



FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

**U.**PORTO

# ACOPLAMENTO DE DETECTORES POTENCIOMÉTRICOS A SISTEMAS DE FLUXO PARA ANÁLISE DE FORMULAÇÕES MULTI-COMPONENTE

---

**Ana Rita Gonçalves da Cruz Ramos Pires**

Tese do 3<sup>o</sup> Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Doutoramento em Ciências  
Farmacêuticas

Química Analítica

*Trabalho realizado sob orientação de:*

*Professora Doutora Maria da Conceição Branco da Silva Mendonça Montenegro*

*Professor Doutor Alberto da Nova Araújo*



Porto, Abril de 2011

Este trabalho foi financiado pela:

**FCT**

**Fundação para a Ciência e a Tecnologia**  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.



Ao aproximar-me do final deste longo percurso, é meu desejo deixar uma mensagem de agradecimento a todos aqueles que me incentivaram, e me ajudaram a superar as diversas etapas.

À FCT, pela atribuição da bolsa de doutoramento que me permitiu a dedicação a este projecto em regime de exclusividade.

Ao Sr. Professor Costa Lima, por ter-me aceite como estudante de doutoramento no Departamento de Química Física da Faculdade de Farmácia, e ter-me proporcionado todos os meios necessários para a realização do trabalho experimental.

À Prof. Doutora Maria Conceição Montenegro, que tive o privilégio de ter como orientadora, devo antes de tudo a oportunidade de ingressar nesta “viagem”, os preciosos conselhos científicos, e o entusiasmo empenhado na concretização do trabalho a que nos propusemos. Recordo especialmente as suas palavras tranquilizantes e sábias, de cada vez que surgia algum resultado menos positivo.

Ao meu co-orientador, Prof. Doutor Alberto Araújo, agradeço o optimismo contagiante, a ajuda sempre presente, as soluções criativas, e o sentido de humor que fazia parecer qualquer problema de fácil resolução.

Ao Doutor João Lopes, pela contribuição no trabalho intitulado “ Simultaneous determination of thiamine and pyridoxine in multivitaminics by Sequential Injection Analysis (SIA) with potentiometric detection”.

Ao Prof. Doutor Maurício Barbosa pela sua contribuição nos trabalhos intitulados “Assessment of dissolution profiles of brand and generic valproic acid based on an experimental clean automatic approach” e “Usefulness of a tandem dissolution-permeation system for comparison of modified release tablets of valproate”.

Ao Prof. Doutor Martinez Calatayud, por me ter recebido no Departamento de Química Analítica da Universidade de Valência, e me ter proporcionado os meios para a concretização do trabalho “ Obtaining simultaneous multiple dissolution profiles of solid oral dosage formulations”. Agradeço também aos meus colegas valencianos José Ramón e Daniel Malo, pela simpatia e ajuda prestadas.

À Eunice Rodrigues e à Sofia Gomes. Pela amizade, que ultrapassou as fronteiras da Faculdade de Farmácia, e por todos os momentos, bons e menos bons, que vivemos juntas.

À Joana Carvalhido, pelos serões cómicos de descontração, e pelos cânticos pouco afinados ao som das mais recentes novidades musicais.

À Cristina Silvestre, pela alegria sempre constante que sabe, como ninguém, espalhar à sua volta.

Ao Rodrigo, pela rápida disponibilização dos conteúdos do tão almejado armário, pelos momentos de bom humor, pelos cânticos “rouxinol”, e pela companhia nos dias de serão.

À Célia Amorim, a minha companheira dos eléctrodos, por todo o apoio, aconselhamento e amizade, que significaram muito para mim.

Ao Hugo Oliveira, pela pronta disponibilidade no auxílio técnico aquando da execução dos métodos de referência por HPLC.

A todos os meus outros colegas do laboratório de Química-Física: David Ribeiro, Marta, Marieta, Marisa, Ana Gomes, André, Cláudia, Diana, Joana Ribeiro, Carla, Luís, Karine, Paula Pinto, Jorge, Mafalda, Marlene, Christian, Sofia, Lúcia, Leonel, D. Manuela, pelo companheirismo e pelos muitos momentos de diversão partilhados.

À D. Belmira, pela ajuda e a experiência transmitidas na preparação de unidades potenciométricas de configuração convencional e tubular.

À Cristina Oliveira, por possibilitar a minha familiarização com as ferramentas de formatação automática do Word, e muito mais.

Ao Hugo Basto, pela ajuda imprescindível com as manhas da formatação.

***Aos meus pais, Ana e Armando. Ao meu irmão João. Ao Carlos.***

***Sem eles, a concretização deste projecto nunca seria possível.***

***A eles dedico esta tese.***

*“Vencer não é nada, se não se teve muito trabalho. Fracassar não é nada, se se fez o melhor possível.”*

Nadia Boulanger, pianista



Com a significativa redução no aparecimento de novas entidades químicas, surge uma corrente na indústria farmacêutica que se foca no desenvolvimento de produtos diferenciados, recorrendo a princípios activos previamente aprovados. Neste contexto, os medicamentos multi-componente impõem-se como uma das estratégias emergentes, tal como se encontra patente no número recente de autorizações para introdução no mercado e consequentes lançamentos deste género de produtos. O objectivo do seu desenvolvimento relaciona-se com a identificação de moléculas que, quando associadas, conduzem a uma melhoria significativa de resultados terapêuticos, em comparação com outras opções de tratamento. Sempre que novas abordagens terapêuticas surgem no horizonte, urge o acompanhamento das suas características farmacológicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas, ao longo do ciclo produtivo do medicamento. Os métodos analíticos fazem parte integrante e crucial deste processo intrincado e demorado. Tradicionalmente, a análise farmacêutica de medicamentos uni e multi-componente é realizada recorrendo à cromatografia líquida de elevada eficiência, com detecção espectrofotométrica, ou espectrometria de massa. Mais recentemente, para o estudo de matrizes farmacêuticas de elevada complexidade, a comunidade científica tem centrado a sua atenção no desenvolvimento de procedimentos analíticos automáticos, rápidos, pouco poluentes, e igualmente eficazes.

Os métodos automáticos de fluxo associados à detecção electroanalítica, especialmente à potenciometria, têm surgido na literatura como uma alternativa aos procedimentos cromatográficos. Este tipo de detecção possibilita a determinação analítica dos componentes de uma amostra farmacêutica, de uma forma célere, sensível, selectiva, e numa elevada gama de concentrações, sem exigir complexos e poluentes processos de tratamento de amostra. Para além disso, nestes sistemas integrados de análise, o número de resultados analíticos que são gerados sobre a mesma amostra e a possibilidade de os obter em tempo real, faz com que a sua utilização em análise farmacêutica seja altamente reconhecida como vantajosa, justificando um elevado ritmo de publicações nos últimos 15 anos.

A detecção potenciométrica com eléctrodos selectivos a ião constitui um bom exemplo do potencial de desenvolvimento face às determinações em matrizes multi-componente. O facto de os ESIs não serem destrutivos de amostra, serem facilmente construídos e miniaturizados e, sobretudo, por ser possível modelar a composição da membrana tornando-a mais ou menos selectiva em relação a determinada espécie química, faz com que, em termos de análise de produtos farmacêuticos constituídos por mais do que um princípio activo, sejam encarados como uma solução eficaz. Além do

referido, acrescenta-se que, ao serem acoplados a sistemas automáticos de fluxo, como por exemplo FIA, SIA ou multicomutação, melhoram as suas características gerais de funcionamento, tornando as medidas mais precisas.

Neste contexto, pareceu-nos importante acoplar sensores potenciométricos a sistemas de análise por injeção sequencial (SIA) e desenvolver procedimentos analíticos com aplicação no controlo de medicamentos multi-componente. A utilidade analítica dos sistemas descritos demonstrou-se através da realização de ensaios comuns, quer no controlo de qualidade, quer nos processos de desenvolvimento da indústria farmacêutica, nomeadamente ensaios de doseamento, de dissolução e de permeabilidade.

Os detectores potenciométricos eram baseados em eléctrodos de membrana de PVC plastificada, que incorporavam a  $\beta$ -ciclodextrina como ionóforo. A liposolubilidade e os mecanismos de complexação que este tipo de compostos apresentam relativamente à molécula alvo tornam-nos bastante selectivos, o que é fundamental para a análise de matrizes complexas, como no caso dos produtos farmacêuticos multi-componente. A metodologia SIA foi seleccionada para o estabelecimento dos procedimentos propostos pela versatilidade que a caracteriza, o que facilita o acoplamento de módulos de dissolução, de permeação, e também a utilização de mais do que um detector em simultâneo, sem haver necessidade de reconfigurar fisicamente o sistema. Estes aspectos auxiliam a análise de matrizes complexas, sobretudo quando se pretende a determinação de mais do que uma espécie farmacologicamente activa. Os sistemas implementados apresentavam ainda a vantagem de permitir uma monitorização em tempo real, facto que é relevante sobretudo nos ensaios de dissolução e de permeabilidade.

Assim sendo, os métodos analíticos propostos ao longo desta tese, podem constituir uma alternativa viável e ambientalmente simpática, para reduzir os custos inevitavelmente associados aos processos de investigação e desenvolvimento de novos medicamentos para uso humano.

**Palavras-chave:** potenciometria, SIA, multi-componente, indústria farmacêutica

With the appearance of new chemical entities on the decline, a tendency that is focused on the development of differentiated products using active principles previously approved is emerging in the pharmaceutical industry. In this context, multi-component medicines impose as one of the emerging strategies, as supported by the recent amount of requests for authorization for the introduction in the market and subsequent launching of this kind of products. The purpose of their development is related to the identification of molecules that when combined in the same formulation, lead to a significant improvement of therapeutic results in comparison with other treatment options. Whenever new therapeutic approaches occur, it's urgent to follow up on their pharmacological, pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics integrated throughout the productive cycle of the medicine. Analytical methods are a crucial part of this complex process. Traditionally, pharmaceutical analysis of mono and multi-component formulations is performed using high performance liquid chromatography, with spectrophotometric or mass spectrometry detection. More recently, for the study of highly complex pharmaceutical matrices, the scientific community has focused its attention on the development of automatic methods that are less pollutant, faster, and equally effective.

Flow injection analyses associated with electroanalytical detection, especially potentiometry, have been noticed in the scientific literature as an alternative to chromatographic procedures. This kind of detection allows the determination of pharmaceutical components in a rapid, sensible and selective way while covering a broad concentration range and without demanding complex and pollutant sample pre-treatment procedures. Furthermore, with these integrated analysis systems, the number of results generated under the same sample and the possibility of obtaining them in real time, makes this kind of application in pharmaceutical analysis highly recognized as an advantageous one, justifying an increase of publications following this topic in the last 15 years.

Potentiometric detection with ion selective electrodes represents a good example of the development potential for multi-component matrices analysis. The fact that ISEs are sample non-destructive, easy to construct, miniaturized and above all, the possibility of modeling its membrane composition rendering it more or less selectivity comparatively to a certain chemical entity, has turned them an effective solution in the analysis of pharmaceutical samples composed with several active principles. Besides, its integration in automatic flow systems, as for example FIA, SIA or multicommutation, improves its general working characteristics, rendering more precise measurements.

In this context, it appeared important to us the connection of potentiometric sensors with sequential injection analysis systems (SIA) and the development of analytical procedures applied to the control of multi-component medicines. The analytical usefulness of the described systems was demonstrated through common tests performed in quality control laboratories and during research processes in the pharmaceutical industry, namely assay, dissolution and permeability tests.

The potentiometric detectors were based on PVC plasticized membrane electrodes and incorporated  $\beta$ - cyclodextrin as ionophore. The liposolubility and the complexation mechanisms presented with this kind of compounds in relation to the target molecule, render them selectivity, which is fundamental for the analysis of complex matrices, as the case of multi-component pharmaceutical products. SIA methodologies were selected to provide the establishment of the proposed procedures due to their versatility, enabling the easy integration of dissolution and permeability modules and also the simultaneous use of more than one detector, without requiring the physical reconfiguration of the system. These aspects help complex matrices analysis, particularly when your aim is the determination of more than one pharmacological active substance. Additionally, the implemented systems presented the advantage of real-time monitoring, which is a relevant fact mainly in dissolution and permeability tests.

Hence, the proposed analytical method reported in this thesis can represent a viable and environmentally friendly alternative, focusing on the reduction of costs that are inevitably associated with research and development processes of new medicines for human use.

**Key-words:** potentiometry, SIA, multi-component, pharmaceutical industry

|   |      |
|---|------|
| <b>ABREVIATURAS</b>   | 1    |
| <b>ENQUADRAMENTOS E OBJECTIVOS GERAIS DA TESE</b>   | 5    |
| <b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO</b>  |      |
| 1. O Controlo da Qualidade na Indústria Farmacêutica  | 15   |
| 1.1. Breve Enquadramento Histórico: A Origem das GMPs e a Qualidade do Medicamento numa Perspectiva Evolutiva | 15   |
| 1.2. Testes e Especificações para Aplicação em Princípios Activos e Produtos Farmacêuticos Acabados           | 19   |
| 1.3. Testes/ Critérios Universais aplicados a Substâncias Activas e a Produtos Farmacêuticos Acabados         | 20   |
| 1.3.1. Testes Aplicados a Substâncias Activas   | 20   |
| 1.3.2. Testes Aplicados a Produtos Farmacêuticos Acabados   | 22   |
| 1.4. Testes / Critérios Específicos Aplicados a Substâncias Activas e a Produtos Farmacêuticos Acabados       | 23   |
| 1.4.1. Testes Aplicados a Substâncias Activas   | 23   |
| 1.4.2. Testes Aplicados a Produtos Farmacêuticos Acabados   | 25   |
| 1.4.2.1. Testes Aplicados a Sólidos para Administração Oral   | 25   |
| 1.4.2.2. Testes Aplicados a Líquidos e Pós Destinados a Reconstituição como Líquidos Orais                    | 32   |
| 1.4.2.3. Testes Aplicados a Produtos Parentéricos   | 35   |
| 2. O Desenvolvimento Farmacêutico   | 45   |
| 2.1. Objectivos do Desenvolvimento Farmacêutico   | 46   |
| 2.2. Componentes do Produto Farmacêutico  | 47   |
|   | xiii |

|   |     |
|---|-----|
| 2.2.1. Princípios Activos   | 47  |
| 2.2.2. Excipientes  | 48  |
| 2.3. Desenvolvimento do Produto Farmacêutico  | 48  |
| 2.3.1. Desenvolvimento de Formulação  | 48  |
| 2.3.2. Propriedades Físico-Químicas e Biológicas  | 51  |
| 2.4. Desenvolvimento do Método de Fabrico   | 52  |
| 2.5. Sistemas de Acondicionamento e Estanquicidade  | 52  |
| 2.6. Desenvolvimento Farmacêutico de Produtos Compostos por uma Combinação de Princípios Activos  | 53  |
| 2.6.1. Pré-Formulação, Formulação e Estabilidade  | 53  |
| 2.6.2. Controlo da Qualidade dos Produtos Farmacêuticos Combinados  | 56  |
| 2.6.2.1. Princípios Activos   | 57  |
| 2.6.2.2. Produto Acabado  | 57  |
| 3. Métodos Analíticos Aplicados no Controlo de Formulações Farmacêuticas Multi-Componente: Ensaios de Doseamento, Ensaios de Dissolução e Ensaios de Permeabilidade                   | 65  |
| 3.1. Ensaios de Doseamento, com Detecção Amperométrica, Voltamétrica, Condutimétrica e Coulométrica   | 79  |
| 3.2. Ensaios de Doseamento, com Detecção Potenciométrica  | 95  |
| 3.3. Ensaios de Dissolução, com Detecção Espectofotométrica e Potenciométrica: Métodos Tradicionalmente Usados, “versus” Novas Abordagens com Potencial para Análise Multi-Componente | 108 |
| 3.3.1. Ensaios de Dissolução, com Detecção por Espectofotometria de UV- Vis   | 111 |
| 3.3.2. Ensaios de Dissolução, com Detecção Potenciométrica  | 118 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.4. Métodos “In Vitro” para Avaliação da Biodisponibilidade de Fármacos: Ensaios de Permeabilidade | 125 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| 3.4.1. Sistemas Integrados Dissolução/ Permeação (D/P) | 128 |
|--|-----|

## **CAPÍTULO II - ASPECTOS GERAIS DA PARTE EXPERIMENTAL**

|                                       |     |
|---------------------------------------|-----|
| 1. Reagentes e Preparação de Soluções | 156 |
|---------------------------------------|-----|

|  |     |
|--|-----|
| 1.1. Reagentes, Soluções e Meios de Dissolução | 156 |
|--|-----|

|  |     |
|--|-----|
| 1.2. Preparação de Amostras para Análise | 157 |
|--|-----|

|   |     |
|---|-----|
| 2. Equipamento e Materiais Utilizados no Decurso do Trabalho Experimental | 158 |
|---|-----|

|                               |     |
|-------------------------------|-----|
| 2.1. Equipamento de Uso Geral | 158 |
|-------------------------------|-----|

|   |     |
|---|-----|
| 2.2. Sistemas de Fluxo de Análise por Injecção Sequencial (SIA) | 160 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| 3. Construção e Avaliação das Características das Unidades Potenciométricas | 164 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| 3.1. Configuração dos Eléctrodos Desenvolvidos | 164 |
|--|-----|

|   |     |
|---|-----|
| 3.2. Preparação das Membranas Sensoras. | 166 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| 3.3. Calibração das Unidades Potenciométricas de Configuração Convencional e Tubular, e Optimização das Condições Hidrodinâmicas de Fluxo dos ESIs Tubulares | 169 |
|--|-----|

|  |     |
|--|-----|
| 3.4. Estudo da Influência do pH na Resposta Potenciométrica dos ESIs Desenvolvidos | 175 |
|--|-----|

|   |     |
|---|-----|
| 3.5. Determinação do Tempo de Resposta dos ESIs | 175 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| 3.6. Determinação dos Coeficientes de Selectividade Potenciométrica dos ESIs | 177 |
|--|-----|

|  |     |
|--|-----|
| 3.7. Aplicação dos ESIs a Amostras Farmacêuticas | 180 |
|--|-----|

**CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DE ELÉCTRODOS SELECTIVOS A IÃO PARA APLICAÇÃO EM FORMULAÇÕES MULTI-COMPONENTE**

Novos Ionóforos Aplicados na Construção de Sensores Potenciométricos Sensíveis a Vitamina B1 e Vitamina B6, Adequados ao Controlo de Polivitamínicos 187

**CAPÍTULO IV - AUTOMATIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE DOSEAMENTO PARA ANÁLISE DE FORMULAÇÕES MULTI-COMPONENTE**

Determinação Potenciométrica Simultânea de Tiamina e Piridoxina em Polivitamínicos, Aplicando um Eléctrodo Baseado em Ciclodextrina, e Sensível a Tiamina 199

**CAPÍTULO V - AUTOMATIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO PARA ANÁLISE DE FORMULAÇÕES MULTI-COMPONENTE**

Determinação dos Perfis de Dissolução de Formulações de Marca e Genéricas de Ácido Valpróico, com Recurso a um Sistema Automatizado Ambientalmente Limpo 219

**CAPÍTULO VI - AUTOMATIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO/ PERMEABILIDADE PARA ANÁLISE DE FORMULAÇÕES MULTI-COMPONENTE**

Demonstração da Utilidade de um Sistema Acoplado de Dissolução / Permeabilidade para Comparação de Comprimidos de Libertação Modificada de Valproato 241

**CAPÍTULO VII - CONCLUSÃO**

Conclusão 261



## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

- Figura 1 - Imagens de aparelhos comerciais nos quais se realizam: a) Testes de Dureza e b) Testes de Friabilidade 26
- Figura 2 - Aparelho de dissolução. Desenhos esquemáticos dos componentes: a) Cesto – aparelho I; b) Pá – aparelho II, reproduzidos da Farmacopeia Europeia [29] (dimensões em mm). O aparelho II geralmente é reservado para comprimidos, enquanto que o aparelho I se aplica a cápsulas ou formas farmacêuticas com tendência a flutuar ou que se desintegram lentamente. c) Imagem de aparelho de dissolução comercial, cujas hastes podem ser substituídas por cestos ou pás, consoante a especificidade dos ensaios a realizar 29
- Figura 3 - Cronograma associado ao processo de Investigação & Desenvolvimento de uma Nova Entidade Química (NEQ) 46
- Figura 4 - Esquema representativo dos sistemas FIA e SIA básicos 69
- Figura 5 - Principais estratégias utilizadas em fluxo para análise multi-componente. Reproduzido de [13] 71
- Figura 6 - a) Estrutura química da molécula hospedeira  $\beta$ - ciclodextrina; b) Forma de cone truncado da molécula  $\beta$ - ciclodextrina. Reproduzido de [113] 103
- Figura 7 - a) Exemplo de uma resposta potenciométrica *in situ*, obtida com um sensor potenciométrico, para uma formulação de loperamida 2 mg, e correspondente gráfico “potencial” *versus* “concentração” de padrão loperamida, b) Perfil de dissolução, com o respectivo gráfico “potencial” *versus* “logaritmo de concentração”. Reproduzido de [138] 122
- Figura 8 - Esquema do sistema automático Dissolução / Permeação. Os pontos de amostragem estão assinalados com letras capitais: D- Dissolução; A- Apical; B- Basolateral. A válvula multiposição estabelece as seguintes conexões: Porta 1 – Esgoto; Porta 2- Amostrador automático para aspiração das soluções padrão; Porta 3- KRB para restituição dos volumes retirados do compartimento basolateral; Porta 8- Detector de fluorescência PMT-FL; Portas 4, 5, 6 – Pontos de amostragem B, A, e D, respectivamente. Reproduzido de [180] 129

## CAPÍTULO II - ASPECTOS GERAIS DA PARTE EXPERIMENTAL

- Figura 1 - Montagem para avaliação das características das unidades potenciométricas de configuração convencional. Legenda: a) Decimilivoltímetro; b) Comutador; c) Agitador magnético; d) Eléctrodo selectivo a ião; e) Eléctrodo de referência 159
- Figura 2 - a) Dimensões da pá (em mm), usada no equipamento de dissolução de uma unidade. Esquema reproduzido da Farmacopeia Europeia [3]; b) Fotografia de um vaso de dissolução Peak Vessel 160
- Figura 3 – Esquema geral do sistema SIA utilizado nos trabalhos dos capítulos IV, V e VI. Legenda: BP- Bomba peristáltica; T- Solução transportadora; VS- Válvula solenóide; VMs – Válvula multi-selector de 8 portas; ESI – Eléctrodo selectivo a ião; ER – Eléctrodo de referência; mV- Milivoltímetro. Os diversos componentes apresentados não estão à escala 162
- Figura 4 – Etapas de construção de um eléctrodo selectivo a ião (ESI) de configuração convencional 165
- Figura 5 - Etapas de construção de um eléctrodo selectivo a ião (ESI) de configuração tubular 166
- Figura 6 – Estrutura química das moléculas: a)  $\beta$ -ciclodextrina e b) 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Estas moléculas foram usadas como ionóforos nos ESIs desenvolvidos e aplicados nos trabalhos dos capítulos III e IV 167
- Figura 7 - a) Deposição de sensor no ESI de configuração convencional; b) Deposição de sensor no ESI de configuração tubular 168
- Figura 8 - Curva de calibração de um ESI de configuração tubular para vitamina B6, inserido num sistema SIA. Trabalho descrito no Capítulo IV. LPD- Limite Prático de Detecção; LIRL- Limite Inferior de Resposta Linear 174
- Figura 9 - Definição e determinação do tempo de resposta segundo a IUPAC [17], como o tempo que medeia entre o instante em que um eléctrodo selectivo a ião e um eléctrodo de referência entram em contacto com a solução amostra, e o primeira instante em que o declive tende para um valor limite previamente seleccionado com base nas condições experimentais ou nos requisitos que dizem respeito à exactidão pretendida (por exemplo, 0,1 mV/min) 176

### **CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DE ELÉCTRODOS SELECTIVOS A IÃO PARA APLICAÇÃO EM FORMULAÇÕES MULTI-COMPONENTE**

Figura 1 - Diagramas de Reilley para VitB1 ESI, efectuados a dois níveis de concentração ( $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) do ião principal 192

Figura 2 - Diagramas de Reilley para VitB6 ESI I e VitB6 ESI II, efectuados a dois níveis de concentração ( $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) do ião principal 192

Figura 3 - Espectros de UV obtidos para duas soluções de concentração  $3 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> em tiamina (A) e em piridoxina (B); após extracção com um volume similar de FNDPE (A' e B'); ou após extracção com cocktails usados na preparação de VitB1 ESI e VitB6 ESI I (A'' e B'') ou após extracção com o cocktail usado na preparação de VitB6 ESI II (C) 193

### **CAPÍTULO IV - AUTOMATIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE DOSEAMENTO PARA ANÁLISE DE FORMULAÇÕES MULTI-COMPONENTE**

Figura 1 - Esquema do sistema de fluxo proposto. P: bomba peristáltica, HC: reactor tubular de retenção, SVi: válvulas solenóides, RV: válvula de Injecção multi-porta, IE: eléctrodo indicador (detector tubular), RE: eléctrodo de referência, MV: decimilivoltímetro, MS: solução stock de tiamina e piridoxina, ou de amostra, ES: solução de calibração preparada externamente, LiCl: solução de ajuste de força iónica ( $0,1$  mol L<sup>-1</sup>) 204

Figura 2 - Registo típico das respostas do ESI III. (a) Injectaram-se no sistema soluções de PYD preparadas externamente, no intervalo de concentrações  $1 \times 10^{-5}$  -  $1 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup> com incrementos de meia década. (b) Estudo de repetibilidade para as soluções de piridoxina  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> 208

Figura 3 - (a) Componentes puros do sinal estimados por MCR a partir de um conjunto de misturas sintéticas de THI (- - -) e PYD (—), usando um fluxo de  $1 \times (1,8$  ml. min<sup>-1</sup>). (b) Sinal analítico obtido para uma amostra contendo diferentes proporções de THI e PYD, usando um fluxo  $2 \times (3,6$  ml.min<sup>-1</sup>) (THI=  $8 \times 10^{-4}$ / PYD=  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> (- - -) e THI=  $1 \times 10^{-4}$ / PYD=  $8 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> (—)) 210

### **CAPÍTULO V - AUTOMATIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO PARA ANÁLISE DE FORMULAÇÕES MULTI-COMPONENTE**

Figura 1 - Esquema do sistema de fluxo utilizado. P: bomba peristáltica, SV: válvula solenóide, HC1: reactor de retenção de 400 cm de comprimento (i.d. 0,8 mm), RV: válvula de injecção multi-porta, DV: vaso de dissolução, SP: sonda de amostragem de 15 cm de comprimento, em PTFE (i.d. 0,5 m), CS: solução de calibração, BT: xix

desborbulhador, VA-ESI: eléctrodo selectivo a ião valproato, Na-ESI: eléctrodo selectivo a ião sódio, RE: eléctrodo de referência, mV: potenciómetro e C2: reactor de 200 cm de comprimento, em PTFE 225

Figura 2 - Perfis de dissolução médios (n=3), obtidos com o detector tubular de valproato (A a E). Os gráficos estão divididos em A, B, C, D, E, de acordo com os grupos na Tabela 1. I: formulação de marca, II- genérico 2, III- genérico 1. A Figura E mostra um registo típico do perfil de dissolução para o genérico E, obtido no sistema SI 231

Figura 3 - Perfis de dissolução médios (n=3) de sódio (linha tracejada) e valproato (linha a cheio), obtidos para as formulações do grupo B, com os detectores tubulares de sódio e valproato. A- formulação de marca; B- genérico B1; C- genérico B2. A Figura C mostra um registo típico do perfil de dissolução para o genérico B2, obtido no sistema SI 234

### **CAPÍTULO VI - AUTOMATIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO/ PERMEABILIDADE PARA ANÁLISE DE FORMULAÇÕES MULTI-COMPONENTE**

Figura 1 - Esquema do sistema de fluxo proposto: Pi- bombas peristálticas 1 e 2, SV- válvula solenóide, DV- vaso de dissolução contendo tampão fosfato (pH 6,8) que funciona como fase entérica, PU- unidade de permeação, PP- tampão fosfato (pH 7,5) que funciona como fase plasmática, RV- válvula selectora multi-porta, CS<sub>i</sub> – soluções de calibração de valproato, TD- detector tubular de valproato, RE- eléctrodo de referência, mV- decimilivoltímetro 247

Figura 2 - Quantidades permeadas de valproato (expressas em M) obtidas com seis soluções dadoras de valproato de sódio  $7 \times 10^{-3}$ ;  $6 \times 10^{-3}$ ;  $5 \times 10^{-3}$ ;  $4 \times 10^{-3}$ ;  $2 \times 10^{-3}$ ;  $1 \times 10^{-3}$  M, em tampão fosfato pH 6,8. As alíquotas de valproato permeado eram amostradas com intervalos de 10 minutos. PP: fase plasmática; EP: fase entérica 250

Figura 3 - Perfis de permeação médios obtidos com três ensaios de comprimidos do mesmo lote. As quantidades permeadas de valproato representam-se em percentagem relativamente ao conteúdo rotulado por comprimido, em função do tempo, em horas. Os gráficos menores mostram os respectivos perfis de dissolução. A: formulação de marca A, genérico A1 e genérico A2, contendo uma relação molar 2:1 valproato de sódio / ácido valpróico, equivalente a 500 mg em valproato de sódio; B: formulação de marca B, genérico B1 e genérico B2, contendo uma relação molar 2:1 valproato de sódio / ácido valpróico, equivalente a 300 mg em valproato de sódio; C: formulação de marca C, contendo uma relação molar 1:1 em valproato de sódio/ ácido valpróico, equivalente a 500 mg em ácido valpróico 251

## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Sequência cronológica dos acontecimentos que antecedem as GMPs   | 16 |
| Tabela 2 - Principais métodos analíticos utilizados na indústria farmacêutica, para análise de formulações multi-componente                                       | 66 |
| Tabela 3 - Métodos electroquímicos para análise de produtos farmacêuticos complexos: Voltametria, Amperometria  | 81 |
| Tabela 4 - Métodos electroquímicos associados a HPLC, para análise de produtos farmacêuticos complexos: Amperometria, Condutimetria, Coulometria e Potenciometria | 91 |
| Tabela 5 - Métodos electroquímicos para análise de produtos farmacêuticos complexos: Potenciometria   | 97 |

## CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DE ELÉCTRODOS SELECTIVOS A IÃO PARA APLICAÇÃO EM FORMULAÇÕES MULTI-COMPONENTE

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 1 - Composição das membranas de VitB1 ESI, VitB6 ESI I e VitB6 ESI II   | 190 |
| Tabela 2 - Características gerais de trabalho dos eléctrodos selectivos a ião para tiamina (vitamina B1) e piridoxina (vitamina B6)  | 190 |
| Tabela 3 - Resumo das principais características dos eléctrodos referidos na literatura sensíveis a vitamina B1, a vitamina B6, ou a ambas as vitaminas  | 191 |
| Tabela 4 - Coeficientes de selectividade potenciométricos ( $\log K_{pot}^{VitB1, \text{interferente}}$ ) para VitB1 ESI   | 193 |
| Tabela 5 - Coeficientes de selectividade potenciométricos ( $\log K_{pot}^{VitB6, \text{interferente}}$ ) para VitB6 ESI I e VitB6 ESI II  | 193 |
| Tabela 6 - Coeficientes de selectividade potenciométricos ( $\log K_{pot}^{VitB1 \text{ ou } VitB6, \text{interferente}}$ ) para VitB1 ESI, Vit B6 ESI I e VitB6 ESI II (método da interferência fixada) | 194 |
| Tabela 7 - Determinação da vitamina B1 em produtos farmacêuticos utilizando o eléctrodo proposto, com os respectivos valores de recuperação e os resultados do método de referência aplicado             | 194 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 8 - Determinação da vitamina B6 em produtos farmacêuticos utilizando os eléctrodos propostos, com os respectivos valores de recuperação e os resultados do método de referência aplicado | 195 |
|---|-----|

### **CAPÍTULO IV - AUTOMATIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE DOSEAMENTO PARA ANÁLISE DE FORMULAÇÕES MULTI-COMPONENTE**

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 1 - Parâmetros de controlo do sistema   | 205 |
| Tabela 2 - Desenho experimental utilizado para otimizar as condições hidrodinâmicas de fluxo recorrendo a soluções de THI ou PYD preparadas externamente, com quatro níveis de concentração, $1 \times 10^{-1}$ , $1 \times 10^{-2}$ , $1 \times 10^{-3}$ , $1 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> | 207 |
| Tabela 3 - Optimização das condições de fluxo com o detector tubular ESI III   | 211 |
| Tabela 4 - Sumário das estruturas do modelo PLS, optimizado para modelizar a THI e PYD em amostras sintéticas  | 212 |
| Tabela 5 - Resultados de validação do modelo, obtidos para duas formulações comerciais de produtos polivitamínicos (unidades em mol L <sup>-1</sup> )  | 213 |

### **CAPÍTULO V - AUTOMATIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO PARA ANÁLISE DE FORMULAÇÕES MULTI-COMPONENTE**

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 1 - Produtos estudados organizados por grupos, de acordo com o tipo de formulação, conteúdo e natureza do princípio activo (somente valproato de sódio, ou associações de ácido valpróico/ valproato de sódio). NaVA- valproato de sódio; VAac- ácido valpróico                        | 224 |
| Tabela 2 - Parâmetros de controlo do sistema  | 227 |
| Tabela 3 - Perfis médios de dissolução dos grupos (n=3), obtidos com o detector para valproato. Q <sub>%</sub> - percentagem dissolvida num determinado tempo (min.), relativamente à quantidade rotulada; CV – coeficiente de variação (%)   | 231 |
| Tabela 4 - Perfis médios de dissolução do grupo B (n=3), obtidos com os detectores para sódio e para valproato, Na-ESI e VA-ESI, respectivamente. Q <sub>%</sub> - percentagem dissolvida num determinado tempo (min.), relativamente à quantidade rotulada; CV – coeficiente de variação (%) | 233 |

