10^{-3}	+0.48 (0.06)	+0.69 (0.08)	+0.70 (0.06)
	2×10^{-2}	+0.36 (0.07)	+0.40 (0.08)	+0.27 (0.02)

[a]Mean and standard deviation of two determinations with two electrodes

to improvement of the electrode response, especially the slope of the calibration plot. This value increased with the amount of additive added to the membrane, and might be related to a change in thermodynamic equilibrium at the membrane–solution interface, because of a change in the dissociation equilibrium of the chemical species contained in the membrane [21, 22].

Effect of pH

The influence of pH on the response of the electrodes was studied in 5×10^{-3} mol dm^{-3} potassium clavulanate solutions with a ionic strength of 0.1 mol dm^{-3}. The pH was changed by addition of small amounts of sodium hydroxide or concentrated sulfuric acid solutions.

The Reilley diagrams (Fig. 1) of the different types of electrode show that the potential values did not vary by more than ±5 mV within the pH range 4.8 to 7.1 for electrode types A and B, and within the range 5.1 to 6.7 for type C electrodes (Table 3). The registered decrease in the amplitude of the operational platform (pH>7) was because of the presence of the anion phenolate resulting from *p-t*-octylphenol [23]. With increasing pH the electrode potential decreased, because of hydroxide anion interference. For pH<4.5 the decrease of the ratio of ionized to non-ionized clavulanate became perceptible (increase of the electrode potential) and was followed by an abrupt decrease of potentials values, probably related to the appearance of the HSO_4^- anion in solution.

Selectivity of the electrodes

The interference of several inorganic and organic anions was assessed by evaluation of the corresponding potentiometric coefficients of selectivity (log K^{POT}) by use of the separate solutions method [24] with main and interferent ion solution concentrations of 5×10^{-3} and 2×10^{-2} mol dm^{-3}, respectively (Table 4). The organic ions selected for this study were amoxicillin, because of its normal presence in pharmaceutical formulations combined with clavulanic acid, and ampicillin because of its similar chemical structure to that of the analysed ion.

The diagram presented in Fig. 2, (5×10^{-3} mol dm^{-3}) shows that the interference from the several ions studied was the same, irrespective of the type of membrane used. It was, nevertheless, found that the extent of interference depended on the amount of additive used, as previously described by other authors [22]. Improvements of 0.82 and 0.48 in log K^{POT} were observed for phosphate and nitrate interferent ions, respectively, when the amount of additive in the membrane was increased by 4.5%.

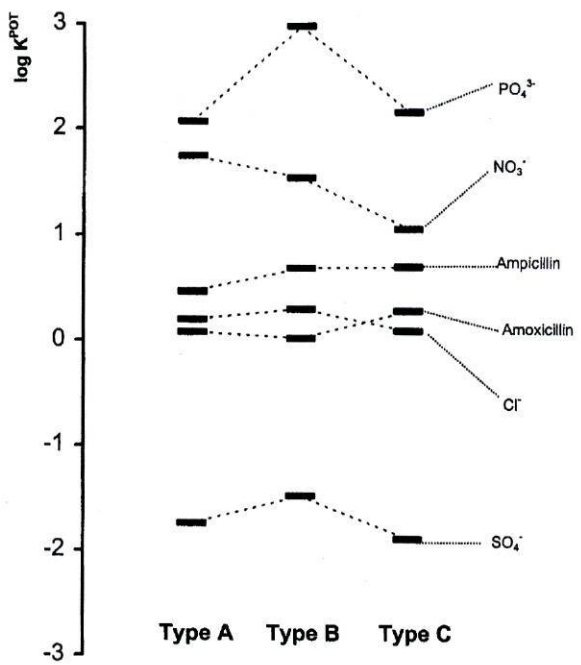


Fig. 2 Diagram depicting the variation of the log $K_{A,B}^{POT}$ values of the clavulanate selective electrodes. Determinations were performed in 5×10^{-3} mol dm^{-3} main and interferent ion solutions

Application to real samples

Commercial pharmaceuticals were analyzed by direct potentiometry with type B electrodes, for which the response characteristics, mainly calibration slope and reproducibility, were best (the potentiometric coefficients of selectivity were similar in all three types). The use of amoxicillin, which is usually combined with clavulanic acid, showed that its effect on the electrodes prepared with approximately 3% of additive (Type B) was much weaker than that on the other units. It was, moreover, found that under the conditions used in the preparation of the samples, amoxicillin was insoluble, thus becoming a very weak interferent.

Table 2 shows the results obtained from the analysis of five samples of pharmaceutical formulations by direct potentiometry, and their comparison with those given by the reference method. Relative errors were <3.5% and relative standard deviations <3.0%.

Both sets of results were further compared by use of the bilateral paired t-test, which gave 0.720 (theoretical t for a confidence level of 95%=2.776). The analysis of the results obtained leads to the conclusion there is no statistical difference between results from both methodologies.

Conclusions

The use of bis(triphenylphosphoranylidene)ammonium clavulanate as ion-exchanger combined with a good plasticizing intermediate solvent and *p-t*-octylphenol as additive enabled the construction of clavulanate-sensitive electrodes of analytical interest in pharmaceutical control.

The additive was essential in the preparation of useful analytical electrodes. The amount of additive used ensured a Nernstian response and reproducible electrodes.

Potentiometry with clavulanate-selective electrodes proved to be an accurate and useful methodology that can be implemented for routine pharmaceutical quality-control analysis.

Acknowledgments The authors wish to thank Fundação para a Ciência e Tecnologia for financial support through the Praxis/P/QUI/10109/1998 project and ATRAL Cipan for the potassium clavulanate samples provided. One of the authors (A.M.P.) wishes to thank the Praxis Program for the Ph.D. grant (Praxis/BD/19793/99).

References

1. Murillo JA, Lemus JM, Garcia LF (1994) Fresenius J Anal Chem 349:761–767
2. Izquierdo P, Goméz-Hens A, Perez-Bendito D (1993) J Pharm Biomed Anal 11:927–931
3. Murillo JA, Lemus JM, Garcia LF (1993) Fresenius J Anal Chem 347:114–118
4. Bird AE, Bellis JM, Gasson BC (1982) Analyst 107:1247–1245
5. Abdel-Moety EM, Abounassif MA, Mohamed ME, Khattab NA (1989) Talanta 36:683–685
6. Izquierdo P, Goméz-Hens A, Perez-Bendito D (1993) Analyst 118:707–710
7. Gonzalez-Perez C, Gonzalez-Martin I, Rodriguez-Vazquez-de-Aldana B (1991) J Pharm Biomed Anal 5:383–386
8. Tsou TL, Wu JR, Youg CD, Wang TM (1997) J Pharm Biomed Anal 15:1197–1205
9. Abounassif MA, Abdel-Moety EM, Mohamed ME, Gad-Kariem ERA (1991) J Pharm Biomed Anal 9:731–735
10. Food and Drug Administration (1984) Fed Regist 49: 39670–39675
11. Miyawa JH, Schulman SG, Perrin JH (1997) Biomed Chromatogr 11:224–229
12. United States Pharmacopoeia, 24th Edn, (2000) 132
13. Cosofret VV, Buck RP (1993) Crit Rev Anal Chem 24:1–58
14. Lima JLFC, Montenegro MCBSM, Sales MGF (1998) J Pharm Biomed Anal 18:93–103
15. Lima JLFC, Montenegro MCBSM, Sales MGF (1996) Mikrochim Acta 124:35–41
16. Lima JLFC, Montenegro MCBSM, Silva AMR (1990) J Pharm Biomed Anal 8:701–704
17. Lima JLFC, Montenegro MCBSM, Silva AMR (1990) J Flow Injection Anal 7:19–33
18. Lima JLFC, Montenegro MCBSM, Alonso J, Bartroli J, Raurich JG (1989) J Pharm Biomed Anal 7:1499–1505
19. Fujinaga T (1982) Phil Trans R Soc Lond A 305:631–635
20. Lapa RAS, Lima JLFC, Silva AMR (1990) Il Farmaco 45:901–913
21. Bühlmann P, Umezawa Y (1999) Electroanalysis 11:687–693
22. Schaller U, Bakker E, Spichiger UE, Pretsch E (1994) Anal Chem 66:391–398
23. Hara H, Kondoh Y, Mitani O, Okazaki S (1990) Anal Chem 62:1139–1143
24. IUPAC, Analytical chemistry division commission on analytical nomenclature, recommendations for publishing manuscripts on ion-selective electrodes (1981) Pure Appl Chem 53: 1907–1912

3.2 – SISTEMA DE ANÁLISE POR INJECÇÃO SEQUENCIAL PARA DETERMINAÇÃO DE CLAVULANATO

A SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS SYSTEM FOR POTASSIUM CLAVULANATE DETERMINATION USING TWO POTENTIOMETRIC DETECTORS

JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS: 30 (2002), 931 - 937

ELSEVIER

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis
30 (2002) 931–937

JOURNAL OF
PHARMACEUTICAL
AND BIOMEDICAL
ANALYSIS

www.elsevier.com/locate/jpba

A sequential injection analysis system for potassium clavulanate determination using two potentiometric detectors

Adriana M. Pimenta, Alberto N. Araújo, Maria Conceição B.S.M. Montenegro *

CEQUP/Departamento Química-Física, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha 164, 4050 Porto, Portugal

Received 19 June 2001; received in revised form 14 May 2002; accepted 20 May 2002

Abstract

Two almost independent potentiometric methods were implemented in a multi-task flow system based on the concept of sequential injection analysis for the analytical control of potassium clavulanate in pharmaceutical formulations. In addition to in-line preparation of the solutions submitted to the analysis, the system simultaneously detected the clavulanate anion and the potassium cation using two potentiometric detectors selective to each of the species referred. For the two determinations, the system developed presented an analytical range of 2 mM–0.1 M. Relative standard deviations of 0.5 and 0.6%, respectively, for clavulanate and potassium, were calculated from the signals obtained for 10 consecutive injections of a solution of 5×10^{-3} M potassium clavulanate. The frequency of sampling was 53 samples h^{-1}. The quality of results supplied was evaluated by comparison with the reference procedure revealing relative errors less than 2% for the two determinations. The simultaneous attainment of two measurements permitted the standardisation of results in real time, the detection of faults in the procedure and monitoring the chemical stability of clavulanate.
© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: SIA; Real-time accuracy assessment; In-line calibration; Potassium clavulanate; Potentiometric detection

1. Introduction

The analytical control of pharmaceutical formulations requires the selection of adequate techniques in respect to the quality of results that they produce and the possibility of functioning on a large scale basis. In this sense, automatic methodologies based on continuous flow techniques have been proposed that additionally allow economy of solutions and reduced analysis time [1]. Recently a multi-task flow system with potentiometric detection was proposed which allowed not only the carrying out of the evaluation of the detector units but also the automatic implementa-

* Corresponding author. Tel.: +351-22-208-7132; fax: +351-22-200-3977
E-mail address: mcbranco@mail.ff.up.pt (M.C.B.S.M. Montenegro).

0731-7085/02/$ - see front matter © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.
PII: S0731-7085(02)00474-0

tion of direct potentiometric procedures, the standard addition and titrations, requiring the operator to prepare only the stock solutions of the chemical species involved in the determination [2]. In this work its application in the development of a procedure of accuracy assessment in real time [3] is evaluated. Usually the accuracy assessment of a routine procedure is based on the verification of the quality of results against those obtained by a reference method periodically carried out or by analysis of certified samples. The sequential injection analysis technique (SIA) [4] presents the advantage of permitting the simultaneous accommodation of different types of procedures on the same sample without having to physically reconfigure the system, therefore facilitating the implementation of the accuracy assessment in real time. Taking advantage of this possibility, the development of a procedure for the control of pharmaceutical formulations is proposed, which could be used on a large scale basis with a high analytical performance. Clavulanic acid, *Z*-(2*R*,5*R*)-3-(2-hydroxyethylidene)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid, is a potent inhibitor of β-lactamases and is commercialised in pharmaceutical formulations in association with amoxicilin [5]. For its determination in pharmaceutical formulations several spectrophotometric [6–10], fluorimetric [11], polarographic [12] and HPLC methods with spectrophotometric [13–15] or chemiluminescence [16] detection have been proposed. However, the quality of results supplied by these techniques depends on the careful processing of samples, correct maintenance of equipment and periodic verification of results.

The resort to ion-selective electrodes minimises some of the drawbacks mentioned, above all owing to its mode of functioning, selectivity and sensitivity. In this work the potential of the simultaneous use of two electrodes selective to clavulanate [17] and potassium is outlined, in the analytical control of potassium clavulanate in pharmaceutical formulations. These detectors when constructed with a tubular configuration, also present the advantage of being easily incorporated into the system in a robust form, allowing a reduced analytical cost and an elevated sampling rate.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All solutions were prepared with deionized water (conductivity < 0.1 μS cm^{-1}) and reagents of p.a. or similar quality, without additional purification.

For the preparation of the membranes of the ion selective electrodes (ISE) bis (triphenylphosphoranylidene) ammonium chloride (Aldrich-12403CS, Steinheim, Germany), valinomycin (Fluka-94675, Steinheim, Switzerland), 2-nitrophenyloctyl ether (Fluka-73732, Steinheim, Switzerland), bis(2-ethylhexyl) sebacate (Fluka-84818, Steinheim, Switzerland) *p-t*-octylphenol (Fluka-75070, Steinheim, Switzerland), potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (Fluka-60591, Steinheim, Switzerland) high molecular weight PVC (Fluka-81392, Steinheim, Switzerland) and tetrahydrofuran (Merck-1.09731, Darmstadt, Germany) were used.

The potassium clavulanate (Cipan 370.70H011, Castanheira do Ribatejo, Portugal) and pharmaceutical formulations acquired in local drugstores were stored in darkness under cold, dry conditions.

A 0.033 M ammonium sulphate solution (Riedel-deHaen D-3016, Seelze, Germany) was used as ionic strength adjuster ($I = 0.1$ M and pH 5.6) and as a carrier in the flow system proposed.

The stock solutions of potassium clavulanate 1×10^{-1} and 2×10^{-2} M were prepared immediately before their use, by rigorous weighing out of the solid and dissolution in the ionic strength adjuster solution.