ANN- *Artificial Neural Networks* / Redes Neurais

API- *Active Pharmaceutical Ingredient* / Princípio Activo

BBNBH- 2,2'- [1,2 butanedil bis(nitriloetilideno)]-bis-hidroquinona

BTPPIA- Cloreto de bis(trifenilfosforanilideno)amónio

BSC- *Biopharmaceutical Classification System* / Sistema de Classificação  
Biofarmacêutica

CQ- Controlo da Qualidade

DAD- *Diode Array Detector*

DBS- Dioctilsebacato

DPV- Voltametria de Pulso Diferencial

D/P- Dissolução/Permeação

DSC- Calorimetria Diferencial de Exploração

ESIs- Eléctrodos Selectivos a Ião

FDA- *Food and Drug Administration*

FIA- Análise por Injecção em Fluxo

FID- Detector de Chama

GC- Cromatografia Gasosa

GMPs- *Good Manufacturing Practices* / Boas Práticas de Fabrico

HPLC- Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência

HPLC-DE- Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência, com detecção Electroquímica

HPLC-UV- Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência, com detecção na zona Ultra-  
Violeta

I&D- Investigação e Desenvolvimento

IPC- *In Process Control* / Controlo em Processo

ISFETs- *Ion Selective Field Effect Transistors* / Transístores de Efeito de Campo Selectivo

IV- Infra-Vermelho

IVIVC- *In Vitro In Vivo Correlation* / Correlação *In Vivo In Vitro*

KRB- Krebs Ringer

LC-MS- Cromatografia Líquida com detecção por Espectómetro de Massas

LC-MS/MS- Cromatografia Líquida com detecção por Espectómetro de Massas acoplado a Espectómetro de Massas

LDME- Levodopa metil éster

L-Dopa- Levodopa

LIRL- Limite Inferior de Resposta Linear

log D- Coeficiente de Distribuição

log P- Coeficiente de Partição

LPD- Limite Prático de Detecção

MCR- Resolução Multivariada de Curvas

MES - Ácido 2-morfolinoetanosulfónico

MS- Espectómetro de Massas

NEQ- Nova Entidade Química

NMR- Ressonância Magnética Nuclear

NPOE- *orto*-nitrofeniloctiléter

NPV- Voltametria de Pulso Normal

OMS- Organização Mundial de Saúde

*p*- ACBK- poli- acid chrome blue K

PAMPA- *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*

PLS- *Partial Lest Squares* / Mínimos Quadrados Parciais



*p*- AMT- poli- 5-amino-2-mercapto-1, 3, 4-tiadiazole

*p*- ATT- poli- 5-amino-1,3,4- tiadiazole-2 tior

*p*- CCA- ácido poli-calconcarboxílico

PTFE- Politetrafluoroetileno, ou Teflon

PVC- Cloreto de Polivinilo

PVC-CCOH- Cloreto de Polivinilo Carboxilado

PVDF- Fluoreto de Polivinilideno

RP-HPLC- Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência de Fase Reversa

RP-LC- Cromatografia Líquida de Fase Reversa

SIA- Análise por Injeção Sequencial

SIC- Cromatografia por Injeção Sequencial

SPE- Extração em Fase Sólida

SWV- Voltametria de Onda Quadrada

THF- Tetrahidrofurano

TOPA- N, N, N', N' - tetraciclohexil-oxi bis (o-fenilenoxi) diacetamida

UPLC- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

USP- *United States Pharmacopeia*

UV- Ultra-Violeta

UV-Vis- Ultra-Violeta Visível



Desenvolver uma entidade molecular é um trabalho hercúleo, demorado, dispendioso e de elevado risco. Com a significativa redução no aparecimento de novas entidades químicas, faz-se sentir uma recente pressão para o investimento em produtos utilizando princípios activos já aprovados. Com efeito, há que ter em conta que incrementos de inovação na terapia farmacológica relacionam-se não só com agentes medicamentosos inovadores, mas também com diferentes indicações terapêuticas para um fármaco já existente, assim como novas formas farmacêuticas com um perfil farmacológico melhorado. Os medicamentos compostos por uma combinação fixa de princípios activos surgem neste contexto como um factor diferenciador no mercado, evidenciado pelo aumento crescente da sua aprovação e recente lançamento. A estratégia desta linha de pesquisa está relacionada com a identificação de moléculas que, quando associadas, conduzam a uma melhoria significativa de resultados terapêuticos, comparativamente a outras opções. Reformular fármacos que já provaram a sua segurança e eficácia em produtos de combinação fixa representa um plano comercial vantajoso para as indústrias de desenvolvimento farmacêutico maximizarem o retorno do capital. A sustentabilidade de tais medicamentos prende-se com as inerentes vantagens associadas, nomeadamente a adesão aumentada do paciente à terapêutica, efeito farmacodinâmico complementar e biodisponibilidade alargada, redução do número de prescrições e dos custos administrativos relacionados. Um outro plano de acção levado a cabo pelas empresas relaciona-se com a produção de medicamentos genéricos, isto é, cópias de medicamentos inovadores cujas patentes já expiraram, constituídos pelo mesmo princípio activo, dosagem e forma farmacêutica. O mercado dos genéricos encontra-se em franca expansão evidenciada principalmente nos últimos 5 anos, coadjuvada pelas políticas governamentais de apoio ao consumo deste tipo de produtos, com partilha de responsabilidades na demanda pelo desenvolvimento sustentável e inclusão social.

Não obstante as mais-valias que apresentam os medicamentos constituídos por uma combinação de princípios activos, diversos problemas podem ocorrer durante o seu desenvolvimento, começando pela formulação. Só porque dois fármacos são administrados em conjunto para tratar uma dada patologia, não significa *per se* que são passíveis de se combinarem numa única formulação. A ciência neste campo ainda aplica em larga medida a técnica da tentativa e erro. Geralmente, os investigadores iniciam a empreitada pelos métodos mais simples, como alteração de formulação, e gradualmente vão evoluindo para aqueles mais complexos, nomeadamente o isolamento de compostos activos em diferentes camadas. Os ensaios de dissolução ganham neste contexto um

## ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS GERAIS DA TESE

---

papel de relevo, evidenciando-se como técnica *in vitro* de excelência, que de uma maneira expedita e simples, permitem descodificar a cinética de libertação das substâncias activas da forma farmacêutica. A par da concepção da formulação, o desenvolvimento de métodos analíticos adequados ao controlo de matérias-primas, produto a granel e produto acabado, encontra-se presente ao longo das várias etapas do processo de Investigação e Desenvolvimento de uma entidade química com interesse farmacêutico.

Efectivamente, a qualidade dos resultados analíticos é um pilar fundamental no sucesso de programas de desenvolvimento, produção e controlo da qualidade dos produtos farmacêuticos, sejam estes constituídos por um princípio activo ou por uma mistura de vários. Ao longo das últimas décadas, as regulações estabelecidas pelas autoridades competentes relacionadas com o controlo da qualidade de produtos farmacêuticos têm vindo a tornar-se cada vez mais exigentes, justificando o interesse crescente no desenvolvimento e aplicação de métodos automatizados de análise que permitam gerar resultados de um modo expedito, confiável e económico. Este fenómeno não é, de todo, indiferente à globalização da economia, nem à adopção de estratégias de automatização de fluxo de redes de informação e manipulação crescente de amostras por parte de indústria farmacêutica. Neste contexto, torna-se essencial o desenvolvimento de métodos analíticos aplicados aos testes classicamente utilizados no controlo da qualidade e no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Estes deverão permitir de um modo simples e automático, comparar as diversas formulações combinadas, através da determinação simultânea de dois ou mais princípios activos (nos ensaios de doseamento ou dissolução, por exemplo), possibilitando um conhecimento das características dos medicamentos nas fases chave de desenvolvimento de novos produtos, tais como a selecção de forma farmacêutica, nos estudos de estabilidade e nos estudos de degradação forçada, entre outros.

Seguindo a linha de raciocínio, esta dissertação teve como objectivo explorar as potencialidades da automatização de métodos analíticos aplicados no controlo de medicamentos multi-componente. Encontra-se organizada de tal forma que num primeiro capítulo, se apresenta uma introdução (Capítulo I), seguida por um breve apontamento dos procedimentos gerais aplicados na execução experimental (Capítulo II), e subsequente descrição detalhada dos trabalhos e técnicas realizadas, bem como dos resultados obtidos (Capítulos III, IV, V e VI), finalizando com as conclusões (Capítulo VII).

Na introdução (Capítulo I), são referenciados os principais testes realizados pelo controlo da qualidade de uma indústria farmacêutica e aborda-se sucintamente o

## ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS GERAIS DA TESE

---

desenvolvimento farmacêutico. Seguidamente, elabora-se um apontamento global dos métodos analíticos existentes para a determinação de substâncias activas em amostras de produtos farmacêuticos de elevada complexidade, com enfoque na detecção electroanalítica associada aos métodos de fluxo. É dada particular relevância aos ensaios de determinação de teor, dissolução e permeabilidade.

Por sua vez, o trabalho experimental explorado no decorrer desta dissertação debruça-se, tal como já foi referido, sobre o desenvolvimento de métodos analíticos automatizados, pouco poluentes e expeditos para o controlo de formulações farmacêuticas de matriz multi-componente. Os sistemas de análise por injeção sequencial (SIA), foram eleitos para empreender este desafio pelas inúmeras vantagens que apresentam, das quais se destacam a sua elevada capacidade de flexibilização e o facto de incorporarem facilmente diferentes tipos de reactores, dispositivos e detectores, quer nas linhas, quer nas portas das válvulas multiposição, adequando o seu emprego à análise multiparamétrica. Os eléctrodos selectivos a ião (ESIs) enquadram-se perfeitamente como detectores em sistemas automatizados para análise de matrizes complexas, apresentando vantagens apreciáveis relativamente aos outros métodos de detecção comumente empregues.

De acordo com uma linha condutora, o objectivo do trabalho experimental prende-se com a exploração das potencialidades dos sistemas SIA-potenciometria demonstrando-se, quer na automatização dos ensaios realizados nos laboratórios de controlo da qualidade e desenvolvimento farmacêutico, quer na geração rápida e fiável de dados para comparação do comportamento das formulações. São seleccionados, pela relevância que possuem, os ensaios de doseamento, ensaios de dissolução e ensaios de permeabilidade.

Numa primeira etapa, desenvolveram-se e construíram-se eléctrodos selectivos a ião para tiamina e piridoxina (vitaminas B1 e B6, respectivamente) com posterior aplicação a formulações de polivitamínicos, para determinação do teor destas duas substâncias, em processo convencional (Capítulo III). Neste capítulo, pretendeu-se descrever de uma forma mais pormenorizada, o desenvolvimento de membranas sensoras incorporando ionóforos com um padrão de selectividade baseado na formação de complexos de inclusão. A escolha deste tipo de compostos baseia-se na possibilidade do reconhecimento selectivo de analitos em matrizes farmacêuticas de elevada complexidade. A selecção adequada da composição qualitativa e quantitativa da espécie sensora (ionóforo), bem como dos restantes constituintes das membranas (solvente mediador, aditivos, polímero de imobilização), possibilitou a obtenção de unidades

## ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS GERAIS DA TESE

---

sensíveis a diferentes espécies químicas. Nesta etapa, concedeu-se especial atenção ao desenvolvimento e caracterização dos eléctrodos construídos.

Nos trabalhos realizados posteriormente, as unidades potenciométricas desenvolvidas foram construídas com configuração tubular e acopladas nos sistemas SIA, para determinação de espécies em matrizes farmacêuticas multi-componente.

No capítulo IV, procedeu-se à automatização de ensaios de doseamento. Para esse efeito, um dos sensores sensível a vitamina B6, mas com elevada interferência inicial de vitamina B1 em condições não estacionárias, foi inserido num sistema de fluxo por injeção sequencial (SIA) e, com aplicação de ferramentas quimiométricas, modulou-se o sinal analítico obtido, por modo a dosear simultaneamente as duas substâncias em misturas sintéticas, com subsequente aplicação a amostras reais de polivitamínicos. Estas respostas mistas foram exploradas tirando partido das condições hidrodinâmicas de fluxo, com vista ao doseamento simultâneo dos dois princípios activos em solução. No sistema descrito, acoplou-se uma válvula solenóide a um dos canais da válvula multiposição, sendo que esta continha ambas as entradas conectadas a soluções padrão de elevada concentração. Através da optimização dos tempos de abertura/ fecho da válvula, geravam-se soluções em linha com concentrações diferentes de dois analitos, as quais possibilitavam a aquisição de dados para a calibração multivariada. Utilizando a mesma técnica, as soluções mais concentradas de amostra eram convenientemente diluídas com o transportador, a fim de se inserirem no intervalo analítico de resposta do sensor potenciométrico.

Nos trabalhos que se seguem, seleccionaram-se formulações combinadas de ácido valpróico e valproato de sódio, em diferentes dosagens e proporções. No capítulo V, elaborou-se a automatização de ensaios de dissolução de formulações farmacêuticas multi-componente. Para tal, construíram-se e inseriram-se num sistema SIA, ESIs tubulares de sódio e valproato a fim de realizar ensaios de dissolução, com determinação simultânea do íão valproato ou dos íões valproato e sódio, tendo sido obtidos, respectivamente, perfis globais e individuais dos componentes das formulações. Um dos canais da válvula multiposição era inserido num vaso de dissolução e colectava, a tempos programados, quantidades discretas de meio de dissolução que, consoante as substâncias a determinar, eram enviados por caminhos analíticos diversos. Uma das vias do sistema SIA continha um eléctrodo tubular selectivo a um dos analitos de interesse e um eléctrodo de referência. O caminho alternativo era composto por dois eléctrodos selectivos ligados em série, sendo que o ESI inserido a jusante estava conectado à entrada de referência do potenciómetro, funcionando como eléctrodo de referência

## ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS GERAIS DA TESE

---

relativamente ao sensor colocado a montante. Assim, consoante as necessidades do operador, eram gerados perfis de dissolução com uma ou duas espécies.

O mesmo sistema foi aplicado na realização simultânea de ensaios de dissolução e de permeabilidade de anião valproato, utilizando uma membrana sintética, o que permitiu comparar os perfis de dissolução/ permeabilidade gerados nos diversos medicamentos disponíveis (capítulo VI). Para este efeito, uma bomba peristáltica acoplada ao aparelho de dissolução, fazia recircular continuamente o meio de dissolução por uma das entradas de uma câmara de difusão inserida no sistema SIA. A espécie de interesse permeava a membrana contida na câmara e, a tempos programados, eram enviadas em direcção ao detector alíquotas contendo o analito.

Em todos os sistemas desenvolvidos foram estudadas e optimizadas as condições hidrodinâmicas de fluxo, tais como caudal e tempos de aspiração e bombeamento das soluções em direcção ao detector, em função das respostas dos sensores potenciométricos empregues e dos objectivos pretendidos.

Esta dissertação debruça-se, assim, sobre três aspectos fundamentais que se sucedem no decorrer do trabalho experimental: o desenvolvimento de sensores potenciométricos, a sua aplicação em sistemas automáticos de fluxo para realização de determinações na análise de formulações farmacêuticas multi-componente e a utilização dos resultados obtidos como instrumento comparativo entre essas mesmas formulações.





# CAPÍTULO I

## Introdução



***“I often say that when you can measure what you are speaking about, and express it in numbers, you know something about it; but when you cannot measure it, when you cannot express it in numbers, your knowledge is of a meagre and unsatisfactory kind.”***

**Lord Kelvin (William Thomson, 1<sup>st</sup> Baron) (1824-1907) English physicist and mathematician. In: Popular Lectures and Addresses, London, 1889.**

---



## 1. O Controlo da Qualidade na Indústria Farmacêutica

### 1.1. Breve Enquadramento Histórico: A Origem das GMPs e a Qualidade do Medicamento numa Perspectiva Evolutiva

As Boas Práticas de Fabrico (GMPs, expressão derivada do inglês “*Good Manufacturing Practices*”), referem-se a um conjunto de regulamentações internacionais concebidas para providenciar qualidade, eficácia e segurança aos produtos farmacêuticos [1-4]. Pretende-se que, com a adopção das GMPs pela indústria farmacêutica, os medicamentos sejam fabricados consistentemente e controlados de modo efectivo de acordo com parâmetros de qualidade, minimizando os riscos que são inerentes a todos os processos produtivos. Os principais riscos associados incluem contaminação inesperada de produtos, dosagem errada e incorrecta rotulagem dos medicamentos, o que contribui inevitavelmente para a ineficácia ou toxicidade do fármaco em questão. Os objectivos das GMPs consistem, assim, na garantia da qualidade do produto disponibilizado e da protecção do utente, significando que, sempre que se fabrica um medicamento, este possui pureza, potência e segurança asseguradas. Por adopção das GMPs, o fabricante torna-se detentor de um registo permanente que assevera que todo o fármaco passa por um protocolo similar, sem garantias *à priori*. Os aspectos regulamentares abrangidos pelas GMPs podem resumir-se nos seguintes princípios: a implementação de um sistema de gestão da qualidade; a qualificação de pessoas, bem como a gestão eficaz de equipamentos; o rastreio de todas as operações de produção; o controlo da qualidade, englobando a supervisão das fases de amostragem, o cumprimento das especificações e dos procedimentos de libertação dos lotes para o mercado; o controlo de licenças de produção; a revisão e a documentação das reclamações e as recolhas do produto, sempre que necessário; a realização de auto-inspecções, com o intuito de monitorizar quer a implementação das GMPs, quer a concordância com os seus princípios.

A origem das GMPs remonta, provavelmente, aos primórdios da nossa civilização, no que diz respeito às preocupações individuais e sociais da segurança e eficácia de produtos alimentares e terapêuticos [6]. Ainda assim, é de destacar que as ocorrências mais marcantes que estão na base do aparecimento de legislação apropriada, contemplando os aspectos da produção e da segurança do consumidor, se localizam maioritariamente no século XX (Tabela 1), conforme se descreve em seguida.

Tabela 1 – Sequência cronológica dos acontecimentos que antecedem as GMPs

| Ano  | Ocorrência   | Consequência   | Referência |
|------|--|--|------------|
| 1902 | Morte de mais de uma dúzia de crianças pela anti-toxina diftérica contaminada com bacilo do tétano;          | <i>Biological Control Act</i> : Obriga a realizar o teste de pureza e dosagem em todos os produtos biológicos; | [7]        |
| 1906 |  | <i>Food and Drug Act</i> : Ilegalização da venda de carne ou outra comida adulterada;                          | [8]        |
| 1906 | <i>US Pharmacopoeia e National Formulary</i> são oficialmente reconhecidos;                                  | Implementação de parâmetros oficiais de dosagem, qualidade e pureza de fármacos;                               | [9-12]     |
| 1935 | Morte de 107 pessoas intoxicadas com dietilenoglicol;  |  | ---        |
| 1938 |  | <i>Food, Drug and Cosmetic Act</i> : Alarga o controlo aos cosméticos e aos dispositivos de utilização médica; | [13]       |
| 1941 | 300 pessoas gravemente afectadas após ingestão de comprimidos de sulfatiazol, contaminados com fenobarbital; | FDA revê os parâmetros do controlo de qualidade e produção na indústria; (documento base GMPs)                 | [14]       |
| 1962 |  | Aparece oficialmente a frase “ <i>Good Manufacturing Practices</i> ”;  | [15]       |
| 1967 |  | Primeiro esboço da OMS sobre GMPs;   | ---        |
| 1968 |  | Publicação do texto, com revisão pela comissão de peritos da OMS;  | [16]       |
| 1972 |  | Publicação do texto na segunda edição da Farmacopeia Internacional;  | [16]       |

Introduzida nos Estados Unidos pela primeira vez com o intuito de regular os produtos biológicos, o *Biological Control Act* (1902) surge devido à morte de crianças induzida por inoculação de antitoxina diftérica, contaminada com bacilo do tétano. Esta lei torna obrigatório a realização do teste de pureza e dosagem em todos os produtos biológicos, bem como a inspecção de fabricantes e vendedores dos mesmos [7].

O *Food and Drug Act* original, instituído em 1906, torna ilegal a venda de carne ou outra comida adulterada e exige a marcação fidedigna dos produtos [8]. A *US Pharmacopoeia* e o *National Formulary* foram reconhecidos nesse mesmo ano, como entidades que implementam parâmetros oficiais de dosagem, qualidade e pureza de fármacos. A lei inclui providências acerca de erros ou falhas na rotulagem dos medicamentos. Estes eram considerados mal marcados [9] se contivessem álcool, morfina, ópio, cocaína ou qualquer outra droga potencialmente perigosa ou aditiva e o respectivo rótulo não indicasse a sua quantidade e / ou proporção. No entanto, a legislação vigente à época, apenas dizia respeito à rotulagem e não às precauções especiais de utilização [10-12].

Após a introdução das sulfamidas em 1935, uma empresa farmacêutica conceituada da época incluiu dietilenoglicol (um solvente orgânico tóxico) como constituinte na formulação de um colutório de sulfanilamida, levando à morte de 107 pessoas. Como consequência, em 1938, o *Food Drug and Cosmetic Act* delibera que as empresas farmacêuticas devem provar a segurança dos seus produtos antes da comercialização dos mesmos, com o intuito de alargar o controlo aos cosméticos e aos dispositivos de utilização médica. Esta directiva providencia o estabelecimento de intervalos de segurança no uso inevitável de substâncias tóxicas e autoriza padrões de qualidade, identidade e preenchimento das embalagens contendo alimentos [13].

Em 1941, cerca de 300 pessoas ficam gravemente debilitadas após a ingestão de comprimidos de sulfatiazol contaminados com fenobarbital, fabricados pela *Winthrop Chemical Company*, em Nova Iorque. Uma investigação aprofundada da FDA (*Food and Drug Administration*), quer à produção quer ao controlo da qualidade, revela falhas severas no fabrico e prática de fraude com o intuito de recomercializar o produto [14]. O incidente potencia, por parte da FDA, a necessidade de rever os parâmetros do controlo da qualidade e produção na indústria, tornando-se a base dos padrões requeridos na produção de todos os produtos farmacêuticos e resultando no que mais tarde viriam a ser conhecidas como as GMPs [14]. A frase “*Good Manufacturing Practices*”, aparece, oficialmente, pela primeira vez, em 1962, em adenda à *US Food, Drug and Cosmetic Act* [15]. O primeiro esboço da Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre GMPs é preparado em 1967 por um grupo de consultores. Subsequentemente, é submetido e aceite na vigésima primeira conferência mundial de saúde, sob o título de “*Draft requirements for Good Manufacturing Practice in the Manufacture and Quality Control of Drugs and Pharmaceutical Specialities*”. Finalmente, este texto é reproduzido em 1968 com revisões por uma comissão de peritos da OMS, e na segunda edição da *Farmacopeia Internacional*, em 1972 [16].

O reforço da legislação, como *modus operandi* para asseverar a produção de medicamentos com a qualidade requerida, não é, de todo, suficiente, sendo responsabilidade do próprio fabricante estabelecer os meios mais adequados para garantir a qualidade e segurança dos produtos comercializados. Não obstante a importância que detém o controlo da qualidade em todo este processo, é essencial tomar consciência que, o objectivo final da indústria farmacêutica é obter um processo de fabrico sem falhas. Efectivamente, o controlo da qualidade destina-se a assegurar, quer ao utilizador profissional, quer ao consumidor final, que a produção de cada lote está de acordo com o especificado no rótulo e cumpre os requisitos legais. Por si só, e apesar de abranger os parâmetros científicos, o controlo da qualidade não é suficiente para atingir os propósitos na totalidade, ainda que represente, indiscutivelmente, uma ferramenta vital no processo. Adicionalmente, deverá existir por parte da indústria uma completa dedicação e compromisso em desenvolver qualidade e fiabilidade em todo o produto farmacêutico [1- 5].

Com o recente fenómeno da globalização e consequente alteração drástica da localização geográfica do fabrico de medicamentos evidenciadas particularmente nos últimos 20 anos, coloca-se a questão de perceber como se garante, nestas condições, a qualidade do medicamento [17]. Actualmente, todos os medicamentos comercializados na Europa, produzidos na Europa ou em países terceiros, têm obrigatoriamente de ser fabricados em unidades industriais aprovadas pelas Autoridades Europeias do Medicamento ou por autoridades de países terceiros com os quais a Europa possui acordos, através dos quais reconhece e delega competências, garantindo a aplicação dos mesmos níveis de exigência e dos padrões de qualidade praticados. Cada unidade industrial é, deste modo, autorizada e qualificada por períodos de tempos limitados, o que obriga à revalidação periódica da sua autorização sendo, por esta via, alvo de uma vigilância apertada do seu desempenho.

Desta forma, todos os medicamentos fabricados fora do espaço europeu sofrem, obrigatoriamente, no momento da sua importação, uma reavaliação da qualidade, através da aplicação de metodologias de controlo da qualidade aprovadas pela Autoridade do Medicamento. Adicionalmente, a informação sobre qualidade conjuntamente com a revisão de toda a documentação relativa ao processo de fabrico, embalagem e transporte, entre outros aspectos, é utilizada para uma decisão final sobre a libertação de cada lote fabricado para comercialização. Este conjunto de actividades e responsabilidades visam assegurar a eficácia e a segurança dos medicamentos genéricos ou inovadores, independentemente da localização geográfica da sua produção. É assim evidente, no contexto global de actividade farmacêutica, que a melhor estratégia



para garantir e salvaguardar a qualidade reside em privilegiar critérios de competência, de desenvolvimento tecnológico, de qualificação de recursos humanos e da implementação de práticas efectivas de gestão e garantia da qualidade no fabrico de medicamentos.

## 1.2. *Testes e Especificações para Aplicação em Princípios Activos e Produtos Farmacêuticos Acabados.*

As especificações consistem numa lista de testes (físicos, químicos, biológicos e microbiológicos) referentes a procedimentos analíticos, conjuntamente com os critérios de aceitação para o resultado obtido. Os critérios podem ser limites numéricos, intervalos ou parâmetros qualitativos. A título exemplificativo, pode citar-se um ensaio de doseamento de um princípio activo, que deve estar compreendido no intervalo percentual 95-105, relativamente à dosagem reclamada no rótulo, ou a cor branca de uma formulação sólida destinada à administração *per os* [18-20]. A expressão "conforme as especificações" é utilizada recorrentemente no seio da indústria farmacêutica, e significa que o API (abreviatura derivada do Inglês, "*Active Pharmaceutical Ingredient*") ou o produto acabado, quando testados de acordo com os procedimentos analíticos, satisfazem os critérios de aceitação estabelecidos e são considerados aceitáveis para o uso a que se destinam.

As especificações aplicam-se nas várias fases do ciclo de vida de um medicamento e, em última análise, é o seu cumprimento que possibilita a libertação dos lotes de produto acabado para o mercado. Assim sendo, procede-se à realização de testes nas matérias-primas (englobando os princípios activos e os excipientes), dos intermediários do produto, sempre que aplicável, (por exemplo a forma farmacêutica comprimido, antes de ser sujeito ao processo de revestimento final) e do granel. Para além do controlo aplicado com vista à libertação dos lotes, uma especificação pode ser executada durante o processo de fabrico, como parte integrante do controlo em processo, denominado por IPC, (abreviatura derivada do Inglês, "*In Process Control*"). Um teste de uniformidade de massa ou um teste de dureza são exemplos de IPCs levados a cabo na produção de sólidos. As especificações podem também ser aplicadas com o intuito de estabelecer ou corroborar a conformidade de uma substância activa durante o seu período de utilização (reteste), ou de um produto acabado, no espaço temporal que corresponde ao prazo de validade. Os testes realizados nestas condições são denominados por ensaios de

estabilidade. Estes dados apresentam-se junto das autoridades aquando do registo de um novo produto farmacêutico, a fim de estabelecer o seu prazo de validade. No entanto, estas análises nem sempre se executam lote-a-lote. Uma vez concedida a aprovação para a comercialização de um dado produto farmacêutico, devem ser mantidos ensaios de estabilidade regulares, de forma a avaliar o comportamento do medicamento relativamente aos diferentes factores ambientais (estabilidade *follow-up*), bem como para assegurar que a qualidade do fármaco não é afectada por eventuais alterações que ocorram no processo produtivo. Os critérios de aceitação para o prazo de validade estabelecem-se com base na informação de estabilidade disponível, e as diferenças que existam relativamente aos critérios de libertação podem ser justificadas à luz das alterações observadas no produto.

É de evidenciar que as especificações são escolhidas para confirmar a qualidade do princípio activo e/ ou produto acabado, e não para o estudar de um modo exaustivo. Nesse sentido, aquelas dever-se-ão focar nas características úteis para assegurar a eficácia e segurança dos medicamentos. Efectivamente, as especificações constituem parâmetros indicadores de qualidade, propostos e justificados pelo fabricante do produto, e aprovados pelas autoridades reguladoras do medicamento como condições de autorização. Existem no entanto muitas outras peças fundamentais que contribuem para o mesmo fim, das quais se destacam a projecção e a caracterização do produto durante o processo de desenvolvimento, a partir da qual as especificações são baseadas, e o cumprimento das GMPs, que implicam entre muitos outros princípios, a validação adequada de métodos analíticos e de fabrico [21].

Dentro dos tipos de testes que se aplicam às substâncias activas e aos produtos farmacêuticos acabados, podem considerar-se de modo geral os universais e os específicos. Estes últimos estão dependentes das características particulares do princípio activo ou da forma farmacêutica em causa.

### 1.3. Testes/ Critérios **Universais** aplicados a Substâncias Activas e a Produtos Farmacêuticos Acabados

#### 1.3.1. Testes Aplicados a Substâncias Activas

Tal como foi referenciado na secção anterior, existem determinados testes que são aplicados de modo transversal a todo o tipo de substâncias activas. Dentro destes, inclui-

se o teste de descrição, que se baseia em parâmetros qualitativos, e os testes de identificação, de doseamento e de impurezas, que assentam em parâmetros quantitativos.

O teste de descrição reveste-se de uma considerável importância, pois possibilita a aquisição rápida de informação acerca de um dado API, pela constatação visual da semelhança ou diferença relativamente às características usualmente apresentadas por este. Consiste, de modo generalizado, no resumo das qualidades do princípio activo, tais como o estado físico e cor. Se alguma destas variáveis se modificar durante o acondicionamento, poderá ser indicativo da ocorrência de degradação e, como tal, deverá ser desencadeado um processo de investigação.

A identificação do API, por sua vez, remete para um procedimento analítico capaz de discriminar entre compostos com estruturas relacionadas que poderão estar presentes na amostra. Os métodos utilizados devem ser preferencialmente selectivos para a substância activa alvo e pode citar-se, a título exemplificativo, a espectroscopia de infravermelho. É de referir que não se considera selectiva a identificação realizada exclusivamente através de um tempo de retenção cromatográfico, aceitando-se, no entanto, a junção de dois métodos analíticos independentes, como um cromatográfico e um espectroscópico. Deste modo, uma corrida efectuada num cromatógrafo líquido de elevada eficiência (HPLC), acoplado a um detector *diode array* ou espectrómetro de massa, providencia ambos os parâmetros, através da combinação do tempo de retenção cromatográfico com o espectro UV ou MS do pico que elui, contra um padrão certificado. Se a substância é um sal, o teste de identificação deverá ser selectivo para os iões individuais. As substâncias opticamente activas podem também necessitar de um teste de identificação selectivo, ou da realização de um ensaio quiral.

Com o intuito de aferir o conteúdo em princípio activo de uma dada substância, inclui-se um teste denominado por ensaio de doseamento, que deve ser idealmente selectivo e indicador de estabilidade, ou seja, capaz de dosear o princípio activo, discernindo entre este e impurezas conhecidas ou desconhecidas, que se formem pela sua degradação, ou outras impurezas resultantes da síntese. Em muitos casos, existe a possibilidade de empregar o mesmo procedimento analítico (por exemplo HPLC-UV), para a determinação simultânea do princípio activo e das impurezas. Quando é utilizado um ensaio não selectivo para doseamento, como uma volumetria, deverão ser aplicados outros procedimentos analíticos, nomeadamente um método de HPLC-UV para aferição das impurezas. A quantificação destas envolve geralmente o desenvolvimento de procedimentos analíticos para determinação de impurezas de carácter orgânico e

inorgânico [23], bem como para dosear o teor de solventes residuais [24]. A técnica analítica de eleição para análise de impurezas é o HPLC-UV, ao passo que, no estudo dos solventes residuais, recorre-se com maior frequência à cromatografia gasosa (GC), com detector por ionização em chama (FID).

### 1.3.2. Testes Aplicados a Produtos Farmacêuticos Acabados

Para todos os produtos farmacêuticos acabados, são igualmente providenciados os ensaios de descrição. No caso das formas farmacêuticas sólidas, para além da forma e da cor, refere-se o seu tamanho (diâmetro e espessura), sendo este um procedimento quantitativo.

Com a execução dos testes de identificação, procura-se estabelecer a identidade do, ou dos APIs presentes no produto farmacêutico, sendo importante discriminar estes princípios activos daqueles cuja estrutura molecular é similar. De igual modo ao que ocorre com a identificação realizada na substância activa, o uso de somente um parâmetro cromatográfico não é suficiente para aceitação do ensaio.

Tal como na análise de APIs, o ensaio de doseamento deve idealmente incluir um procedimento selectivo e indicador de estabilidade para determinar a dosagem do, ou dos princípio(s) activo(s) presentes na forma farmacêutica. Os resultados dos testes de uniformidade de teor, em que se quantifica o princípio activo individualmente no produto acabado, em 10 unidades da forma farmacêutica, podem ser utilizados para o doseamento de API, se os métodos analíticos empregues forem apropriados para esse fim. É de ressaltar que, sempre que existir evidência da interferência dos excipientes com a realização do procedimento analítico não selectivo, nomeadamente num doseamento efectuado através de absorção no UV, deve aplicar-se um procedimento selectivo.

Na categoria dos testes de impurezas, incluem-se as de natureza orgânica e inorgânica [25] e os solventes residuais [24]. As impurezas orgânicas que advêm da degradação dos princípios activos e aquelas provenientes do processo de fabrico dos mesmos, devem ser monitorizadas no produto final e os respectivos limites de aceitação são estabelecidos, considerando cada produto de degradação individualmente, e a sua totalidade. No que diz respeito àquelas impurezas resultantes do processo de síntese do princípio activo, o seu controlo restringe-se usualmente à substância activa e, como tal,

não se incluem nos limites de impurezas totais. No entanto, se a impureza de síntese é também um produto de degradação, o seu nível é monitorizado e incluído nos limites totais de produtos de degradação. Apesar de o teste de impurezas ser considerado universal, é possível, através da aplicação de métodos analíticos apropriados, comprovar que, numa dada formulação específica e nas condições de armazenamento previstas, o princípio activo não se degrada. Consequentemente, os testes aos produtos de degradação podem ser reduzidos ou mesmo inexistentes, mediante a aprovação das respectivas autoridades reguladoras.

#### 1.4. Testes / Critérios **Específicos** Aplicados a Substâncias Activas e a Produtos Farmacêuticos Acabados

Adicionalmente aos testes universais anteriormente descritos, são muitas vezes considerados testes específicos, aplicados caso a caso, consoante o API ou a forma farmacêutica estudada. Estes incluem-se nas especificações para o controlo do lote, sempre que demonstram possuir impacto na qualidade do princípio activo e da forma farmacêutica. Durante o processo de desenvolvimento farmacêutico e, à medida que se vai adquirindo informação adicional acerca de um dado produto, poderão ser utilizados testes adicionais, em situações específicas.

##### 1.4.1. Testes Aplicados a Substâncias Activas

Dependendo da natureza da substância activa e do uso a que se destina, existe a possibilidade de serem avaliadas as suas propriedades físico-químicas. Estas incluem a determinação de características tão diversas como o pH de uma solução aquosa, o ponto de fusão ou intervalo de fusão de um sólido, e o índice de refração de um líquido. Assim sendo, e a título exemplificativo, os procedimentos a utilizar podem basear-se na análise refractométrica recorrendo ao refractómetro de Abbé, na análise potenciométrica do pH com eléctrodo de vidro e na análise do ponto de fusão pelo método do tubo capilar.

Durante o desenvolvimento de um produto e tendo por base o conhecimento do processo de fabrico do mesmo, deverá estudar-se a necessidade de incluir testes e critérios de aceitação para determinação das impurezas inorgânicas na substância activa,

nas quais se incluem os catalizadores de reacção. Quando se realizam estes ensaios, é necessário levar em consideração que os procedimentos e critérios de aceitação para cinzas sulfatadas e resíduos de ignição seguem os procedentes dos métodos compendiais como, por exemplo, os descritos na farmacopeia dos Estados Unidos [26], ao passo que as outras impurezas são determinadas por métodos apropriados, tais como a espectroscopia de absorção atómica.

De igual forma aos exemplos anteriormente citados, de acordo com a natureza de um dado API, o uso a que se destina e o seu processo de fabrico, podem aplicar-se diferentes tipos de testes microbianos e respectivos critérios de aceitação [27]. A título exemplificativo, citam-se os testes de esterilidade, quando executados nas substâncias fabricadas como estéreis e testes de endotoxinas, sempre que os princípios activos são destinados a serem formulados como produtos farmacêuticos injectáveis. No que diz respeito aos limites microbianos de um princípio activo e aplicando os procedimentos propostos pelas farmacopeias e normas internacionais [27, 28, 29], podem ser especificados a contagem total de microorganismos aeróbios, leveduras e fungos e a ausência de bactérias específicas (por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras).

No decurso dos estudos de desenvolvimento farmacêutico, verifica-se frequentemente que muitos princípios activos são higroscópicos, sofrem degradação em meio húmido, ou são hidratos estequiométricos. Nestes casos, justifica-se a aplicação de um teste para determinação do conteúdo em água. O critério de aceitação estabelece-se com base em dados dos efeitos da hidratação ou absorção de humidade. Em alguns casos, um procedimento simples baseado na perda de massa por secagem poderá ser considerado apropriado. No entanto, é preferível a utilização de uma metodologia de detecção mais exacta e sensível, como uma titulação de Karl Fisher. É também usual que muitos APIs sólidos existam sob mais de uma forma cristalina, com diferentes propriedades físicas. Este fenómeno é denominado polimorfismo, e aplica-se, não só às formas cristalinas elementares, mas também à sua hidratação de solvatação, constituindo, neste caso, aquilo que vulgarmente se designa por pseudopolimorfismo. As diferenças nestas formas são susceptíveis de afectar a qualidade e eficácia dos produtos farmacêuticos. Sempre que for comprovado que as formas polimorfas alteram a actuação, biodisponibilidade e / ou estabilidade do princípio activo, a forma sólida apropriada para utilização como medicamento deverá ser especificada. A existência de formas múltiplas é inferida através da sua avaliação recorrendo a medidas físico-químicas e técnicas diversas como, por exemplo, a determinação do ponto de fusão, o espectro de infra-vermelho (IV), a difracção de raios X, a análise térmica, a

espectroscopia de Raman, a microscopia óptica e a ressonância magnética nuclear (NMR).

A determinação da distribuição da dimensão de partícula de um princípio activo é um ensaio realizado naqueles APIs destinados à utilização em formulações farmacêuticas sólidas ou suspensões. É um parâmetro com impacto significativo na estabilidade do produto final, uma vez que é susceptível de influenciar factores como o grau de molhabilidade de um pó, em contacto com um líquido, ou a extensão de exposição de um sólido ao ar e à luz. É igualmente relevante para a velocidade de dissolução do API e conseqüentemente, para a sua biodisponibilidade. Dependendo do processo utilizado na síntese da substância activa, existe a possibilidade de se obterem lotes com partículas de tamanhos diversos e, neste caso, a determinação do parâmetro supracitado adquire elevada importância no controlo da qualidade. Uma das técnicas analíticas mais utilizadas é a difracção de raios laser, sendo que se recorre frequentemente à microscopia para o mesmo fim.

#### 1.4.2. Testes Aplicados a Produtos Farmacêuticos Acabados

De acordo com o tipo de produto farmacêutico acabado que se pretende controlar, incluem-se geralmente testes e critérios de aceitação adicionais. Na secção seguinte dá-se a conhecer uma amostra representativa dos principais tipos de testes e critérios apropriados, para determinadas formas farmacêuticas. Estas incluem sólidos de administração oral, líquidos de administração oral e produtos parentéricos de pequeno e grande volume.

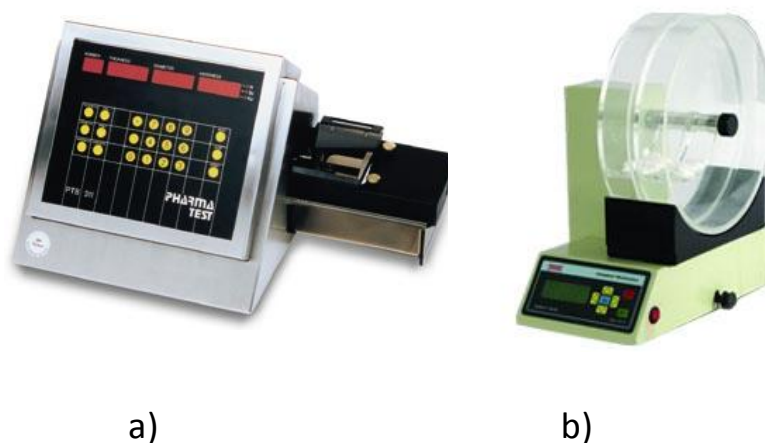
Devido à natureza do trabalho experimental descrito nesta tese se debruçar em grande parte sobre a temática dos ensaios de dissolução, confere-se em seguida uma especial atenção e pormenor às especificidades e aplicações deste teste.

##### **1.4.2.1. Testes Aplicados a Sólidos para Administração Oral**

Na gama dos produtos farmacêuticos formulados como sólidos para administração oral é vulgar a execução dos testes seguidamente descritos em formas farmacêuticas do

tipo comprimidos (revestidos e não revestidos) e cápsulas duras. É de ressaltar que alguns poderão também ser aplicados a cápsulas moles e grânulos.

De um modo geral, os comprimidos deverão possuir suficiente força mecânica para resistir a quebras durante o transporte, em condições normais, acondicionamento e manuseamento e ainda assim serem suficientemente moles para se desintegrarem e dissolverem apropriadamente após ingestão. As forças que habitualmente causam rupturas, quebras ou lascas nos comprimidos são a fricção e o choque. A dureza de um comprimido é consequência da pressão aplicada na fase de compressão e é um critério fundamental a determinar, na medida em que pode afectar a sua desintegração e dissolução. O teste de friabilidade relaciona-se intimamente com o de dureza e pretende avaliar a capacidade dos comprimidos em suportar abrasão no manuseamento, armazenamento e transporte. Na Figura 1 representam-se unidades comerciais usadas para a determinação destes parâmetros na indústria farmacêutica. Normalmente executa-se o teste de dureza e / ou friabilidade, como controlo durante o processo de fabrico (IPC). Nestas circunstâncias, não se incluem geralmente estes atributos nas especificações de libertação. No entanto, se as características de dureza e de friabilidade possuem um impacto crítico na qualidade do produto farmacêutico, o que se verifica por exemplo nos comprimidos mastigáveis, os critérios de aceitação são incluídos na especificação para libertação do lote.



**Figura 1- Imagens de aparelhos comerciais nos quais se realizam: a) Testes de Dureza e b) Testes de Friabilidade**

A fim de assegurar a consistência das formas farmacêuticas, cada unidade de um lote deverá ter um conteúdo em princípio activo dentro de um limite estreito, relativamente à dosagem rotulada. O termo uniformidade das preparações farmacêuticas



pode definir-se como o grau de uniformidade da quantidade de princípio activo em cada forma farmacêutica. Este termo refere-se, quer à massa da forma farmacêutica (uniformidade de massa), quer ao conteúdo em substância activa (uniformidade de teor), usando-se para a sua avaliação um procedimento descrito nas farmacopeias, nomeadamente na *USP Pharmacopeia* [30]. Geralmente, a especificação inclui o cálculo do teor individual de API, realizado em 10 unidades da forma farmacêutica, por correcção da dosagem da forma em função da sua massa individual e de acordo com os resultados obtidos no ensaio de doseamento ou, alternativamente, a aplicação de um método analítico para quantificar 10 unidades separadamente. A execução de um dos procedimentos supracitados depende de diversos factores, como o peso da forma farmacêutica, o conteúdo do princípio activo na mesma, e do tipo de forma farmacêutica, entre outros. Quando apropriados, estes testes realizam-se como IPCs e os critérios de aceitação respectivos são incluídos na especificação do produto.

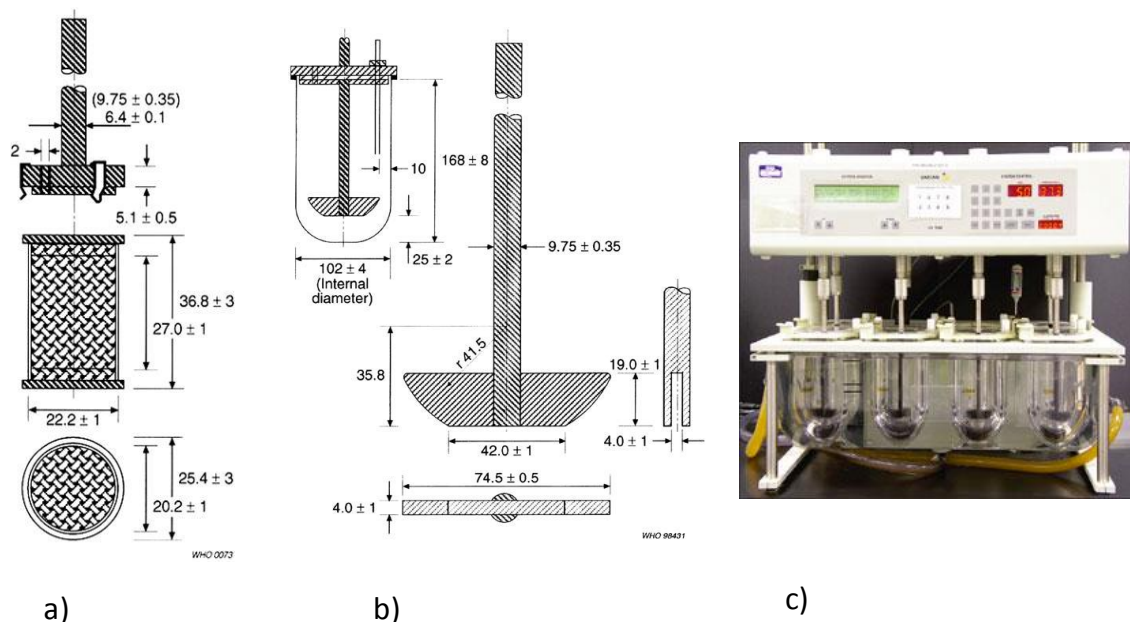
Também no produto acabado, é incluído um teste para determinação do conteúdo em água, sempre que se justifique. De igual forma ao que sucede com o API, prefere-se adoptar um procedimento de detecção selectivo para água como, por exemplo, a avaliação recorrendo a uma titulação pelo método de Karl Fisher.

Os testes de limites microbianos são considerados como atributos das GMPs, e da Garantia da Qualidade. Geralmente, é aconselhada a sua avaliação no produto farmacêutico, a não ser que já tenham sido testados os seus componentes antes do início do processo de fabrico. Neste último caso, o processo tem de estar convenientemente validado e dos estudos existentes é possível inferir um baixo risco de contaminação ou proliferação microbiana. Os critérios de aceitação estabelecem-se para contagem de microorganismos aeróbios totais, contagem de fungos e leveduras totais, ausência de bactérias específicas (como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*). A sua determinação ocorre no processo de fabrico, tendo por base procedimentos adequados, descritos, por exemplo, nas monografias da USP [31], com uma determinada frequência e tempos de amostragem, justificada pelos dados e experiência que existem relativamente ao produto em causa. Tal como para os APIs, o tipo de testes microbiológicos e dos respectivos critérios de aceitação baseiam-se na natureza do próprio processo, da substância activa e do uso a que se destina o produto farmacêutico.

As especificações para medicamentos sólidos *per os* normalmente incluem a cinética de libertação do princípio activo da forma farmacêutica. Neste contexto, o ensaio de dissolução é geralmente requerido para todas as formulações farmacêuticas sólidas

de administração oral, nas quais a absorção do princípio activo precede o seu efeito terapêutico. As raras excepções são os comprimidos que cumprem os requisitos de completa solubilidade ou de muito rápida desagregação e fármacos radioactivos. No entanto, quase todas as monografias compendiais de produto acabado sólido abrangem actualmente este ensaio. Para o efeito, são utilizados aparelhos de dissolução com requisitos e especificações descritos nas Farmacopeias [29, 32].

Geralmente, os ensaios são conduzidos a 37°C e o meio de dissolução é preferencialmente água desgaseificada. No entanto, poderão ser realizados num tampão aquoso (tipicamente com pH compreendido no intervalo 4 a 8) ou ácido diluído (ácido clorídrico de 0,001 a 0,1 N), quando as características de solubilidade do princípio activo ou produto farmacêutico em causa estão comprometidas. O volume de meio a utilizar deverá ser pelo menos três vezes o volume suficiente para se obter uma solução saturada do respectivo princípio activo, garantindo desta forma que a dissolução é independente da solubilidade do mesmo. Os volumes commumente empregues situam-se no intervalo 500 a 1000 mL, sendo possibilitada a utilização de volumes superiores (mais do que 2000 ml) para análise de fármacos com solubilidade limitada. A selecção do aparelho adequado é realizada de acordo com a formulação e com o seu comportamento nos ensaios *in vitro*. Quando os ensaios de dissolução são realizados aplicando velocidades de rotação elevadas produzem, geralmente, resultados menos discriminativos, isto é, menos capazes de detectar diferenças na dissolução da formulação. Para colmatar este facto e de acordo com os dados obtidos durante os estudos de desenvolvimento farmacêutico, avaliam-se e seleccionam-se velocidades de rotação mais reduzidas. As velocidades frequentemente utilizadas são de 100 rpm para o aparelho I (Cesto) e 50 rpm para o aparelho II (Pás), para formas farmacêuticas sólidas e 25 rpm para suspensões. Na Figura 2, encontram-se esquematizadas as dimensões de alguns componentes do aparelho de dissolução.



**Figura 2- Aparelho de dissolução. Desenhos esquemáticos dos componentes: a) Cesto – aparelho I; b) Pá – aparelho II, reproduzidos da Farmacopeia Europeia [29] (dimensões em mm). O aparelho II geralmente é reservado para comprimidos, enquanto que o aparelho I se aplica a cápsulas ou formas farmacêuticas com tendência a flutuar ou que se desintegram lentamente. c) Imagem de aparelho de dissolução comercial, cujas hastes podem ser substituídas por cestos ou pás, consoante a especificidade dos ensaios a realizar.**

Conforme inicialmente referido, é imperativa a avaliação do tempo de dissolução quando se consideram formulações farmacêuticas de libertação imediata [32]. Para propósitos compendiais, o tempo do teste é, de um modo geral, 30 a 60 minutos, com uma única especificação de percentagem de princípio activo dissolvida, a um dado tempo, relativamente à quantidade especificada no rótulo. No entanto, na presença de formas farmacêuticas de libertação modificada [33- 36], são geralmente estabelecidas condições teste e procedimentos de amostragem apropriados, significando que as recolhas de líquido de dissolução deverão ser realizadas a tempos variados, após o início do teste. Nestes casos, apresenta-se um gráfico de quantidade de princípio activo dissolvido, em função do tempo. Os tempos de amostragem e as respectivas especificações são expressas em percentagem de API libertado relativamente ao conteúdo rotulado (Q), caindo quase sempre no intervalo de Q 70 a 80 % de produto dissolvido. Este procedimento aplica-se a formas farmacêuticas de libertação prolongada, enquanto que, para formas farmacêuticas de libertação retardada, se executam geralmente testes de duas fases (usando diferentes meios de dissolução em sucessão, ou em paralelo). Para efeitos compendiais, são requeridas pelo menos três amostragens

para caracterizar o perfil de libertação do princípio activo da forma farmacêutica. Um tempo de amostragem inicial é habitualmente obtido uma a duas horas após o início do teste, com o intuito de demonstrar que é pouco provável a ocorrência de sobredosagem. Um tempo intermédio define o perfil *in vitro* da dissolução da substância activa e um último tempo de amostragem mostra a libertação completa da mesma. No caso de formulações de libertação imediata ou modificada que sejam constituídas por uma associação de dois ou mais APIs, a determinação da percentagem de libertação deverá ser efectuada para cada uma das substâncias que faz parte da sua constituição (resultados de dissolução individuais).

É de enfatizar que, aquando da submissão de um novo fármaco às autoridades competentes, ou para efeitos de comparação de comportamento de formulações farmacêuticas (por exemplo entre um genérico e o medicamento de referência do mercado), poderão ser exigidos tempos adicionais de análise para além dos especificados, quer para as formulações de libertação imediata, quer para as de libertação modificada [18]. Até há poucos anos, no que concerne à comparação dos perfis de dissolução de formulações farmacêuticas, os ensaios de dissolução com um único tempo de amostragem e respectiva especificação eram empregues para avaliar alterações de escala produtiva e mudanças pós-aprovação, tais como transposição de escala, modificações do local de fabrico, de composição, do equipamento e dos processos de fabrico. Efectivamente, na presença de certas modificações menores, um teste de dissolução empregando um tempo de amostragem e respectiva especificação poderia ser considerado suficiente para assegurar que a qualidade e eficácia do produto em questão permaneciam inalteradas. No entanto, na presença de mudanças mais drásticas, era recomendada uma comparação dos perfis de dissolução efectuados sob condições idênticas no produto, antes e após a alteração [32-35]. Consideram-se como equivalentes dois perfis de dissolução em virtude do seu perfil global, ou da similitude em cada ponto de amostragem durante a execução do teste. A comparação destes é levada a cabo recorrendo a modelos independentes ou dependentes. Um dos modelos independentes mais simples [37] utiliza, quer o Factor de Diferença ( $f_1$ ) quer o Factor de Semelhança ( $f_2$ ) para comparar os perfis. O valor de  $f_1$  fornece a indicação da diferença entre duas curvas a cada tempo de dissolução e é uma medida do erro relativo entre as duas curvas. Por sua vez, o Factor de Semelhança  $f_2$  é uma medida da similitude em percentagem, das curvas de dissolução de duas unidades. As expressões numéricas que definem ambos os factores são, respectivamente:

$$f1 = \left\{ \frac{\left[ \sum_{t=1}^n |R_t - T_t| \right]}{\left[ \sum_{t=1}^n R_t \right]} \right\} \times 100$$

**Equação 1- Factor de Diferença.**  $n$  - nº de pontos de amostragem,  $R_t$  valor de dissolução da amostra de referência, ao tempo  $t$ ,  $T_t$  valor de dissolução da amostra pós-alteração, ao tempo  $t$ .

$$f2 = 50 \times \log \left\{ \left[ 1 + \left( \frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n |R_t - T_t|^2 \right]^{-0,5} \right\} \times 100$$

**Equação 2- Factor de Semelhança.**  $n$  - nº de pontos de amostragem,  $R_t$  valor de dissolução da amostra de referência, ao tempo  $t$ ,  $T_t$  valor de dissolução da amostra pós-alteração, ao tempo  $t$ .

Geralmente, valores de  $f_1$  até 15 e de  $f_2$  superiores a 50 asseguram a equivalência das duas curvas e, conseqüentemente, a eficácia dos lotes pré e pós alteração. Têm sido descritos na literatura muitos outros modelos matemáticos dependentes [37], para modelização dos perfis de dissolução, possibilitando a sua comparação através do cálculo dos coeficientes de variação entre os parâmetros das respectivas equações de ajuste dos perfis. Em cada caso, deve seleccionar-se o modelo mais apropriado tendo em conta o perfil de dissolução dos lotes aprovados, antes das modificações que tenham sido efectuadas, por exemplo, alterações no processo produtivo, na escala de fabrico, ou na formulação. É recomendada a aplicação de um modelo linear ou quadrático com não mais de três parâmetros. Quando a variabilidade entre os lotes ultrapassa os 15% de coeficiente de variação, deve optar-se por um modelo multivariado independente.

Para produtos farmacêuticos contendo substâncias activas que se dissolvem rapidamente a valores de pHs fisiológicos (dissolução superior a 80% em 15 minutos, a pH 1.2, 4.0 e 6.8), o ensaio de desagregação pode substituir o de dissolução. Este teste pretende determinar se os comprimidos ou cápsulas se desagregam dentro de um determinado período de tempo, após serem colocados em meio aquoso [38]. A desagregação completa é atingida quando nenhum resíduo da forma farmacêutica inicialmente colocada no aparelho permanece visível, com excepção de fragmentos insolúveis de revestimento, ou revestimentos de cápsulas sem núcleo palpável no

interior. A utilização do ensaio de desagregação é mais apropriada se se estabelecer uma relação com a dissolução, ou quando a desagregação mostra ser mais discriminativa que esta, isto é, é capaz de distinguir adequadamente aqueles lotes que não cumprem os requisitos de qualidade pretendidos. Neste caso, a execução do ensaio de dissolução poderá não ser necessária. Enquanto decorre o desenvolvimento farmacêutico, é tida em consideração a informação sobre a robustez da formulação e o processo de fabrico da mesma, para a escolha do ensaio de dissolução *versus* o de desagregação.

#### **1.4.2.2. Testes Aplicados a Líquidos e Pós Destinados a Reconstituição como Líquidos Oraís**

Em seguida, será abordada uma selecção dos principais testes geralmente aplicados aos produtos farmacêuticos formulados como líquidos e pós destinados a reconstituição como líquidos oraís. Embora alguns testes sejam semelhantes aos que foram descritos para as formulações sólidas na secção 1.4.2.1., existem outros específicos para este tipo de formulações.

Durante o desenvolvimento de produtos farmacêuticos líquidos, realizam-se estudos de modificação do pH e subsequente verificação do impacto que essas alterações detêm na qualidade do produto final. Como tal, e quando justificável, aplicam-se intervalos de aceitação para o pH.

O ensaio de conteúdo em álcool de um dado líquido para administração oral é efectivado sempre que esta substância é declarada quantitativamente no rótulo, de acordo com as regulações pertinentes. Habitualmente, recorre-se a técnicas de cromatografia gasosa para efectuar o doseamento e os teores de etanol correspondentes são especificados.

No ensaio de uniformidade das preparações farmacêuticas aplicam-se os mesmos critérios que para as formas farmacêuticas sólidas de administração oral. Este conceito destina-se a embalagens contendo formas líquidas de dose única e de múltipla dose. A dose farmacêutica considera-se como a quantidade típica ministrada ao paciente e esta, se controlada, pode ser medida directamente ou calculada com base no peso ou volume totais, divididos pelo número total de doses esperadas. Se o equipamento de dispensa é parte integral da embalagem, deve ser utilizado para medir a dose. No caso dos pós

destinados a reconstituição, o teste de uniformidade de massa é geralmente considerado aceitável.

Também nos testes de limites microbianos se aplicam os mesmos critérios que para as formas farmacêuticas sólidas de administração oral. Se existir justificação científica apropriada, baseada, por exemplo, nos estudos de desenvolvimento ou nos dados recolhidos durante o processo de fabrico do produto em causa, os pós destinados a reconstituição para administração como líquidos orais, podem não ser sujeitos aos testes supracitados. Frequentemente, ocorre que as preparações líquidas orais necessitam de ser formuladas com conservantes antimicrobianos, obrigando ao estabelecimento de critérios de aceitação para o seu conteúdo. Estes baseiam-se na dosagem mínima de conservante adequado para manter a qualidade microbiológica do produto, em todas as fases do seu ciclo de uso proposto até ao final do prazo de validade. A eficácia do conservante utilizado é demonstrada durante o desenvolvimento, transferência de escala e validade do produto, através da realização dos ensaios de estabilidade, embora o teste químico para a determinação do conteúdo de conservante, seja o atributo normalmente incluído na especificação. A especificação da concentração mínima de conservante utilizado é demonstrada como eficaz no controlo de microorganismos pela aplicação de um teste de eficácia antimicrobiana proposto, por exemplo, na Farmacopeia dos Estados Unidos [31]. Os testes de conteúdo em conservantes antimicrobianos são, normalmente, realizados para libertação do lote para o mercado, ainda que, em determinadas circunstâncias, os ensaios em processo possam substituir os de libertação. Para além dos conservantes antimicrobianos anteriormente referenciados, são igualmente efectuados testes com o intuito de quantificar o conteúdo em conservantes antioxidantes, se for necessário recorrer à sua utilização. Em certos casos, sempre que devidamente justificado através de estudos de desenvolvimento e estabilidade, os testes realizados durante a validade do produto são desnecessários e os que são aplicados durante processo de fabrico substituem os de libertação do lote. Obviamente, quando o processo de fabrico ou o acondicionamento é modificado, esta decisão é novamente ponderada.

Durante o desenvolvimento farmacêutico, são escolhidos os componentes dos sistemas de acondicionamento e fecho de um dado produto líquido o mais precocemente possível e, simultaneamente, ocorre recolha de dados referentes à cedência de substâncias. Consequentemente, sempre que os dados de desenvolvimento demonstram essa necessidade, são considerados apropriados testes e especificações para as soluções orais acondicionadas em sistemas sem vidro, ou em acondicionamentos de vidro com fecho sem vidro, relativamente às substâncias extraíveis dos componentes do

acondicionamento/ fecho como, por exemplo, borracha ou garrafas de plástico. Nestes casos, aplica-se um teste de cedência de substâncias do material de acondicionamento. No entanto, quando os dados de desenvolvimento e de estabilidade evidenciam que as substâncias cedidas pelo acondicionamento/ sistema de estanquicidade se encontram consistentemente abaixo dos níveis demonstrados como aceites e seguros, este teste é eliminado. No caso de ocorrer alguma mudança no sistema de acondicionamento e / ou na formulação, poderão ser novamente investigados.

Para suspensões orais e pós destinados a resuspensão, aplica-se um teste de dissolução com os respectivos critérios de aceitação, o que ocorre, por exemplo, na presença de substâncias activas pouco solúveis. O teste utilizado, aparelho, meio e condições seguem normalmente aquelas descritas nas Farmacopeias [29, 32]. Para dosagens farmacêuticas de libertação imediata, são geralmente aceites determinações de uma única amostra de líquido de dissolução e doseamento de princípio activo. No que concerne as formulações farmacêuticas de libertação modificada, devem ser realizadas amostragens a intervalos apropriados, ao longo de todo o ensaio de dissolução. Os critérios de aceitação baseiam-se nos intervalos de variação observados durante o desenvolvimento do produto farmacêutico e consideram os perfis de dissolução dos lotes que demonstram uma aceitável eficácia *in vivo*. Em alternativa ao procedimento de dissolução, pode ser apropriado realizar a avaliação da distribuição da dimensão de partícula, com critérios de aceitação quantitativos. Como fundamento da escolha de um em detrimento de outro, analisam-se os resultados provenientes do desenvolvimento farmacêutico do produto. Os critérios de aceitação incluem uma distribuição de dimensão de partícula aceitável, expressa, por exemplo, em volume total de partículas num dado intervalo (pela apresentação de percentis de volume) e baseiam-se na observação dos intervalos de variação obtidos, levando em consideração os perfis de dissolução dos lotes que demonstram eficácia aceitável *in vivo*, e o uso a que se destina o produto. Uma das técnicas geralmente utilizadas para estimar este parâmetro é a difracção por raios laser [39], podendo também recorrer-se à microscopia ou à tamisação. Quando os produtos demonstram consistência na libertação rápida do, ou dos, princípio(s) activo(s), esta especificação não é considerada.

Tratando-se de suspensões orais que formam sedimento após armazenagem, é apropriada a existência de critérios de aceitação para a redispersibilidade. Nestes casos, adopta-se o procedimento de agitação e deve estar indicado se é manual ou mecânica, bem como o tempo necessário para se atingir a formação da suspensão. Aquando da submissão às autoridades reguladoras do medicamento de um novo fármaco líquido destinado à administração oral, pode propôr-se a eliminação deste parâmetro das



especificações de libertação do lote, a sua realização periódica, ou mesmo deixar de existir de todo, se justificável pelos dados obtidos durante o desenvolvimento farmacêutico. De igual forma, para pós secos destinados a reconstituição e administrados como líquidos orais, podem existir critérios de aceitação para o tempo de reconstituição. A escolha do diluente na submissão de um novo produto farmacêutico líquido, deve ser devidamente justificada às respectivas autoridades reguladoras do país em causa. Este teste pode realizar-se lote-a-lote, periodicamente, apenas em alguns dos lotes, ou mesmo ser eliminado, sendo que todas as possibilidades são justificadas pelos dados obtidos no desenvolvimento do produto. Para este tipo de formulações que requerem reconstituição, poderá existir um teste e critérios de aceitação para determinação do conteúdo em água. Quando o efeito de humidade absorvida *versus* água de hidratação foi adequadamente caracterizado ao longo do processo de desenvolvimento do produto, considera-se geralmente suficiente a aplicação de um procedimento de perda por secagem. Contudo, em determinados casos, e similarmente ao que já foi anteriormente descrito para formas farmacêuticas sólidas, é utilizado um ensaio selectivo, como a aferição do conteúdo em água recorrendo ao método de titulação de Karl Fisher.

Na presença de suspensões e soluções viscosas, inclui-se frequentemente nas especificações a avaliação das propriedades reológicas, tais como a viscosidade ou gravidade específica e, como tal, referem-se claramente os testes e critérios aplicados. Geralmente, a determinação da gravidade específica é efectuada por recurso a um densímetro ou um picnómetro. Um tipo de viscosímetro muito utilizado na indústria farmacêutica, pela sua conveniência e por fornecer resultados rapidamente, é o viscosímetro rotativo, nomeadamente o de Brookfield. Este possui uma pá ou parafuso, que é imerso na amostra teste e mede a resistência ao movimento do componente rotativo [40].

#### **1.4.2.3. Testes Aplicados a Produtos Parentéricos**

Muitos dos ensaios descritos anteriormente para formas líquidas e sólidas destinadas a administração oral são semelhantes aos preconizados para avaliação qualitativa dos produtos parentéricos. Neste caso incluem-se os testes de uniformidade de teor e de pH, a determinação do conteúdo em água, que se reserva a produtos parentéricos não aquosos e aos que se destinam a reconstituição, e a determinação do conteúdo em conservantes antimicrobianos e antioxidantes. Para produtos parentéricos

formulados como suspensões injectáveis, também pode ser pertinente, de acordo com os dados obtidos nos estudos de desenvolvimento farmacêutico, realizar um ensaio de dissolução ou, alternativamente, desenvolver um procedimento analítico adequado para estimar a distribuição da dimensão de partícula. Nos casos de suspensões injectáveis que formam sedimento sob condições de armazenamento, poderá ser apropriado estabelecer critérios de aceitação para redispersibilidade. Similarmente, nos injectáveis que requerem reconstituição, deve existir um critério de aceitação para o tempo que esta demora a ocorrer.