The sample stock solutions were prepared by weighing out a quantity of powder equivalent to 237.3 mg of potassium clavulanate, that resulted from the pulverisation and homogenisation of 20 tablets. Each amount was transferred to a volumetric flask of 2500 ml with 15 ml of water, the mixture being placed under stirring in an ultrasonic bath for 10 min. The volume was adjusted to 2500 ml with water and the solutions were filtered. The potentiometric analyses were carried out in an aliquot of the filtrate that was properly diluted with the ionic strength adjuster in order to obtain a

clavulanate solution with a concentration of about 1×10^{-2} M.

For the analyses carried out by the reference method [18] a volume of the sample stock solution was diluted with water until achievement of a final clavulanate concentration of about 9.8×10^{-4} M.

2.2. Construction of electrodes

The tubular electrodes, selective for clavulanate and potassium, with PVC membrane and without internal reference solution, were constructed according to the procedures previously described [19], depositing the sensory membrane in the conductor surface of the central electrode hole.

The membrane used in the construction of the clavulanate electrode [17] was prepared by a mixture of 1.3% (w/w) bis (triphenylphosphoranylidene) clavulanate, 64.5% (w/w) 2-nitrophenyloctyl ether, 3.2% (w/w) *p-t*-octylphenol and 31.0% (w/w) PVC. For the potassium electrode the membrane preparation was followed mixing 1.0% (w/w) of valinomycin, 65.8% (w/w) bis(2-ethylhexyl) sebacate, 0.2% (w/w) potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate and 33.0% (w/w) of PVC. The membranes were left to dryness and conditioned in a 10^{-2} M solution of primary ion for 12 h.

2.3. Equipment and software

The multi-task flow-system (Fig. 1), whose mode of functioning was previously described [2] was made up of a peristaltic pump Gilson Minipuls 3 (Villiers-le-Bel, France), equipped with a PVC propulsion tube, of the same brand, with a 1.85 mm internal diameter. The other components included a six-port rotatory valve (RV) from Valco Instruments, model Cheminert C15-3186E (Houston, USA); a three-way solenoid valve (SV) NResearch 161 T031 (Stow, USA); two potentiometers Crison micropH-2002, sensitivity ±0.1 mV (Barcelona, Spain) that measure the difference of potential between the indicator electrodes and a reference electrode of double junction AgCl/Ag model 90-0029 from Russel (Fife, Scotland), containing a 0.033 M ammonium sulphate solution in the external compartment.

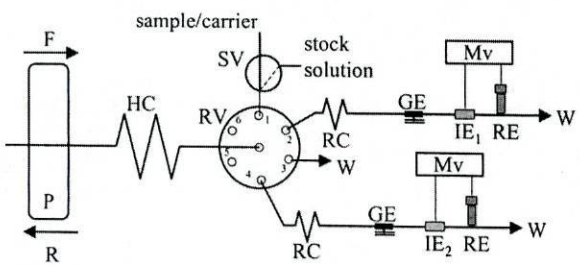


Fig. 1. SIA system for potassium clavulanate determination in pharmaceuticals. P = peristaltic pump; RV = rotatory valve; SV = three way solenoid valve; GE = grounding electrode; IE_1 = clavulanate-selective electrode; IE_2 = potassium-selective electrode; RE = reference electrode; Mv = decimilivoltimeter; W = waste.

The manifold was constructed with PTFE tubing of 0.8 mm internal diameter; the serpentine holding coil (HC) was 400 cm in length, and the reaction coils (RC) were 40 cm each. Supports were used for the tubular and reference electrodes and the grounding electrodes were constructed in the laboratory [20].

The system was controlled by a computer through an Advantech PCL 711B interface card with the system control and signal acquisition programme having been developed in QuickBasic language.

The sample analysis by the method proposed by the United States Pharmacopoeia [18] was carried out in a chromatographic Merck Hitachi system (Tokyo, Japan), made up of a pump (model 7100), connected to an Rheodyne injector model 7725i (loop of 20 μl) and a silica column Lichrocart RP 18 (250 × 4 mm), packed with Lichrosorb 5 μm particles. The detector used was a diode array system, model 7000, with the data processed through software of the same brand (Model D7000).

2.4. Procedures

Initially the HC and transmission channels between the RV and detection systems were filled with carrier/adjuster of ionic strength solution selecting ports 2 and 4 and placing the peristaltic pump in propulsion mode. This mode of operation was maintained until a stable baseline was obtained for the electrodes. The instructions required for an analytical cycle for determination of the

clavulanate anion and of the potassium cation are defined in Table 1. The first three steps of the calibration procedure and first two steps of the measurement procedure correspond to the substitution of the solutions that fill the system.

The selection of port 1 (first step of the calibration cycle) with the SV activated enabled the filling up of the active access channel with a 2×10^{-2} M solution of potassium clavulanate for the evaluation of the slope of the electrode selective to clavulanate or the electrode selective to potassium. When the SV was not activated the passive channel was filled with carrier solution for the calibration procedure of the potentiometric detectors or with sample solution in the case of analytical determinations.

The determination of the electrode slopes was carried out by four times selection of the two last steps of the calibration cycle, involving the RV ports 1 and 2 in the case of clavulanate ISE and 1 and 4 in the case of potassium ISE. Potassium clavulanate calibration solutions with respective concentrations of 5×10^{-3}, 1×10^{-2}, 1.5×10^{-2} and 2×10^{-2} M were automatically prepared in the interior of the system for each selection of port 1, by means of the SV on/off cycles. Small plugs of the standard of potassium clavulanate (2×10^{-2} M) were aspirated into the HC by activation of the SV (SVon) in alternated mode, with plugs of carrier solution, when the SV was in the off position (SVoff). The mutual dispersion between the two solutions inserted during the stage of

Table 1
System operation

RV	SV state[b]		Volume (μl)	Flow-rate (ml min^{-1})	Flow direction	Event
Clavulanate or potassium[a] selective electrode calibration						
1	ON		200	1.5	R	Stock potassium clavulanate solution
1	OFF		200	1.5	R	Carrier
3	–		600	4.0	F	Waste
1	ON	25% 50% 75% 100%	375	1.5	R	In-line clavulanate standard preparation
2	–		4000	2.0	F	Clavulanate measurement
or[a]						
1	ON	25% 50% 75% 100%	500	9.8	R	In-line potassium standard preparation
4	–		41 700	5.0	F	Potassium measurement
Clavulanate or potassium[a] determination						
1	OFF		200	1.5	R	New sample
3	–		400	4.0	F	waste
1	OFF		375	1.5	R	Clavulanate sample volume
2	–		4000	4.0	F	Clavulanate measurement
or[a]						
1	OFF		500	9.8	R	Potassium sample volume
4	–		4170	5.0	F	Potassium measurement

Steps for potassium clavulanate determination in pharmaceutical formulations with the SIA system in Fig. 1. R = reverse; F = forword; RV = rotatory valve; SV = solenoide valve.

[a] Potassium procedures.

[b] Each SV on/off cycle has 2 s.

aspiration into the HC and during the sending to the detector permitted simulation of the intercalation of the solutions with the mentioned above concentrations. To obtain the four standards the SV was activated during 25, 50, 75, and 100% of the time for each on/off cycle applied to the SV.

For the calibration of the clavulanate ISE, 375 μl of solution (corresponding to eight cycles) were aspirated and sent to the detector at a flow rate of 2.0 ml min^{-1}. For the analytical determinations, port 1 was selected and filled with sample solution to be measured. A sample volume equal to that mentioned above was aspirated into the HC and sent to the detector (port 2) with a similar flow rate. For the calibration of the potassium ISE, 500 μl of solution was aspired in port 1 (corresponding to five cycles) and sent to the detector (port 4) at a flow rate of 5.0 ml min^{-1}. The measurement was carried out in a mode similar to that of clavulanate, aspiring to the HC, through port 1, a sample volume of 500 μl that was sent to the detector at a flow rate of 5 ml min^{-1}.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation of the system proposed

As is the characteristic of continuous flow methodologies, the injection of reduced volumes of sample, in a liquid flow stream, determines its physical dispersion leading to a transient analytical signal in the detector, of reduced intensity when compared with that obtained by conventional analysis using an increased sample volume. In these circumstances, the reproducibility of measurements depends on the constancy of the hydrodynamic variables of the system, verified periodically in a direct form or by carrying out calibration procedures. The minimisation of physical dispersion of the solutions injected can contribute to the increase in robustness of analysis in that the results are less influenced by small changes of the system working conditions. With the objective of guaranteeing a degree of robustness to the proposed procedures, the intensity and repeatability of the potentiometric signals obtained was studied either by varying the injection volume for the two determinations in the interval 150–1000 μl and the propulsion flow in the interval 2–8 ml min^{-1} in a way whereby the sampling rate was not diminished. In these experiments, the RC was fixed initially at 20 cm with which it would be possible to minimise the volumes of solutions spent per determination. It was verified however that the proximity of the RV detector devices introduced an electrical noise in the measurements, difficult to eliminate with the grounding electrode inserted in line, before the detection system. The RC length was therefore increased to 40 cm. With the increase of injection volume, an increase in the intensity of analytical signals was verified up to volumes of 375 and 500 μl, respectively, for clavulanate and potassium, as a consequence of decreasing the dispersion effect. For greater injection volumes no significant improvement in the intensity of signals was observed. These injection volumes were obtained for maximum flow rate of 2 and 5 ml min^{-1}, respectively, for clavulanate and potassium. The increments of the flow rate carried an appreciable loss of signal repeatability, possibly caused by inertia to the flow during the aspiration stage and by the dynamic response characteristics of each of the electrode types used.

As previously demonstrated [2], the system enabled in-line preparation of solutions using the SV valve housed in port 1. By means of successive momentary activations of SV, during aspiration, through port 1 it was possible to create a stack of small zones of stock solution of potassium clavulanate and of ionic strength adjuster solution. The aspiration and inversion of flow direction contributed to the homogenisation of potassium clavulanate concentration in all segments, with the final concentration being determined by the proportion of time during which the SV remained activated. By fixing the on/off cycle time at 2 s, it was possible to guarantee a sufficiently reduced volume of the segments to permit an effective homogenisation, even when the SV remained activated during 1% of each cycle. This time was sufficient to allow a reproducible aspiration of the two solutions. The longer aspiration of solutions from port 1, with the application of an increasing number of cycles, illustrated the attainment of

Table 2
Determination of clavulanic acid pharmaceuticals formulations (mg clavulanic acid/tablet)

Samples	Reference method[a]	ESI clavulanate[a]	R.D. (%)[b]	ESI potassium[a]	R.D. (%)[b]
Augmentin	136.8±0.6	134.5±1.6	−1.7	136.6±1.2	−0.1
Betamox	143.9±0.5	142.1±2.0	−1.3	143.1±1.7	−0.6
Clavamox	125.2±1.6	126.3±1.3	0.9	125.8±1.4	0.5
Penilan	113.3±0.6	115.6±1.3	2.0	111.3±1.4	−1.8

[a] Average of four determinations±standard deviation.
[b] Relative deviation to the reference method.

analytical signals for the determination of clavulanate and potassium with increasing intensity. Analytical signals were obtained with an intensity of 95% when compared to the intensity obtained for the conventional analysis of the same calibration solutions when 375 μl (eight cycles) were aspirated for the clavulanate detector and 500 μl (five cycles) for the potassium detector. Equally, the calibration carried out with the 5×10^{-3}, 1×10^{-2}, 1.5×10^{-2} and 2×10^{-2} M standards of potassium clavulanate, prepared in the interior of the system, were compared with those prepared manually and no differences in the intensity of analytical signals obtained have been observed.

Having optimised the flow conditions regarding the flow rate and injection volumes, the characterisation of ISEs was then proceeded with. It was shown that the unit selective to clavulanate presented a Nernst response in the concentration interval of 2×10^{-3}–1×10^{-1} M, with a slope of -60.5 ± 0.5 mV decade^{-1}. A relative standard deviation of 0.6% was obtained for 10 consecutive injections of standard 5×10^{-3} M potassium clavulanate solution, with the sampling frequency being 55 injections h^{-1}. The potassium ISE exhibited a linear response in the interval 2×10^{-3}–1×10^{-1} M, with a slope of 56.6 ± 0.2 mV decade^{-1}. Following 10 consecutive injections of standard 5×10^{-3} M potassium clavulanate solution, it was observed that the rsd of the results was 0.5%, with the sampling frequency being 53 injections h^{-1}.

3.2. Analytical applications

Having optimised the flow conditions and defined the characteristics of the ISEs, a determination of clavulanic acid in pharmaceutical formulations commercialised in Portugal was proceeded with, by direct potentiometry following the procedure referred to in Table 1. To evaluate the quality of the potentiometric results obtained, a determination of clavulanic acid on the same samples resorting to the reference method proposed by the USP [18] was carried out in parallel. The results obtained are shown in Table 2. The application of the student t-test for the pairs of values obtained, showed an absence of statistical differences for a confidence level of 95%. The

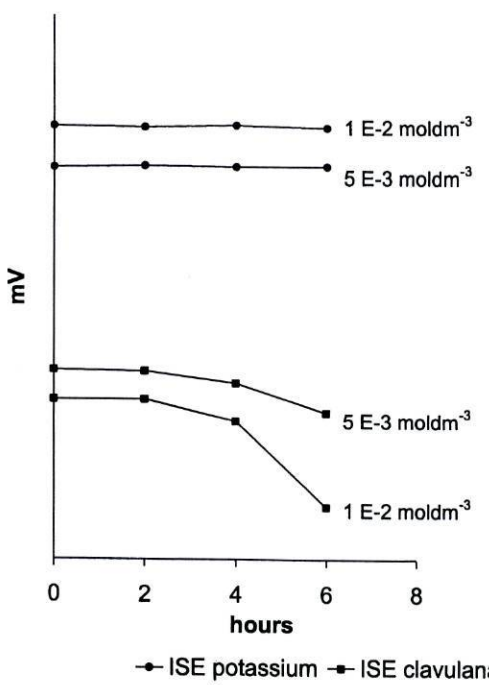


Fig. 2. Effect on signal intensity by exposure a potassium clavulanate solution (5×10^{-3} and 1×10^{-2} mol dm^{-3}) to air and light.

exposure of samples to the air and light leads to a rapid degradation of clavulanate (Fig. 2) and gives rise to a progressive deviation between the measurements obtained with the proposed system. However, the mean of the results obtained by the two procedures could be more accurate. The random errors are minimised and the nature of the systematic errors arising from the presence of interfering species is different for the two ISEs. The analysis of the relative errors or the absence of agreement of results could therefore indicate a fault of one of the procedures and the consequent necessity of system verification, or the degradation of clavulanate in the pharmaceutical formulations.

4. Conclusions

The possibility of coupling in a robust form, two potentiometric detectors, sensitive to anion and to cation, of simple construction, to a SIA system permitted the evaluation of potassium clavulanate in pharmaceutical formulations by two different methodologies. The system developed was easy to operate, gave rise to a reduced consumption of reagents, favoured an elevated sampling frequency, an accuracy of results estimated in real time and proved useful in analytical control of pharmaceutical formulations.

Acknowledgements

The authors wish to thank Fundação para a Ciência e Tecnologia for financial support through the Praxis/P/QUI/10109/1998 project and ATRAL Cipan for the potassium clavulanate samples provided. One of us (A.M.P.) wishes to thank the Praxis Program for the Ph.D. grant (Praxis/BD/19739/99).

References

[1] J.M. Calatayud, Flow Analysis of Pharmaceuticals: Automation in the Laboratory, Taylor and Francis, London, 1996.
[2] R.N. Fernandes, M.G.F. Sales, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro, J. Pharm. Biomed. Anal. 25 (2001) 713–720.
[3] C.C. Oliveira, R.P. Sartini, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, Anal. Chim. Acta 350 (1997) 31–36.
[4] G.D. Christian, Analyst 119 (1994) 2309–2314.
[5] K. Partiftt (Ed.), Martindale, 32nd ed., Pharmaceutical Press, London, 1999, p. 190.
[6] J.A. Murillo, J.M. Lemus, L.F. Garcia, Fresenius J. Anal. Chem. 349 (1994) 761–767.
[7] P. Izquierdo, A. Goméz-Hens, D. Perez-Bendito, J. Pharm. Biomed. Anal. 11 (1993) 927–931.
[8] J.A. Murillo, J.M. Lemus, L.F. Garcia, Fresenius J. Anal. Chem. 347 (1993) 114–118.
[9] A.E. Bird, J.M. Bellis, B.C. Gasson, Analyst 107 (1982) 1241–1245.
[10] E.M. Abdel-Moety, M.A. Abounassif, M.E. Mohamed, N.A. Khattab, Talanta 36 (1989) 683–685.
[11] P. Izquierdo, A. Goméz-Hens, D. Perez-Bendito, Analyst 118 (1993) 707–710.
[12] C. Gonzalez-Perez, I. Gonzalez-Martin, B. Rodriguez-Vazquez-de-Aldana, J. Pharm. Biomed. Anal. 5 (1991) 383–386.
[13] T.L. Tsou, J.R. Wu, C.D. Young, T.M. Wang, J. Pharm. Biomed. Anal. 15 (1997) 1197–1205.
[14] M.A. Abounassif, E.M. Abdel-Moety, M.E. Mohamed, E.R.A. Gad-Kariem, J. Pharm. Biomed. Anal. 9 (1991) 731–735.
[15] Food and Drug Administration, Federal Register 49, 1984, pp. 39670–39675.
[16] J.H. Miyawa, S.G. Schulman, J.H. Perrin, Biomed. Chromatogr. 11 (1997) 224–229.
[17] A.M. Pimenta, C.M.C.M. Couto, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro, Fresenius J. Anal. Chem. 371 (2001) 400–403.
[18] United States Pharmacopeia 24 National Formulary 19, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 1999, pp. 133–134.
[19] S. Alegret, J. Alonso, J. Bartroli, J.M. Paulis, J.L.F.C. Lima, A.A.S.C. Machado, Anal. Chim. Acta 164 (1984) 147–152.
[20] S. Alegret, J. Alonso, J. Bartroli, A.A.S.C. Machado, J.L.F.C. Lima, J.M. Paulis, Quim. Anal. 6 (1987) 278–294.

CAPÍTULO IV- DETERMINAÇÃO DE DICLOFENAC

SIMULTANEOUS POTENTIOMETRIC AND FLUORIMETRIC DETERMINATION OF DICLOFENAC IN A SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS SYSTEM

ANALYTICA CHIMICA ACTA: 470 (2002), 185 - 194

ELSEVIER

Analytica Chimica Acta 470 (2002) 185–194

ANALYTICA CHIMICA ACTA

www.elsevier.com/locate/aca

Simultaneous potentiometric and fluorimetric determination of diclofenac in a sequential injection analysis system

A.M. Pimenta, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro*

CEQUP, Departmento Química-Física, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050 Porto, Portugal

Received 25 April 2002; received in revised form 25 June 2002; accepted 15 July 2002

Abstract

Two independent methods for the determination of diclofenac were simultaneously implemented in an automated analytical system, based on the concept of sequential injection analysis, providing real-time assessment of results quality. The potentiometric detection was carried out with an ion-selective electrode based on a cyclodextrin while for the fluorimetric determination the sample was previously subject to in-line irradiation with UV light. The potentiometric and photochemical-fluorimetric determinations exhibited linear working ranges of 5×10^{-6} to 1×10^{-2} and 1×10^{-6} to 1×10^{-4} mol dm^{-3}, respectively. Relative standard errors of 0.5% for the potentiometric determination and 0.6% for the photochemical-fluorimetric determination were obtained after 10 consecutive injections of a 5×10^{-5} mol dm^{-3} diclofenac standard solution. The sampling rate was about 32 samples h^{-1}. Both methods were applied in the analysis of pharmaceutical formulations. The quality of results obtained was evaluated by comparison to the reference method, with no statistically significant differences for a 95% confidence level.
© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: SIA; Real-time accuracy assessment; Sodium diclofenac; Potentiometric determination; Photochemical-fluorimetric determination

1. Introduction

The importance of the chemical control of pharmaceutical products, as a result of the social, economic and public health impact that it imposes, demands the development of more sensitive, reliable, representative and responsive analytical methodologies, which can additionally accomplish large scale analysis with high sampling rates. In an effort to fulfil these requirements, automated methodologies based on distinct continuous flow techniques have been proposed [1], which offered the additional advantage of significant reductions of reagents consumption and waste generation. Among these techniques, sequential injection analysis (SIA) allows different analytical procedures to be accommodated in the same system without requiring its physical reconfiguration [2]. This feature has been explored to implement the concept of real time accuracy assessment in the quality control of pharmaceutical formulations, which is an aspect of great importance in routine laboratory analysis [3]. According to this concept, the sample is processed simultaneously by two quasi-independent methods being the results obtained intrinsically more accurate [4]. This work proposes the application of the concept of real time accuracy assessment in a SIA system for the control of diclofenac in pharmaceutical formulations.

Sodium diclofenac, sodium [*o*-(2,6-dichloroanilino)phenyl] acetate is a non-steroidal drug with

* Corresponding author. Tel.: +351-222087132; fax: +351-222003977.
E-mail address: mcbranco@ff.up.pt (M.C.B.S.M. Montenegro).

0003-2670/02/$ – see front matter © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.
PII: S0003-2670(02)00669-4

anti-inflammatory, analgesic and antipiretic properties [5]. Due to its therapeutic relevance several methodologies have been proposed for the determination of diclofenac in pharmaceutical formulations including spectrophotometry [6–15], fluorimetry [16–19], potentiometry [20,21] chromatography [22–24], and nuclear magnetic resonance spectroscopy [25]. Among these methodologies, ion selective electrodes (ISE) are particularly advantageous since they are easily constructed in the laboratory at relatively low-cost, exhibit good analytical performance regarding selectivity and sensitivity and are robust and easily incorporated in continuous flow systems [26]. Similarly, the combination of photochemical reactions with fluorimetric detection in hydrodynamic systems has demonstrated to be a versatile, simple, selective and sensitive analytical strategy [27]. Taking advantage of the analytical potential of these two techniques, a SIA procedure combining a new diclofenac selective sensor for potentiometric detection and the fluorimetric determination following in-line sample irradiation with UV light, is proposed.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All solutions were prepared with deionized water (conductivity $< 0.1\ \mu S\ cm^{-1}$) and analytical grade chemicals without further purification were used.

Electrode membranes were prepared with α-cyclodextrin (Sigma-C-4642) as neutral carrier, tetradodecylammonium bromide (Fluka-87249) as fixed cationic site, 2-nitrophenyloctyl ether (Fluka-73732) as mediator solvent and PVC (Fluka-81392) as immobilising matrix. The solid polymers were dissolved in tetrahydrofuran (Merck-1.09731).

To enable the simultaneous adjustment of pH and ionic strength an $0.2\ mol\ dm^{-3}$ ammonia–ammonium sulphate buffer solution adjusted to pH 9.9 and $I = 0.1\ mol\ dm^{-3}$ was used as carrier solution.

The stock sodium diclofenac (Sigma-D-6899) solution ($1 \times 10^{-2}\ mol\ dm^{-3}$) was prepared by rigorous weighing of the solid and dilution with the buffer solution. The less concentrated solutions were obtained by rigorous dilution of the concentrated ones with the pH and ionic strength adjusting solution.

In the trials carried out by HPLC according to the method proposed by USP [28], which was used as the reference method, the mobile phase was composed of a mixture of methanol and phosphate buffer pH 2.5 (700:300) filtered and degassed. In this analysis, a 0.75 mg/ml diclofenac standard solution was previously diluted with in a diluent solution composed of a 70:30 mixture of methanol and water.

2.2. Sample preparation

The preparation of the solid sample solutions (tablets and suppositories) comprised the homogenisation of 20 tablets or suppositories, after which an amount of the resulting powder or paste equivalent to 16 mg diclofenac was rigorously weighed and dissolved in 50.0 ml of buffer solution. This solution was later filtered and diluted with the same buffer in such a way as to obtain a solution whose expected diclofenac concentration was $5 \times 10^{-5}\ mol\ dm^{-3}$. The liquid sample solutions (injectables) were prepared, after prior homogenisation of the liqubid contained in five ampules, by diluting an appropriate sample aliquot with buffer solution in such a way as to obtain a diclofenac concentration similar to the above mentioned one.

The preparation of tablet and suppository sample solutions according to the reference procedure [28], involved the ultrasonic dissolution with diluent solution of a sample amount corresponding to a final diclofenac concentration of 0.75 mg/ml, for 30 min. These solutions were subsequently filtered through a 0.5 μm porosity filter and used with no other treatment. For injectable formulations, an aliquot from the mixed content of five ampules was diluted with diluent solution, in such a way as to obtain a 0.75 mg/ml sodium diclofenac concentration. This solution was filtered prior to analysis.

2.3. Construction of conventional and tubular electrodes

The polymeric membranes used in the construction of electrodes were prepared by dissolving α-cyclodextrin (1.2% w/w) and tetradodecylammonium bromide (0.4% w/w) in the mediator solvent, 2-nitrophenyloctyl ether (65.6% w/w). Thereafter, the PVC (32.8% w/w) was dissolved in tetrahydrofuran and added to the previous mixture.

Diclofenac-selective electrodes, without reference solution, were constructed in both conventional and tubular configurations following the methodology previously described [29]. The membrane solutions were directly applied on the conductor support, made up of a mixture of epoxi resin (Araldite) with graphite powder [30]. Following preparation of the electrodes, they were put on hold until the tetrahydrofuran was completely evaporated and thereafter placed in a 1×10^{-4} mol dm^{-3} sodium diclofenac solution to condition the membrane.

2.4. Apparatus

A Crison micropH, model 2002 decimillivoltammeter (sensitivity ±0.1 mV) was used to measure the potential differences between a Russel model 90-0029 double-junction AgCl/Ag reference electrode and the indicator electrode. The outer compartment of the reference electrode contained an ammonia–ammonium buffer solution (pH 9.9 and $I = 0.1$ mol dm^{-3}). The pH measurements were performed with a Phillips GAH 110 glass electrode.

To carry out the fluorescence measurements a Gilson model 121 fluorimeter, equipped with a 305–395 nm Gilson 095312 excitation filter, a 430–470 nm Gilson 095442 emission filter and a 9 μl optical volume flow cell, was used. The irradiation, at 254 nm, was accomplished with a Philips TUV 15 W/G15T8 low pressure mercury lamp. The photo-degradation reactor was implemented by coiling a PTFE tubing (200 cm length and 0.8 mm i.d.) around the lamp, which was subsequently placed inside a protecting chamber equipped with a fan to cool the reactor to room temperature. For the same reason, the lamp was only switched on when the sample was in the interior of the photo-reactor.

The determinations by sequential injection analysis were carried out with the multi-task flow-system (Fig. 1), whose mode of functioning was previously described [31]. This was composed of a Gilson Minipuls 3 peristaltic pump (Villier-le-Bell, France), equipped with a PVC propulsion tube of the same brand (1.85 mm i.d.); a six-port rotary valve (RV) from Valco Instruments, model Cheminert C15-3186E (Houston, USA), and a NResearch 161 T031 (Stow, USA) three-way solenoid valve (SV). The different components of the manifold were interconnected with PTFE tubing of 0.8 mm i.d. Some homemade devices such as joint pieces, grounding electrode, supports for tubular and reference electrodes as described elsewhere were also used [32]. The system was computer-controlled through an Advantech PCL 711B interface card, and the control and data acquisition and processing program was developed in QuickBasic language.

Sample analysis by the USP method [28] was carried out in a chromatographic Merck Hitachi system, made up of a pump (model 7100), connected to an Rheodyne injector model 7725i (20 μl loop) and a Waters XTerra^{TM} RP 8 column (3.9 mm × 150 mm), packed with 5 μm beads, and a model 7455 diode-array detector. Data were processed using the same brand software, model D7000.