Dado o carácter invasivo de administração, o cumprimento de especificações que garanta a eficácia e segurança é naturalmente mais exigente e, por isso mesmo, acompanhado da realização de testes adicionais quanto às características de esterilidade. Uma vez que a execução deste teste obriga a condições de assepsia rigorosas, essenciais para uma correcta interpretação dos resultados, os analistas devem estar devidamente treinados e qualificados. Com o intuito de garantir a correcta manutenção das condições de assepsia, procede-se periodicamente à realização de amostragens para controlo microbiano do local de trabalho onde são realizados os ensaios. Geralmente, os produtos farmacêuticos analisam-se pelo método da filtração por membrana ou, no caso de este não ser adequado, pela inoculação directa do meio de cultura, conforme especificado nas respectivas monografias compendiais, como é exemplo a citada na USP [41]. De igual forma, o teor endotoxinas constitui um parâmetro incluído na especificação do produto acabado injectável e cujos procedimentos se encontram descritos nas farmacopeias, designadamente a dos Estados Unidos [42]. Este teste pretende detectar ou quantificar endotoxinas bacterianas, que podem estar presentes na amostra analisada. Para esse efeito, recorre-se a um reagente denominado por LAL (lisado de amebócito *Limulus*). Genericamente, existem dois tipos de técnicas para proceder à determinação de endotoxinas, nomeadamente *gel-clot*, que se baseia na formação de gel, e técnicas fotométricas. Estas últimas incluem um método turbidimétrico, no qual ocorre desenvolvimento de turbidez após clivagem de um substrato endógeno e um método cromogénico, sustentado no aparecimento de coloração, após clivagem de um complexo sintético péptido-cromogénico. Mediante justificação adequada, pode aplicar-se o teste de pirogenicidade como alternativa ao de endotoxinas. Este limita um nível aceitável de reacção febril que ocorre num paciente, após aplicação do produto injectável em causa. A sua execução envolve a medição da subida de temperatura nos coelhos, decorrente da injeção, e pretende verificar se as cobaias toleram a administração do produto, numa dose que não exceda os 10 ml/kg, dentro de um período não superior a 10 minutos [43].

Dado o carácter invasivo da administração parentérica, fazem normalmente parte das especificações de todos os produtos deste tipo, a avaliação das partículas visíveis e da limpidez da solução e, se se entender apropriado, o estudo de partículas subvisíveis. Entendem-se como partículas todas as substâncias estranhas, móveis e de trajectória aleatória, excluindo as bolhas gasosas. Não se pode proceder à sua quantificação por análise química, devido à diminuta quantidade de material que representam e à sua composição heterogénea. As soluções injectáveis, incluindo aquelas constituídas por sólidos estéreis destinados a uso parentérico são, de maneira geral, isentas de partículas que podem ser observadas por inspecção visual. A avaliação de partículas estranhas subvisíveis para contagem, dentro de determinados intervalos de dimensão, é executada por um procedimento de obscuração de luz e, no caso de não estar em conformidade com os limites de aceitação estabelecidos, recorre-se à microscopia [44].

As formulações parentéricas embaladas em seringas pré-cheias, embalagens com auto injector ou equivalentes, devem ter procedimentos teste e critérios de aceitação relativos à funcionalidade do sistema de administração. Estas podem incluir controlo da pressão ou integridade do sistema de selagem, ou outros parâmetros como força de libertação do pistão, força da função poder de injeção, etc. Em determinadas circunstâncias estes testes realizam-se durante o processo de fabrico. Tal como ocorre com as formulações líquidas, torna-se necessário efectivar o controlo da cedência de substâncias do material de acondicionamento e a estanquicidade deste. Apesar de o impacto destes testes ser considerado significativamente mais importante para produtos parentéricos do que para líquidos de administração oral, poderão não ser efectuados de todo, se os estudos obtidos durante o desenvolvimento farmacêutico e os ensaios de estabilidade evidenciarem que as substâncias cedidas estão consistentemente abaixo dos níveis considerados como aceitáveis e seguros. Contudo, esta decisão é novamente investigada no caso dos materiais ou da formulação farmacêutica sofrerem alterações.

A pressão osmótica desempenha um papel fundamental em todos os processos biológicos que envolvem difusão de solutos ou transferência de fluidos através de membranas. A osmose ocorre quando o solvente, mas não as moléculas de soluto, atravessam uma membrana semipermeável, movimentando-se de regiões de baixa para regiões de alta concentração, a fim de produzir equilíbrio. Na prática, o conhecimento da pressão osmótica é importante para determinar se uma solução parentérica é hiposmótica, iso-osmótica ou hiper-osmótica, relativamente ao sangue completo. A osmolaridade de uma solução expressa os osmoles em função do volume e, como tal, é corrente a sua utilização na prática clínica. A osmolaridade não pode ser medida, calculando-se teoricamente a partir dos valores de osmolalidade ou, alternativamente,

através das concentrações molares dos solutos. A osmolalidade é determinada experimentalmente, pela medição da depressão do ponto de congelamento da solução [45], recorrendo a um aparelho denominado por osmómetro. Como os valores de osmolaridade calculados teoricamente podem originar resultados erróneos, é preferível optar pela execução experimental. Sempre que a tonicidade de um produto é indicada na rotulagem do mesmo, realiza-se o controlo da osmolaridade, através do procedimento acima descrito. Este teste, ao invés de se realizar lote-a-lote, pode ser executado em IPC, em testes periódicos, ou mesmo pelo cálculo do teor, quando existem dados de desenvolvimento farmacêutico que justifiquem estas decisões.

## Referências Bibliográficas

- [1] United States Department of Health and Human Services. Food and Drug Act, Code of Federal regulations cGMP Title 21, FDA parts 210 & 211; 2002.
- [2] Her Majesty's Stationery Office, Orange guide. Guide to good pharmaceutical manufacturing practice, London; 1983.
- [3] International Conference on Harmonization, ICH Q7. Good manufacturing practice guide for Active Pharmaceutical Ingredients; 2000 Nov.
- [4] Pharmaceutical Inspection Convention Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme /Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products Part I and II; 2007.
- [5] Arayne MS, Sutana N, Zaman MK. Historical incidents leading to the evolution of good manufacturing practice. *Accred Qual Assur* 2008 Aug; 13 (8): 431-432.
- [6] US Department of Health and Human Services, US Food and Drug Administration FDA backgrounder; 1999.
- [7] Miller HI. *To America's Health: a proposal to reform the Food and Drug Administration*. Hoover Institution Press, Stanford; 2000.
- [8] Sinclair U. *The Jungle*. Doubleday, NY; 1906.
- [9] Barkan ID. Industry invites regulation: The passage of Pure Food and Drug Act of 1906. *Am J Public Health* 1985 Jan; 75 (81): 18-26.
- [10] Klein DB, Tabarrok A. Do off-label drug practices argue against FDA efficacy requirements. *Amer J Econ Sociol* 2008; 67 (5): 743-775.
- [11] Niezgoda EL, Richardson MM. Federal food and drug act violations. *Am Crim L Rev* 1998 Apr; 35: 767.
- [12] Merrill RA. The architecture of government regulation of medical products. *Va L Rev Code* 1996 Nov; 82 (8): 1753-1866.
- [13] Cooper DE. Adequate controls for new drugs: good manufacturing practice and the 1938 federal Food, Drug and Cosmetic Act. *Pharm Hist* 2002; 44 (1): 12-23.
- [14] Swan JP. The 1941 Sulfathiazole Disaster and the Birth of Good Manufacturing Practices. *J Pharm Sci Technol* 1999 May; 53 (3): 148-153.

- [15] McClellan MB. The food and drug administration's strategic action plan- protecting and advancing America's health: responding to new challenges and opportunities. US Food and Drug Administration, Washington DC; 2003 Aug.
- [16] WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations 1968; 22<sup>nd</sup> report.
- [17] Dr. António Bica. Qualidade, Segurança e Eficácia de base científica. 2009 Dez, nº11. Disponível em <http://www.infarmed.pt> [acedido em 2010-09-04].
- [18] International Conference on Harmonization, ICH Q6A. Note for Guidance Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances; 2000 May.
- [19] WHO Technical Report Series nº 908, WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparations, thirty-seventh report; 2003.
- [20] EMEA. Directive 75/318/ EEC as amended, Jun 1992. Specifications and control tests on the finished product 3AQ11A.
- [21] International Conference on Harmonization, ICH Q2 (R1). Validation of analytical procedures: text and methodology; 1995 May.
- [22] International Conference on Harmonization, ICH Q1A (R2). Stability testing of new drug substances and products; 2003 Feb.
- [23] International Conference on Harmonization, ICH Q3A (R). Impurities in new drug substances; 2008 Jun.
- [24] International Conference on Harmonization, ICH Q3C. Impurities: Residual solvents; 1997 Dec.
- [25] International Conference on Harmonization, ICH Q3B (R). Impurities in new drug products; 2006 Apr.
- [26] Residue on Ignition (281). In US Pharmacopoeia: USP 30: The National Formulary: NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.
- [27] International Conference on Harmonization, ICH Q6B. Specifications: Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/ biological products.

- [28] Microbiological examination of non sterile products (1111). In United States Pharmacopoeia: USP 30: The National Formulary: NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.
- [29] European Pharmacopoeia, 6<sup>th</sup> Edition, 2008, Strasbourg.
- [30] Uniformity of dosage unit (905). In US Pharmacopoeia: USP 30: The National Formulary: NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.
- [31] Antimicrobial effectiveness testing (51). In US Pharmacopoeia: USP 30: The National Formulary: NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.
- [32] Dissolution (711); The dissolution procedure: Development and Validation (1092). In US Pharmacopoeia: USP 30: The National Formulary: NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.
- [33] CDER. Guidance for Industry: Dissolution testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms; 1997 Aug.
- [34] CDER, Div. of Bioequivalence. Guidance for Industry: Oral Extended (Controlled) Release Dosage Forms, In vivo Bioequivalence and In vitro Dissolution Testing. ODG, Rockville; 1996.
- [35] CDER, Div. Of Bioequivalence. Guidance for Industry: SUPAC-MR: Modified Release Solid Oral Dosage Forms. ODG, Rockville; 1997.
- [36] Crison, JR. Developing Dissolution Tests for Modified Release Dosage Forms: General Considerations. Diss. Technol 2009.
- [37] Moore JW, Flanner HH. Mathematical Comparison of Dissolution Profiles. Pharm Tech 1996; 20 (6): 64-74.
- [38] Disintegration (701). In US Pharmacopoeia: USP 30: The National Formulary: NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.
- [39] Light diffraction measurements of Particle Size (429). In US Pharmacopoeia: USP 30: The National Formulary: NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.
- [40] Viscosity (911). In US Pharmacopoeia: USP 30: The National Formulary: NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.
- [41] Sterility Test (71). In US Pharmacopoeia: USP 30: The National Formulary: NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

[42] Bacterial Endotoxins Test (85). In US Pharmacopoeia: USP 30: The National Formulary: NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

[43] Pyrogen Test (151). In US Pharmacopoeia: USP 30: The National Formulary: NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

[44] Particulate Matter In Injections (788). In US Pharmacopoeia: USP 30: The National Formulary: NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

[45] Osmolality and Osmolarity (785). In US Pharmacopoeia: USP 30: The National Formulary: NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.



*“Life is like a box of chocolates...*

*You never know what you're gonna get!”*

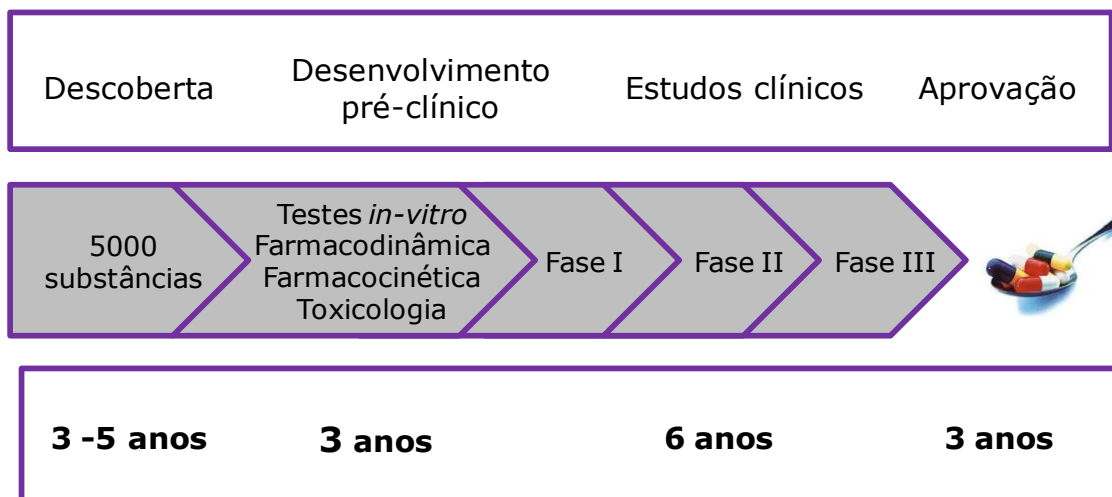
*In: Forrest Gump, 1994*

---



## 2. O Desenvolvimento Farmacêutico

O processo de Investigação e Desenvolvimento (I&D) de produtos farmacêuticos envolve a geração e manipulação de pequenas moléculas, e estende-se desde a escala laboratorial até à produção a nível industrial e subsequente comercialização [1]. Deste modo, o sucesso dos programas I&D depende, em grande parte, da aplicação integrada de conhecimentos em áreas tão diversas como a química orgânica, a química analítica, a engenharia de processos, a análise de risco, as regulamentações de conformidade e as operações de produção, que devem ser executadas de forma efectiva. No espaço temporal que medeia entre o início do processo de Investigação e Desenvolvimento e a aplicação clínica dos fármacos, a produção dos compostos sofre uma transposição de escala de poucas centenas de miligramas, até uma quantidade considerável de quilogramas. Usualmente, esta transição não ocorre de forma harmoniosa e são dispendidos recursos financeiros e humanos consideráveis para desenvolver um método de fabrico capaz de operar à escala piloto e, eventualmente, transitar para a escala industrial, com posterior lançamento no mercado [2]. Determinados factores que são subestimados ou mesmo negligenciados no laboratório, entre os quais se destacam a robustez do processo, a produção de resíduos químicos perigosos, a segurança, o impacto ambiental, a disponibilidade de matérias-primas em quantidades industriais, a propriedade intelectual e o custo final do produto, detêm um impacto decisivo aquando da produção em larga escala e necessitam de ser analisados com cautela. A escolha da melhor rota a seguir para levar a cabo o desenvolvimento é um evento crucial e deverá surgir precocemente no espaço temporal da I&D, caso contrário poderá deter um impacto desastroso na viabilidade financeira das empresas. Adicionalmente aos factores científicos e técnicos, o parâmetro de velocidade coloca-se na linha da frente da “arena” farmacêutica. Historicamente, a indústria dispende mais de 10 anos, desde que surge a ideia à comercialização do produto. Contudo, as circunstâncias actuais exigem que haja uma diminuição no tempo que se estende desde o desenvolvimento pré-clínico ao lançamento do medicamento para o mercado, conforme se descreve na Figura 3.



**Figura 3- Cronograma associado ao processo de Investigação & Desenvolvimento de uma Nova Entidade Química (NEQ).**

Esta mudança de atitude prende-se com a diminuição proporcional do tempo disponível para realizar com eficácia e segurança todos os processos envolvidos e coloca uma enorme pressão na organização, com conseqüentes implicações no sistema de I&D.

### 2.1. Objectivos do Desenvolvimento Farmacêutico

Os objectivos do desenvolvimento farmacêutico relacionam-se com a projecção de um produto de qualidade, bem como do seu processo de fabrico, a fim de obter consistentemente a eficácia pretendida [3,4]. A informação e o conhecimento científico adquiridos nos estudos de desenvolvimento farmacêutico permitem delimitar as especificações e as etapas críticas de controlo da produção e, simultaneamente, constituir a base para a gestão do risco e da qualidade. É importante o reconhecimento de que a qualidade não deverá ser unicamente testada no produto final, mas sim construída durante o processo de desenvolvimento [5]. No mínimo, devem ser determinadas e desenvolvidas estratégias para o controlo de todos os aspectos dos princípios activos, dos excipientes, dos materiais de acondicionamento e dos processos produtivos, que são críticos para a qualidade do produto final. Estes atributos críticos identificam-se geralmente através do grau de impacto que as variações na formulação ou no método de fabrico provocam na qualidade do produto. Assim sendo, uma formulação cuidadosamente projectada, fabricada de acordo com as GMPs, com processos e métodos de teste adequadamente validados, deve estar conforme com as especificações

desejadas no produto final. Quando eficazmente conduzidos, os estudos de desenvolvimento farmacêutico asseguram que são aplicadas especificações relevantes, quer na libertação do lote, quer durante o prazo de validade do mesmo, com o intuito de que as características esperadas no produto farmacêutico sejam consistentemente cumpridas.

## 2.2. *Componentes do Produto Farmacêutico*

### 2.2.1. Princípios Activos

De modo geral, devem ser identificadas as características físico-químicas e as propriedades biológicas dos princípios activos que influenciam a acção do produto farmacêutico final, bem como a sua produção. Pode ser necessário considerar as características físico-químicas do API na formulação, em relação à dosagem e à via de administração. Quando um parâmetro físico demonstra ser variável e crítico para a qualidade do produto, é controlado por um método apropriado, com critérios de aceitação na especificação da substância activa, ou por outros meios adequados. Como consequência, realizam-se testes adicionais para princípios activos usados em formulações específicas, para além daqueles que fazem parte de formulações mais simples e adicionalmente aos testes presentes nas monografias das farmacopeias. Como exemplos de características susceptíveis de serem estudadas, podem referir-se a solubilidade, o conteúdo em água, a dimensão de partícula, as propriedades cristalinas, entre outras, tal como foi referenciado na secção anterior. Estas podem relacionar-se entre si de variadas formas complexas, sendo que o cientista deve sempre tentar prever o seu efeito combinado. A título exemplificativo, considera-se o conteúdo em água de um API, que influencia outros parâmetros, como as suas propriedades cristalinas e a dimensão de partícula. A dimensão de partícula é susceptível de interferir na biodisponibilidade, na uniformidade de dosagem, nas propriedades de uma suspensão, na solubilidade, e na estabilidade do produto. O polimorfismo pode alterar a solubilidade, a biodisponibilidade e a estabilidade. De igual forma, para que se possam formular produtos farmacêuticos compostos, dever-se-á avaliar previamente a compatibilidade entre os diversos princípios activos.

### 2.2.2. Excipientes

A selecção qualitativa e quantitativa dos excipientes mais apropriados à constituição de um fármaco deve ser estabelecida atendendo às características que podem influenciar a eficácia do produto final, como a sua estabilidade e biodisponibilidade, à compatibilidade entre eles e à produção do medicamento. Em relação aos excipientes escolhidos, deverá ser demonstrada a sua capacidade para desempenhar as funções a que se destinam, durante o prazo de validade do produto farmacêutico. É necessário levar em consideração que, sempre que se utilizam novos constituintes no fabrico de um produto, tais como uma matriz diferente para formular uma preparação de libertação prolongada, um novo agente propelante, um facilitador de permeabilidade, etc, devem ser fornecidos às autoridades competentes dados sobre a composição e função desempenhada por cada um destes, conjuntamente com a toda a informação relevante para demonstrar segurança.

## 2.3. *Desenvolvimento do Produto Farmacêutico*

### 2.3.1. Desenvolvimento de Formulação

A primeira fase deste processo denomina-se por pré-formulação e consiste na caracterização da substância activa através da recolha de informação bibliográfica ou experimental, para obter uma base a partir da qual se elabora a formulação propriamente dita. As características físico-químicas da substância poderão condicionar a escolha da via de administração mais apropriada, do material de embalagem primário, e do método de fabrico a utilizar. Em função da informação recolhida definem-se fórmulas experimentais e, conseqüentemente, os excipientes e a composição qualitativa e quantitativa, as especificações e os métodos de fabrico e realizam-se as primeiras experiências à escala laboratorial. São também previamente seleccionados os materiais para acondicionamento dos lotes sujeitos aos estudos de estabilidade. Seguidamente, avaliam-se as características do produto, definem-se as especificações técnicas em falta e selecciona-se a fórmula mais adequada. Concomitantemente a todo este processo, inicia-se, em paralelo, o desenvolvimento, a optimização e a validação dos métodos analíticos.

Tal como já foi anteriormente referido, o desenvolvimento de uma formulação deverá levar em consideração todos os atributos que são críticos para a qualidade do produto farmacêutico, tendo em mente o uso a que se destina e a via de administração. Neste âmbito, a planificação experimental recorrendo à utilização de desenhos experimentais [6], contribui decisivamente na identificação de variáveis que poderão vir a ter impacto na qualidade do produto final. Os processos de mistura constituem um dos parâmetros mais críticos, na medida em que asseguram distribuição uniforme da, ou das, substância(s) activa(s), e permitem colmatar diferenças nas propriedades de superfície, na cristalinidade, na dimensão de partícula, entre outras, que podem resultar na segregação de pós em misturas secas. Assim sendo, a homogeneidade obtida com o processo de mistura deverá ser assegurada e demonstrada durante o desenvolvimento, através dos estudos de validação. Para a unidade sólida de administração oral, é necessário garantir a uniformidade de distribuição entre os diferentes lotes e dentro do mesmo lote, uma vez que a quantificação do teor de API numa mistura não descreve a distribuição do princípio activo pelas dosagens individuais. Como tal, o ensaio de uniformidade das preparações farmacêuticas faz parte das especificações do produto final, sendo uma análise realizada lote-a-lote, como mencionado anteriormente.

Outros tipos de testes fundamentais durante o desenvolvimento do produto são os de desempenho, sendo considerados como um indicador da libertação do princípio activo pela forma farmacêutica no local alvo, dependendo, quer da via de administração, quer da forma farmacêutica utilizada. A libertação do princípio activo da dose farmacêutica pode ser imediata, como nos supositórios e comprimidos de libertação convencional, ou modificada, de forma a alterar a cinética ou local de libertação, da qual são exemplo os comprimidos de libertação prolongada ou retardada. Consideram-se para este fim os ensaios de desagregação e os de dissolução, já descritos na secção dos testes e especificações aplicados a substâncias activas e produtos farmacêuticos. Os testes de desagregação são normalmente executados em cada lote de produto acabado, para formas orais e também para supositórios, e em fases intermédias, como núcleos dos comprimidos antes do revestimento. Este teste pretende demonstrar a quebra efectiva da forma farmacêutica, isto é, a eficácia do desagregante, após administração. Como já referido, pode não ser necessária a aplicação do ensaio de desagregação em rotina, se for incluída nas especificações finais uma dissolução com poder discriminatório. É necessário apresentar informação de suporte para a escolha do ensaio de dissolução em detrimento do ensaio de desagregação, ou vice-versa, bem como para o desenvolvimento e a adequação do teste escolhido.

Os ensaios de dissolução pretendem determinar *in vitro* a quantidade de princípio activo libertada da dose farmacêutica num reservatório e podem, em certas circunstâncias, ter o intuito de reflectir o comportamento *in vivo* do produto. No entanto, na prática, o comportamento *in vivo* é dependente de um elevado número de factores, fazendo com que a correlação *in vivo* / *in vitro* seja difícil de estabelecer. De qualquer modo, este teste providencia um intervalo útil de dados e a investigação das propriedades de dissolução é efectuada para todas as formas farmacêuticas a que se aplica, na fase de desenvolvimento [7, 8]. Da análise destes estudos, é possível inferir acerca da relevância do teste de dissolução para previsão do comportamento *in vivo* da substância activa. Nas preparações farmacêuticas de libertação convencional, os testes de dissolução devem ser realizados durante o desenvolvimento e estudos de estabilidade, para determinar se vão, ou não, ser incluídos rotineiramente nas especificações do produto acabado. No que concerne às preparações farmacêuticas de libertação modificada, a escolha do teste de dissolução e das cinéticas de libertação adoptadas para analisar a reprodutibilidade dos lotes deve ser justificada convenientemente, levando em consideração os ensaios *in vivo* realizados, para estabelecer o perfil de libertação e de absorção do produto. Se possível, realiza-se um estudo que correlacione cinéticas de libertação *in vitro* com resultados *in vivo*, de forma a estabelecer padrões significativos para os testes *in vitro*. Esta correlação reveste-se de particular importância naqueles produtos medicinais que contêm princípios activos com uma janela terapêutica estreita.

O registo de um novo produto farmacêutico junto às autoridades competentes deve ser acompanhado pelos dados das formulações usadas nos ensaios clínicos e dos resultados dos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência. Quaisquer diferenças entre a formulação proposta para comercialização e aquelas que foram utilizadas nos ensaios clínicos e nos estudos de estabilidade pioneiros são obrigatoriamente descritas e justificadas de um modo inequívoco. Neste contexto, torna-se essencial a informação referente a estudos comparativos *in vitro* (ensaios de dissolução), ou *in vivo* (estudos de bioequivalência), entre as formulações usadas nos testes de eficácia clínica e segurança e aquelas propostas para venda ao público.

Pode assim afirmar-se que os objectivos do ensaio de dissolução se alteram durante o ciclo de vida da forma farmacêutica [9]. Nas fases iniciais de desenvolvimento de um medicamento, pretende-se estabelecer o mecanismo de dissolução. Nas fases posteriores, desenvolve-se um conhecimento do impacto da formulação chave e dos parâmetros do processo, na dissolução, e na correlação *in vitro* / *in vivo*. Desta forma, factores como, por exemplo, a dureza dos comprimidos, certos ingredientes inertes que



incham ao absorver humidade e os revestimentos especiais, são passíveis de ajuste durante o ciclo de desenvolvimento produtivo, a fim de controlar a velocidade de libertação dos APIs em solução. Outros parâmetros relacionados com a solubilidade da substância e a sua forma cristalina não se controlam com facilidade. A partir do momento em que ocorre o registo do produto, deve elaborar-se um teste de dissolução aplicado ao controlo da qualidade (CQ), no qual o foco é a consistência lote-a-lote e a detecção de desvios de produção. Neste contexto, o ensaio demonstra que as formas farmacêuticas são produzidas de acordo com as especificações e que todos os parâmetros críticos de processo resultam na consistência do produto, tal como foi referenciado na secção 1.4.2.1. Na fase de desenvolvimento, o alcance do ensaio é alterado, para procurar estimar a libertação do princípio activo no seu desempenho *in vivo*. Na maioria dos casos, os objectivos do CQ *versus* I&D obrigam ao desenho de dois protocolos de dissolução diferentes. No âmbito do CQ, poderá ser apropriado um ensaio super discriminatório para detectar os desvios de fabrico, por mais mínimos que sejam, ao passo que, para prever o comportamento *in vivo* do fármaco, um ensaio deste tipo não é desejável. Em concreto, adequa-se um teste sensível e confiável requerendo comportamentos similares de dissolução *in vivo* e *in vitro*, ou que idealmente possuam uma relação quantificável entre ambos. Durante o processo de investigação de um novo produto é, assim, frequente o emprego de meios de dissolução biorelevantes, isto é, que representem o mais fielmente possível a composição e as características físico-químicas dos fluidos gastro-intestinais, ao mesmo tempo que providenciam estabilidade física, enquanto decorre a dissolução propriamente dita [10].

### 2.3.2. Propriedades Físico-Químicas e Biológicas

As propriedades físico-químicas e biológicas relevantes para a segurança, eficácia e produção de um produto farmacêutico devem ser identificadas durante o seu desenvolvimento, incluindo as implicações fisiológicas da substância activa e os atributos específicos da formulação. Como exemplo, pode citar-se o desenvolvimento de um teste para determinação da fracção respirável de um produto inalado.

#### 2.4. *Desenvolvimento do Método de Fabrico*

No decurso desta fase são considerados os atributos críticos da formulação, conjuntamente com as opções disponíveis do método de fabrico, a fim de orientar a selecção do referido processo e confirmar a adequabilidade dos componentes seleccionados. Os estudos de desenvolvimento de processo de fabrico constituem a base para a melhoria contínua, a validação, a verificação contínua e os requisitos de controlo do mesmo. Os estudos devem também contemplar os atributos físicos, químicos e microbiológicos. A informação recolhida durante esta fase poderá ser utilizada para justificar as especificações do produto farmacêutico.

Durante o programa de desenvolvimento de processo, quaisquer pontos críticos ou pontos finais deverão ser monitorizados ou controlados, como por exemplo o ponto final da granulação. Esta monitorização constante proporciona um maior conhecimento e adaptabilidade do processo e permite desenvolver estratégias de controlo dos atributos críticos, a fim de garantir a produção de um dado medicamento com segurança e qualidade. Tal como já foi anteriormente referenciado, no caso de produtos farmacêuticos estéreis, deve ser escolhido um método de esterilização apropriado, quer da formulação, quer do material de acondicionamento primário.

#### 2.5. *Sistemas de Acondicionamento e Estanquicidade*

Aquando do processo de desenvolvimento da substância activa e do produto acabado, são realizados vários ensaios de estabilidade para a obtenção de dados de registo. Estes dados devem demonstrar que existe um conhecimento alargado da forma como as características do produto são influenciadas por diferentes factores ambientais, servindo de base para a escolha das condições de armazenamento recomendadas e para o tipo de protecção do produto. Pode, assim, dizer-se que a selecção do acondicionamento tem uma lógica subjacente em concordância com o uso a que se destina o produto farmacêutico e com a adequabilidade do sistema de estanquicidade para o armazenamento e o transporte do mesmo. Entre os aspectos avaliados, citam-se, a título de exemplo, o acondicionamento primário, a escolha de materiais, a protecção da humidade e da luz, a compatibilidade dos materiais de construção com a forma farmacêutica, através da investigação da ocorrência de fenómenos de adsorção à

embalagem, ou cedência de substâncias desta, e a segurança dos materiais. Concomitantemente, são realizados ensaios que demonstrem a integridade da embalagem e do sistema de fecho e equaciona-se a existência de possíveis interacções entre o produto farmacêutico e a embalagem, ou rótulo.

No caso de se utilizar um dispositivo doseador (pipeta, caneta injectável, inalador de pó), é importante demonstrar que é cedida uma quantidade exacta e reprodutível da dose nas condições teste que, tanto quanto possível, simulem as do uso do produto.

## *2.6. Desenvolvimento Farmacêutico de Produtos Compostos por uma Combinação de Princípios Activos.*

Os produtos farmacêuticos constituídos por uma combinação de dois ou mais princípios activos têm vindo a ser cada vez mais utilizados, com o intuito de beneficiar dos efeitos aditivos de dois medicamentos administrados simultaneamente. O propósito da combinação deverá sempre basear-se em princípios terapêuticos válidos. Aquando do desenvolvimento de um produto deste tipo, é necessário comparar as potenciais vantagens (actuação mais rápida, mais eficácia, ou eficácia semelhante, com maior segurança) com possíveis desvantagens (como por exemplo toxicidade cumulativa), para cada combinação de princípios activos e para cada dose dessa combinação. As potenciais vantagens da sua administração estão também relacionadas com a eliminação de uma reacção adversa provocada por uma substância na presença de outra, ou a simplificação da terapia, com subsequente aumento da adesão do paciente e melhoria da qualidade de vida [11-14].

### 2.6.1. Pré-Formulação, Formulação e Estabilidade

A estabilidade dos produtos farmacêuticos compostos é um factor que afecta significativamente o resultado do seu desenvolvimento [15-17]. Efectivamente, os problemas de estabilidade nas formulações farmacêuticas combinadas podem atribuir-se à ocorrência de três tipos diferentes de interacção: interacção fármaco - fármaco, fármaco - excipiente e fármaco - excipiente - fármaco. No primeiro caso, dois ou mais princípios activos interagem directamente, resultando na degradação dos fármacos e na formação

de diversas impurezas. Por exemplo, o lisinopril combinado com a aspirina sofre acetilação, originando acetil lisinopril que, ao ser administrado, poderá resultar numa série de reacções adversas [18]. No segundo caso, um princípio activo presente numa formulação combinada contém um excipiente incompatível com outros princípios activos. O telmisartan necessita da incorporação de um excipiente alcalino; contudo, num comprimido de telmisartan-hidroclorotiazida o excipiente induz a acetilação da hidroclorotiazida [19]. No último caso, os princípios activos podem não interagir directamente, mas exibir incompatibilidade na presença de determinados componentes da formulação. Por exemplo, a combinação de rifampicina e isoniazida é estável, na ausência de componentes adicionais que criem um ambiente ácido ou alcalino [20]. Os problemas de incompatibilidade são, muitas vezes, facilitados pelo contacto próximo entre os princípios activos e os excipientes. Existem outros factores como o pH do microambiente da formulação, a temperatura e a humidade, que iniciam e catalisam reacções químicas. A instabilidade das formulações combinadas manifesta-se de variadas formas, usualmente englobadas num de três grupos: instabilidade física, incluindo alterações na aparência (como cor, precipitação, dureza, etc), instabilidade química, demonstrando-se na variação no teor das substâncias activas e impurezas, e instabilidade funcional, provocando alterações no perfil de libertação dos princípios activos.

Uma estratégia sistemática de planeamento do fármaco multi-componente é o primeiro passo para detectar potenciais problemas de compatibilidade e projectar adequadamente o produto. Com efeito, poderá ser possível desenvolver, de modo seguro, um medicamento combinado que seja simultaneamente estável e com um prazo de validade suficiente, desde que os seguintes factores chave sejam considerados: estudos de pré-formulação e degradação forçada, estudos de selecção de forma farmacêutica, estudos de acondicionamento, estudos pré-clínicos e estabelecimento de especificações do produto.