2.5. Procedures

In the multi-task system (Fig. 1), the holding coil (HC) and the transmission channels between RV and the detection systems were initially filled up with carrier/ionic strength adjuster solution by selecting ports 2/4 and placing the peristaltic pump in propulsion mode. This mode of operation was maintained until a stable baseline was obtained in the two detectors. The instructions required for an analytical determination cycle of diclofenac are defined in Table 1. The first three steps of the calibration procedure and the first two steps of the measurement procedures correspond to the alteration of the chemical nature of the solutions that access the system through the SV. The selection of port 1 (first step of calibration cycle) with the SV activated, enable the filling up of the active access channel with a 1×10^{-4} mol dm^{-3} sodium diclofenac solution for both the potentiometric and fluorimetric calibration procedures. When the SV was not activated, the passive port channel was filled up with carrier solution for the calibration procedure or with sample solution in the case of analytical determinations.

The potentiometric and fluorimetric calibration procedures were carried out by preparing in-line calibration solutions of different concentration [31]. For this effect, the last two steps of the calibration cycle, involving RV ports 1 and 2/4, were sequentially executed four times. Calibration solutions of respective diclofenac concentration 2.5×10^{-5}, 5×10^{-5}, 7.5×10^{-5} and 1×10^{-4} mol dm^{-3} were prepared

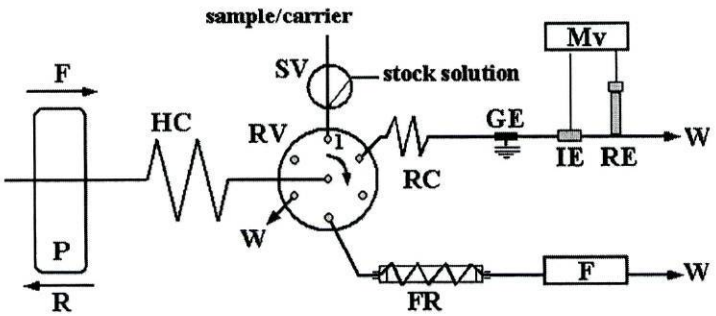


Fig. 1. SIA system for diclofenac determination in pharmaceuticals. P: peristaltic pump; RV: rotary valve; SV: three way solenoid valve; HC: holding coil; RC: reaction coil; GE: ground electrode; IE: diclofenac-selective electrode; RE: reference electrode; Mv: decimilivoltimeter; FR: photoreactor; F: fluorimeter; W: waste.

automatically in the interior of the system for each selection of port 1 by means of the SV on/off cycles. Small standard diclofenac plugs (1×10^{-4} mol dm^{-3}) were aspirated into the HC by activation of SV (SV_{on}) in an alternating mode with plugs of carrier solution when the SV was in the off position (SV_{off}). The mutual dispersion between both solutions during the aspiration stage and during the sending to the detector

Table 1
System operation

RV	SV state[a]	L state	Volume (μl)	Flow-rate (ml/min)	Flow direction	Event
Diclofenac selective electrode calibration						
1	On	–	200	1.5	R	Stock diclofenac solution
1	Off	–	200	1.5	R	Carrier
5	–	–	600	4.0	F	Waste
1	On 25, 50, 75 and 100%	–	400	2.4	R	In-line diclofenac standard preparation
2	–	–	13000	7.9	F	Diclofenac measurement
Diclofenac potentiometric determination						
1	Off	–	200	1.5	R	New sample
5	–	–	400	4.0	F	Waste
1	Off	–	400	2.4	R	Diclofenac sample volume
2	–	–	13000	7.9	F	Diclofenac measurement
Diclofenac fluorimetric calibration						
1	On	Off	200	1.5	R	Stock diclofenac solution
1	Off	Off	200	1.5	R	Carrier
5	–	Off	600	4.0	F	Waste
1	On 25, 50, 75 and 100%	Off	400	2.4	R	In-line diclofenac standard preparation
4	–	Off	780	2.6	F	Diclofenac in the fotoreactor
4	–	On	–	–	–	Diclofenac irradiation during 15 s
4	–	Off	2330	2.0	F	Diclofenac measurement
Diclofenac fluorimetric determination						
1	Off	Off	200	1.5	R	New sample
5	–	Off	400	4.0	F	Waste
1	Off	Off	400	2.4	R	Diclofenac sample volume
4	–	Off	780	2.6	F	Diclofenac in the fotoreactor
4	–	On	–	–	F	Diclofenac irradiation during 15 s
4	–	Off	2330	2.0	F	Diclofenac measurement

Steps for diclofenac determination in pharmaceutical formulations with the SIA system in Fig. 1. RV: rotatory valve; SV: solenoide valve; L: UV lamp; R: reverse; F: forword.

[a] Each SV cycle as 2 s.

enable the simulation of the intercalation of the different standard solutions with the above mentioned concentrations. To obtain the four standards, the SV was activated during 25, 50, 75 and 100% of each on/off cycle time applied to the SV.

For the diclofenac ISE calibration, 400 μl of solution (corresponding to 10 cycles of the SV) were aspirated and sent to the detector at a flow rate of 7.9 ml min^{-1}. For the analytical determinations, port 1 was selected and filled up with the sample solution to be measured after which 400 μl of sample were aspirated to the HC and sent to the detector (port 2) with the same flow rate. For the fluorimetric calibration, 400 μl of solution (corresponding to 10 cycles) were aspirated and sent to the photoreactor. When the sample plug reached the photoreactor, the flow stopped and the sample was irradiated for 15 s, after which it was sent to the detector (port 4) at a flow rate of 2.0 ml min^{-1}. For the analytical determinations, port 1 was selected and filled up with the sample solution to be measured. Following this, 400 μl of sample were aspirated to the irradiation system with fluorimetric detection (port 4) under exactly the same conditions as those previously described.

3. Results and discussion

3.1. Potentiometric determination

The electrode membrane was based on the use of a cyclodextrin that forms inclusion compounds with diclofenac 1:1 [19]. The cyclodextrins are cyclical oligosaccharides with torus-like form, consisting of 6–12 glucose units with an α-D (1–4) linkage, which could form inclusion compounds with several organic molecules of adequate size and polarity. Recently, they have been incorporated in elasticised PVC membranes and used as ionophores in ISEs for the detection of a wide range of alkyl and arylammonium ions, with other electrodes based on cyclodextrins with enantioselectivity being reported in the literature [33]. Based on this knowledge, the construction of a diclofenac selective sensor was proposed, in a first stage with conventional configuration and lately with a tubular configuration, for application in the automated analysis in a multitask flow system.

The general working characteristics of conventional electrodes were evaluated by performing regular calibrations with sodium diclofenac solutions within the concentration range of 5×10^{-7} to 1×10^{-2} mol dm^{-3}, in solutions with adjusted pH and ionic strength and according to the IUPAC recommendations [34]. The electrodes presented good working characteristics namely a wide range of linear response (4×10^{-6} to 1×10^{-2} mol dm^{-3}) with an anionic slope of 57.5 mV per decade, a practical limit of detection of 1×10^{-6} mol dm^{-3}, good reproducibility (0.4 mV per day) and a rapid response time (<20 s). To determine the characteristics of the electrodes in fixed pH solutions, the influence of this parameter on the response of the electrodes was first studied, in solutions of 5×10^{-4} and 5×10^{-3} mol dm^{-3} sodium diclofenac. The different pH conditions were obtained by addition of small volumes of concentrated potassium hydroxide and sulphuric acid solutions. The operational pH range was obtained when the potential values did not vary by more than ±5 mV. As can be observed in Fig. 2, in the range between 8.2 and 12.7 pH units, the electrodes' response is practically constant and independent of pH, since diclofenac was completely ionised in this pH zone. In the pH zones <8.2, there was a precipitation of diclofenac in the form of acid, by protonation of the secondary amine. Also the interference from the H^+ ion causes an oscillation in potential. Considering this behaviour, a buffer solution of ammonia–ammonium sulphate (pH 9.9) was used in the characterisation trials of the electrodes. This solution acted simultaneously as an adjuster of both ionic strength and pH.

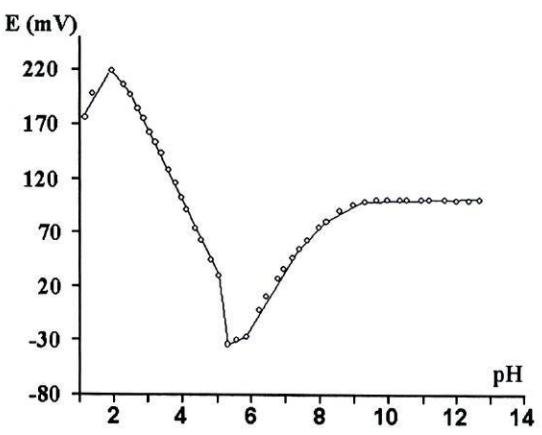


Fig. 2. Reilley diagram for diclofenac selective electrodes in 5×10^{-4} mol dm^{-3} diclofenac solutions ($I = 0.1$ mol dm^{-3}).

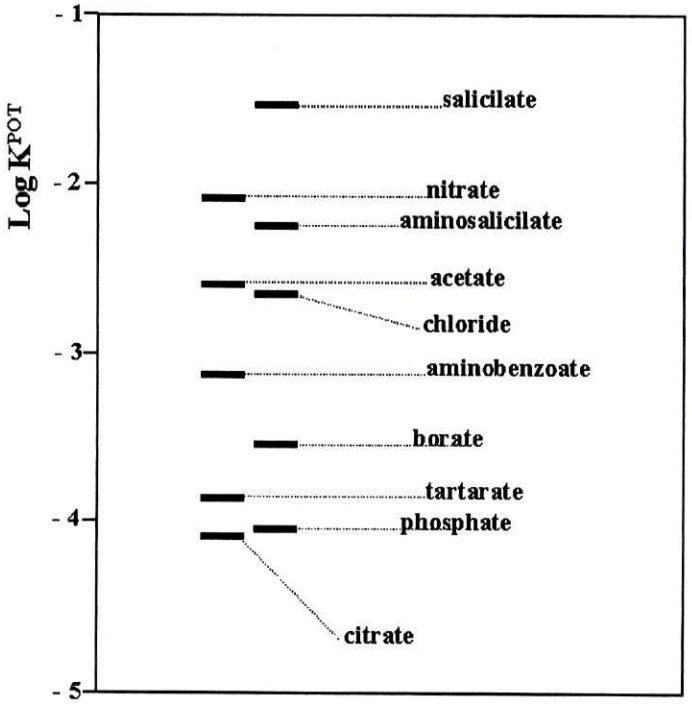


Fig. 3. Diagram representing the log $K^{POT}_{A,B}$ values of the diclofenac selective electrodes. Determinations carried out in 5×10^{-3} mol dm^{-3} main and interferent ion solutions.

The extension of interference of some organic and inorganic anions was evaluated determining the coefficients of potentiometric selectivity ($\log K^{POT}$) by the separated solutions method [34] with the interferent and primary ion at various concentration levels. The sequence of interferents obtained for the units constructed was citrate < phosphate < tartarate < borate < aminobenzoate < chloride < benzoate < acetate < aminosalicilate < nitrate < salicilate. The diagram represented in Fig. 3, when the concentration of interferent and primary ion was 5×10^{-3} mol dm^{-3}, showed that the electrodes constructed did not present significant interferences from the ions studied. It is equally important to refer that the level of interference is possibly related to the charge, hydrophilicity and size of the hydrated ions, which determine its inclusion in the cyclodextrin cavities [35]. No adverse effect on the response of the electrode was observed for up to a 100-fold excess of many pharmaceutical excipients and diluents commonly used for drug formulations such as fructose, glucose, lactose, manitol, starch and carboxymetilcellulose.

The general working characteristics of the tubular detectors were evaluated after coupling it to the SIA system (Fig. 1) and using an ammonia–ammonium sulphate buffer solution (pH 9.9 and $I = 0.1$ mol dm^{-3}) as carrier solution. An optimum injection volume of 400 μl was selected at a flow rate of 7.9 ml min^{-1} to the detector since this conditions enabled the attainment of an analytic signal of comparable intensity to that obtained by the injection of larger volumes. Under these flow conditions the characteristics of ISEs were determined (Table 2). The units presented a Nernstian response in the concentration interval 5×10^{-6} to 1×10^{-2} mol dm^{-3}, with a slope of -56.6 ± 1.0 mV per decade. Relative standard errors of 0.93 and 0.53% were obtained after 10 consecutive injections of two standard solutions of sodium diclofenac of concentrations of 1×10^{-5} and 5×10^{-5} mol dm^{-3}, respectively. The sampling rate was samples per hour.

Having optimised the flow conditions and known the characteristics of the ISEs, the automation of both the in-line ISEs calibration procedure and sample

Table 2
Analytical features of merit of the developed procedures for the determination of diclofenac

	Potentiometric procedure	Photochemical-fluorimetric procedure
Linear range (mol dm^{-3})	5×10^{-6} to 1×10^{-2}	1×10^{-6} to 1×10^{-4}
Detection limit (mol dm^{-3})	–	6×10^{-7}
Pratical limit of detection[a] (mol dm^{-3})	2×10^{-6}	–
Quantification limit (mol dm^{-3})	–	2×10^{-6}
Lower limit of linear range[b] (mol dm^{-3})	5×10^{-6}	–
Regression equation	$mV^c = 56.63 \log C^d + 360.91$	$\text{Log } F^e = 1.041 \log C^d + 6.46$
Quadratic correlation coefficient (R^2)	0.9992	0.9995
R.S.D.[c] (%)	0.93; 0.53	1.82; 0.64
Sampling rate (samples per hour)	33	32

[a] Practical limit of detection determined according to IUPAC recommendations [34].
[b] Lower limit of detection determined according to IUPAC recommendations.
[c] mV: potentiometric signal.
[d] Log C: logarithm of diclofenac concentration (mol dm^{-3}).
[e] Log F: logarithm of fluorescence signal; R.S.D.: relative standard deviation for 10 replicates of a 1×10^{-5} and a 5×10^{-5} mol dm^{-3} diclofenac standard solution.

determination, was carried out. As previously demonstrated [31] the system enable the in-line preparation of calibration solutions from the stock solution using the SV placed in port 1. By means of successive momentary activations of SV during the aspiration through port 1, it was possible to create a stack of small zones of sodium diclofenac stock solution and ionic strength adjuster solution. The aspiration and subsequent flow reversal contributed to the homogenisation of sodium diclofenac concentration over all segments, with the final concentration being determined by the proportion of time during which the SV remains activated. For injection volumes of 400 μl (10 cycles) of sodium diclofenac solutions, analytical signals with an intensity of 95% comparatively to those obtained with the conventional analysis of the same calibration solutions, were obtained. Equally, when the calibration carried out with the 2.5×10^{-5}, 5×10^{-5}, 7.5×10^{-5} and 1×10^{-4} mol dm^{-3} diclofenac standards prepared within the flow system was compared with the calibration carried out with standards prepared manually no difference in the intensity of the obtained analytical signals was observed.

3.2. Photochemical-fluorimetric determination

Diclofenac in its native form presents an excitation maximum at a wavelength of 279 nm and a Stokes-shift of 73 nm [17]. Preliminary batch experiments to evaluate the effect of direct UV light irradiation in diclofenac solutions revealed the formation of photoproducts with increased quantum yields, even with small irradiation times. Irradiation for 30 s of a M mol dm^{-3} diclofenac solution generates a new emission band with a maximum fluorescence of 420 nm, and with an intensity 485 times greater when compared with the diclofenac fluorescence band in the native form (Fig. 4). This behaviour is attributed to the formation of a photoproduct that yields a much more intense fluorescence than that of diclofenac native one.

In the flow studies, it was verified that the irradiation time, volume of sample injected, flow rate and the reaction pH, produced significant differences in the intensity of fluorescence signals. The sample residence time in the photoreactor was the most critical parameter and its effect was evaluated by filling up the reaction coil (RC) with reproducible sample volumes, stopping the flow and placing the lamp in the ON position over increasing time periods. The results obtained indicated that the intensity of fluorescence attained a maximum when the sample was irradiated for a period of 10–30 s. For irradiation times >30 s a decrease in fluorescence was observed. The sample injection volume and flow rate were also studied. A volume of 400 μl and a flow rate of 2.0 ml min^{-1} was selected for posterior experiments as they represented the conditions that corresponded to the best compromise between sampling frequency and signal intensity. The effect of reaction pH was studied by injecting

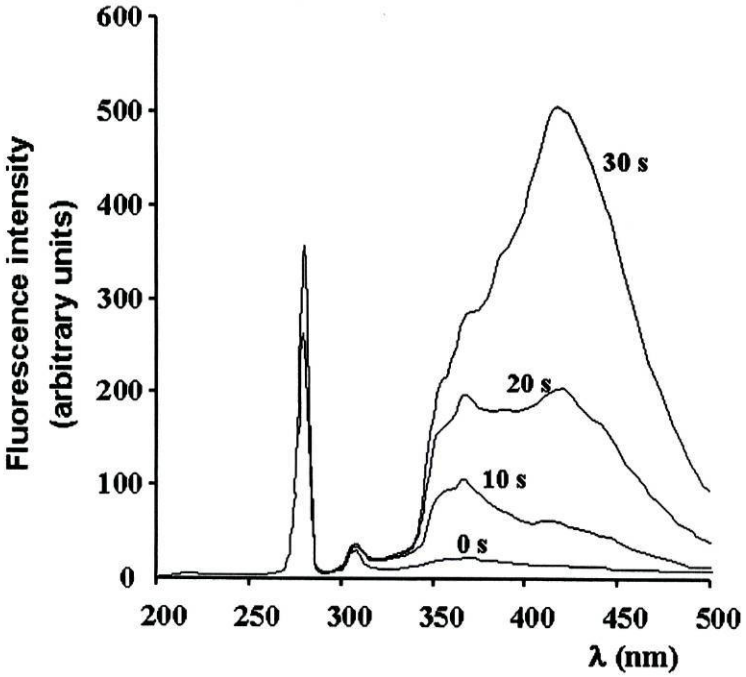


Fig. 4. Effect of irradiation time on the fluorescence intensity of a 1×10^{-4} mol dm^{-3} diclofenac standard solution. Spectra obtained before irradiation, after 10, 20 and 30 s irradiation.

a 5×10^{-5} mol dm^{-3} solution prepared in HCl–KCl (pH 2), citric acid–sodium citrate (pH 3, 4, 5, 6); KH_2PO_4–K_2HPO_4 (pH 7), ammonia–ammonium sulphate (pH 8, 9, 10, 11) buffer solutions, while using the same buffers as carriers solutions. The intensity of obtained signals was higher at alkaline pH and constant at pH > 9, demonstrating that this parameter has a major influnce in the reaction kinetic. Accordingly, in the following experiments likewise what happened with the potentiometric procedure an ammonia–ammonium buffer of fixed pH (pH 9.9) was used as carrier solution. Other analytical figures of merit for the determination of diclofenac are presented in Table 2. These data was obtained after carrying out at least three measurements at distinct concentration levels and by using the previously fixed

Table 3
Obtained results of diclofenac pharmaceuticals formulations (mg diclofenac/unit)

Samples	Reference method[a]	Potentiometric determination[a]	R.D. (%)[b]	Photochemical-fluorimetric determination[a]	R.D. (%)[b]	Average results	R.D. (%)[b]
FenilV®dispersível	46.9 ± 0.3	46.5 ± 0.9	−0.9	46.4 ± 0.3	−1.0	46.5	−0.9
Diclotec®	51.89 ± 0.09	52 ± 1	0.2	52.4 ± 0.3	1.0	52	0.2
Diclofenac merck®50	49.6 ± 0.3	50 ± 1	0.8	50.7 ± 0.3	2.2	50	0.8
Voltaren®retard 100	99.3 ± 0.4	99.9 ± 0.7	0.6	100.6 ± 0.3	1.3	100.2	0.9
Fenil®-V 75 mg/2 ml	74.7 ± 0.3	74 ± 1	−0.9	75.4 ± 0.5	0.9	75	0.4
Voltaren®75 mg/3 ml	74.7 ± 0.5	75 ± 1	0.4	74.5 ± 0.5	−0.3	75	0.4
Flameril®100 suppository	99.6 ± 0.5	99.8 ± 0.2	0.2	99.5 ± 0.6	−0.1	99.7	0.1

[a] Average of four determinations ± S.D.
[b] Relative deviation to the reference method.

hydrodynamic conditions. The calibration curves obtained showed a linear response in a concentration interval of two-orders of magnitude between 1×10^{-6} and 1×10^{-4} mol dm^{-3}. The repeatability of the described procedure was calculated by injecting diclofenac solutions of 1×10^{-5} and 5×10^{-5} mol dm^{-3} and carrying out 10 replicates. The influence of compounds that can be found in pharmaceutical formulations was studied by preparing diclofenac solutions containing a quantity of the potential interferent for up to 100-fold regarding diclofenac concentration. No interferences were detected from the excipients used in the manufacture of the studied formulations.

3.3. Analytical control of pharmaceutical formulations

Sodium diclofenac determinations were performed in various pharmaceutical formulations by the two proposed methodologies. The instructions required for the analytical cycle of diclofenac determination are defined in Table 1.

In parallel, the samples were also determined by the reference method [28] aiming to evaluate the accuracy of the results obtained by these methodologies (Table 3). The application of the Student *t*-test for the pairs of values obtained illustrated the absence of statistical differences at a confidence level of 95% for the results obtained ($t = 0.157$ for the potentiometric/reference procedure; $t = 0.918$ for the fluorimetric/reference procedure). After evaluation of the relative errors corresponding to sample analysis, it is possible to conclude that the average of the results obtained by the two methodologies is more accurate since random errors are minimised.

4. Conclusions

This analytical system, in addition to operating automatically, is robust, rapid and enables the determination of diclofenac by two procedures based on two independent methodologies. The SIA system with accuracy assessment proved to be useful in the large scale quality control of diclofenac in pharmaceutical products, since it permits the evaluation of quality of results in real time and with an elevated sampling frequency.

Acknowledgements

The authors wish to thank Fundação para a Ciência e Tecnologia for financial support through the Praxis/P/QUI/10109/1998. One of the authors (A.M.P.) wishes to thank the Praxis Program for the Ph.D. grant (Praxis/BD/19793/99).

References

[1] J.M. Calatayud, Flow Analysis of Pharmaceuticals: Automation in the Laboratory, Taylor and Francis, London, 1996.
[2] G.D. Christian, Analyst 119 (1994) 2309.
[3] A.M. Pimenta, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro, Anal. Chim. Acta 438 (2001) 31.
[4] C.C. Oliveira, R.P. Sartini, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, Anal. Chim. Acta 350 (1997) 31.
[5] Martindale, Thirty-second Edition, Pharmaceutical Press, Taunton, Massachusetts, 1999, p. 31.
[6] I. Kramancheva, I. Dobrev, L. Brakalov, A. Andreeva, Anal. Lett. 30 (1997) 2235.
[7] J.C. Botello, G. Pérez-Caballero, Talanta 42 (1995) 105.
[8] B.V. Kamath, K. Shivram, G.P. Oza, S. Vangani, Anal. Lett 26 (1993) 665.
[9] C.S. Sastry, A.R.M. Rao, T.N.V. Prasad, Anal. Lett. 20 (1987) 349.
[10] Z.A. El Sherif, M.I. Walash, M.F. El-Tarras, A.O. Osman, Anal. Lett. 30 (1997) 1881.
[11] S. Agatonovi-Kuštrin, L. Ivanovi, D. Radulovi, M. Vasiljevi, Analyst 116 (1991) 753.
[12] C.S.P. Sastry, A.S.R.P. Tipirneni, M.V. Suryanarayana, Analyst 114 (1989) 513.
[13] Y.K. Agrawal, K. Shivramchandra, J. Pharm. Biomed. Anal. 9 (1991) 97.
[14] P. Ortega-Barrales, A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández-De Córdova, A. Molina-Diaz, Anal. Sci. 15 (1999) 985.
[15] B.V. Kamath, K. Shivram, A.C. Shah, J. Pharm. Biomed. Anal. 12 (1994) 343.
[16] L.A. Carreira, M. Rizk, Y. El-Shabrawy, N.A. Zakhari, S.S. Toubar, J. Pharm. Biomed. Anal. 13 (1995) 1331.
[17] P.C. Damiani, M. Bearzotti, M.A. Cabezón, A.C. Olivieri, J. Pharm. Biomed. Anal. 20 (1999) 587.
[18] J.A. Arancibia, G.M. Escandar, Analyst 124 (1999) 1833.
[19] J.A. Arancibia, M.A. Boldrini, G.M. Escandar, Talanta 52 (2000) 261.
[20] S.S.M. Hassan, R.M. Abdel-Aziz, M.S. Abdel-Samad, Analyst 119 (1994) 1993.
[21] O. Çakirer, E. Kiliç, O. Atakol, A. Kenar, J. Pharm. Biomed. Anal. 20 (1999) 19.
[22] L. González, G. Yuln, M.G. Volonté, J. Pharm. Biomed. Anal. 20 (1999) 487.
[23] D. Grandjean, J.C. Beolor, M.T. Quincon, E. Savel, J. Pharm. Sci. 78 (1989) 247.
[24] M.E. Abdel-Hamid, L. Novotny, H. Hamza, J. Pharm. Biomed. Anal. 24 (2001) 587.

[25] A.A. Fattah, J.P. El-Khateeb, S.A.A. Raxeg, M.S. Tawakkol, Spectrosc. Lett. 21 (1988) 533.
[26] M.C.B.S.M. Montenegro, J.L.F.C. Lima, I.L. Mattos, G.O. Neto, J.A.G. Neto, E.A.G. Zagatto, Talanta 40 (1993) 1563.
[27] H. Chen, J. Zhu, X. Cao, Q. Fang, Analyst 123 (1998) 1017.
[28] U.S. Pharmacopeia 24 National Formulary 19, The United States Pharmacopeia Convention Inc., Rochkville, 1999, p. 546.
[29] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, A.M.R. Silva, Il Farmaco 45 (1990) 901.
[30] J.L.F.C. Lima, M.C.B.S.M. Montenegro, A.M.R. Silva, J. Pharm. Biomed. Anal. 8 (1990) 701.
[31] R.N. Fernandes, M.G.F. Sales, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro, J. Pharma. Biomed. Anal. 25 (2001) 713.
[32] S. Alegret, J. Alonso, J. Bartroli, J.M. Paulis, J.L.F.C. Lima, A.A.S.C. Machado, Anal. Chim. Acta 164 (1984) 147.
[33] A. Ferancová, J. Labuda, Fresenius J. Anal. Chem. 370 (2001) 1.
[34] IUPAC, Analytical chemistry division commission on electro-analytical chemistry, recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes, Pure Appl. Chem. 66 (1994) 2527.
[35] R.V. Chamberlain II, K. Slowinska, M. Majda, P. Bühlmann, H. Aoki, Y. Umezawa, Langmuir 16 (2000) 1388.

CAPÍTULO V- DETERMINAÇÃO DE CLORETOS

CHLORIDE-SELECTIVE MEMBRANE ELECTRODES AND OPTODES BASED ON AN INDIUM (III) PORPHYRIN FOR THE DETERMINATION OF CHLORIDE IN A SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS SYSTEM

ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY: SUBMITED

CHLORIDE-SELECTIVE MEMBRANE ELECTRODES AND OPTODES BASED ON AN INDIUM (III) PORPHYRIN FOR THE DETERMINATION OF CHLORIDE IN A SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS SYSTEM

Adriana M. Pimenta[1], Alberto N. Araújo[1], Maria Conceição B.S.M. Montenegro[1]*, Celio Pasquini[2], Jarbas J.R. Rohwedder[2] and Ivo M. Raimundo Jr.[2]

[1]REQUIMTE, Dep. Química-Física, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050 Porto, Portugal

[2]Instituto de Química – UNICAMP – CP 6154 – CEP 13084-971 – Campinas – Brazil

Abstract

Two quasi-independent methods for potentiometric and optical determination of chloride were simultaneously implemented in a flow system, providing real-time assessment of the quality of results. A potentiometric and an optical polymeric membrane doped with the same indium (III) octaethyl-porphyrin were used as sensor ionophore. The working mechanism and the analytical characteristics of these porphyrin-based sensors with respect to dynamic range, selectivity, repeatability and lifetime are discussed. These sensors, utilised as detectors in a flow system, were applied for the analysis of chloride in pharmaceutical solutions. The quality of the results obtained was evaluated by comparison with those provided by the reference method and no significant statistical differences at the 95% confidence level were observed. The simultaneous attainment of two measurements permitted the standardisation of results in real time and the detection of failures in the procedure.