Os estudos de pré formulação e degradação forçada procuram diagnosticar possíveis interacções entre os fármacos, ou entre estes e excipientes, com consequente diminuição do teor de um ou mais princípio activos, ou formação de impurezas. Efectivamente, os ensaios em condições forçadas devem fazer parte integrante dos estudos de desenvolvimento de novas substâncias activas quer estas integrem formulações uni, quer multi-componente. Nestes estudos, os APIs são submetidos a condições forçadas para promover activamente a sua degradação, com a finalidade de identificar possíveis produtos de degradação e compreender os mecanismos fundamentais que provocam a sua formação. De um modo geral, nos ensaios de

degradação forçada avalia-se a influência da temperatura, da humidade e, quando apropriado, da oxidação sobre a(s) substância(s) activa(s). Frequentemente, estima-se o efeito de uma vasta gama de pHs sobre os APIs, bem como a sensibilidade que estes demonstram à hidrólise e à luz (ensaios de fotoestabilidade) [21].

Uma vez que os componentes que interagem são conhecidos, bem como os mecanismos dessa interacção, uma forma farmacêutica deverá ser projectada no sentido de evitá-la. Várias técnicas provaram originar formulações estáveis, sendo a maior parte baseada no princípio da separação física. As mais importantes incluem microencapsulação dos fármacos antes da sua incorporação na forma farmacêutica, comprimidos multicamada com princípios activos adicionados às diferentes camadas, e formas farmacêuticas do tipo cápsula, com “*pellets*” ou comprimidos contendo os diferentes fármacos. A título exemplificativo, refira-se que produtos de combinação compostos por telmisartan e hidroclorotiazida estão disponíveis como comprimidos bicamada, com uma das camadas contendo telmisartan e a outra hidroclorotiazida [19]. Como o telmisartan necessita da incorporação de um excipiente alcalino para acelerar a dissolução, é adicionada à sua composição a meglumina. Contudo, a hidroclorotiazida é instável em meio alcalino, implicando que um comprimido monolítico seja inapropriado para esta formulação e, como tal, uma formulação bicamada auxilia a minimizar a degradação [19]. A técnica de revestir um ou mais princípios activos antes da sua incorporação numa forma farmacêutica tem vindo a obter bastante sucesso. O revestimento pode ocorrer na forma da microencapsulação acima citada, revestimento normal, ou revestimento de libertação retardada. Este último detém a vantagem adicional de libertar o princípio activo num local específico do tracto gastrointestinal, evitando potenciais interacções *in vivo* entre os diferentes constituintes de uma formulação combinada. Nos estudos publicados em [22], uma cápsula que contém comprimidos de libertação modificada com retenção gástrica de rifampicina e comprimidos de isoniazida com revestimento entérico demonstra reduzir a degradação provocada pela isoniazida sobre a rifampicina em meio ácido, com melhoria significativa da sua biodisponibilidade.

Todavia, apenas porque dois ou mais tratamentos funcionam conjuntamente num paciente, não significa que são necessariamente passíveis de se combinar num único comprimido. Se uma das formas for menos solúvel que a outra, a libertação do fármaco para a corrente sanguínea será afectada. Similarmente, se uma das doses for muito mais baixa que a outra, poderá ser difícil assegurar que o princípio activo de dosagem inferior se distribua uniformemente no comprimido. A dificuldade sentida pelos investigadores na área da formulação prende-se com o facto de ainda não haver compreensão total do mecanismo pelo qual os compostos farmacêuticos em pó podem interagir num

comprimido. Embora o conhecimento acerca do comportamento de materiais como os pós metálicos seja amplo no que diz respeito às interacções entre pequenas moléculas orgânicas, de estrutura cristalina, muito mais flexíveis e ligadas por forças extremamente ténues, ainda há um mundo por explorar. Adicionado a este facto, a interacção de ligantes e excipientes usados nos comprimidos, tais como a celulose ou o amido, podem evidenciar ou, pelo contrário, mascarar as propriedades de um princípio activo e, sendo assim é necessário que os cientistas formuladores possuam um conhecimento teórico alargado das reacções físicas que poderão ocorrer entre as formas sólidas de compostos farmacêuticos [23].

As estratégias acima referidas reduzem incompatibilidades, mas as interacções poderão ocorrer a longo prazo, devido à exposição do produto a factores ambientais como humidade, radiação, oxigénio ou temperatura. O acondicionamento do produto é um factor crucial para mitigar este tipo de riscos. Como exemplo, pode ser citada a degradação dos demais constituintes de uma formulação pelos produtos hidrolíticos do ácido acetilsalicílico. De forma similar, um produto de combinação formado por metronidazol, tetraciclina, e famotidina, mostra ser estável quando seco, mas extremamente instável em condições de humidade e temperatura elevadas [24]. O acondicionamento de produtos combinados usando material que funciona como barreira da humidade (blísteres individuais com folha de alumínio, PVC, etc), poderá ampliar o prazo de validade. Uma mistura ajuizada de estratégia de formulação e projecção de acondicionamento melhora a estabilidade do produto e controla, de um modo significativo, a degradação do fármaco. Ainda assim, é sempre possível que esta ocorra originando impurezas conhecidas ou desconhecidas. O desafio consiste em estabelecer especificações para o novo produto, que proporcionem suficiente prazo de validade, sem comprometer a sua segurança e eficácia. O prazo de validade pode ser estimado com recurso à realização dos estudos de estabilidade acelerada, no entanto, a submissão de um novo medicamento às autoridades implica a realização de testes de estabilidade em condições a longo prazo, tal como já foi referido [21].

### 2.6.2. Controlo da Qualidade dos Produtos Farmacêuticos Combinados

Os produtos farmacêuticos combinados podem definir-se como medicamentos compostos por uma associação de dois ou mais princípios activos formulados numa única forma farmacêutica e disponíveis em certas dosagens fixas. Para estes produtos

devem ser adoptados os princípios descritos em seguida uma vez que constituem parâmetros críticos, sem contudo conceder menor relevância às normas orientadoras nacionais e internacionais da qualidade, que são aplicáveis a todos os princípios activos e formas farmacêuticas [11-14].

#### **2.6.2.1. Princípios Activos**

A qualidade e a consistência do produto acabado depende, em grande medida, do controlo exercido sobre princípios activos que se pretendem incorporar numa dada formulação, nomeadamente em parâmetros tão cruciais como o conteúdo em impurezas, a dimensão de partícula, e o polimorfismo. Por este facto, a aquisição de princípios activos deve ser restringida a fontes autorizadas e reguladas. Ainda assim, no caso daqueles APIs com monografias compendiais, é eventualmente necessária informação analítica adicional que decorre de propriedades físico-químicas diversas, perfis de impurezas distintos, e do uso de solventes orgânicos provenientes de diferentes processos de síntese. Aqueles que não estão sujeitos a monografias da farmacopeia devem seguir as linhas orientadoras de qualidade, especialmente no que diz respeito a estudos de estabilidade, impurezas e solventes residuais [21, 25].

#### **2.6.2.2. Produto Acabado**

Como parte do desenvolvimento farmacêutico e, tal como já foi referenciado, deve demonstrar-se que os ingredientes individuais são compatíveis uns com os outros, assim como com os excipientes e os materiais utilizados no acondicionamento primário. Os estudos de compatibilidade entre os excipientes e os APIs podem ser efectuados recorrendo à técnica analítica de calorimetria diferencial de exploração (DSC).

A uniformidade de dosagem das preparações farmacêuticas é considerada essencial neste tipo de produtos e deverá ser testada no processo de desenvolvimento de formulação e na validação final do mesmo. Para assegurar que os pós se misturam convenientemente, executam-se IPCs. Mesmo assim, e sempre que apropriado, a uniformidade de dosagem é executada no produto final, através da quantificação individual de cada componente activo.

São também desenvolvidos e validados métodos analíticos capazes de distinguir cada um dos princípios activos na presença uns dos outros, bem como métodos para detectar e dosear a formação de produtos de degradação [26, 27].

No caso de suspensões e pós, destinados a administração oral, os critérios de sedimentação e redispersibilidade devem ser analisados e examinam-se as soluções para averiguar a ocorrência de fenómenos de cristalização e precipitação.

Para avaliar as características *in vitro* de um produto farmacêutico combinado, procede-se ao desenvolvimento de um ensaio de dissolução com capacidade discriminativa [3, 7, 28], estabelecendo limites para cada um dos princípios activos, tal como foi referido anteriormente. O método de dissolução é incorporado nos programas de estabilidade e controlo da qualidade. Este assegura que a presença de dois ou mais APIs não afecta a evolução do teste. Para efeitos de comparação e estabelecimento de similaridade de um novo produto farmacêutico combinado com um medicamento de referência já existente no mercado, são requeridos perfis de dissolução com múltiplos pontos.



## Referências Bibliográficas

- [1] Federsel HJ. Chemical process research and development in the 21<sup>st</sup> century: Challenges, Strategies and Solutions for Pharmaceutical Industry Perspective. *Acc Chem Res* 2009 Apr; 42 (5): 671-680.
- [2] Sandner P, Ziegelbauer K. Product-related research: how research can contribute to successful life-cycle management. *Drug Discov Today* May 2008; 13 (9/10): 457-463.
- [3] International Conference on Harmonization, ICH Q8 (R2). *Pharmaceutical Development*; 2009 Nov.
- [4] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for guidance on Development Pharmaceuticals; 1998 Jan.
- [5] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP), ICH topic Q8, Q9 e Q10. Note for guidance on Pharmaceutical Development, Quality Risk Management and Pharmaceutical Quality System, Questions and Answers; 2009 Jun.
- [6] US Food and Drug Administration. Guidance for Industry: PAT – A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance. Disponível em <http://www.fda.gov/Cder/OPS/PAT.htm>; 2004 Sep. [acedido em 2010-09-04].
- [7] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Guideline on the investigation of Bioequivalence; 2008 Jul.
- [8] Dickinson PA, Lee WW, Stott PW, Townsend AI, Smart JP, Ghahramani P, et al. Clinical relevance of dissolution testing in Quality by Design. *AAPS J* 2008 Jun; 10 (2): 280-290.
- [9] Wang Q, Ma D, Higgins JP. Analytical method selection for drug product dissolution testing. *Dissolut Technol* 2006 Aug; 13 (33): 6-13.
- [10] Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman J. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm Res* 2008 Jul; 25 (7): 1663-1676.

- [11] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Guideline on fixed combination medicinal products; 2008 Feb.
- [12] EMEA. Directive 81/852/ EEC as amended, May 1991. Fixed combination products 7AE5a.
- [13] Scientific and technical principles for fixed dose combination drug products for the treatment of HIV /AIDS, Malaria and Tuberculosis.
- [14] WHO Technical Report Series n° 929, WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparations, annex 5: guidelines for registration of fixed dose combination medicinal products, thirty-nine report; 2005.
- [15] Dubey R, Seshasayana A, Reddy SP, Jayanthi S. The combination drugs debate. *Pharm Tech Eur* 2009 Sep; 21 (9): 28-35.
- [16] Wertheimer A, Morrison A. Combination drugs: Innovation in Pharmacotherapy. *Pharmacol Ther* 2002 Jan; 27 (1): 44-49.
- [17] Herrick TM, Million RP. Tapping the potential of fixed dose combinations. *Nat Rev Drug Discov* 2007 Jul; 6: 513-514.
- [18] Kumar V, Prasad B, Singh S. Pharmaceutical issues in the development of a polypill for the treatment of cardiovascular diseases. *Drug Discov Today* 2008; 5 (1): 63-71.
- [19] Nakatani M, Yokoyama K, Sawada T. Bilayer tablet comprising telmisartan and diuretic. United States Patent Application (20080113023).
- [20] Bhutani H, Singh S, Jindal KC, Chakraborti AK. Mechanistic explanation to the catalysis by pyrazinamide and ethambutol of reaction between rifampicin and isoniazid in anti-TB FDCs. *J Pharm Biomed Anal* 2005 Oct; 39 (5): 892-899.
- [21] International Conference on Harmonization, ICH Q1A (R2). Stability testing of new drug substances and products; 2003 Feb.
- [22] Gohel MC, Sarvaiya KG. A novel solid dosage form of Rifampicin and Isoniazid with improved functionality. *AAPS PharmSciTech* 2007 Aug; 8 (3), article 68.
- [23] Frantz S. The trouble with making combination drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2006 Nov; 5 (11): 881-882.
- [24] Wu Y, Fassihi R. Stability of metronidazole, tetracycline HCl and famotidine alone and in combination. *Int J Pharm* 2005 Feb; 290 (1-2): 1-13.
- [25] International Conference on Harmonization, ICH Q3C. Impurities: Residual solvents; 1997 Dec.

[26] International Conference on Harmonization, ICH Q3B (R). Impurities in new drug products; 2006 Apr.

[27] International Conference on Harmonization, ICH Q2 (R1). Validation of analytical procedures: text and methodology; 1995 May.

[28] Graffner C. Regulatory aspects of drug dissolution from an European perspective. Eur J Pharm Sci 2006 Nov; 29 (3-4): 288-293.



***“Every experiment proves something. If it doesn't prove what you wanted it to prove, it proves something else. “***

***Prof. Anon***

---



### **3. Métodos Analíticos Aplicados no Controlo de Formulações Farmacêuticas Multi-Componente: Ensaios de Doseamento, Ensaios de Dissolução e Ensaios de Permeabilidade**

O âmbito da análise farmacêutica consiste numa vasta panóplia de áreas que se interligam e o seu intuito foca-se, em última instância, na obtenção de dados que possam contribuir para maximizar a eficácia e a segurança das terapias medicamentosas, a par de proporcionar mais-valias económicas associadas à produção de fármacos. Dentro do âmbito dos interesses da indústria farmacêutica, podem evidenciar-se os seguintes: investigação das matérias-primas que compõem um produto farmacêutico, investigação dos intermediários de síntese de um medicamento, estudo dos produtos investigacionais que constituem potenciais fármacos, desenvolvimento e análise das formulações farmacêuticas e das suas impurezas, bem como dos produtos de degradação. A segurança, eficácia e economia das terapias medicamentosas faz-se sentir, não só ao nível da saúde pública, mas também nos aspectos financeiros e políticos. Como consequência, a análise farmacêutica e biomédica é um dos ramos mais importantes da química analítica aplicada. Tal como ficou evidenciado nas secções anteriores desta dissertação, os medicamentos compostos por uma combinação de princípios activos impõem-se na indústria como uma alternativa extremamente vantajosa relativamente aos fármacos mono-componente, justificada não só pelos benefícios sentidos na melhoria da qualidade de vida dos utentes, mas também pelo aumento e rapidez do retorno de capital para as empresas, que assim se conseguem posicionar de um modo mais efectivo num mercado global ferozmente competitivo.

A cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC), particularmente a de fase reversa (RP-HPLC), é a técnica analítica separativa mais popular na indústria farmacêutica. A sua utilização disseminada abrange vários estadios da investigação e desenvolvimento farmacêutico e do controlo da qualidade, durante a produção de medicamentos [1]. Os requerimentos para os métodos HPLC modificam-se consoante a fase de desenvolvimento do fármaco. Nos estadios iniciais de descoberta de moléculas, o enfoque é principalmente nos elevados ritmos de análise, sendo que as moléculas resultantes da química combinatória são identificadas por LC-MS (cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massa) [1]. Os estudos que se seguem são os bioensaios, estudos metabólicos e de farmacocinética e, pelo facto de necessitarem de elevada sensibilidade e selectividade, recorrem ao HPLC-MS/MS e ao UPLC (cromatografia líquida de ultra-eficiência), sendo que esta metodologia recente possibilita geralmente a obtenção de corridas cromatográficas em menos de 5 minutos. Nas fases mais tardias de

desenvolvimento de formulação e de comercialização requerem-se métodos simples e tecnicamente lineares, ainda assim robustos. Após o desenvolvimento das metodologias analíticas, estas são validadas e transferidas para os laboratórios de controlo da qualidade. O HPLC acoplado a um analisador multicanal (DAD, i.e. “*diode array detector*”), ou a um simples detector UV, é o método mais comumente encontrado nos laboratórios industriais a este nível e manifesta-se em elevada escala nos ensaios de determinação de teor de princípios activos, impurezas de síntese e/ ou produtos de degradação gerados pelo envelhecimento da formulação, realizados às matérias-primas, aos produtos intermediários e a granel e no produto farmacêutico acabado [1]. Na verdade, cerca de 75% das monografias da USP disponíveis para o controlo do produto acabado recorrem ao HPLC-UV [2] na realização dos ensaios de doseamento que necessitam de métodos específicos e indicadores de estabilidade.

Os ensaios de dissolução, por sua vez, fazem uso da espectroscopia no UV-Vis e ao HPLC-UV, uma vez que a maioria dos compostos farmacêuticos absorve radiações no intervalo correspondente ao ultra-violeta visível [2].

Para análise dos medicamentos compostos por mais do que um princípio activo, aplicam-se as mesmas técnicas, quer nos doseamentos, quer nos ensaios de dissolução, conforme especificado na Tabela 2.

**Tabela 2- Principais métodos analíticos utilizados na indústria farmacêutica, para análise de formulações multi-componente**

| Tipo de Ensaio | Fase de Aplicação                  | Método Analítico   |
|----------------|------------------------------------|--|
| Doseamento     | I&D <sup>a</sup> ; CQ <sup>b</sup> | HPLC acoplado a detector DAD <sup>c</sup>  |
| Dissolução     | I&D <sup>a</sup> ; CQ <sup>b</sup> | HPLC acoplado a detector DAD <sup>c</sup> ;<br>Espectrofotometria derivativa e<br>métodos quimiométricos |
| Permeabilidade | I&D <sup>a</sup>                   | LC- MS/MS <sup>d</sup>   |

<sup>a</sup>I&D- Investigação e Desenvolvimento; <sup>b</sup>CQ- Controlo da Qualidade; <sup>c</sup>DAD- “*Diode Array Detector*”;  
<sup>d</sup>Cromatografia Líquida com Detecção por Espectrómetro de Massas, acoplado a Espectrómetro de Massas

A técnica de HPLC destaca-se, comparativamente aos ensaios de dissolução com detecção por UV, pelas capacidades separativas que evidencia, melhor selectividade e



sensibilidade. Para além disso, a sua aplicabilidade estende-se não só às formulações compostas por combinações de APIs, como naqueles medicamentos com princípios activos de baixa dosagem. Para a realização de ensaios de dissolução estão disponíveis no mercado módulos de amostragem, que permitem fazer a transferência de líquido de dissolução para o equipamento de HPLC de forma automatizada, poupando bastante tempo na análise. Por outro lado, quando a transferência é realizada manualmente, estas metodologias tornam-se extremamente demoradas, se se considerar que a análise de um lote implica a injeção de 6 amostras, correspondendo à dissolução de 6 comprimidos. Alternativamente, a espectrofotometria derivativa a múltiplos comprimentos de onda, conjuntamente com o tratamento de dados por quimiometria, têm vindo a ser cada vez mais utilizadas na análise de formulações com mais de um API, ao nível dos laboratórios de desenvolvimento farmacêutico e controlo da qualidade. A desvantagem desta técnica consiste no facto de nem sempre ser possível resolver espectros sobreponíveis e de ser necessário a preparação manual e fastidiosa de inúmeras soluções de calibração.

Os ensaios de permeabilidade constituem um parâmetro chave no processo de investigação e desenvolvimento farmacêutico [3], uma vez que possibilitam, em determinadas circunstâncias, estabelecer estimativas acerca da solubilidade e da permeabilidade de moléculas e formulações nas membranas biológicas. A sua importância faz-se sentir, mais especificamente, aquando da selecção de potenciais princípios activos com actividade terapêutica e características biofarmacêuticas adequadas e, mais tarde, na selecção de formulação, para produtos farmacêuticos com um, ou com vários componentes. A determinação deste parâmetro na indústria ocorre principalmente por duas vias: sistemas celulares *in vitro* ou sistemas baseados em tecidos, e ensaios com membranas artificiais, nomeadamente PAMPA (*Paralell Artificial Membrane Assay*). No primeiro caso obtêm-se uma mimetização mais aproximada das condições *in vivo*, contudo a automatização e os elevados ritmos de amostragem são difíceis de atingir. A linha celular do carcinoma do cólon Caco-2 tem vindo a ser utilizada, na indústria farmacêutica, para estimar a capacidade dos compostos permearem o epitélio intestinal. Estes métodos são extremamente trabalhosos e proporcionam obtenção de resultados de uma forma lenta. Contudo, já se encontram disponíveis sistemas comerciais automáticos [4] para realizar esta análise, estando no entanto a sua utilização ainda pouco difundida. A detecção é feita maioritariamente por espectroscopia de UV, LC-MS/MS e fluorescência. Os métodos PAMPA [3, 5], por sua vez, representam um meio rápido, de baixo custo e adaptável a elevados ritmos de amostragem, consistindo numa ferramenta de varrimento capaz de prever as capacidades de transporte passivo dos compostos. As membranas artificiais de natureza lipídica são depositadas em poços

de placas, sobre as quais se adicionam os compostos a testar que difundem pela solução de lípidos e, posteriormente, analisam-se os resultados por espectroscopia de UV e LC-MS/MS. Para compostos farmacêuticos multi-componente, aplica-se o LC-MS/MS (Tabela 2).

A utilização de métodos de cromatografia líquida de elevada eficiência está difundida à escala mundial ao nível da indústria farmacêutica, uma vez que é a técnica de eleição constante nas farmacopeias, facilitando a utilização dos mesmos métodos analíticos pelas diferentes unidades fabris. Para além disso, adapta-se às várias fases do ciclo de vida de um medicamento e possui suficiente selectividade para ser aplicado às formulações farmacêuticas constituídas por mais do que um princípio activo e para determinação concomitante de APIs e das suas impurezas. Contudo, quase todos os métodos de preparação de amostras ocorrem de forma lenta e fastidiosa, sem falar dos excessivos tempos de corrida cromatográfica que, não raramente, resultam em durações superiores a 10 horas por lote de medicamento analisado, o que pode ser dramático num laboratório com poucos equipamentos deste género. Adicionalmente, o recurso a fases móveis constituídas por elevada percentagem de componente orgânico tem vindo a causar preocupações ambientais. Os custos excessivos associados a esta técnica constituem outra das suas desvantagens mais evidentes.

A fim de se adaptar ao rápido aumento das exigências sentidas quer ao nível da quantidade, quer na qualidade dos resultados analíticos, a comunidade científica tem vindo a apostar no desenvolvimento de métodos analíticos automáticos e pouco poluentes, com aplicação em vários tipos de indústrias, entre as quais a farmacêutica, como se comprova pelo elevado número de publicações referentes a este tópico no último quarto do século vinte [2, 6]. Na verdade, a automatização e a miniaturização dos ensaios aplicados nos laboratórios de análise farmacêutica tornam-nos rápidos e eficientes, capacitando-os para tarefas rotineiras e de I&D [6, 7]. Uma linha de investigação que tem vindo a ser amplamente desenvolvida neste âmbito diz respeito à análise de matrizes aplicando metodologias de fluxo.

Em 1975 surge o conceito de análise por injeção em fluxo, FIA [8], (Fig. 4), na qual pequenos volumes de amostra, medidos rigorosamente, são introduzidos de forma discreta num transportador, sendo arrastados através de um sistema de fluxo não segmentado. A introdução desta técnica vem revolucionar o conceito de automatização dos procedimentos químicos, uma vez que permite a obtenção de medições instrumentais sem se atingir o estado de equilíbrio físico (isto é, sem homogeneização entre as amostras e o transportador/ reagente), nem de equilíbrio químico (sem completar

as reacções). Os sistemas FIA tornam-se populares, pois possibilitam automatizar procedimentos de rotina nos laboratórios de controlo da qualidade, com escassos recursos económicos, reduzido consumo de amostras e elevados ritmos de amostragem. Com a vulgarização dos computadores nos laboratórios, foi possível automatizar o controlo dos diversos componentes eléctricos nas montagens, obviando algumas das deficiências destes sistemas.

Em 1990, é proposto por Ruzicka e Marshall um novo conceito de análise por injeção sequencial (Fig.4), SIA [9], que, mantendo as vantagens associadas à análise por injeção em fluxo, reduz os inconvenientes devidos ao seu uso como instrumento de rotina.

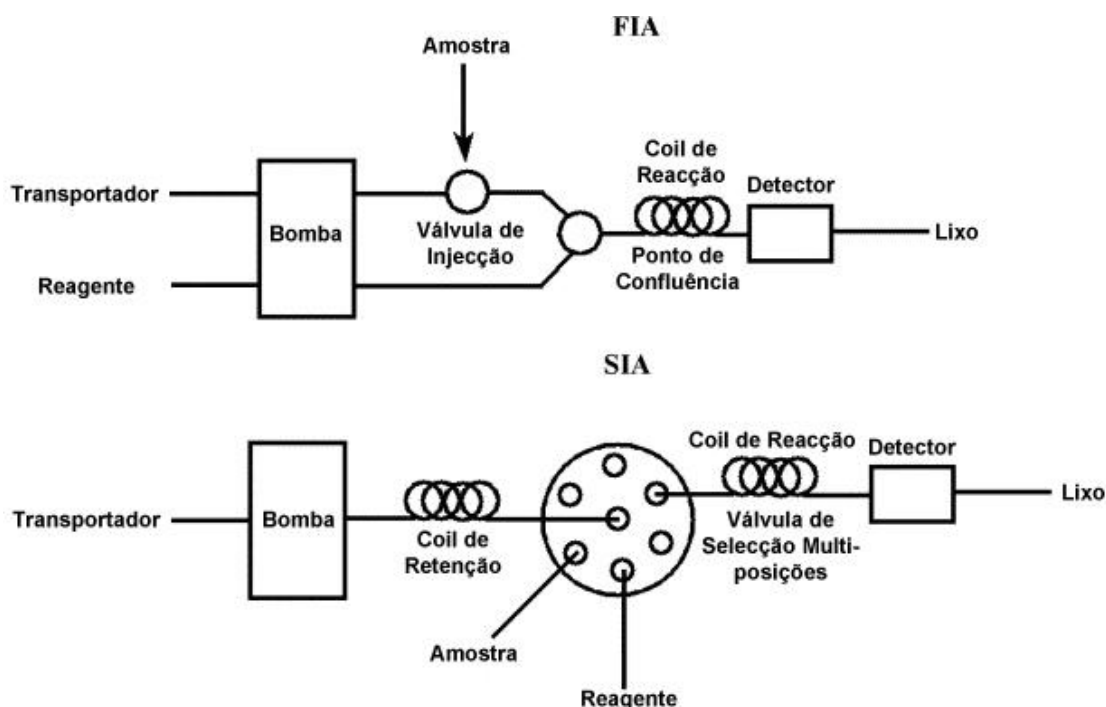


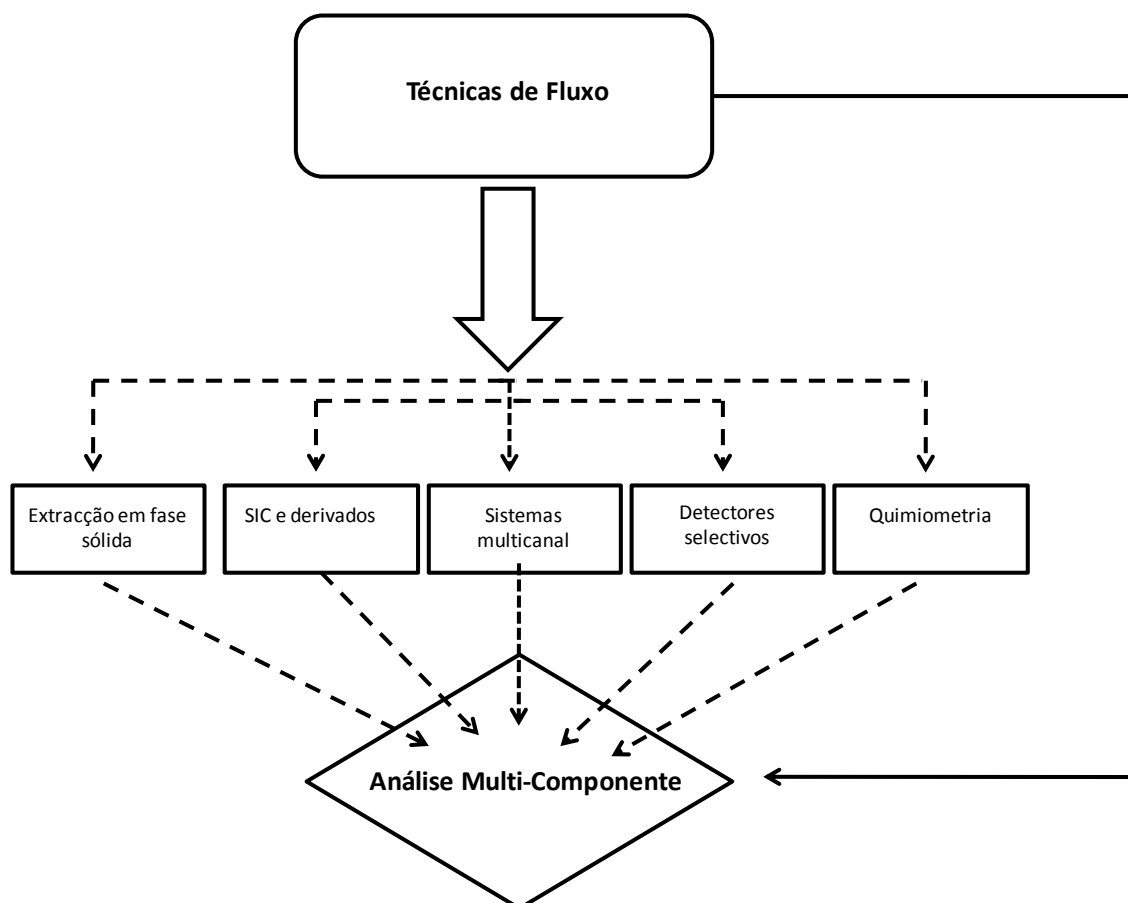
Figura 4- Esquema representativo dos sistemas FIA e SIA básicos.

O fundamento básico é, em ampla medida, similar ao anterior: transporte reprodutível de zonas de amostra e reagentes que se interpenetram devido a fenómenos combinados de dispersão radial e axial, originando uma zona composta reprodutível. Consequentemente, os produtos de reacção são formados em áreas de gradiente de concentração bem definidas e o sinal transiente que é gerado providencia resultados analíticos reprodutíveis. Este tipo de sistemas oferece vantagens evidentes relativamente ao referido atrás, pois as montagens são mais simples e universais que as FIA, sendo constituídas por uma só bomba, válvula e canal, isto é, o sistema SIA básico (Fig. 4). Para além disso, podem ser facilmente adaptados a diferentes situações analíticas,

simplesmente modificando os parâmetros de fluxo ou volumes de injeção, por controlo através de computador. Como funcionam apenas quando as medições são requeridas, o transportador não é bombeado continuamente como nas montagens FIA, reduzindo o consumo de reagentes e amostra, e diminuindo os efluentes gerados. Uma das características mais extraordinárias deste tipo de sistemas de fluxo é a sua capacidade inerente para acomodar uma pletera de operações unitárias (por exemplo extracção líquido-líquido em linha, precipitação ou co-precipitação em reactores, extracções de fase sólida em reactores de coluna com materiais compactantes de características hidrofílicas ou hidrofóbicas, etc.), facilitadas pela incorporação de reactores ou módulos adicionais. Estas configurações possibilitam os processos de pré tratamento de amostras e determinações multi-componente numa única análise [10, 11]. Podem citar-se, como exemplos mais recentes de aplicações dos sistemas SIA, aquelas efectuadas ao nível industrial, como alternativa viável aos métodos analíticos de processamento clássicos. Estas aplicações reflectem-se, não apenas na monitorização e no controlo dos processos, mas também proporcionam um diminuto uso da energia, do tempo e consumo de matérias-primas, com conseqüente minimização dos efluentes e melhoria da qualidade, quantidade e consistência dos produtos [12].

Com o advento da necessidade de efectuar de forma expedita a identificação e quantificação de diferentes compostos numa mistura verifica-se, nos últimos anos, um aumento da popularidade da determinação multi-componente, sentida ao nível das mais variadas áreas. Mais concretamente, na indústria farmacêutica, este tipo de ensaios têm vindo a ser frequentemente requeridos para execução de testes nos medicamentos compostos por mais que um princípio activo, bem como para determinação da pureza enantiomérica nas matérias-primas, ou para aferição do teor de impurezas de síntese e produtos de degradação, concomitantemente com o doseamento de um ou mais APIs e excipientes. O recurso a sistemas de fluxo para determinações múltiplas oferece um sem número de potenciais vantagens relativamente às técnicas cromatográficas separativas, derivadas da flexibilidade dos mesmos, do elevado ritmo de amostragem e consumos modestos de amostras e reagentes. Dependendo do tipo de aplicação (por exemplo o número de analitos a analisar simultaneamente, a concentração destes analitos, a complexidade da matriz, a disponibilidade de instrumentação, etc), são executadas uma ou mais técnicas de determinação multi-componente. Segundo Gómez et al [13], e conforme exemplificado na Fig.5, podem considerar-se as seguintes estratégias principais utilizadas em fluxo para a determinação multi-componente: preparação da amostra por extracção em fase sólida (SPE), separação dos diferentes componentes através da cromatografia por injeção sequencial (SIC) ou abordagens semelhantes,

gestão de fluidos e de amostras através de sistemas multicanal, detecção de analitos com detectores selectivos acoplados aos sistemas de fluxo e tratamento de dados experimentais recorrendo a técnicas quimiométricas. Neste artigo de revisão, a área farmacêutica é descrita como uma das possíveis aplicações das técnicas de fluxo na análise multi-componente, embora sejam abordadas outras possibilidades, de um modo bastante esclarecedor.