Keywords: Sequential injection analysis; real-time accuracy assessment; chloride-selective electrode; chloride optode; indium (III) octaethyl -porphyrin

*Corresponding author: Tel.: +351-222087132; Fax: +351-222003977; e-mail address: mcbranco@mail.ff.up.pt (Maria Conceição B.S.M. Montenegro)

1. Introduction

The accuracy assessment concept in flow analysis has been proposed and applied in the determination of several analytes in large scale analysis [1-4]. In these systems, the injected sample is processed by two quasi-independent analytical methods, thus enabling intrinsically more accurate results. As two measurements of the same analyte of the injected sample are obtained at the same time their comparison can be exploited for accuracy assessment. If the two measurements are similar the quality of the results is considered good. If the two measurements disagree, failure of the system performance and/or a matrix interference can be inferred. Taking into account that random errors should not affect both measurements with the same sign and magnitude and that the systematic deviations are different in both methods, the value corresponding to their mean is a more accurate estimate of the analyte concentration in the sample. Other figures of merit of flow systems implementing this concept are the low consumption of reagents and high sampling rate, thus rendering good analytical tools for process control [5]. In this paper, the application of the concept of real time accuracy assessment in a SIA system is proposed by using two chemical sensors based on the same recognition element, employing, however, two different transduction procedures (potentiometric and optical). The recognition membranes were composed of an indium (III) porphyrin immobilised on polyvinyl chloride (PVC) film, and their analytical usefulnesses were evaluated in the determination of chloride in pharmaceutical formulations. Indium (III) porphyrins have been used as anion carriers for ion-selective electrodes [6-9] and optodes [10-14] based on polymeric membranes, giving enhanced responses toward chloride ion. Moreover, they exhibit selectivity profiles which deviate significantly from the Hofmeister sequence, due to the preferred axial site coordination of anions with the metallic centre of the metalloporphyrine structure.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All solutions were prepared with deionised water (conductivity < 0.1 μS cm^{-1}) and analytical grade reagents were used without further purification.

The ionophore chloro (2,3,7,8,12,13,17,18-octaethylporphyrinato) indium (III) (In(OEP)Cl) was synthesised via metallation of the corresponding free porphyrin (Aldrich 25,240-9) with the metal (III) salt (Aldrich 33,406-5), which was carried out by reflux in glacial acetic acid, according to the procedure described previously [15,16]. Metalloporphyrin purity was confirmed by thin layer chromatography. Membrane components poly(vinyl chloride) (PVC), 4´,5´dibromofluorescein octadecyl ester (ETH 7075), potassium tetrakis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]borate (KTFPB), o-nitrophenyloctyl ether (o-NPOE), and bis(2-ethylhexyl)sebacate (DOS) were used as received from Fluka. The solid polymers were dissolved in tetrahydrofuran (THF, Merck-1.09731) for preparation of the membranes.

Simultaneous adjustment of pH and ionic strength was accomplished by using an 0.05 mol dm^{-3} NaH_2PO_4 buffer solution (pH = 4.2) as carrier solution in the flow system.

The chloride reference solutions were prepared by appropriate dilution, with the buffer solution, of a 0.1000 mol L^{-1} NaCl stock solution. The silver nitrate titrant solution used in the reference procedure [17] was standardised against a chloride standard solution by potentiometric titration.

The determination of chloride content in pharmaceutical formulations by the proposed and reference procedures was performed after appropriate sample dilution in order to obtain final concentrations of ca 1.0×10^{-3}, 2.5×10^{-2}, 1.0×10^{-2} mol dm^{-3} of chloride ion. Samples were diluted with a 0.05 mol dm^{-3} NaH_2PO_4 buffer solution.

2.2. Construction of the ion-selective electrodes

The polymeric membranes used for the construction of potentiometric detectors were prepared by dissolving In(OEP)Cl (1.0 % w/w) and KTFPB (0.4 % w/w = 32 % mol, relative to metalloporphyrin) in the mediator solvent, o-NPOE (65.6 % w/w). Thereafter, the PVC (33.0 % w/w) was dissolved in THF and added to the previous mixture. Chloride-selective electrodes, without an inner reference solution, were constructed in a tubular configuration as previously described [18]. The membrane solution was directly applied on the conductor support, made up of a mixture of epoxi resin (Araldite®) with graphite powder [19], and the THF solvent was left to evaporate completely in air. Finally, the electrode was placed in a 1.0 $\times$ 10^{-4} mol dm^{-3} sodium chloride solution for membrane hydration.

2.3. Construction of the ion selective optode

The optical chloride membrane was composed of 30 % w/w PVC, 1.8 % w/w of In(OEP)Cl, 1.0 % w/w of ETH 7075 and 67.2 % w/w of DOS. Blank reference membranes (without ionophore and chromoionophore) with similar composition (30 % w/w of polymer and 70 % w/w of DOS) were also prepared. The film casting solutions were prepared by dissolving a total of 200 mg of membrane components in 2 mL of THF. Optical sensing membranes were cast from these solutions on to glass slides (9 $\times$ 40 mm, 1 mm thickness for batch measurements, and 18 $\times$ 18 mm, 1 mm thickness for flow measurements) by spin coating at 2000 rpm. The THF was allowed to evaporate overnight, leaving a thin polymer film attached to the glass slide.

2.4 Apparatus

A micropH decimillivoltammeter (Crison model 2002, sensitivity ± 0.1 mV) was used to measure the potential differences between a double-junction AgCl/Ag reference electrode (Russel model 90-0029) and the indicator electrode. The outer compartment of the reference electrode was filled with a 0.05 mol dm^{-3} NaH_2PO_4 solution.

Batch UV–Vis absorbance measurements were made on a UV/VIS double beam spectrophotometer (Lambda 6B, Perkin-Elmer), with the polymer film coated glass slides placed in a commercial cubic quartz cell (1×1×4 cm) containing the test solution. The films were soaked for 20 minutes in 0.05 mol dm^{-3} NaH_2PO_4 solution (pH 4.2) before the measurements. Flow absorbance measurements were made on a UV/VIS spectrophotometer (Jenway) using a flow-through cell with a volume of 150 μl and a pathlength of 3 mm. Two identical membranes attached on their respective glass slides were mounted in the flow-through cell and placed in the sample beam. Absorbances were measured at 530 nm.

Sequential injection analysis determinations were carried out with the multi-task flow-system (Fig. 1), whose mode of functioning has been described previously [20]. This system was composed of a Gilson Minipuls 3 peristaltic pump (Villier-le-Bell, France), equipped with a PVC propulsion tube (Gilson, 1.30 mm internal diameter); a six-port rotary valve (RV) from Valco Instruments, model Cheminert C15-3186E (Houston, USA); and a NResearch 161 T031 (Stow, USA) three-way solenoid valve (SV). The components of the manifold were interconnected with PTFE tubing of 0.8 mm internal diameter. Home-made devices, such as joint pieces, grounding electrode, and supports for tubular and reference electrodes were also employed and constructed as described elsewhere [21]. The system was controlled by a microcomputer through an Advantech PCL 711B interface card. Software for control of the system and data acquisition was written in Microsoft QuickBasic 4.5.

The reference procedure [17] for the determination of chloride consisted of a potentiometric titration with a silver nitrate titrant solution, using as a detector a silver electrode with a homogeneous crystalline membrane, constructed according to Ferreira et al. [22].

2.5. Procedures

In the multi-task system (Fig. 1), the holding coil (HC) and the transmission channels between RV and the detection systems were initially filled with carrier / ionic strength adjuster solution by selecting the ports 2/4 (potentiometric / optical detection systems, respectively) and setting the peristaltic pump in the propulsion mode, which was maintained until stable baselines were obtained for the two detectors. The instructions required for an analytical determination cycle of chloride are defined in Table 1. The first three steps of the calibration procedures and the first two steps of the determination procedures for both detection systems correspond to the change of the solutions that access the flow system through the SV valve. The selection of port 1 of RV (first step of calibration cycle), while the SV valve was turned on, enabled the filling up of the active access channel with a 2.0×10^{-3} mol dm^{-3} sodium chloride stock solution for the electrode calibration procedure or with a 5.0×10^{-2} mol dm^{-3} sodium chloride stock solution for the optode calibration procedure. When the SV valve was off, the passive port channel was filled either with carrier solution (for the calibration procedure) or with sample solution (in the case of analytical determinations).

The electrode and optode calibration procedures were carried out by preparing in-line reference solutions of different concentrations [20], as described in the last two steps of the calibration procedures shown in Table 1. Each reference solution was prepared by aspirating into the holding coil, through port 1 of RV, appropriate aliquots of carrier and stock chloride solutions, by means of on/off cycles of SV valve. In the calibration of the potentiometric detector, a 2.00×10^{-3} mol dm^{-3} chloride stock solution was employed, as pointed out above. Five on/off cycles of SV valve, in which SV valve was turned on for 25, 50, 75 and 100 % in

each cycle, permitted that a total of 375 μL of carrier / chloride stock solutions were aspirated into the holding coil, producing 5.00×10^{-4}, 1.00×10^{-3}, 1.50×10^{-3}, 2.00×10^{-3} mol dm^{-3} chloride reference solutions, respectively. Thereafter, the mixture zone was pumped towards the detector through port 2 of RV at a flow rate of 6.0 mL min^{-1}. For optode calibration, 15 on/off cycles of SV valve were performed, aspirating into the holding coil a total volume of 650 μL, which was subsequently pumped towards the detector through port 4 of RV at a flow rate of 2.7 mL min^{-1}. When the mixture zone reached the optode, the flow was stopped for 50 s and, after signal acquisition, the solution was discharged. In the optode calibration, by using a 5.00×10^{-2} mol dm^{-3} chloride stock solution, 1.25×10^{-2}, 2.50×10^{-2}, 3.75×10^{-2}, 5.00×10^{-2} mol dm^{-3} reference solutions were prepared, by turning on the SV valve for 25, 50, 75 and 100% of the time of each cycle, respectively.

In the determination step, 375 μL and 650 μL of sample solution were aspirated into the holding coil for potentiometric and optical detection, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation of the sensing membranes

In order to obtain sensing membranes with the best characteristics under flow conditions, different formulations were tested by varying the mediator solvent and the ionic additive. For potentiometric purposes, a membrane composed of 1.0 % w/w In(OEP)Cl, 0.4 % w/w KTFPB, 65.6 % w/w o-NPOE and 33 % w/w PVC was selected. As previously shown [9], the incorporation in the membrane composition of an anionic lipophilic additive in the proportion of 32% mol/mol relative to metalloporphyrin, resulted in a significant improvement of slope and selectivity of the electrodes when compared with those in which the additive is absent.

For optical membrane preparation, the more lipophilic mediator solvent (DOS) revealed better transparency and a lower leaching profile than o-NPOE. For the same reasons the ETH 7075 chromoionophore was selected instead of other ones previously mentioned [10]. A film composed of 1.8 % w/w In(OEP)Cl, 1.0 % w/w ETH 7075, 67.2 % w/w DOS and 30 % w/w PVC was finally selected.

3.2. Potentiometric Determination

The performances of the ion selective membranes developed were assessed by using the sequential injection system depicted in Fig. 1, in which a 0.05 mol dm^{-3} NaH_2PO_4 solution (pH = 4.2 and I = 0.05 mol dm^{-3}) was used as carrier solution. A reference/sample solution volume of 375 μl and a flow rate of 6.0 mL min^{-1} were selected, as these conditions enable the attainment of an analytic signal as intense as those obtained by sampling larger volumes, which correspond to the stationary state. The membrane response for different anions was evaluated and the potentiometric selectivity coefficients were determined by the separate solutions method [23], fixing the concentrations of chloride and interfering ions at 5.0×10^{-3} mol dm^{-3}. The results listed in Table 2 demonstrate that the electrodes developed follow the typical behaviour of metalloporphyrin-based sensors, presenting a selectivity which deviates from the classical Hofmeister sequence, as they are more selective towards chloride than to more lipophilic ions, such as perchlorate and nitrate. Moreover, when compared with other electrodes based on ion exchangers [24], they reveal better selectivity characteristics for salicylate, thiocyanate and iodide ions. Considering the use of In (III) porphyrins in polymeric membranes, it was also shown that the incorporation of a lipophilic anionic additive induces an anionic charged response mechanism, enhancing the performance and selectivity towards chloride ions [7]. The electrodes also exhibit super-Nernstian calibration curves for chloride ions, within the concentration range from 1.00×10^{-5} to 1.00×10^{-2} mol dm^{-3}, with a slope of – 87.5 ± 1.1 mV per decade, as shown in Fig. 2. This

super-Nernstian behaviour is explained by the dimer-monomer equilibrium of the porphyrin into the organic phase of the sensor membrane [9, 25]. In the absence of the analyte, the porphyrin is positively charged in the membrane, forming with hydroxide ion a bridged dimeric porphyrin (In (III) $[OEP]_2$ $(OH)^+$), with the borate ion acting as the counter ion. However, in the presence of anions which compete for axial bonding with metal centre, the dimeric form is broken yielding porphyrin monomers. The repeatability of the potentiometric detection system was evaluated by processing ten replicates of chloride reference solutions with concentrations of 5.00×10^{-5} mol dm^{-3} and 1.00×10^{-2} mol dm^{-3}, which provided relative standard deviations of 0.64 and 0.29 %, respectively. The flow system allowed a frequency of 60 samples per hour and the response of the ion selective membrane remained constant for at least four months.

3.3. Optical Determination

Indium (III) porphyrins, which were firstly used as sensors for potentiometric detection [6-9], have been also exploited in the development of optical sensors [10-14]. In the present work, a PVC-based membrane, doped with In(OEP)Cl (ionophore) and with a dibromofluoresceine lipolphilic derivative (pH indicator) was assessed. When the membrane is immersed in a chloride solution (prepared in phosphate buffer, pH 4.2), the simultaneous co-extraction of the anion and proton occurs in order to assure the electroneutrality of the membrane. As a result, the protonation of the pH indicator is observed, leading to a change in the absorbance spectrum of the membrane. The equilibrium mechanism can be described as:

$$In(OEP) - Ind_m + H_{aq}^{+} + A_{aq}^{-} \Leftrightarrow In(OEP) - A_m + HInd_m$$

where Ind_m represents the anionic form of the indicator linked to In(OEP) in the absence of the analyte, and $HInd_m$ represents the protonated form of the indicator after the co-extraction into the membrane of the proton H_{aq}^+ and the anion A_{aq}^-.

Fig. 3 depicts the absorbance spectra of the sensing membrane in the presence and absence of chloride solution prepared in phosphate buffer (pH= 4.2). In the absence of the analyte, the spectrum presents an intense shoulder around 530 nm that is probably due to the bonding established between the phenol group of the pH indicator and the porphyrin central atom. However, in the presence of chloride, or other anions that also compete for the axial bonding site, the indicator is released to the bulk of the sensing membrane in the protonated form, decreasing, as a consequence, the absorbance in the region around 530 nm.

After selection of the optimum wavelength for optical transduction, the performances of the optodes developed were evaluated employing the sequential injection flow system. The flow-through cell was assembled by placing two sensing membranes between two black acrylic supporting blocks, separated by a silicone spacer containing two drilled tubular entrances. The flow cell was then placed in the sample compartment of the spectrophotometer and connected to port 4 of RV. As described in the experimental section, 650 μl of the analyte solution were aspirated into the holding coil, propelled towards the detector and the flow was stopped for 50 s when the sample zone reached the flow cell. By this way, an absorbance signal with an intensity of 95% of the corresponding signal obtained in batch conditions was attained. As can be seen in Fig. 4, a dynamic range from 1.00×10^{-3} to 1.00 mol dm^{-3} for chloride ions was obtained, by performing a calibration using reference chloride solutions prepared in phosphate buffer (pH 4.2). The optical selectivity coefficients against several anionic species were assessed by the separated solutions method for α values of 0.5 [26]. As shown in Table 2, except for a few anions, the membrane presented a selectivity pattern similar to those for the potentiometric membrane, regarding the lipophilic characteristics of the interfering species. The difference probably can be related to the strength of the ETH ligand and/or the mediator solvent which were used in membrane

preparation. The repeatability of the optical detection system was evaluated by processing 10 replicates of chloride solutions with concentrations of 1.00×10^{-2} mol dm^{-3} and 1.00×10^{-1} mol dm^{-3}, which provided relative standard deviations of 0.96 and 0.52 %, respectively. The analytical frequency was 14 samples per hour. The lifetime of the optode was shorter than of its potentiometric counterpart, it being necessary to replace the membranes after four working days, as they became disrupted.

3.4. Analytical Control of Pharmaceutical Formulations

Chloride determinations were performed in various pharmaceutical preparations by employing the two proposed methods, according to the procedures summarised in Table 1. Furthermore, the determinations of chloride were also carried out by the reference method [17], aimed at evaluating the accuracy of the results obtained by these methods, as shown in Table 3. The application of the *Student t-paired* test indicated the absence of statistical differences at a confidence level of 95% for the results obtained (t = 1.160 for the potentiometric/reference procedures; t = 0.514 for the optical/reference procedures). After evaluating the relative deviations achieved in the analysis of the samples, it can be concluded that averaging the values obtained by the two methods provide more accurate results, as random errors are minimised.

4. Conclusions

Sensing membranes based on In(III)octaethyl-porphyrins, besides presenting high selectivity for chloride ions, were of simple preparation and easily coupled to a sequential injection system for analytical purposes. The procedures developed enabled the accomplishment of chloride determination in pharmaceuticals by two different transduction techniques, saving costs with respect to reagent comsuption and sample pre-treatment. The

implementation of the two quasi-simultaneous detection systems provides both real-time accuracy assessment and failure detection in large scale analysis.

Acknowledgments

The authors thank Nuno Milhazes for the synthesis and purification of the metalloporphyrin. One of the authors (A.M.P.) wishes to thank the Praxis Program for a Ph.D. grant (Praxis/BD/19793/99). Authors are also grateful to Professor C.H. Collins for manuscript revision and to CAPES (Brazil) and ICCTI (Portugal) for financial support.

References

1. Oliveira CC, Sartini RP, Zagatto EAG, Lima JLFC (1997) Anal Chim Acta 350: 31-36

2. Zagatto EAG, Vicente S, Oliveira CC, Sartini RP, Lima JLFC (1998) J. Flow Injection Anal 15: 226-233

3. Pimenta AM, Araújo AN, Montenegro MCBSM (2001) Anal Chim Acta 438: 31-38

4. Pimenta AM, Araújo AN, Montenegro MCBSM (2002) Anal Chim Acta 470: 185-194

5. Pimenta AM, Araújo AN, Montenegro MCBSM (2002) J Pharm Biomed Anal 30: 931-937

6. Park SB, Matuszewski W, Meyerhoff ME, Liu YH, Kadish KM (1991) Electroanalysis 3: 909-916

7. Bakker E, Malinowska E, Schiller RD, Meyerhoff ME (1994) Talanta 41: 881-890

8. Steinle ED, Schaller U, Meyerhoff ME (1998) Anal Sci 14: 79-84

9. Malinowska E, Niedziólka J, Meyerhoff ME (2001) Anal Chim Acta 432: 67-78

10. Wang E, Meyerhoff ME (1993) Anal Chim Acta 283: 673-682

11. Wang E, Meyerhoff ME (1993) Anal Lett 26: 1519-1533

12. Barker SLR, Shortreed MR, Kopleman R (1997) Anal Chem 69: 990-995

13. Barker SLR, Thorsrud BA, Kopleman R (1998) Anal Chem 70: 100-104

14. Wang E, Romero C, Santiago D, Syntilas V (2001) Anal Chim Acta 433: 89-95

15. Bhatti M, Bhatti W, Mast E (1972) Inor Nucl Chem Lett 8: 133-137.

16. Buchler J, Dolphin D (1978) (eds) The Porphyrins, Academic Press, New York

17. Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD (1999) (eds) Standard methods for the examination of water and wastewater 20th Edition, American Public Health Association, Washington DC

18. Lapa RAS, Lima JLFC, Silva AMR (1990) Il Farmaco 45: 901-913

19. Lima JLFC, Montenegro MCBS, Silva AMR (1990) J Pharm Biomed Anal 8: 701-704

20. Fernandes R.N., Sales MGF, Reis BF, Zagatto EAG, Araújo AN, Montenegro MCBSM (2001) J Pharm Biomed Anal 25: 713-720

21. Alegret S, Alonso J, Bartroli J, Paulis JM, Lima JLFC, Machado AASC (1984) Anal Chim Acta 164: 147-152

22. IMPLVO Ferreira, JLFC Lima, AOS Rangel (1994) Food Chem 50: 211-217

23. Buck RP, Lindner E (1994) Pure Appl Chem 66: 2527-2536.

24. Ozawa S, Miyagi H, Shibata Y, Oki N, Kunitake T, Keller WE (1996) Anal Chem 68: 4149-4152

25. Steinle ED, Amemiya S, Buhlmann P, Meyerhoff ME (2000) Anal Chem 72: 5766-5773

26. Bakker E, Buhlmann P, Pretsch E (1997) Chem Rev 97: 3083-3132

Table 1. Steps for chloride determination in pharmaceutical formulations with the SIA system depicted in Fig. 1. RV = rotary valve; SV = solenoid valve; R = reverse; F = forward.

RV	SV state[1]		Volume (μL)	Flow-rate (mL/min)	Flow direction	Event
Chloride selective electrode calibration						
1	ON		200	1.5	R	Stock chloride solution
1	OFF		200	1.5	R	Carrier solution
5	-		600	4.0	F	Waste
1	ON	25 % 50 % 75 % 100 %	375	2.4	R	In-line chloride reference solution preparation
2	-		6000	6.0	F	Chloride measurement
Chloride potentiometric determination						
1	OFF		200	1.5	R	New sample
5	-		400	4.0	F	Waste
1	OFF		375	2.4	R	Chloride sample volume
2	-		6000	6.0	F	Chloride measurement
Chloride optode calibration						
1	ON		200	1.5	R	Stock chloride solution
1	OFF		200	1.5	R	Carrier solution
5	-		600	4.0	F	Waste
1	ON	25 % 50 % 75 % 100 %	650	1.3	R	In-line chloride reference solution preparation
4	-		700	1.4	F	Chloride solution in the flow cell
4	-		-	-	-	Flow stopped for 50s
4	-		6750	2.7	F	Chloride measurement
Chloride optical determination						
1	OFF		200	1.5	R	New sample
5	-		400	4.0	F	Waste
1	OFF		650	2.3	R	Chloride sample volume
4	-		700	1.4	F	Chloride solution in the flow cell
4	-		-	-	F	Flow stopped for 50s
4	-		6750	2.7	F	Chloride measurement

[1]each SV cycle of 2 s.

Table 2. Anion selectivity coefficients for the ion selective electrode and for the optical sensing membrane, measured in phosphate buffer solution at pH 4.2.

Anions	[a]Log $K_{Cl,Y}^{Pot}$	[b]Log $K_{Cl,Y}^{Opt}$
	In (OEP) Cl ISE	In (OEP) Cl / ETH7075 optode
Cl^-	0	0
Sal^-	0.96	0.94
SCN^-	0.88	0.62
I^-	0.60	0.78
Br^-	0.08	0.17
NO_2^-	0.45	-0.67
OAc^-	-0.94	[c]---
ClO_4^-	-0.87	[c]---
NO_3^-	-1.3	[c]---
F^-	-1.9	[c]---

[a] log $K_{Cl,Y}^{Pot}$ calculated at 5.00×10^{-4} mol dm^{-3} Cl^- and interferent ion solution;
[b] log $K_{Cl,Y}^{Opt}$ calculated at $\alpha = 0.5$;
[c] no interference was observed.

Table 3 Results obtained for chloride determinations in pharmaceuticals formulations (g chloride / 100 mL solution)

Samples	Reference Method[1]	Potentiometric Determination[1]	R.D. (%)[2]	Optical Determination[1]	R.D. (%)[2]	Average results	R.D. (%)[2]
Maia Lab	0.565±0.010	0.574±0.012	1.6	0.560±0.008	-0.9	0.567	0.4
Glucosteril	0.583±0.010	0.567±0.012	-2.7	0.598±0.010	2.6	0.583	0.0
Fresenius	0.579±0.007	0.587±0.011	1.4	0.565±0.009	-2.4	0.576	-0.5
Mustela	0.585±0.004	0.567±0.012	-3.1	0.589±0.012	0.7	0.578	-1.2
Dextran	0.579±0.008	0.557±0.009	-3.8	0.564±0.010	-2.6	0.561	-3.1

[1] average of 4 determinations ± standard deviation

[2] relative deviation from the reference method

Caption for Figures

Figure 1. SIA system for chloride determination in pharmaceuticals. P = peristaltic pump; RV = rotary valve; SV = three-way solenoid valve; HC = holding coil; RC = reaction coil; GE = ground electrode; IE_1 = chloride-selective electrode; RE = reference electrode; Mv = decimillivoltimeter; S = spectrophotometer; W = waste.

Figure 2. Potentiometric response to chloride of the selective electrode prepared with a membrane containing 1% w/w of In(OEP)Cl and 0.4 % w/w of KTFPB in PVC / o-NPOE (33.0; 65.6% w/w) in NaH_2PO_4 buffer solution, pH 4.2.

Figure 3. Absorption spectra of an In(OEP) doped PVC film immersed in a pH 4.2 NaH_2PO_4 buffer solution (a) without and (b) with 1.00×10^{-1} mol dm^{-3} chloride. Membrane composition: 1.0 % w/w ETH 7075, 1.8 % w/w In(OEP)Cl, 67.2 % w/w of DOS, and 30 % w/w PVC.

Figure 4. Optical response of ETH 7075 / In(OEP)Cl in PVC/DOS film to a chloride ion solution prepared in pH 4.2 phosphate buffer (absorbance measured at 530 nm).