**Figura 5 - Principais estratégias utilizadas em fluxo para análise multi-componente. Reproduzido de [13].**

A extracção em fase sólida consiste na incorporação directa de uma microcoluna como elemento separativo no sistema, de modo a aumentar de forma considerável a selectividade do desempenho analítico. As colunas mais utilizadas são empacotadas, com material que absorve selectivamente. A separação é atingida devido à diferente retenção ou desorção, quando dois ou mais analitos diferentes interagem com a fase sólida [14 -19].

A cromatografia por injeção sequencial (SIC) foi reportada pela primeira vez em 2003 [20, 21], e baseia-se na utilização de uma coluna monolítica que é colocada entre a válvula multiposição de um sistema SIA convencional e a célula de fluxo. Esta pode

operar sob condições isocráticas (utilizando a fase móvel como transportador), ou em gradiente (proporcionando a dispersão do eluente na solução transportadora). Adicionalmente, a programação automática do fluxo da fase móvel facilita a obtenção de gradientes de fluxo que aumentam a resolução do pico, diminuindo o tempo total de corrida cromatográfica. Esta técnica tem vindo a ser aplicada na separação de moléculas orgânicas em preparações farmacêuticas [22 -26].

Os sistemas multicanal têm como base o engenho na combinação dos diferentes componentes que constituem um sistema de fluxo, providenciando desta forma a selectividade na determinação dos constituintes da amostra. O mais simples compreende várias corridas ou injeções da amostra em diferentes condutas (reactores), nos quais cada analito é determinado individualmente, pela modificação das condições experimentais [27]. As estratégias usuais recorrem a peças separadoras de fluxo e reactores de retenção. Os separadores de fluxo fazem a ligação a linhas de diferentes comprimentos, proporcionando diferentes tempos de residência, nos quais os analitos podem reagir com reagentes específicos. Os canais juntam-se antes do detector e, para cada canal ou analito, é possível obter diferentes sinais analíticos, que se traduzem em diferentes picos, provenientes de uma única injeção de amostra. Esta linha de acção é frequentemente explorada nas reacções cinéticas de diversos analitos que compõem uma dada mistura. Exemplificando, em [28], reporta-se o desenvolvimento de um método cinético para determinação de citrato e piruvato, com fluxo parado. No trabalho em causa, os dois analitos exibem diferente comportamento cinético numa reacção de quimiluminescência, o que leva a que as medições sejam realizadas imediatamente após a mistura do reagente com a amostra e depois de alguns segundos, com obtenção dos dados cinéticos e subsequente resolução da mistura. A aplicação efectua-se em formulações farmacêuticas, no caso do citrato, e em urinas, para determinar ambos os compostos.

Uma outra estratégia para levar a cabo a determinação multi-componente consiste na utilização de vários detectores selectivos ou detectores em série, denominados habitualmente por *arrays* [29], que proporcionam uma resposta típica para um dado analito. Sendo assim, cada detector fornece o sinal da espécie de interesse. Efectivamente, os detectores selectivos como, por exemplo, os sensores electroquímicos [30-32], auferem vantagens neste tipo de montagens pois, como foi anteriormente referido, podem ser acoplados em linha a sistemas de pré tratamento de amostra, que variam desde sistemas de pré concentração, aos de eliminação de interferentes. Estes acoplamentos são também interessantes pelo facto de permitirem que pequenos volumes

de amostra sejam injectados automaticamente, produzindo frequências de análise elevadas.

Por último, o processamento de dados multivariados com recurso a ferramentas quimiométricas torna possível a determinação de várias espécies, simultaneamente, e numa única análise. Na análise de dados, consideram-se dois tipos de sinais multivariados, designadamente dados de primeira ordem e dados de segunda ordem. Os dados de primeira ordem são gerados comumente com detectores de varrimento rápido e sistemas multicanal. Os sistemas de fluxo podem ser aplicados para gerar este tipo de dados de uma forma expedita, detendo neste caso as vantagens de automatização, elevada frequência de análise e possibilidade de levar a cabo pré-tratamentos, como a pré-concentração de amostras. Os dados de primeira ordem podem também ser obtidos pela análise cinética diferencial, com monitorização do sinal dependente do tempo [33, 34]. Na análise quimiométrica de dados de primeira ordem, os métodos quimiométricos de regressão linear mais frequentemente utilizados são o dos mínimos quadrados parciais (PLS, *Partial Least Squares*) [33, 34] e as redes neuronais (ANN, *Artificial Neural Networks*) [35, 36]. Estes constituem ferramentas poderosas de optimização não linear e detêm várias vantagens sobre as lineares como, por exemplo, possibilitar a construção de modelos, sem conhecimento das funções modelares. Para a obtenção de dados de segunda ordem são utilizados detectores multicanal e deverá ser gerada simultaneamente uma outra ordem de dados. Os sistemas de fluxo detêm aqui um papel preponderante possibilitando a modificação das condições de análise da amostra ao longo do tempo (como modificação do pH), enquanto esta passa pelo detector, adquirindo-se, deste modo, uma matriz de dados. De uma forma resumida, a primeira ordem de dados corresponde ao sinal multivariado (por exemplo, aquisição de um sinal a diferentes comprimentos de onda), e a segunda ordem, à propriedade que permite à amostra modificar a sua composição (por exemplo, pela aplicação de um gradiente de pH) [37]. O acoplamento dos tratamentos quimiométricos de dados com outras estratégias separativas pode ser uma das escolhas mais atractivas, devido ao seu baixo custo experimental, permitindo melhorar notavelmente a capacidade de resolução dos sinais quando estes estão parcialmente sobrepostos [38-40].

Qualquer técnica instrumental pode, em teoria, ser usada como detector num sistema de fluxo, devendo todavia ser detentora de determinadas características [41]. O principal requisito relaciona-se com o tamanho da célula de fluxo, que deverá ser de baixo volume relativamente ao volume global do sistema, para que não resulte comprometido o carácter transiente da medida. É igualmente importante que o detector possua uma transdução de resposta rápida e que não ocorra alteração do sinal, devido ao tempo prolongado de processamento do mesmo pelos componentes electrónicos. A

espectrofotometria de UV-Vis é a técnica mais frequentemente usada como processo de detecção, incorporado nos sistemas de fluxo, o que se deve à facilidade com a qual uma célula com pequeno volume óptico pode ser acoplada ao espectrofotómetro, o modo efectivo como é ligada ao restante equipamento e o facto da maior parte dos analitos poderem ser detectados com a utilização de uma reacção específica de desenvolvimento de cor.

A maior parte da pesquisa reportada no âmbito desta dissertação relaciona-se com a utilização de sensores electroanalíticos para estudo de matrizes farmacêuticas de carácter multi-componente, uma vez que o trabalho experimental realizado recorre aos detectores do tipo potenciométrico, para efectuar o mesmo género de análise. Efectivamente, os sensores electroanalíticos tem vindo a ganhar o seu terreno, quer em determinações realizadas em estático, quer incorporados em sistemas de fluxo [42], ou mesmo como detectores associados a cromatografia líquida de elevada eficiência. Uma grande vantagem apresentada por estes sensores é a sensibilidade das aplicações analíticas não estar dependente da configuração da célula de fluxo, na mesma extensão em que ocorre na detecção espectrofotométrica. Deste modo, tanto o acoplamento como a miniaturização são passíveis de se realizarem de uma forma mais expedita. Associados a metodologias de fluxo, podem ser acopladas quer unidades singulares de detecção, quer *arrays* de detectores electroquímicos para determinações em simultâneo, como já foi anteriormente referido [39, 40]. Para além disso, os métodos electroanalíticos são, de modo geral, mais sensíveis que os ópticos, possuindo amplo intervalo de resposta linear e não necessitando de pré tratamentos de amostra laboriosos. Como grande vantagem, poder-se-á ressaltar o facto de não serem susceptíveis a colorações e turbações de amostra, o que não acontece nos detectores ópticos.

Dentro dos detectores electroanalíticos usualmente aplicados na análise de produtos farmacêuticos multi-componente, podem considerar-se os coulométricos, os condutimétricos, os voltamétricos, os amperométricos e os potenciométricos.

A coulometria fundamenta-se na redução ou na oxidação electrolítica de um componente, durante um período de tempo suficiente para assegurar a sua conversão quantitativa ao novo estado de oxidação, e na medição da quantidade de electricidade, em *coulombs*, consumida ou produzida. Se se considerarem os métodos electroanalíticos na sua globalidade, não fazem parte daqueles mais selectivos e rápidos, sendo no entanto muito precisos e exactos. Estes métodos não requerem calibrações com padrões. A coulometria pode efectuar-se a potencial aplicado constante, a corrente aplicada constante e a potencial do eléctrodo indicador (cátodo) controlado. Uma das aplicações mais vulgares das titulações coulométricas ao nível da indústria farmacêutica



consiste na determinação do teor em água pelo método de Karl Fisher, em matéria-prima e produto acabado [43].

A condutimetria é um método de análise iónica que se baseia na medição da condutância, ou condutividade eléctrica de uma solução, traduzindo a maior ou menor facilidade com que a solução conduz corrente eléctrica. As análises condutimétricas podem efectuar-se por condutimetria directa ou por titulação condutimétrica. Nas titulações condutimétricas, acompanha-se a variação da condutância da solução em estudo, à medida que ocorre a reacção química por adição de titulante, contrariamente à análise por condutimetria directa, que é feita sem reacção química, não constituindo um método selectivo [43].

As características comuns a todas as técnicas voltamétricas [44] consistem na aplicação de um potencial ( $E$ ) a um eléctrodo, e a monitorização da corrente resultante ( $i$ ) que flui na célula electroquímica. A célula electroquímica na qual ocorre o processo voltamétrico é composta por um eléctrodo de trabalho (indicador), um eléctrodo de referência e usualmente um contra-eléctrodo auxiliar. Em muitos casos, o potencial é variado, ou a corrente é monitorizada num dado período de tempo ( $t$ ). O potencial aplicado produz uma alteração na concentração das espécies electroactivas à superfície do eléctrodo, pela redução ou oxidação electroquímica. A oxidação ou redução da substância que ocorre à superfície do eléctrodo indicador, a um dado potencial aplicado, resulta no transporte de massa para a superfície do eléctrodo e na geração de corrente. Estas técnicas são, por isso, consideradas activas. Os princípios fundamentais dos vários tipos de voltametria derivam da mesma teoria electroquímica, podendo considerar-se, de modo genérico, a voltametria cíclica, os métodos de pulso (nos quais se incluem a voltametria de pulso normal (NPV), voltametria de pulso diferencial (DPV) e a voltametria de onda quadrada (SWV)), e as técnicas de pré-concentração e de redissolução (voltametria de redissolução anódica, de redissolução catódica, e de redissolução adsortiva). Para determinação de princípios activos em produtos farmacêuticos complexos, as técnicas DPV e SWV detêm a maior expressão [44].

A amperometria [42, 43] é maioritariamente uma subclasse da voltametria, na qual se procede à medição da corrente eléctrica, a potencial controlado, entre o eléctrodo indicador e o de referência. Por oposição, na voltametria varia-se o potencial, conforme foi referido. A célula electroquímica contém um eléctrodo indicador e um eléctrodo de referência, numa solução sujeita a agitação. Para distinguir amperometria de outras formas de voltametria, deve considerar-se que, no primeiro caso, as correntes medidas são somadas ao longo do tempo. Contrariamente, nas técnicas voltamétricas, as medições de corrente devem ser consideradas independentemente, a intervalos de tempo discretos. A cronoamperometria, uma derivação da amperometria, consiste na

medição da corrente eléctrica de uma célula electroquímica em função do tempo, quando a diferença de potencial entre os eléctrodos indicadores e de referência é controlada. Esta técnica realiza-se, usualmente, com um eléctrodo indicador estacionário numa solução não agitada, e as curvas da corrente em função do tempo reflectem a transferência de massa e a dinâmica dos processos químicos.

Uma das mais-valias relacionadas com a detecção amperométrica consiste na sua sensibilidade elevada que, por associação à selectividade proporcionada pelo eléctrodo quando se tratam de biosensores ou imunosensores, possibilita a análise rápida e automática de matrizes complexas como as farmacêuticas, biológicas ou alimentares. No que concerne as técnicas voltamétricas, estas são, em larga maioria, aplicadas à determinação de metais [44]. Quando em presença de amostras com concentrações extremamente baixas de analitos, os métodos de fluxo associados a este tipo de processo de detecção proporcionam uma pré-concentração automatizada, por electrólise (voltametria de redissolução anódica) ou por adsorção (voltametria de redissolução adsorptiva), minimizando o risco de contaminação da amostra e reduzindo significativamente o tempo de análise. O uso de técnicas voltamétricas encontra-se também disseminado na análise de produtos farmacêuticos [44], sendo que os procedimentos associados à determinação envolvem usualmente apenas um simples passo de diluição da amostra, com a vantagem de a maioria dos excipientes das formulações não interferirem nas determinações subsequentes.

A transdução potenciométrica baseia-se nas medições da diferença de potencial de uma célula electroquímica composta pelo eléctrodo indicador e um eléctrodo de referência, de potencial constante, ambos em contacto com a solução em análise, na ausência de corrente eléctrica [43, 45]. A solução não é afectada no processo, pelo que a técnica potenciométrica é considerada não destrutiva de amostra. A diferença de potencial medida entre os dois eléctrodos é então relacionada com a concentração de um ou mais analitos, presentes na solução na forma iónica. Os eléctrodos indicadores podem ser de diversos tipos: metálicos, de membrana, transístores de efeito de campo selectivo (ISFETs- “*Ion Selective Field Effect Transistors*”), eléctrodos para gases e biosensores. Os eléctrodos de membrana exibem uma elevada selectividade para com o analito de interesse, tornando-se por isso uma área muito interessante para explorar na análise de produtos farmacêuticos de matriz multi-componente. Estes eléctrodos são funcionalmente diferentes dos metálicos, uma vez que a diferença de potencial medida não é devida a uma reacção de oxidação-redução, mas sim a um potencial químico que se desenvolve entre as superfícies da membrana, decorrente da diferença de concentração do analito na sua interface, referindo-se genericamente como eléctrodos selectivos a ião (ESIs). A

classificação das membranas existentes baseia-se no material utilizado na sua concepção. Por sua vez, as particularidades associadas a cada processo de construção do eléctrodo, entre as quais a natureza da membrana sensora, proporcionam-lhe selectividade para com um ião particular. Assim sendo, consideram-se de modo geral dois tipos: eléctrodos de membrana cristalina e eléctrodos de membrana não cristalina. Neste último grupo, integram-se os eléctrodos de vidro, os eléctrodos de membrana líquida e os eléctrodos de membrana imobilizada num polímero. Este tipo de ESIs contém na sua constituição um ionóforo, isto é, uma molécula à qual se liga o analito de interesse de forma reversível, proporcionando a ocorrência de uma diferença de potencial. Os ionóforos constituem o componente dos eléctrodos de membrana polimérica que possuem maior relevância para a selectividade dos mesmos. Efectivamente, a selectividade pode, em última análise, estar relacionada com diferenças nas forças de ligação entre os vários iões e o ionóforo aplicado na membrana. Este componente, por sua vez, é dissolvido num solvente mediador de constante dielétrica apropriada, que tem como função garantir as propriedades viscoelásticas desejáveis da membrana e solubilizar os constituintes da mesma. O sensor iónico assim composto é, posteriormente, incorporado numa matriz semi-rígida como, por exemplo, cloreto de polivinilo (PVC), polietileno ou borracha de silicone [46]. Este tipo de sensores detêm potencialidades fantásticas, evidenciadas sobretudo pela facilidade de construção no laboratório e pelo facto do corpo do eléctrodo ser facilmente reciclável, pelo seu baixo custo, robustez e simplicidade de miniaturização, associados a excelentes características de trabalho. Estas evidenciam-se principalmente pelo amplo intervalo de resposta linear e sensibilidade, mesmo para baixas concentrações de analito. Adicionalmente, a possibilidade de modelizar o ionóforo de acordo com as características da molécula que se pretende analisar, torna o processo extremamente selectivo e versátil, já que favorece a construção de eléctrodos para uma grande variedade de espécies químicas [42, 46, 47]. A maior parte das unidades potenciométricas referidas na literatura para análise de matrizes farmacêuticas de natureza multi-componente, recorre a esta família de sensores potenciométricos [45, 46, 48, 49].

Pelo facto de os eléctrodos selectivos a ião funcionarem como detectores de superfície [46-48], tornam-se especialmente atractivos para a incorporação em sistemas de fluxo [49]. A simplicidade da aparelhagem que lhes está associada capacita-os para processos de controlo analítico como alternativa às metodologias convencionais, usualmente mais morosas e dispendiosas. Para além disso, como são de fácil construção, operam num intervalo analítico de concentrações alargado, as suas medições não são afectadas por turvações e colorações da amostra e não são

destrutivos da mesma, tornam-se ideais para avaliação multiparamétrica. Tal como foi referido anteriormente, de um modo genérico, para os detectores electroanalíticos, o facto de a sensibilidade da resposta analítica de um ESI não ser tão dependente da configuração das células de fluxo, relativamente aos detectores espectrofotométricos, facilita os processos de miniaturização [48, 50]. A inserção deste tipo de detectores em sistemas de análise por injeção em fluxo [49-52] contribui para uma melhoria geral das suas características operacionais. Com efeito, destacam-se a reprodutibilidade do sinal analítico, a velocidade rápida de resposta e o condicionamento contínuo da membrana sensora. Adicionalmente, ocorre uma diminuição do *drift* do potencial eléctrico, uma melhoria da selectividade analítica, a eliminação da contaminação gerada pelo eléctrodo de referência, o escasso ou inexistente pré tratamento da amostra (que a existir pode ser efectuado em linha), a obtenção de elevados ritmos de amostragem, a facilidade na automatização de métodos analíticos e a diminuição do consumo de reagentes, comparativamente à potenciometria utilizando eléctrodos em configuração convencional. A sua inserção em sistemas SIA abre ainda a possibilidade para a realização simultânea de ensaios usando *arrays* de detectores [53], com elevada precisão e exactidão dos resultados analíticos.

Tal como já foi referido, a tese aqui apresentada diz respeito à utilização de detectores electroanalíticos sensíveis a uma ou mais espécies, com o objectivo da determinação de constituintes em matrizes farmacêuticas multi-componente, uma vez que o trabalho experimental exposto no decorrer da dissertação tem como enfoque o desenvolvimento de métodos automatizados para análise de formulações do mesmo tipo, com detecção potenciométrica. Seguidamente, comenta-se uma selecção representativa de métodos electroanalíticos desenvolvidos nos últimos anos, para determinação do teor de substâncias activas em matéria-prima ou em formulações farmacêuticas de natureza multi-componente, considerando não só a análise simultânea de dois ou mais APIs, mas também o doseamento de apenas um princípio activo, na presença de produtos de degradação, ou de outros princípios activos, e a análise enantiomérica. Na maioria dos trabalhos citados, os ensaios são realizados em modo convencional e noutros estudos os sensores são acoplados a sistemas de fluxo (FIA, SIA, multicomutação ou cromatografia líquida de elevada eficiência).

No que diz respeito ao desenvolvimento de metodologias automatizadas para obtenção dos perfis de dissolução de um ou mais APIs em formulações farmacêuticas complexas, a pesquisa realizada na literatura mostrou que a utilização de sensores electroanalíticos se encontra restrita aos do tipo potenciométrico. Ainda assim, a aplicação de ESIs nesta área tem sido bastante modesta e presentemente cinge-se,

quase na totalidade, a formulações farmacêuticas uni-componente. Por sua vez, a espectrofotometria UV-Vis é indubitavelmente dominante na área [1]. São dados a conhecer alguns dos trabalhos efectuados e comparam-se as potencialidades e mais-valias dos métodos potenciométricos *versus* os espectrofotométricos, uma vez que parte do trabalho experimental constante desta tese diz respeito ao desenvolvimento e automatização de ensaios de dissolução de formulações farmacêuticas multi-componente, com detecção potenciométrica. Por último, é feita uma revisão dos métodos existentes que acoplam ensaios de dissolução aos ensaios de permeação *in vitro*, comentando as vantagens e potencialidades deste tipo de abordagem como forma de varrimento de compostos activos, e meio comparativo de formulações na fase de desenvolvimento farmacêutico. Nesta área não se encontram, à data, publicações que apliquem detecção potenciométrica. O enfoque dos trabalhos descritos na literatura centra-se, não na detecção em si, uma vez que não foram introduzidas novidades apreciáveis nos processos de detecção até ao momento usados, mas na interpretação dos resultados obtidos. Como tal, no decorrer da tese, é respeitada a mesma forma de abordagem.

No início de cada secção apresenta-se uma tabela contendo o resumo dos aspectos principais de alguns dos trabalhos realizados nos últimos 15 anos referentes à determinação do teor de princípios activos em produtos farmacêuticos multi-componente, com detecção amperométrica e voltamétrica (Tabela 3), por HPLC acoplado a detectores electroquímicos (Tabela 4) e potenciométrica (Tabela 5). Não se pretende fazer uma revisão exaustiva, mas antes dar a conhecer as principais áreas de interesse dos investigadores neste domínio.

### 3.1. *Ensaio de Doseamento, com Detecção Amperométrica, Voltamétrica, Condutimétrica e Coulométrica*

A maioria dos trabalhos constantes na literatura, que dizem respeito aos ensaios de doseamento em matrizes farmacêuticas multi-componente (matérias-primas ou produto acabado), são efectuados em modo convencional, com detecção voltamétrica. Neste grupo, inserem-se uma quantidade apreciável de referências que aposta na construção e aplicação de eléctrodos de carbono vítreo modificado, com detecção por voltametria diferencial de pulso (DPV) [54-56, 58-62] e por voltametria cíclica [57]. Uma outra estratégia de acção frequentemente explorada recorre aos eléctrodos de pasta de grafite

modificados, com detecção por DPV [64, 66, 68, 69], por voltametria cíclica [63, 67], ou por voltametria de redissolução anódica por onda quadrada [65] (Tabela 3). Nma das citações referidas [70], os autores desenvolvem uma metodologia voltamétrica (DPV), utilizando como sensor um eléctrodo de diamante modificado com boro, para aplicação no mesmo tipo de formulações. O emprego amplo destes detectores na análise farmacêutica, particularmente nos medicamentos multi-componente, deve-se a demonstrarem todo um conjunto de vantagens já anteriormente evidenciadas para os sensores electroanalíticos, das quais se destacam a facilidade de preparação de amostra, a rapidez de análise, o baixo custo, e a sensibilidade elevada.

**Tabela 3** - Métodos electroquímicos para análise de produtos farmacêuticos complexos: Voltametria, Amperometria

| Analito   | Ensaio                                      | Matriz   | Detector  | Método de Detecção               | Intervalo linear   | Limite de Detecção   | Referência |
|---|---|--|---|----------------------------------|--|--|------------|
| <b>Acetaminofeno e Tramadol</b>                         | Doseamento em produto acabado (comprimidos) | Comprimidos contendo a combinação dos dois APIs  | Eléctrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de carbono  | Voltametria de pulso diferencial | 0,1-100 $\mu\text{M}$<br>10-1000 $\mu\text{M}$   | 0,05 $\mu\text{M}$<br>1 $\mu\text{M}$                                      | [54]       |
| <b>Ácido Ascórbico, Dopamina e Ácido úrico</b>          | Doseamento em produto acabado (injectáveis) | Misturas sintéticas dos três APIs;<br>Injectáveis (dopamina);<br>Comprimidos de vitamina C (ácido ascórbico)   | Eléctrodo de carbono vítreo modificado com poli - (ACBK) <sup>a</sup> | Voltametria de pulso diferencial | $2 \times 10^{-6}$ - $6 \times 10^{-4}$ M<br>$1 \times 10^{-6}$ - $8 \times 10^{-4}$ M   | 10,0 $\mu\text{M}$<br>0,5 $\mu\text{M}$<br>0,5 $\mu\text{M}$               | [55]       |
| <b>Ácido Ascórbico, Dopamina, Ácido úrico</b>           | Doseamento em produto acabado (injectáveis) | Misturas sintéticas dos três APIs<br>Injectáveis de dopamina   | Eléctrodo de carbono vítreo modificado com poli - (AMT) <sup>b</sup>  | Voltametria de pulso diferencial | 200nM-0,8 mM   | 0,92 nM<br>0,07 nM<br>0,57 nM  | [56]       |
| <b>Ácido Ascórbico, Epinefrina e Ácido úrico</b>        | Doseamento em produto acabado (injectáveis) | Injectáveis de epinefrina dopados com ácido ascórbico e ácido úrico  | Eléctrodo de carbono vítreo modificado com poli (ácido caféico)       | Voltametria cíclica              | $2,0 \times 10^{-5}$ -<br>$1,0 \times 10^{-3}$ M<br>$2,0 \times 10^{-5}$ -<br>$1,0 \times 10^{-3}$ M<br>$5,0 \times 10^{-6}$ -<br>$3,0 \times 10^{-4}$ M | $7,0 \times 10^{-6}$ M<br>$2,0 \times 10^{-7}$ M<br>$6,0 \times 10^{-7}$ M | [57]       |
| <b>Ácido Ascórbico, Norepinefrina e Ácido úrico</b>     | N/A   | Misturas sintéticas dos três APIs  | Eléctrodo de carbono vítreo modificado com poli (CCA) <sup>c</sup>    | Voltametria de pulso diferencial | $2 \times 10^{-5}$ - $8 \times 10^{-5}$ M<br>$2 \times 10^{-5}$ - $4 \times 10^{-4}$ M   | 0,5 $\mu\text{M}$<br>0,1 $\mu\text{M}$<br>0,5 $\mu\text{M}$                | [58]       |
| <b>Ácido Úrico (UA), Epinefrina (EP) e Xantina (XN)</b> | Doseamento em produto acabado (injectáveis) | Soluções das três substâncias, na presença de concentrações 40 vezes superiores de ácido ascórbico; Injectáveis de epinefrina e amostras de urina humana (xantina) | Eléctrodo de carbono vítreo modificado com poli-ATT <sup>d</sup>      | Voltametria de pulso diferencial | $4 \times 10^{-8}$ - $4 \times 10^{-5}$ M (EP)   | 40 nM (EP)<br>60 nM (UA e XN)  | [59]       |

| Analito  | Ensaio   | Matriz  | Detector  | Método de Detecção                      | Intervalo linear   | Limite de Detecção                                   | Referência |
|--|--|---|---|---|--|--|------------|
| <b>S -Captopril</b>  | Teste de pureza enantiomérica em matéria-prima; teste de uniformidade de teor em produto acabado (comprimidos) | Matéria-prima contendo os dois enantiómeros; comprimidos de captopril | Biosensor amperométrico baseado em L-aminooxidase, acoplado a um sistema SIA  | Cronoamperometria                       | 50 nmol/L- 1,5 $\mu$ mol/L   | 16 nmol/L  | [79]       |
| <b>S e R- Captopril</b>  | Teste de pureza enantiomérica em matéria-prima   | Matéria-prima contendo os dois enantiómeros                           | Biosensores amperométricos baseados em L- e D-aminooxidase, acoplados a um sistema SIA  | Cronoamperometria                       | 0,4-1,6 $\mu$ mol/L (S)<br>120 nmol/L-950 nmol/L (R)                                   | 0,2 nmol/L (S)<br>15nmol/L (R)                       | [80]       |
| <b>S e R- Captopril</b>  | Teste de pureza enantiomérica em matéria-prima   | Matéria-prima contendo os dois enantiómeros                           | Eléctrodo de membrana enantioselectiva baseado em maltodextrina (S-captopril);<br>Biosensor amperométrico baseado em D-aminooxidase (R-captopril), ambos acoplados a um sistema SIA | Cronopotenciometria e Cronoamperometria | 1 -1000 $\mu$ mol /L (S)<br>100-1000 $\mu$ mol /L (R)                                  | 4,4x10 <sup>-7</sup> mol /L (S)<br>13,85 nmol /L (R) | [72]       |
| <b>Dopamina (na presença de elevada concentração de Ácido Ascórbico)</b> | Doseamento em produto acabado (injectáveis)  | Misturas sintéticas dos dois APIs;<br>Injectáveis de dopamina         | Eléctrodo de carbono vítreo com nanopartículas de Au  | Voltametria de pulso diferencial        | 1X10 <sup>-8</sup> – 2,5X10 <sup>-5</sup> M  | 4,0X10 <sup>-9</sup> M                               | [60]       |
| <b>Dopamina e Epinefrina</b>   | Doseamento em produto acabado (injectáveis)  | Injectáveis de dopamina e epinefrina (mistura)                        | Eléctrodo de carbono vítreo modificado com poli (taurina)   | Voltametria de pulso diferencial        | 2X10 <sup>-6</sup> - 6X10 <sup>-4</sup> M<br>1X10 <sup>-6</sup> - 8X10 <sup>-4</sup> M | 3X10 <sup>-7</sup> M<br>1X10 <sup>-7</sup> M         | [61]       |



| Analito   | Ensaio  | Matriz   | Detector   | Método de Detecção                                    | Intervalo linear  | Limite de Detecção   | Referência |
|---|---|--|--|---|---|--|------------|
| <b>Dopamina e Epinefrina</b>                            | Doseamento em produto acabado (injectáveis)   | Injectáveis de dopamina e epinefrina (mistura)   | Eléctrodo de pasta de grafite modificado com poli (ácido isonicotínico)  | Voltametria cíclica                                   | $8,0 \times 10^{-5} - 7,0 \times 10^{-4} \text{ M}$<br>$5,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$  | $2 \times 10^{-5} \text{ M}$<br>$1 \times 10^{-6} \text{ M}$               | [63]       |
| <b>Enalapril, Ramipril e Pentopril (S-Enantiómeros)</b> | Teste de pureza enantiomérica em matéria-prima  | Matéria-prima dos três APIs  | Biosensor amperométrico baseado em L-aminooxidase, acoplado a um sistema SIA   | Cronoamperometria                                     | $0,08 - 1,50 \mu\text{M}$<br>$0,12 - 0,60 \mu\text{M}$<br>$0,2 - 6,0 \mu\text{M}$   | $4,33 \text{ nmol/L}$<br>$0,01 \mu\text{molm/L}$<br>$0,1 \mu\text{molm/L}$ | [73]       |
| <b>Epinefrina (na presença de Acetaminofeno)</b>        | Doseamento em produto acabado (injectáveis)   | Misturas sintéticas (epinefrina + acetaminofeno);<br>Injectáveis (epinefrina)                            | Eléctrodo de pasta de grafite modificado com BBNBH <sup>e</sup> e nanopartículas de TiO <sub>2</sub>   | Voltametria de pulso diferencial                      | $1,0-600,0 \mu\text{M}$<br>(Ep)   | $0,2 \mu\text{M}$<br>(Ep)  | [64]       |
| <b>Isoniazida e Rifampicina</b>                         | Doseamento em produto acabado (comprimidos)   | Comprimidos de isoniazida e rifampicina;<br>Comprimidos contendo combinação dos dois APIs<br>Soro humano | Eléctrodo de pasta de grafite  | Voltametria de redissolução anódica por onda quadrada | $5 \times 10^{-7} - 4 \times 10^{-5} \text{ M}$<br>$5 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-5} \text{ M}$  | $1,55 \times 10^{-8} \text{ M}$<br>$4,23 \times 10^{-8} \text{ M}$         | [65]       |
| <b>Melatonina e Piridoxina</b>                          | Doseamento em produto acabado (comprimidos)   | Comprimidos contendo combinação dos dois APIs  | Eléctrodo de carbono vítreo  | Voltametria de pulso diferencial                      | $2 \times 10^{-5} - 8 \times 10^{-5} \text{ M}$<br>$2 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-4} \text{ M}$  | $5,86 \times 10^{-6} \text{ M}$<br>$2,45 \times 10^{-6} \text{ M}$         | [62]       |
| <b>L-e D-Metotrexato</b>                                | Teste de pureza enantiomérica em matéria-prima; Teste de uniformidade de teor (comprimidos e injectáveis) | Matéria-prima contendo os dois enantiómeros;<br>Comprimidos e injectáveis                                | Biosensor amperométrico baseado em L-aminooxidase (L- AAOD), e/ ou L- glutamato oxidase (Glox) e <i>horseradish</i> peroxidase (HRP), acoplados a um sistema SIA | Amperometria  | $10- 600 \text{ nmol/L}$<br>(L-AAOD)<br>$100-200 \text{ pmol /L}$<br>(L-AAOD + HRP)<br>...<br>(várias combinações dos enzimas para construção de biosensores) | $4 \text{ nmol /L}$ (L-AAOD)<br>$6 \text{ pmol /L}$ (L-AAOD + HRP)<br>...  | [74]       |

| Analito                                | Ensaio   | Matriz   | Detector  | Método de Detecção               | Intervalo linear   | Limite de Detecção                               | Referência |
|--|--|--|---|----------------------------------|--|--|------------|
| <b>Nicotinamida</b>                    | Doseamento em produto acabado (comprimidos)                      | Comprimidos polivitamínicos  | Eléctrodo de pasta de grafite modificado com compostos macrocíclicos (Hexathia)                                   | Voltametria de pulso diferencial | 0,1-500 µg/ mL   | 0,03 µM/ mL                                      | [66]       |
| <b>Paracetamol e Cafeína</b>           | Doseamento em produto acabado (comprimidos)                      | Comprimidos contendo combinação dos dois APIs  | Eléctrodo de diamante dopado com boro   | Voltametria de pulso diferencial | $5,0 \times 10^{-7}$ – $8,3 \times 10^{-5}$ M (ambos)  | $4,9 \times 10^{-7}$ M<br>$3,5 \times 10^{-8}$ M | [70]       |
| <b>Paracetamol e p-Aminofenol</b>      | Doseamento em produto acabado (comprimidos) e teste de Impurezas | Comprimidos de paracetamol aos quais é adicionado p-aminofenol (produto de degradação) | Eléctrodo de carbono líquido iónico   | Voltametria de pulso diferencial | $2,0 \times 10^{-6}$ – $2,2 \times 10^{-3}$ M<br>$3,0 \times 10^{-7}$ – $1,0 \times 10^{-3}$ M | $5,0 \times 10^{-7}$ M<br>$1,0 \times 10^{-7}$ M | [68]       |
| <b>Piridoxina</b>                      | Doseamento em produto acabado (comprimidos)                      | Comprimidos polivitamínicos  | Eléctrodo de pasta de grafite modificado com hexacianoferrato (III) de Cobre(II)                                  | Voltametria cíclica              | $1,2 \times 10^{-6}$ – $6,9 \times 10^{-4}$ M  | $4,1 \times 10^{-7}$ M                           | [67]       |
| <b>S- Perindopril</b>                  | Teste de pureza enantiomérica em matéria-prima                   | Matéria-prima contendo mistura dos dois enantiómeros                                   | Biosensor amperométrico baseado em L-aminooxidase, acoplado a um sistema FIA                                      | Cronoamperometria                | 200 pM- 80 nM  | 100 pM   | [75]       |
| <b>S- Perindopril e R- Perindopril</b> | Teste de pureza enantiomérica em matéria-prima                   | Matéria-prima contendo mistura dos dois enantiómeros                                   | Biosensor amperométrico baseado em L-aminooxidase e D-aminooxidase, acoplados a um sistema FIA e a um sistema SIA | Cronoamperometria                | 240 pM- 60 nM<br>6nM- 40 nM  | 120 pM<br>4 nM                                   | [76]       |
| <b>R- Perindopril</b>                  | Teste de pureza enantiomérica em matéria-prima                   | Matéria-prima contendo mistura dos dois enantiómeros                                   | Biosensor amperométrico baseado em D-aminooxidase, acoplados a um sistema FIA                                     | Cronoamperometria                | 20-100 nM  | 4nM  | [78]       |

| Analito  | Ensaio   | Matriz  | Detector  | Método de Detecção  | Intervalo linear                                      | Limite de Detecção                      | Referência |
|--|--|---|---|---------------------|---|---|------------|
| <b>Tiamina (B1), Riboflavina (B2) e Piridoxina (B6)</b>                    | Doseamento em produto acabado (comprimidos)  | Comprimidos polivitamínicos (B1 ou B6)                      | Eléctrodo de pasta de grafite modificado com ruténio (III) hexacianorutenato (II), aplicado num sistema FIA   | Voltametria cíclica | 0,5-50 µmol<br>1,0-50 µmol<br>0,2-50 µmol             | 0,2 µmol<br>0,5 µmol<br>0,1 µmol        | [71]       |
| <b>L- Tiroxina (L-T4), D- Tiroxina (D- T4) e L-Triiodotironina (L- T3)</b> | Teste de pureza enantiomérica em matéria-prima e produto acabado (comprimidos e injectáveis) | Matéria – prima de L- T4 Comprimidos e injectáveis de L- T4 | Eléctrodos de pasta de grafite: Imunosensores amperométricos (L-T4 e L-T3) e biosensor amperométrico baseado em L- aminooxidase, acoplados a um sistema SIA | Cronoamperometria   | 10- 780 ng/ mL<br>50- 500 nmol/ mL<br>105- 380 ng/ mL | 8.52 ng/ mL<br>20 nmol/ mL<br>12 ng/ mL | [77]       |