Figure 1 -

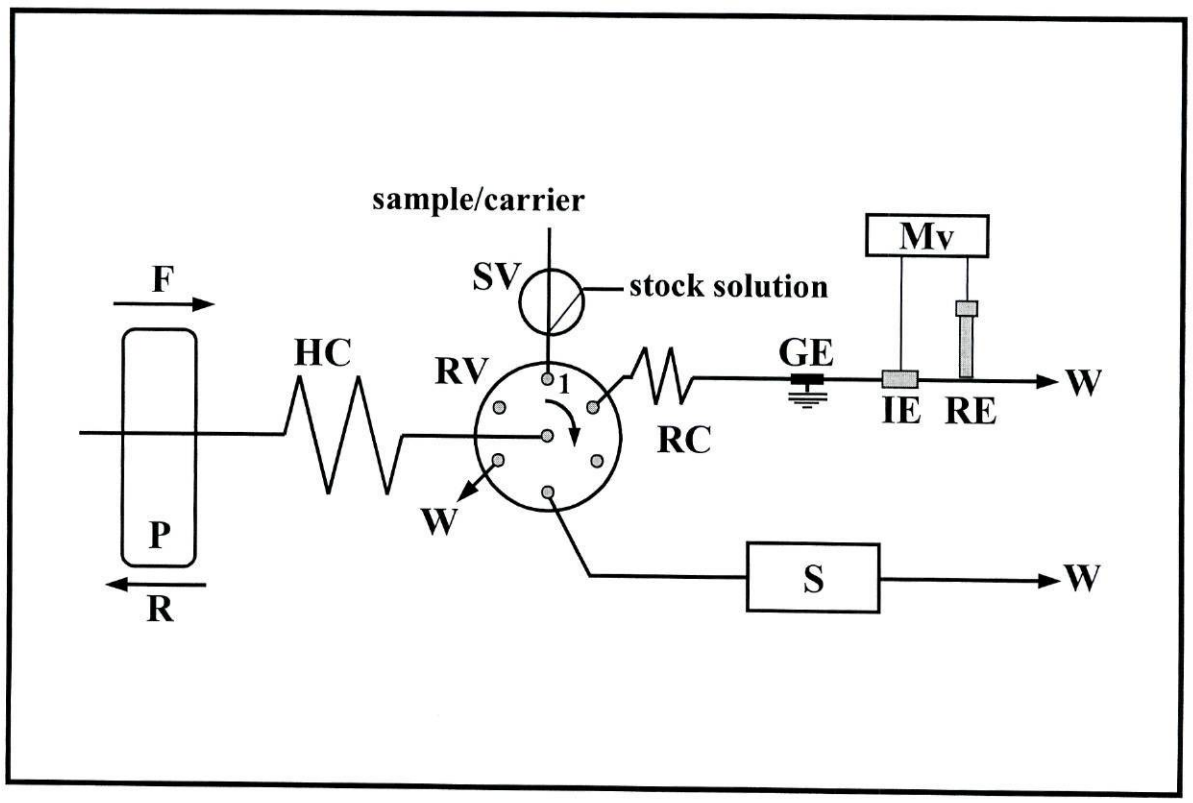

sample/carrier
Mv
F
SV
stock solution
HC
RV
1
GE
W
IE
RE
RC
P
W
S
W
R

Figure 2 -

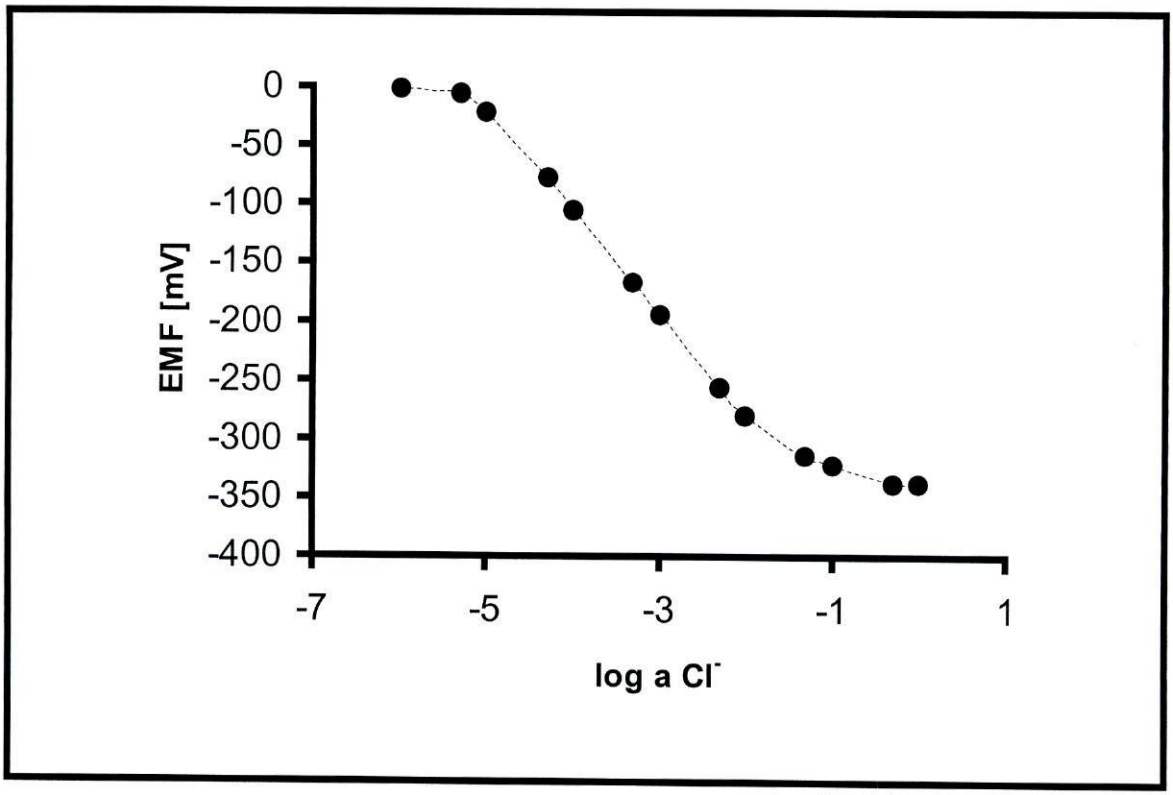


Figure 3 -

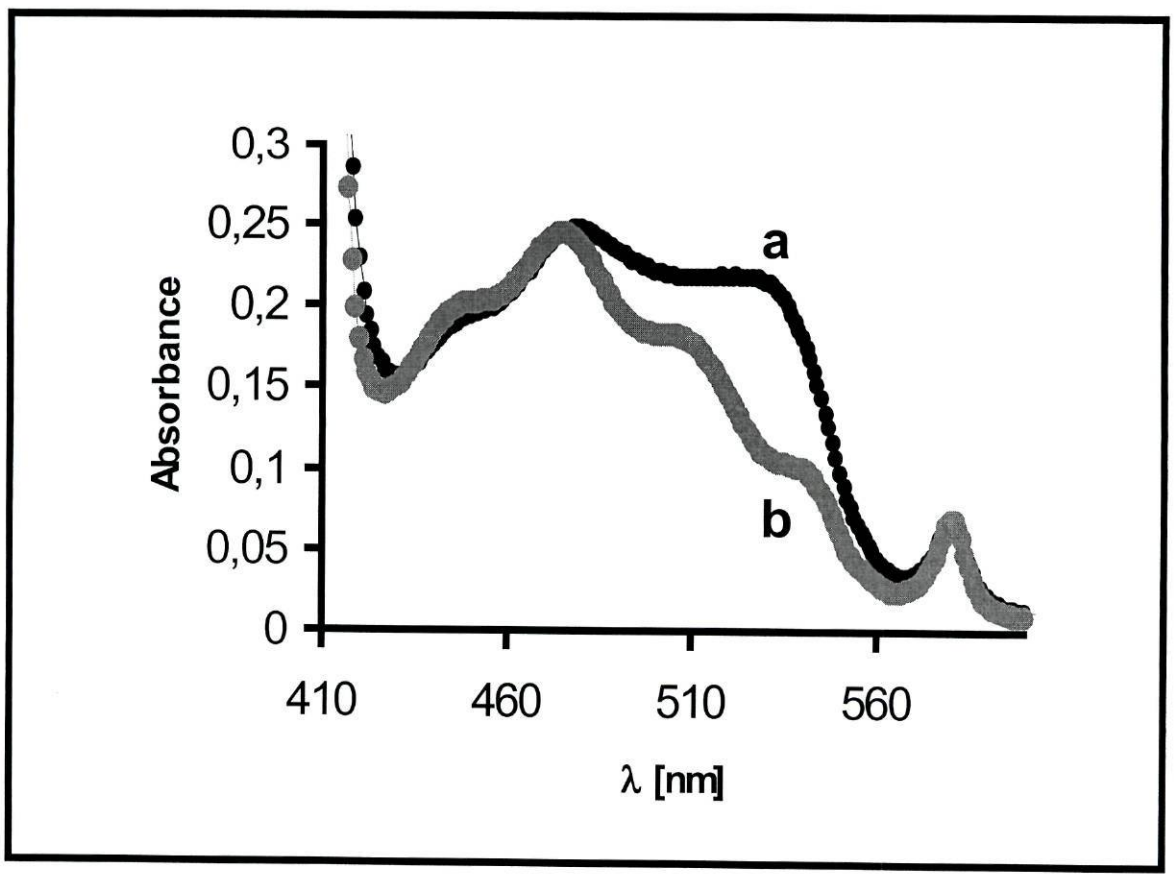
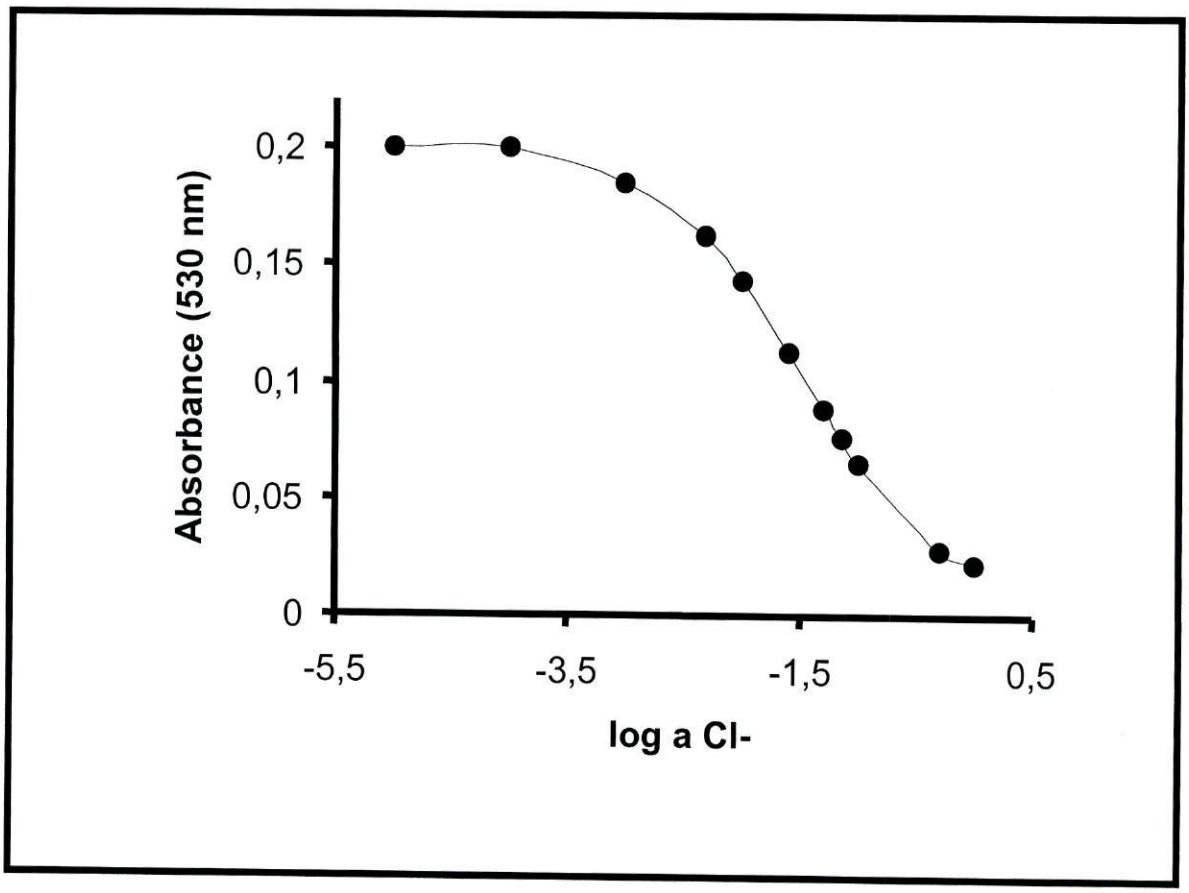


Figure 4 -



CAPÍTULO VI- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sistemas SIA apresentados, associados ao conceito de exactidão aferida, provaram representar uma medida robusta e económica para o controlo de qualidade de formulações farmacêuticas em rotina. Estes sistemas monitorizam, de forma contínua e em tempo real, a qualidade dos resultados e, por isso, são também importantes para a gestão da qualidade analítica. A aferição dos resultados é conseguida com a obtenção de duas medidas do mesmo analito. A concordância dos resultados revela a ausência de inviesamento, enquanto que a discordância detecta o seu inviesamento, que pode ter origem numa falha num dos procedimentos, ou pode ser resultado de uma interferência num dos procedimentos. No caso particular do sistema desenvolvido para a análise de ácido clavulânico, o desvio na concordância dos resultados ao longo do tempo era indicativo da degradação química do clavulanato, pois o sinal analítico obtido com o eléctrodo de clavulanato variava em função da sua degradação, enquanto que o sinal analítico obtido com o eléctrodo de potássio permanecia inalterado. Este sistema também evidenciou o seu potencial para detectar a degradação química do produto a analisar, sugerindo uma nova

preparação das amostras a analisar. Estes sistemas estão sob controlo analítico e, por isso, permitem decidir quando é que os resultados são confiáveis.

A técnica de análise utilizada revelou-se adequada para a exploração deste conceito de exactidão aferida, pois as duas determinações analíticas podem ser facilmente adaptadas na mesma configuração, sem acréscimo significativo dos custos de análise e da complexidade das montagens a estabelecer. Quando se alterava a determinação analítica, não era necessário grandes reconfigurações físicas das montagens, pois a técnica SIA é de aplicação simples e versátil, tendo sido demonstrada a sua utilidade na determinação de vários princípios activos e em diversos tipos de formulações farmacêuticas.

A instrumentação utilizada para este tipo de montagens é económica, robusta, simples e pouco sofisticada, o que origina sistemas analíticos mecanicamente estáveis, robustos, com poucas exigências de manutenção e apropriados para o funcionamento por períodos prolongados. Estes sistemas apresentam autonomia em relação ao operador, e a qualidade dos resultados analíticos também não está dependente da sua qualificação. A manipulação que envolve a actividade humana fica diminuída e consequentemente a oportunidade do erro humano.

Além destas vantagens, os sistemas SIA desenvolvidos processam um elevado número de amostras, com um reduzido consumo de toma de amostra e de reagentes. Estas características são importantes quando a rotina laboratorial solicita um grande número de amostras para análise. Os protocolos de análise desenvolvidos mostraram-se favoráveis relativamente aos procedimentos propostos pelos códigos oficiais relacionados com a análise de produtos farmacêuticos, que referem etapas de pré-tratamento de amostra fastidiosas, longas e/ou a necessidade de equipamento sofisticado e de operadores qualificados para a sua execução.

Finalmente, podemos ainda concluir que a versatilidade e as vantagens destes sistemas automatizados podem ainda ser exploradas noutras áreas do controlo de qualidade de medicamentos, como são exemplos os ensaios de dissolução, o controlo em processo e ainda os ensaios funcionais. Estes aspectos poderão ser determinantes para o sucesso dos programas de desenvolvimento, produção e controlo de medicamentos, pois é possível tomar decisões com confiança e evitar que resultados dúbios acarretem maiores custos e atrasos no processo de produção de um medicamento.