<sup>a</sup> poli- acid chrome blue K; <sup>b</sup> poli- 5-amino-2-mercapto-1, 3, 4-tiadiazole; <sup>c</sup> ácido poli-calconcarboxílico; <sup>d</sup> poli- 5-amino-1,3,4- tiadiazole-2 tiol; <sup>e</sup> 2,2'- [1,2 butanedil bis(nitriloetilideno)]-bis-hidroquinona

Muito embora advoguem a análise multiparamétrica, a aplicação prática realizada em algumas das referências anteriormente citadas [56, 58-60, 64] reduz-se a misturas sintéticas de diferentes APIs e produtos farmacêuticos muito simples, tais como injectáveis constituídos apenas por um dos compostos em análise. Não é referido qualquer estudo sobre o comportamento destes sensores em matrizes farmacêuticas realmente complexas, nas quais se inserem os comprimidos multi-componente. A título de exemplo, comentam-se os trabalhos desenvolvidos pelo grupo de investigação de Kalimuthu et al. [56, 59], nos quais se reporta a construção e aplicação de eléctrodos de carbono vítreo modificados com polímeros condutores, para a determinação simultânea de princípios activos. Estes tipos de sensores têm sido alvo de interesse considerável por parte da comunidade científica devido à sua elevada sensibilidade, selectividade e estabilidade, facilidade de construção e espessura desejável do filme, que pode ser preparado na superfície do eléctrodo. Existe ainda a possibilidade de gerar interacções electroestáticas entre o sensor e o analito de interesse pela adição de cargas positivas ou negativas à sua superfície, através da electropolimerização de monómeros apropriados. O método de preparação de eléctrodos de polímeros modificados proporciona um meio eficaz de controlar parâmetros electroquímicos como espessura do filme, permeação e características de transporte de carga. Ambos os estudos mostram que os sensores em causa resolvem eficazmente os sinais dos três princípios activos analisados através da quantificação realizada em misturas de soluções padrão, com obtenção de limites de detecção na ordem dos nM. Apesar das potencialidades sugeridas pelos autores, a aplicação a amostras reais é concretizada no doseamento de apenas um API, em produto acabado do tipo injectável [56, 59], e de uma substância activa, em amostras de urina humana [59], recorrendo ao método de adição padrão.

Ainda assim, verifica-se uma quantidade apreciável de artigos que reportam a aplicação dos eléctrodos desenvolvidos em matrizes farmacêuticas de elevada complexidade (Tabela 3), nomeadamente em formulações sólidas de administração oral compostas por dois APIs [62, 65, 66, 67, 70, 71], ou mesmo para doseamento concomitante de um princípio activo e de impurezas resultantes da sua degradação [68]. Nesta secção, destaca-se o trabalho desenvolvido pelos autores Hammam et al. [65], no qual é descrita uma metodologia para doseamento de rifampicina e isoniazida em comprimidos mono-componente (constituídos pelos dois fármacos isoladamente), ou em comprimidos multi-componente (com combinação de ambos), e em amostras de soro humano, tendo sido obtidas recuperações excelentes, sem necessidade de pré-tratamentos complexos de amostra ou demoradas extracções da mesma.

Por sua vez, um exemplo da aplicação de eléctrodos de pasta de grafite modificados ao ensaio de doseamento e de impurezas em produto acabado, encontra-se bem patente no trabalho proposto por Safavi et al [68]. Neste, procede-se à determinação concomitante de paracetamol (PAR) e *p*-aminofenol (PAP). O paracetamol é um derivado sintético não opiáceo do *p*-aminofenol, que sofre hidrólise em condições inapropriadas de armazenamento, como elevadas temperaturas e meio ácido ou alcalino. Uma vez que tem sido reportado o seu efeito nefrotóxico e teratogénico, o PAP é detectado em PAR, como impureza, ou intermediário sintético. O sensor utilizado é denominado pelos autores como “eléctrodo de carbono líquido iónico”. A utilização de líquido iónico como ligador da pasta de grafite num eléctrodo comum, sintetizado tal como reportado anteriormente num artigo do mesmo grupo de investigação [69], favorece o aumento da condutividade da membrana, a rápida transferência de electrões, e o não incrustamento do analito sobre esta. Este eléctrodo proporciona, a determinação simultânea de PAR e quantidades vestigiais de PAP, em produto acabado (comprimidos), com obtenção de bons resultados de recuperação. Embora não referido pelos autores, uma vez que a metodologia descrita é indicadora da estabilidade do produto, poderia ser adequada à realização de ensaios de estabilidade em formulações farmacêuticas contendo paracetamol.

Outro exemplo de aplicação de técnicas voltamétricas no doseamento de medicamentos multi-componente em modo convencional encontra-se explicitado no trabalho reportado pelo grupo de investigação de Lourenção et. al [70], no qual é descrito um eléctrodo de diamante dopado com boro, que confere condutividade metálica ao material. Este tipo de sensores começa a ter bastante relevo na área dos detectores electroquímicos, uma vez que proporcionam uma ampla janela de potenciais aplicados em soluções aquosas, baixas correntes basais, estabilidade a longo termo e baixa sensibilidade ao oxigénio dissolvido. A aplicação faz-se no doseamento de formulações farmacêuticas contendo paracetamol e cafeína, sendo que os autores destacam a rapidez e o baixo custo, comparativamente às metodologias clássicas de HPLC-UV, para análise do mesmo tipo de matrizes.

Algumas das referências constantes na literatura debruçam-se sobre ensaios realizados num tipo de produtos farmacêuticos de elevada complexidade, como é o caso dos medicamentos polivitamínicos. Com efeito, a maioria dos trabalhos encontrados [62, 66, 67] descrevem o doseamento destes APIs por aplicação de técnicas voltamétricas, de forma convencional, tal como referenciado anteriormente. Existem, disponíveis no mercado, dezenas de formulações contendo misturas de vitaminas hidro e liposolúveis, sendo que estas matrizes exigem geralmente bastantes passos de pré tratamento antes

de proceder à análise propriamente dita, quando se recorrem às técnicas cromatográficas com detecção espectrofotométrica. Muitas vezes, os resultados obtidos com recurso a HPLC acoplado a detectores UV, não têm a resolução requerida, uma vez que as vitaminas são compostos estruturalmente semelhantes, com tempos de retenção e comprimentos de onda de absorção similares. Para além disso, os métodos extractivos usualmente aplicados para a sua análise, para além de serem demorados e difíceis de executar, podem originar facilmente perda de amostra. Neste contexto, os métodos electroquímicos, particularmente os amperométricos, os voltamétricos e os potenciométricos, tem vindo a demonstrar-se como uma alternativa viável para análise de produto acabado polivitamínico.

A título de exemplo, referem-se os trabalhos propostos em [66], onde se estuda o comportamento electroquímico da nicotinamida (vitamina B3), num eléctrodo de pasta de grafite modificado com compostos macrocíclicos, como éteres coroa e calixarenos, e em [67], no qual se descreve a determinação electroquímica de piridoxina (vitamina B6), com recurso a um eléctrodo de pasta de grafite modificado com um complexo de hexacianoferrato (III) de cobre (II). Ambos os métodos são aplicados a formulações polivitamínicas, com obtenção de bons resultados, sem se verificarem interferências apreciáveis relativamente à presença de outras vitaminas.

A análise dos trabalhos publicados na literatura mostra que a maior parte das aplicações descritas com detecção amperométrica recorrem a sistemas automáticos de fluxo, e têm como alvo de acção a realização de ensaios de pureza em misturas racémicas. Efectivamente, na última década, uma quantidade significativa de estudos tem vindo a debruçar-se sobre o desenvolvimento de métodos com detecção cronoamperométrica inseridos em sistemas FIA e SIA [72-80], para realização de testes de pureza enantiomérica em matéria-prima e produto acabado (Tabela 3). Estes sistemas detêm um papel preponderante uma vez que, após injeção da amostra tamponada, esta flui na montagem, pela célula electroquímica que contém o sensor quiral, sendo as medições realizadas automaticamente e num espaço de tempo muito curto, além de possibilitarem o condicionamento contínuo da superfície dos sensores levado a cabo pelo transportador [72-80]. A linha de investigação referida faz uso de enzimas enantioselectivas, aplicadas no desenvolvimento de biosensores amperométricos, tendo como suporte físico os eléctrodos de pasta de grafite.

Os testes de pureza enantiomérica de substâncias biologicamente activas são de uma importância extrema nos fármacos quirais, uma vez que na maioria dos casos está comprovado que apenas um dos enantiómeros possui o efeito farmacológico desejado,

enquanto o outro pode ser tóxico, menos activo, ter efeitos laterais indesejáveis, ou mesmo actuar como antagonista do primeiro. Para além da produção farmacêutica, a pureza enantiomérica de vários compostos demonstra ser fundamental na síntese estéreo-específica de pesticidas e de alguns aditivos alimentares, nos casos em que apenas um pode interagir satisfatoriamente.

Na análise de rotina efectuada nas indústrias farmacêuticas, a cromatografia quiral tornou-se a ferramenta analítica mais utilizada na quantificação de racematos [1]. Para a construção de colunas com o grau de selectividade desejada, derivatizaram-se agentes quirais que foram imobilizados na superfície de um suporte (maioritariamente gel de sílica), o que origina discriminadores *in situ* durante o processo cromatográfico. No entanto, estes métodos vulgarmente utilizados para o doseamento simultâneo de enantiómeros nem sempre proporcionam precisão adequada para este tipo de ensaios, são dispendiosos, demorados, e difíceis de implementar. Outra estratégia experimentada relaciona-se com o emprego de *arrays* de sensores [72] que, para além do custo elevado, muitas vezes implicam a utilização de métodos quimiométricos a fim de resolver sinais com sobreposição, tornando o processo menos preciso e mais difícil de aplicar rotineiramente [72].

Todos estes factores são discutidos em [72], no qual um sistema de fluxo por injeção sequencial (SIA) é proposto para determinação de R- captopril e S- captopril. Para dosear o enantiómero R, emprega-se um sensor bioamperométrico de pasta de grafite, baseado em D-amino-oxidase e, no caso do S- captopril, opta-se pela detecção potenciométrica, recorrendo a um eléctrodo de membrana enantioselectiva composto pelo ionóforo maltodextrina. O sistema descrito é utilizado para a determinação simultânea em linha dos enantiómeros durante o processo de síntese, directamente e sem pré-tratamentos de amostra, com obtenção de excelentes resultados.

O mesmo grupo desenvolve um sistema FIA aplicado à detecção de S-perindopril em matéria-prima, composta por uma mistura dos dois isómeros [75] e, num trabalho subsequente, compara as características de um sistema FIA com um sistema SIA para doseamento simultâneo de S- e R- perindopril [76], em matriz semelhante. O sistema SIA demonstra mais eficiência devido ao resultado obtido apresentar precisão e exactidão superiores, aos modestos consumos de amostras e reagentes, e à sua versatilidade. Apesar das mais-valias que decorrem da aplicação deste tipo de metodologias, uma desvantagem da sua utilização relaciona-se com o diminuto tempo de vida que os biosensores amperométricos apresentam, quando inseridos em sistemas de fluxo.

Uma tendência que se tem vindo a verificar nos últimos 15 anos consiste na associação, cada vez mais frequente, da cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) com a detecção electroquímica (DE), como método generalizado de análise farmacêutica (Tabela 4). Corroborando este facto, algumas monografias compendiais (por exemplo na Farmacopoeia Europeia 5.5 [81]) recomendam o emprego de HPLC incorporando a detecção amperométrica na análise de antibióticos, tais como a gentamicina, neomicina, frameticina, tobramicina e netilmicina. A grande mais-valia da detecção electroquímica associada à cromatografia líquida de elevada eficiência prende-se sobretudo com a diminuição das interferências das substâncias que absorvem no UV e com o aumento da selectividade, sensibilidade e intervalo de linearidade proporcionado pelos detectores electroanalíticos. Os ensaios de impurezas, que pesquisam componentes muitas vezes ao nível do nanograma, beneficiam com o recurso a este tipo de sensores. Fica contudo a ressalva que permanecem as desvantagens do tempo de preparação das amostras recorrendo a procedimentos fastidiosos, os custos elevados associados a esta técnica, bem como a utilização excessiva de solventes orgânicos, danosos para os frágeis ecossistemas terrestres.



**Tabela 4** - Métodos electroquímicos associados a HPLC, para análise de produtos farmacêuticos complexos: Amperometria, Condutimetria, Coulometria, e Potenciometria

| Analitos                                     | Ensaio  | Matriz  | Método de Detecção      | Sensor   | Condições Cromatográficas  | Limite de Detecção   | Referência |
|--|---|---|-------------------------|--|--|--|------------|
| <b>Clenbuterol, Ambroxol e Bromexina</b>     | Doseamento em produto acabado (comprimidos)   | Comprimidos contendo ambroxol, ou mistura deste API com clenbuterol | Potenciometria          | Eléctrodos de membrana plástica com ionóforos derivados de $\alpha$ -ciclodextrina e TOPA <sup>a</sup> , acoplados a 2 sistemas cromatográficos RP-LC <sup>b</sup> | Fase móvel I: acetonitrilo: etanol: ácido perclórico 1,66 mM (60:2:38), pH 2,45; Fase móvel II: acetonitrilo: ácido fosfórico 20 nM (25:75), pH 2,6; fluxo: 1ml. min <sup>-1</sup>   | Os mais baixos: 2,9x10 <sup>-9</sup> M (Clen.); 2,1x10 <sup>-9</sup> M (Amb.); 1,4x10 <sup>-10</sup> M (Brom.) | [134, 135] |
| <b>Diazepam, Nitrazepam e Clonazepam</b>     | Doseamento em produto acabado (comprimidos)   | Comprimidos compostos por mistura dos três APIs                     | Amperometria            | Eléctrodo de diamante dopado com boro  | Fase móvel: fosfato de sódio 0,10M, pH 3,5: acetonitrilo (65:35); fluxo: 1,2 mL.min <sup>-1</sup>  | 2,0 µg. ml <sup>-1</sup> (Diaz.); 0,5 µg. ml <sup>-1</sup> (Nitraz.); 0,6 µg. ml <sup>-1</sup> (Clonaz.)       | [82]       |
| <b>L- Dopa metiléster (LDME)</b>             | Ensaio de doseamento de API e doseamento de impurezas (L-dopa, 3-metiltirosina-MTS e L-tirosina-TS), em matéria-prima e produto acabado (comprimidos) | Matéria-prima e produto acabado de LDME                             | Amperometria            | Detector electroquímico 2465, Waters, USA  | Fase móvel: metanol, acetonitrilo, 50 mM de dihidrogenofosfato de potássio (8:2:90), contendo 5mM de haxanosulfonato de sódio, 5mM EDTA e 5 mM de NaCl, ajustados a pH 3,2, com ácido ortofosfórico; fluxo: 0,8 ml.min <sup>-1</sup> | 3,15 ng/mL ( L-DOPA)<br>2,04 ng/mL (MTS)<br>2,8 ng/mL (TS)   | [86]       |
| <b>Mucolíticos (oito princípios activos)</b> | Doseamento em produto acabado (xaropes)   | Xaropes da tosse (contendo até 5 destes APIs)                       | Condutimetria indirecta | Detector de condutividade modelo 2151001, Alltech  | Fase móvel: água: acetonitrilo: etanol (38: 60: 2), contendo 1mM de ácido perclórico); fluxo: 1 mL.min <sup>-1</sup>   | A resposta para todos os APIs é semelhante, com detecção ao nível dos nanogramas                               | [87]       |

| Analitos   | Ensaio  | Matriz  | Método de Detecção  | Sensor  | Condições Cromatográficas   | Limite de Detecção   | Referência |
|--|---|---|---|---|---|--|------------|
| <b>Pipecurónio (brometo) e quatro impurezas</b>              | Doseamento de API em produto acabado e doseamento de impurezas (solução)    | Solução (formulação farmacêutica) dopada com as 4 impurezas                   | Coulometria   | Array de eléctrodos de grafite porosa             | Fase móvel: solução de hidróxido de tetraetilamónio 4,53 g/L pH 6,4; acetonitrilo (6:4 v/v); fluxo: 1.5 ml. min <sup>-1</sup>           | 8 ng/ ml (Pip.)<br>8, 18, 10 e 18 ng/ ml, para as impurezas I, II, III e IV, respectivamente | [85]       |
| <b>Rocurónio e oito impurezas</b>                            | Doseamento de API em produto acabado e doseamento de impurezas (injectável) | Injectáveis do API dopado com algumas das impurezas                           | Amperometria  | Eléctrodo de carbono vítreo                       | Fase móvel: solução de hidróxido de tetrametilamónio 4,53 g.L <sup>-1</sup> pH 7,4; acetonitrilo (1:9); fluxo: 1,5 mL.min <sup>-1</sup> | 45 ng/ ml (Ruc.);<br>25 - 750 ng/ ml (Imp.)  | [84]       |
| <b>Tiamina (B1), Piridoxina (B6) e Cianocobalamina (B12)</b> | Doseamento em produto acabado (comprimidos)                                 | Comprimidos polivitamínicos e suplementos alimentares                         | Coulometria (B6 e B12) e detecção espectrofotométrica – UV (B1) | Detector electroquímico Coulochem II, modelo 5010 | Fase móvel: tampão fosfato de sódio dibásico 0,05M, 10% metanol (V/V) e trimetilamina 0,018 M, pH 3,55; fluxo: 1 ml .min <sup>-1</sup>  | 9,2 ng/ ml (B1)<br>2,7 ng/ ml (B6)<br>0,08 ng/ ml (B12)                                      | [88]       |
| <b>Triamtereno e Furosemida</b>                              | Doseamento em produto acabado (comprimidos)                                 | Comprimidos compostos por uma mistura dos dois APIs; amostras de urina humana | Amperometria  | Eléctrodo de carbono vítreo                       | Fase móvel: tampão fosfato de potássio 5 mM, pH 5,5; acetonitrilo (30:70); fluxo 1ml. min <sup>-1</sup>                                 | 15 ng/ ml (Furos.);<br>0,1 ng/ ml (Triam.)   | [83]       |

<sup>a</sup> N, N, N', N' - tetraciclohexil-oxi bis(o-fenilenoxi)diacetamida; <sup>b</sup> Cromatografia Líquida de Fase Reversa

Deste modo, não são completamente exploradas as potencialidades dos detectores electroquímicos, já amplamente discutidas no decorrer da tese. Embora apareçam na literatura trabalhos integrando detectores do tipo electroanalítico em sistemas de fluxo, com todas as vantagens anteriormente enunciadas, se os produtos a analisar são extremamente complexos, ou se se pretender determinar simultaneamente um elevado número de compostos (mais de três), é quase inevitável o recurso a sistemas cromatográficos para possibilitar uma resolução de mistura satisfatória. Neste sentido, os métodos electroquímicos acoplados a HPLC constituem um nicho interessante a explorar pelas indústrias do ramo farmacêutico, especialmente na análise de impurezas de síntese e produtos de degradação.

Na Tabela 4 faz-se um resumo dos trabalhos pesquisados na literatura científica, utilizando detecção amperométrica [82-84, 86], condutimétrica [87] e coulométrica [85, 88], quando associadas a HPLC. Em algumas destas referências, descreve-se a aplicação no doseamento de APIs em formulações farmacêuticas combinadas como, por exemplo, no trabalho desenvolvido por Martins et al. [82], no qual um eléctrodo de diamante dopado com boro é integrado numa célula amperométrica acoplada a um sistema de HPLC para determinação de benzodiazepinas. Tal como anteriormente referido, os eléctrodos de boro têm vindo a ser alvo de atenção por parte da comunidade científica, devido às características electroquímicas únicas que apresentam, das quais se destacam a elevada estabilidade derivada das propriedades inertes no que diz respeito à adsorção de espécies químicas, e a facilidade de limpeza da sua superfície comparativamente com os eléctrodos de carbono vítreo. Para além disso, possibilitam trabalhar com potenciais mais positivos que estes últimos e são detentores de uma longa estabilidade. Este sensor é aplicado num sistema HPLC com uma coluna C18 de fase reversa, em condições isocráticas, com obtenção de resultados satisfatórios no doseamento simultâneo de nitrazepam, clonazepam e diazepam, em comprimidos constituídos por uma mistura destes três princípios activos. Outro exemplo encontra-se patente no trabalho descrito em [83], no qual os autores referem o desenvolvimento de um método de HPLC com detecção amperométrica, para determinação de dois diuréticos: triamtereno e furosemida, em comprimidos constituídos por uma mistura dos dois princípios activos e em amostras reais de urina, após ingestão do mesmo fármaco por voluntários saudáveis. Neste caso, o detector consiste num eléctrodo de carbono vítreo.

A capacidade de dosear simultaneamente uma elevada quantidade de APIs encontra-se defendida, de modo peremptório, no trabalho descrito em [87], no qual se desenvolve um método de HPLC com o intuito de aplicar à determinação concomitante

de oito princípios activos em xaropes da tosse, usando como processo de detecção a condutimetria indirecta. Estes APIs incluem cloridrato de bromexina, maleato de clorfeniramina, cloridrato de efedrina, fosfato de codeína, bromidrato de dextrometorfano, cloridrato de papaverina e cloridrato de fenilefedrina. O método proposto possui vantagens quando comparado aos de HPLC com detecção espectrofotométrica, na medida em que permite a determinação de compostos que não absorvem na região do U.V, a resposta é similar para todos os fármacos detectados e é proporcional ao número de moléculas, fazendo com que vários APIs possam ser detectados na mesma corrida cromatográfica. Para além disso, pode reduzir o número de passos de diluição requeridos nos métodos clássicos de cromatografia. É interessante realçar que a detecção não depende do grupo funcional das moléculas, o que abre a possibilidade para aqueles fármacos que não podem ser quantificados pela falta de um grupo funcional específico poderem-no ser, com recurso a esta aplicação. São analisados nove xaropes da tosse constituídos por misturas de vários APIs, até um máximo de 5 por formulação e os resultados obtidos estão em conformidade com o método de HPLC com detecção espectrofotométrica, usado como comparação. A metodologia proposta demonstra ser sensível, apresentando um limite de detecção ao nível dos nanogramas, com amplo intervalo de resposta linear e mais simples que a maioria dos métodos de HPLC envolvendo derivatização da amostra, ou o recurso a compostos químicos que fornecem associações de pares-iónicos.

Outras referências na área do HPLC-DE apostam no desenvolvimento de métodos para a realização do ensaio de impurezas em matéria-prima e produto acabado. Nomeadamente, no trabalho reportado por Błażewicz et al. [84], é descrito um método de HPLC associado a detecção amperométrica, com um eléctrodo de carbono vítreo, para quantificar simultaneamente brometo de rocurónio e oito das suas impurezas. A aplicação faz-se em injectáveis do referido princípio activo, dopado com algumas das substâncias alvo. As recuperações calculadas são perfeitamente comparáveis com as obtidas por aplicação de uma metodologia de referência (HPLC- UV). No entanto, o método proposto é mais sensível e preciso no que diz respeito à quantificação das impurezas, podendo ser aplicado com segurança na análise de rotina em matéria-prima e em produto farmacêutico acabado. O mesmo grupo de investigação publica um método similar de HPLC com detecção coulométrica [85] para análise de brometo de pipecurónio, em conjunto com quatro das suas impurezas, numa solução farmacêutica. Relativamente ao trabalho anterior, o recurso a um *array* de eléctrodos, que consiste numa série de sensores coulométricos posicionados em série, origina uma detecção multicanal e permite maior sensibilidade, com obtenção de limites de quantificação inferiores, quer do

princípio activo, quer das suas impurezas. Este sistema proporciona a visualização de voltamogramas hidrodinâmicos e permite trabalhar sob condições de gradiente. Além disso, os diversos canais adquirem dados a potenciais diferentes, proporcionando conseqüentemente uma análise de dados multidimensional, o que é especialmente interessante para resolução de misturas complexas.

Existem também referências que apostam no desenvolvimento de metodologias para doseamento de APIs, concomitantemente com a quantificação de impurezas resultantes do processo de síntese de matérias-primas, como é exemplo o trabalho descrito em [86]. Neste, os autores reportam um método de HPLC com detecção amperométrica para separar e quantificar Levodopa metiléster (LDME) e as suas impurezas de síntese, nomeadamente a levodopa (L- Dopa), a 3- metiltirosina e a L- tirosina. Em simultâneo, é também descrito um método quiral de HPLC, para quantificar o excesso enantiomérico (teste de pureza), com detecção óptica. Tanto o doseamento como o ensaio de pureza são validados de acordo com procedimentos descritos na literatura [89-91]. Os dois métodos aplicam-se no ensaio de doseamento em matéria - prima e cápsulas de produto acabado, com obtenção de bons resultados, sendo que o enantiómero D não é detectado em nenhum dos dois produtos farmacêuticos, e o conteúdo obtido para o princípio activo LDME nas cápsulas é concordante com a quantidade expressa no rótulo.

### 3.2. *Ensaio de Doseamento, com Detecção Potenciométrica*

A área de investigação que se debruça sobre o desenvolvimento e aplicação de eléctrodos selectivos a ião, pelas inúmeras mais-valias que apresenta, continua a ser alvo do interesse da análise farmacêutica, como o testemunham diversos artigos de revisão publicados nos últimos anos [22, 47-51]. Tal como já foi anteriormente referido, entre as vantagens que caracterizam os ESIs destacam-se a simplicidade do *design* e *modus operandi*, o baixo custo, e a selectividade adequada, o que os torna ideais para determinações em matrizes farmacêuticas multi-componente [48]. Para além disso, o facto de não serem destrutivos de amostra possibilita o seu emprego em análises multiparamétricas. Relativamente a outros tipos de sensores electroanalíticos, os potenciométricos evidenciam-se por serem detentores de maiores tempos de vida e passíveis de miniaturização, uma vez que as suas características funcionais não são de modo geral afectadas [47, 50]. Desta forma, adequam-se facilmente à incorporação em

sistemas de fluxo miniaturizados, capazes de debitar resultados de excelente qualidade analítica de modo automático, e em tempo real acompanhando, a par e passo, a evolução de uma indústria que se quer cada vez mais exigente.

A análise da literatura relativamente a este aspecto dá conta que a maioria dos trabalhos recorre à detecção potenciométrica com ESIs em modo convencional. Efectivamente, poucas são as referências que descrevem o acoplamento deste género de detectores a sistemas de fluxo, para análise de matrizes farmacêuticas multi-componente. A grande generalidade dos artigos publicados que faz uso das metodologias FIA e SIA tem como aplicação a realização de ensaios de doseamento em medicamentos polivitamínicos (Tabela 5).

Os trabalhos abordados em seguida efectuam-se em modo estático, por potenciometria directa. Os sensores potenciométricos desenvolvidos são de membrana plástica e baseiam-se na formação de pares-iónicos entre os analitos de interesse e sais lipofílicos, incorporados numa matriz de PVC [93-95]. No que concerne aos eléctrodos descritos nos trabalhos [94, 95], estes mostram-se ineficazes no doseamento das moléculas alvo, em comprimidos constituídos por uma mistura dos dois princípios activos. No entanto, verifica-se que podem ser aplicados na análise de formulações uni-componente, quantificando com sucesso o respectivo API, na presença de elevada quantidade dos respectivos produtos de degradação.

**Tabela 5- Métodos Electroquímicos para análise de produtos farmacêuticos complexos: Potenciometria**

| Analito  | Ensaio   | Matriz  | Sensor   | Declive (mV/década)  | Intervalo de Linearidade  | Aplicação   | Referência |
|--|--|---|--|--|---|---|------------|
| <b>S- Captopril</b>                            | Teste de pureza enantiomérica em matéria-prima; ensaios de uniformidade de teor em produto acabado (comprimidos) | Matéria-prima do S-enantiómero; comprimidos de captopril  | $\beta$ – ciclodextrina (2-hidroxi-3-metil amoniopropil), em pasta de grafite  | $57,70 \pm 0,30$   | $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-2} \text{ M}$   | Cronopotenciometria, com eléctrodos convencionais   | [114]      |
| <b>S- Cilazapril, Pentopril e Trandolapril</b> | Teste de pureza enantiomérica em matéria-prima   | Matéria-prima dos S-enantiómeros  | $\beta$ – ciclodextrina (2-hidroxi-3-metil amoniopropil), em pasta de grafite  | $56,85 \pm 0,20$ (C)<br>$58,16 \pm 0,10$ (P)<br>$52,45 \pm 0,20$ (T)   | $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-2} \text{ M}$<br>$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-2} \text{ M}$<br>$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ | Cronopotenciometria, com eléctrodos convencionais   | [115]      |
| <b>Ciclofosfamida e Ifosfamida</b>             | Ensaio de doseamento em produto acabado; ensaio indicador de estabilidade (comprimidos)                          | Comprimidos de ciclofosfamida ou ifosfamida; misturas sintéticas de cada um dos APIs com diferentes proporções dos respectivos produtos de degradação | Complexo iónico do catião de interesse e tetrafenilborato de sódio, em PVC (I) e (II);<br>Sensor sem par iónico, em PVC-COOH (III) | 56 (sensor I, ciclofosfamida)<br>54,6 (sensor II, ifosfamida)<br>49,7 (sensor III, para as duas substâncias) | $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ (sensor I e II)<br>$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ (sensor III)                       | Potenciometria directa, com eléctrodos convencionais  | [94]       |
| <b>Citrato (CIT)</b>                           | Ensaio de doseamento em produto acabado (pós e líquidos de irrigação)  | Produtos farmacêuticos; Bebidas   | Complexo iónico do anião citrato com um sal de amónio quaternário (BTPPIA-CIT) <sup>a</sup> em PVC                                 | $61,9 \pm 0,6$ (convencional)<br>$80,2 \pm 0,7$ (tubular)  | $5 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ (tubular)   | Eléctrodos convencionais: avaliação; eléctrodos tubulares inseridos num sistema FIA: avaliação e doseamento | [126]      |

| Analito                                  | Ensaio  | Matriz  | Sensor   | Declive (mV/década)  | Intervalo de Linearidade  | Aplicação  | Referência |
|--|---|---|--|----------------------|---|--|------------|
| <b>S- Enalapril</b>                      | Teste de pureza enantiomérica em matéria-prima: ensaios de uniformidade de teor em produto acabado (comprimidos)            | Matéria-prima do S-enantiómero; comprimidos de enalapril  | $\beta$ – ciclodextrina (2-hidroxi 3-metil amoniopropil), em pasta de grafite  | $55,00 \pm 0,30$     | $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-2} \text{ M}$   | Cronopotenciometria, com eléctrodos convencionais    | [116]      |
| <b>S- Ibuprofeno</b>                     | Teste de pureza enantiomérica em matéria-prima; ensaios de uniformidade de teor em produto acabado (comprimidos e cápsulas) | Matéria-prima do S-enantiómero; comprimidos e cápsulas de ibuprofeno  | Maltodextrinas, com diferentes dimensões, em pasta de grafite  | 59,0<br>58,4<br>55,6 | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3} \text{ M}$<br>$1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-3} \text{ M}$<br>$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ | Potenciometria directa, com eléctrodos convencionais | [119]      |
| <b>Oxibutinina (OX) e Flavoxato (FX)</b> | Ensaio de doseamento em produto acabado; ensaio indicador de estabilidade (comprimidos)                                     | Formulações farmacêuticas; misturas sintéticas de cada um dos APIs com os respectivos produtos de degradação; plasma humano | Complexo iónico do catião de interesse com tungstofosfato e reinecato (OX) e tetrakis 4-clorofenil borato e reinecato (FX), em PVC | 60 (para ambos)      | $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ (para ambos)  | Potenciometria directa, com eléctrodos convencionais | [95]       |



| Analito                                      | Ensaio   | Matriz  | Sensor   | Declive (mV/década)  | Intervalo de Linearidade   | Aplicação   | Referência |
|--|--|---|--|--|--|---|------------|
| <b>S- Perindopril</b>                        | Teste de pureza enantiomérica em matéria-prima; ensaios de uniformidade de teor em produto acabado (comprimidos)                   | Mistura dos enantiómeros S e R em diferentes proporções; comprimidos  | $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ ciclodextrinas, em pasta de grafite  | 56,64 ( $\alpha$ )<br>50,71 ( $\beta$ )<br>63,00 ( $\gamma$ )            | $1 \times 10^{-7}$ - $1 \times 10^{-3}$ M<br>$1 \times 10^{-7}$ - $1 \times 10^{-3}$ M<br>$1 \times 10^{-7}$ - $1 \times 10^{-3}$ M  | Potenciometria directa, com eléctrodos convencionais  | [117]      |
| <b>Pioglitazona (PIO) e Metformina (MET)</b> | Ensaio de doseamento em matéria-prima; ensaios indicadores de estabilidade; ensaios de doseamento em produto acabado (comprimidos) | Misturas sintéticas dos dois APIs; mistura sintética de PIO com os seus produtos de degradação; comprimidos constituídos pelos dois ou por um dos APIs; plasma humano | Complexos iónicos do princípio activo com tetrafenil borato (TPB) de sódio e reinecato (RNC) de amónio, em PVC | 26,74 (PIO-TPB)<br>25,29 (PIO-RNC)<br>51,56 (MET-TPB)<br>49,29 (MET-RNC) | $3,2 \times 10^{-5}$ - $1 \times 10^{-2}$ M<br>$3,2 \times 10^{-5}$ - $1 \times 10^{-2}$ M<br>$1 \times 10^{-3}$ - $1 \times 10^{-1}$ M<br>$1 \times 10^{-3}$ - $1 \times 10^{-1}$ M | Potenciometria directa, com eléctrodos convencionais  | [93]       |
| <b>Piridoxina (B6)</b>                       | Ensaio de doseamento em produto acabado (injectáveis e cápsulas)   | Preparações farmacêuticas polivitamínicas (injectáveis e cápsulas)  | Calix(8)areno em PVC   | $60,4 \pm 3,1$   | $1,0 \times 10^{-4}$ - $1,0 \times 10^{-1}$ M  | Método da adição padrão, com eléctrodos convencionais | [120]      |
| <b>Piridoxina (B6)</b>                       | Ensaio de doseamento em produto acabado (comprimidos)  | Preparações farmacêuticas polivitamínicas (comprimidos)   | Complexos iónicos do princípio activo com molibdofosfato e tungstofosfato, em PVC                              | $54,0 \pm 0,5$ (B6-molibdofosfato)<br>$54,5 \pm 0,4$ (B6-tungstofosfato) | $6,0 \times 10^{-5}$ - $1,0 \times 10^{-2}$ M  | Potenciometria directa, com eléctrodos convencionais  | [121]      |

| Analito                               | Ensaio   | Matriz  | Sensor  | Declive (mV/década)                                   | Intervalo de Linearidade  | Aplicação   | Referência |
|---------------------------------------|--|---|---|---|---|---|------------|
| <b>Piridoxina (B6)</b>                | Ensaio de doseamento em produto acabado (comprimidos, injectáveis e xaropes) | Preparações farmacêuticas polivitamínicas (comprimidos, injectáveis e xaropes)                                  | Complexos iónicos do princípio activo com tetra 2-(clorofenil) borato, em PVC | 55,5 ± 0,6  | 1,0x10 <sup>-4</sup> - 1,0x10 <sup>-1</sup> M   | Eléctrodo tubular aplicado num sistema SIA multitarefa: avaliação das características do sensor, doseamento por potenciometria directa e titulação                | [123]      |
| <b>Tiamina (B1) e Piridoxina (B6)</b> | Ensaio de doseamento em produto acabado (comprimidos e xaropes)              | Preparações farmacêuticas polivitamínicas (comprimidos e xaropes), determinação de B1 nestas matrizes           | Complexos iónicos do princípio activo com tetra 2-(clorofenil) borato, em PVC | 32,6 ± 0,9 (B1)<br>62,60 ± 0,3 (B6)                   | 8,0x10 <sup>-6</sup> - 1,0x10 <sup>-2</sup> M<br>2,0x10 <sup>-5</sup> - 1,0x10 <sup>-2</sup> M  | Eléctrodos convencionais e tubulares, inseridos num sistema FIA: doseamento de B1, por potenciometria directa   | [122]      |
| <b>Tiamina (B1) e Piridoxina (B6)</b> | Ensaio de doseamento em produto acabado (comprimidos e injectáveis)          | Preparações farmacêuticas polivitamínicas (comprimidos e injectáveis)   | β – ciclodextrinas, em PVC – COOH   | 51,7 ± 0,8 (B1)<br>60,6 ± 0,6 (B6)<br>61,1 ± 1,4 (B6) | 1,0x10 <sup>-4</sup> - 1,0x10 <sup>-1</sup> M<br>5,8x10 <sup>-5</sup> - 1,0x10 <sup>-1</sup> M<br>4,3x10 <sup>-4</sup> - 1,0x10 <sup>-1</sup> M | Método da adição padrão, com eléctrodos convencionais   | [124]      |
| <b>Tiamina (B1) e Piridoxina (B6)</b> | Ensaio de doseamento em produto acabado (comprimidos)                        | Misturas artificiais constituídas pelas duas vitaminas; preparações farmacêuticas polivitamínicas (comprimidos) | β – ciclodextrina, em PVC – COOH  | N/A   | 1,0x10 <sup>-4</sup> - 1,0x10 <sup>-3</sup> M (para ambas as vitaminas)   | Sensor selectivo a tiamina inserido num sistema SIA multitarefa; análise quimiométrica do sinal potenciométrico obtido (PLS), para determinação das duas espécies | [125]      |

<sup>a</sup> cloreto de bis(trifenilfosforanilideno)amónio-citrato

Mais concretamente, destaca-se o artigo publicado por El-Gobashy et al. [93], onde são desenvolvidas quatro membranas sensoras selectivas a ião, para detectar cloridrato de pioglitazona e cloridrato de metformina. Estas membranas baseiam-se na utilização de permutadores iónicos dos APIs com tetrafenilborato de sódio e reinecato de amónio. A elevada lipofilia e estabilidade do par iónico tornam possível a aplicação dos eléctrodos no doseamento de pioglitazona presente em misturas preparadas em laboratório, na presença de produtos de degradação ácidos, e pioglitazona adicionada de metformina, em diferentes proporções relativas. Para além disto, como os excipientes, aditivos e ingredientes comumente utilizados nas formulações não interferem, a determinação do teor em produtos farmacêuticos decorre sem qualquer tipo de pré tratamento ou extracção. Os sensores mostram ser capazes de dosear pioglitazona e metformina em formulações contendo estes princípios activos isoladamente, ou em comprimidos compostos por associação de ambos os APIs, com obtenção de excelentes recuperações. Os mesmos eléctrodos são utilizados, com sucesso, no doseamento destes fármacos em amostras de plasma humano.

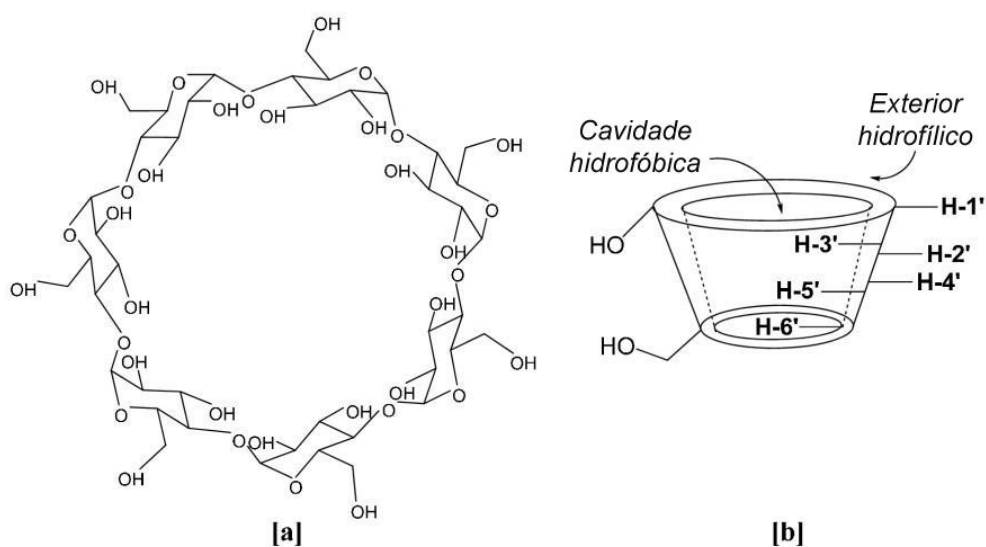
Por sua vez, Hassan et al. [94] descrevem o desenvolvimento de um método com concepção semelhante, em que se reporta a construção de eléctrodos em matriz de PVC e PVC-COOH, com o intuito de determinar ciclofosfamida e ifosfamida. Tal como no trabalho anterior, estas unidades baseiam-se na formação de pares iónicos entre o catião de interesse e tetrafenilborato de sódio. Uma terceira unidade é construída na ausência do par iónico, funcionando através da reacção entre os grupos COOH dissociados do PVC e as espécies presentes em solução. Verifica-se, no entanto, que este sensor exhibe características comparativamente menos interessantes relativamente aos dois anteriores, nomeadamente um intervalo de resposta linear mais estreito, um limite de detecção mais elevado e um declive menor. A aplicação das três unidades é demonstrada em formulações farmacêuticas contendo ifosfamida ou ciclofosfamida, com obtenção de bons resultados de recuperação, quando comparados com um método de referência compendial. A grande desvantagem das unidades descritas consiste na impossibilidade de quantificarem um dos princípios activos na presença do outro, isto é, não podem ser utilizados no doseamento em matrizes farmacêuticas combinadas, constituídas pelos dois componentes. No entanto, mostram-se eficazes na determinação individual de cada API, em presença dos respectivos produtos de degradação e substâncias aparentadas. O estudo dos coeficientes de selectividade potenciométricos indica que os eléctrodos baseados em pares iónicos são cerca de 10 a 100 vezes mais selectivos relativamente ao que não possui. Como tal, estes ESIs são aplicados no doseamento dos princípios activos em misturas sintéticas do API, com mais de 50% dos respectivos produtos de

degradação. A incorporação de pares iónicos na elaboração da membrana dos eléctrodos é, igualmente, reportada por Heba et al [95] para dosear cloridrato de oxibutinina e cloridrato de flavoxato. Neste trabalho, os autores promoveram a precipitação dos aniões tungstofosfato e reinecato com a oxibutina, ou do anião tetrakis 4-clorofenilborato e aniões reinecato com flavoxato e posterior incorporação do material electroactivo na matriz de PVC. De igual forma ao que ocorre no artigo anteriormente citado, os sensores não permitiram a aplicação a formulações farmacêuticas compostas por uma mistura dos dois APIs, mas evidenciaram selectividade adequada na presença dos produtos de degradação até teores de cerca de 60%. É de ressaltar que embora estas metodologias [94, 95] não possam ser aplicadas ao doseamento em produtos farmacêuticos combinados, são certamente adequadas à realização de ensaios de estabilidade em comprimidos mono-componente.

Como já foi referido na secção 3.1., a análise enantiomérica tem vindo a ganhar cada vez mais destaque na indústria farmacêutica, devido a muitos fármacos serem administrados como misturas racémicas, apesar das diferenças significativas que demonstram os enantiómeros individuais, a nível farmacológico, farmacodinâmico e farmacocinético. Este facto abriu caminho para uma nova estratégia comercial das indústrias de síntese, relacionada com o desenvolvimento de uma única forma enantiomérica, de um fármaco que foi anteriormente aprovado como mistura racémica. Uma empresa pode, desta forma, patentear um enantiómero isoladamente [96].

Os sensores potenciométricos destacam-se na análise enantiomérica [96-101] essencialmente pelas mesmas razões que apresentam os biosensores amperométricos anteriormente referenciados. A ligação enantioselectiva constitui o princípio que rege o desenvolvimento de eléctrodos enantioselectivos de membrana potenciométrica, nos quais um selector quiral, como ciclodextrinas, éteres coroa, maltodextrinas, derivados de quininas e quinidinas, acomoda o enantiómero. Dois tipos de matrizes têm vindo a ser descritas para o desenvolvimento destes sensores: baseadas em PVC [102] e em pasta de grafite [101]. A molécula mais utilizada como selector quiral é a ciclodextrina (Figura 6). Esta possui formato toroidal e a singularidade de ter grupos hidroxilo primários e secundários fora da cavidade, com o exterior hidrofílico, ao passo que a superfície interna tem grupos C-H e oxigénios do tipo éter, sendo o seu interior hidrofóbico. A característica demarcante das ciclodextrinas é a capacidade que demonstram ao formar complexos de inclusão com um elevado número de compostos orgânicos e inorgânicos, o que tem vindo a ser extensivamente explorado na indústria farmacêutica [103-107]. Estas moléculas são oligossacarídeos presentes na natureza, muitas vezes derivatizadas para formarem espécies neutras ou carregadas, consoante o interesse [108]. As cavidades

das ciclodextrinas demonstram ser adequadas para enantioseparação de misturas racémicas, por proporcionarem uma dupla selectividade conseguida quer a nível interno (dependente do tamanho da cavidade e da molécula hospedeira), quer a nível externo (dependente dos grupos funcionais e das suas ligações com o analito). São conhecidas as aplicações destas macromoléculas não só na construção de sensores potenciométricos para análise enantioselectiva directa, como também incorporadas como recobrimento de colunas, em vários tipos de cromatografia quiral [109-112], funcionando como poderosos selectores quirais.



**Figura 6- a) Estrutura química da molécula hospedeira  $\beta$ - ciclodextrina; b) Forma de cone truncado da molécula  $\beta$ - ciclodextrina. Reproduzido de [113].**

Embora as técnicas tradicionalmente usadas na análise quiral [1] envolvam métodos separativos de cromatografia acoplados a detectores do tipo *photo diode array* ou UV, a aplicação directa de detectores potenciométricos detêm vantagens inegáveis, das quais se destacam a quantificação dos enantiómeros sem etapas de separação prévia, a elevada sensibilidade e enantioselectividade que proporcionam, a rapidez, exactidão e precisão da informação analítica, assim como o baixo custo da análise. Comparando com outros tipos de sensores electroanalíticos, nomeadamente os amperométricos anteriormente referenciados, os potenciométricos destacam-se pelo seu longo tempo de vida. Contudo, contrariamente ao ocorrido com os sensores amperométricos, os trabalhos constantes na literatura relativos ao doseamento de enantiómeros com ESIs são realizados genericamente em modo convencional [114-119], conforme se descreve em seguida.

Em [114] reporta-se a construção de um novo eléctrodo baseado em pasta de grafite impregnada com solução de 2-hidroxi-3-trimetilamoniopropil-  $\beta$  – ciclodextrina que é usado para dosear S- captopril em matéria-prima (ensaio de pureza) e no ensaio de uniformidade de teor de comprimidos, pelo método cronopotenciométrico. O mesmo eléctrodo é referido noutros trabalhos [115, 116], sendo aplicado na realização de testes de pureza enantiomérica de S - enantiómeros de cilazapril, pentopril e trandolapril, com obtenção de excelentes recuperações [115] e na determinação da pureza enantiomérica de S - enalapril em matéria-prima, e testes de uniformidade de teor nos comprimidos desta substância activa, por cronopotenciometria [116].

Numa publicação subsequente, o mesmo grupo de investigação descreve um estudo alargado [117], no qual se aplicam ciclodextrinas com cavidades de dimensões diversas, com o intuito de proceder à selecção quiral no ensaio de pureza do S- perindopril, em matéria-prima. A construção de três eléctrodos é baseada em  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  ciclodextrinas não substituídas, impregnadas em matrizes de pasta de grafite, e a quantificação realiza-se por potenciometria directa. A análise de S- perindopril na presença do seu enantiómero R é levada a cabo com recurso a misturas dos dois antípodas, em diferentes proporções, comprovando a adequabilidade do sensor proposto, para o fim a que se destina. Os resultados obtidos são excelentes, sendo que a  $\alpha$  ciclodextrina demonstra ter a enantioselectividade mais marcada. De acordo com os autores, verificam-se melhorias significativas com o uso destas unidades, relativamente aos sensores anteriormente descritos para análise do S-perindopril [118] preparados com  $\beta$ -ciclodextrinas substituídas e não substituídas, no que diz respeito aos limites de detecção (mais baixos, pelo uso de ciclodextrinas não substituídas), enantioselectividade (mais elevada, especialmente com a unidade  $\alpha$ ) e declive da recta de calibração (sensibilidade superior, principalmente com as unidades  $\alpha$  e  $\gamma$ ).

Outro exemplo da aplicação de selectores quirais para a construção de ESIs, encontra-se patente no trabalho [119], no qual são desenvolvidos três eléctrodos enantioselectivos de pasta de grafite, baseados em maltodextrinas com diferentes dimensões. O objectivo consiste no doseamento de S- ibuprofeno em matéria-prima (teste de pureza) e nos comprimidos e cápsulas compostas por este princípio activo, por potenciometria directa. O ensaio proposto demonstra ser simples, reproduzível e de baixo custo, sendo que os resultados reportados são perfeitamente concordantes com os de um método cromatográfico comparativo.

Dada a natureza e a complexidade das matrizes farmacêuticas polivitamínicas disponíveis no mercado (constituídas por uma panóplia de vitaminas e minerais), a

maioria dos métodos disponibilizados pela literatura recorre a difíceis, demorados e dispendiosos processos de pré tratamento de amostra. Daí que o desenvolvimento de métodos simples, robustos e económicos, obviando procedimentos mais complexos, constitua um desafio. O aparecimento de alguns trabalhos científicos na área potenciométrica, corresponde a esse desafio, como o demonstram os artigos publicados [120-125]. Alguns destes estudos são efectuados em modo convencional [120, 121, 124]. Contudo, tal como já foi referido, uma parte significativa dos trabalhos para a realização de ensaios de doseamento em matrizes polivitamínicas faz uso das vantagens da associação dos sistemas de análise em fluxo aos sensores potenciométricos de membrana plástica, com configuração tubular [122, 123, 125]. O método potenciométrico de adição padrão é, muitas das vezes, utilizado como forma de diminuir o efeito da interferência da matriz polivitamínica, face à sua natureza extremamente complexa. De um modo geral, o ionóforo é composto por uma associação da vitamina com um respectivo sal lipofílico, constituindo um par-iónico [121-123], ou então recorrendo a moléculas que formam selectivamente complexos de inclusão com a vitamina de interesse [120, 124, 125]. A análise dos resultados genericamente obtidos com a aplicação supracitada demonstra que este segundo tipo de ionóforos é, de modo geral, mais eficaz nos ensaios de doseamento, o que deverá estar relacionado com as propriedades superiores de selectividade proporcionadas pela utilização de moléculas que interagem selectivamente com o analito, reduzindo significativamente a interferência da matriz.

Em [120] desenvolve-se um eléctrodo para o doseamento de cloridrato de piridoxina (vitamina B6) constituído por um carregador neutro (calix-8-areno), incorporado numa matriz de PVC e usando como solvente mediador *o*-nitrofeniloctiléter. Os coeficientes de selectividade referidos para o sensor indicam uma excelente selectividade para a vitamina B6, relativamente a espécies usualmente presentes em preparações farmacêuticas. O eléctrodo proposto é aplicado com sucesso na análise de piridoxina em injectáveis e cápsulas polivitamínicas, pelo método da adição padrão.

A construção e avaliação de dois sensores potenciométricos sensíveis a cloridrato de piridoxina é igualmente descrita em [121]. Estes baseiam-se na formação de pares iónicos do catião piridoxina, com molibdofosfato e tungstofosfato respectivamente, numa matriz de PVC. A aplicação é feita em dois tipos de comprimidos polivitamínicos por potenciometria directa, com obtenção de bons resultados, pelo que este constitui um método de baixo custo que pode ser utilizado para determinação do conteúdo de vitamina B6 em matrizes complexas, sem necessidade de proceder a operações de separação prévias.

Os autores Lima et al. [122] propõem a construção e aplicação de eléctrodos selectivos de ião, sem solução de referência interna, de configuração convencional e tubular, com o objectivo de proceder à determinação das vitaminas B1 e B6 (respectivamente tiamina e piridoxina), em formulações farmacêuticas. As unidades tubulares são acopladas a um sistema de análise por injeção em fluxo. As membranas são preparadas com o par iónico vitamina - tetra (2-clorofenil borato) dissolvido em *o*-nitrofeniloctiléter e imobilizado numa matriz de PVC. Os sensores são aplicados na determinação do teor das respectivas vitaminas em formulações farmacêuticas polivitamínicas e os resultados obtidos em fluxo são comparados com os da potenciometria directa convencional e com o método de referência da farmacopeia, mostrando concordância. Não se obtêm resultados aceitáveis no doseamento de piridoxina, devido à elevada interferência das outras vitaminas presentes, usualmente, nestas formulações, especialmente a que é exercida pela tiamina.

Com o intuito de viabilizar um maior grau de automatização e de aumentar a robustez dos procedimentos relacionados com determinação potenciométrica para controlo de fármacos é proposto, em [123], um sistema de fluxo baseado na análise por injeção sequencial. A grande vantagem deste sistema é a de não ser necessária uma reconfiguração física do mesmo, caso se pretenda mudar de detector e também pelo facto de toda a preparação das amostras e dos reagentes poder ser efectuada em linha. Como detector, é escolhido um eléctrodo sensível a vitamina B6 para demonstrar as suas potencialidades como, por exemplo, a geração de soluções em linha, a caracterização do eléctrodo selectivo a ião, a realização de titulações e a determinação do conteúdo em piridoxina nas matrizes farmacêuticas polivitamínicas, por potenciometria directa. Este sistema, inovador na época, mostra ainda deter vantagens adicionais, como baixo consumo de reagentes e geração de reduzidos volumes de efluentes.

Um outro trabalho envolvendo a determinação de um API em matriz farmacêutica complexa, com recurso a um sensor potenciométrico de configuração tubular para aplicação num sistema FIA, é reportado pelos autores Ribeiro et al. [126]. Estes propõem o desenvolvimento de eléctrodos de membrana plástica selectivos a ião citrato, com o objectivo de estabelecer um método simples e exacto que proporcione a sua determinação em vários tipos de amostras. Os sensores de configuração tubular são preparados incorporando nas membranas poliméricas um sal de amónio quaternário para troca iónica, diferentes tipos de mediadores (com diferentes polaridades) e, nalguns casos, para melhorar a selectividade, o aditivo *p-tert*-octilfenol. As características gerais dos eléctrodos são avaliadas num sistema FIA, sendo que as mais vantajosas pertencem ao sensor incorporando o aditivo e o solvente mediador bis (2-etilhexil) sebacato. Este



eléctrodo é acoplado ao sistema FIA para análise de diversos tipos de matrizes, como bebidas não alcoólicas, cervejas e produtos farmacêuticos (pós e líquido de irrigação), sendo que os resultados obtidos são concordantes com os do método de referência aplicado.

Recentemente, as vantagens da associação de detectores potenciométricos à cromatografia líquida de elevada eficiência têm vindo a ser demonstradas como uma alternativa vantajosa na determinação por HPLC-DE de catiões orgânicos, pelo grupo de investigação de Nagels et al [127, 128]. Com recurso à detecção potenciométrica, a interferência da matriz causada pelos compostos eluídos primeiramente e que absorvem no UV é substancialmente reduzida. Comparativamente ao HPLC-DE com detecção amperométrica anteriormente referida, a potenciométrica não se restringe aos compostos electroactivos. Por outro lado, também não necessita de sistemas supressores de iões, como no caso da detecção condutimétrica. Contrastando com a resposta dos detectores amperométricos, a resposta dos potenciométricos é quase independente do fluxo, o que abre a possibilidade da utilização de sistemas miniaturizados, de fluxo turbulento, ou sistemas UPLC, recursos que são altamente recomendados para diminuir o ciclo de análise do medicamento. A maioria das publicações deste grupo diz respeito à análise de compostos orgânicos com interesse farmacêutico em amostras biológicas [129], ou à utilização do HPLC-potenciometria, como ferramenta de varrimento de moléculas potencialmente candidatas a fármacos, para aplicação nas fases iniciais de desenvolvimento de novas entidades químicas [130, 131], ou mesmo para análise de DNA [132, 133]. Esta linha de investigação demonstra veementemente as potencialidades dos *arrays* de detectores potenciométricos, acoplados ao método separativo de cromatografia líquida de elevada eficiência, na quantificação de compostos estruturalmente similares.

No entanto, poucas publicações do grupo supracitado se debruçam sobre a análise de medicamentos compostos por uma combinação de APIs. Nesta dissertação, destacam-se os trabalhos que dizem respeito à detecção potenciométrica de fármacos lipofílicos como clenbuterol, ambroxol e bromexina, acoplada a sistemas HPLC de fase reversa, com o intuito de aplicar à quantificação específica destes compostos em formulações farmacêuticas de administração oral [134, 135] (Tabela 4). Os ionóforos neutros macrocíclicos (derivado de  $\alpha$ - ciclodextrina) e acíclicos (derivados de N, N, N', N'- tetraciclohexil-oxi bis (*o*-fenilenoxi) diacetamida – TOPA - da família das diamidas dioxidicarboxílicas) são usados para a construção de eléctrodos de membrana líquida, baseados em PVC. Comparativamente ao método por detecção no UV com absorção num único comprimento de onda e à utilização do mesmo sensor sem o ionóforo, estes

possibilitam um aumento considerável de sensibilidade para com os agentes mucolíticos. O uso de TOPA confere uma selectividade superior para a determinação qualitativa e quantitativa de bromexina e ambroxol sendo que, no caso do clenbuterol, o eléctrodo baseado na ciclodextrina modificada demonstra uma sensibilidade, repetibilidade e reprodutibilidade aumentadas. Estes eléctrodos são aplicados com sucesso como detectores em sistemas cromatográficos de fase reversa, para determinar os compostos em comprimidos contendo apenas um princípio activo (ambroxol) e uma mistura de dois (ambroxol e clenbuterol).

### *3.3. Ensaio de Dissolução, com Detecção Espectrofotométrica e Potenciométrica: Métodos Tradicionalmente Usados, “versus” Novas Abordagens com Potencial para Análise Multi-Componente.*

Tal como já foi sobejamente comentado nas secções 1.4.2.1. e 2.3.1. desta dissertação, o ensaio de dissolução consiste num teste de caracterização usado comumente pela indústria farmacêutica, a fim de guiar o desenvolvimento de formulação e controlar a qualidade do produto [91]. Na fase de desenvolvimento farmacêutico, a aplicação deste teste possibilita a avaliação dos efeitos combinados de diferentes factores de formulação, como as propriedades físico-químicas do, ou dos APIs e excipientes utilizados, bem como dos diversos passos do processo de fabrico, na velocidade e extensão da absorção do fármaco [136].

A evolução contínua dos objectivos durante o ciclo de vida produtivo pode requerer o recurso a diferentes métodos de detecção analítica para a obtenção de testes de dissolução efectivos e eficientes [137]. Esta secção pretende fornecer uma visão global dos métodos analíticos aplicados no desenvolvimento de ensaios de dissolução de formulações farmacêuticas sólidas de administração oral, compostas por um ou mais princípios activos, com enfoque na detecção electroanalítica. Actualmente, os poucos trabalhos publicados que envolvem a utilização de sensores electroanalíticos como detectores em ensaios de dissolução restringem-se aos do tipo potenciométrico. Neste conjunto de artigos, menos referências ainda descrevem o acoplamento dos ESIs a sistemas automáticos de fluxo. No que concerne a utilização de sensores potenciométricos para a realização de ensaios de dissolução em formulações multi-componente, apenas se encontra uma referência na literatura que contém uma aplicação deste tipo. Nesta secção, aborda-se também um conjunto de trabalhos que se focam na

dissolução de formulações multi-componente, com detecção por espectrofotometria de UV-Vis, uma vez que é o método clássico por excelência e mais vulgarmente utilizado nos ensaios de dissolução de fármacos uni e multi-componente [2].

Quando se consideram os medicamentos multi-componente, para além de factores que influenciam o comportamento de dissolução de uma formulação uni-componente, é necessário levar em consideração que os diversos APIs podem ter diversas velocidades de dissolução, devidas às solubilidades intrínsecas ou formas cristalinas distintas. A automatização do teste de dissolução surge como uma mais-valia, uma vez que possibilita a obtenção simultânea de perfis de dissolução de várias unidades e para cada uma destas, dos perfis individuais dos princípios activos que as constituem, proporcionando-se assim um encurtar drástico do tempo de análise.

Os sistemas automáticos de dissolução, segundo os autores Fang et al. [138] e Pimenta et al. [139], deverão ser detentores das seguintes características: alta eficiência de tratamento e determinação de amostra em linha, possibilitando monitorização em tempo quase real; alta frequência de amostragem, com elevada resolução do perfil de dissolução; baixo consumo de amostra, introduzindo um distúrbio mínimo no volume do vaso de dissolução; monitorização simultânea de vários componentes numa dosagem farmacêutica multi-componente; elevada estabilidade dos sistemas de detecção, mesmo funcionando por períodos extensos; monitorização da linha de base e recalibrações em linha do sistema de detecção.

O desenvolvimento de espectrofotómetros comerciais UV-Vis *diode-array* abre o caminho para as técnicas de desconvolução e, conseqüentemente, a análise de amostras multi-componente, com analitos que absorvem no UV. Estas técnicas permitem a determinação simultânea dos constituintes de uma mistura pela optimização do ajuste espectral entre o espectro obtido com a amostra e o espectro de uma solução contendo quantidades conhecidas dos diversos componentes dessa amostra. Os espectros derivativos de UV-Vis representam outra solução para a eliminação de interferências analíticas, já que tornam possível que a análise se efectue a um ou mais comprimentos de onda, nos quais o composto de interesse pode ser analisado com relativa precisão e com interferência negligenciável, por parte da matriz ou outros APIs presentes na amostra. O recurso a métodos automatizados de fluxo (FIA, SIA, multicomutação), acoplados à determinação UV, directa, recorrendo a técnicas derivativas [140], ou calibração multivariada, possibilita a melhoria dos limites de detecção e de quantificação, com o mínimo de consumo de solução amostra, fornecendo resultados a ritmos elevados e em tempo quase real. Podem, deste modo, obter-se sem grandes constrangimentos

perfis de dissolução de formulações de libertação prolongada com grande resolução, para além dos perfis de medicamentos multi-componente [141].

Desenvolvimentos recentes incluem sondas de fibra óptica com detecção na zona UV-Vis, aplicados a ensaios de dissolução *in situ* [142]. Uma das características mais extraordinárias destes métodos é o de providenciarem informação em tempo real sobre factores cinéticos críticos do, ou dos, princípio (s) activo (s), como sejam a supersaturação, conversão de formas, solubilidade intrínseca e o processo cinético na totalidade da dissolução da formulação. Apesar de os métodos correntemente disponibilizados padecerem de exactidão inferior e variabilidade exacerbada, devidos à deposição de partículas na janela do detector UV-Vis, a eficiência demonstrada com a informação cedida em tempo real converte estes métodos *in situ* numa excelente alternativa relativamente aos ensaios convencionais realizados por amostragens discretas, especialmente nos estádios primordiais de desenvolvimento farmacêutico.

Ainda assim, o uso da espectrofotometria de absorção como processo de detecção possui algumas desvalias dificilmente contornáveis. Nomeadamente, verifica-se que os métodos têm uma janela de trabalho estreita, o que frequentemente os incapacita para os estudos de dissolução de formulações farmacêuticas contendo um amplo intervalo de dosagem, como ocorre comumente no início dos processos de desenvolvimento farmacêutico. Esta limitação também se faz sentir aquando da análise de uma formulação multi-componente, contendo princípios activos com dosagens consideravelmente diferentes. Numa formulação farmacêutica combinada, os métodos espectrofotométricos não podem, na maioria das vezes, ser utilizados directamente, principalmente devido à interferência cruzada dos APIs presentes. Mesmo com a disponibilidade recente dos espectrofotómetros para executar análise multi-componente, é necessário um desenvolvimento de método adicional, incluindo investigação ao nível do tratamento dos dados, para poderem ser empregues na rotina dos ensaios de dissolução nos laboratórios de controlo da qualidade. Por sua vez, os inconvenientes respeitantes às interferências causadas por materiais insolúveis, substâncias coloidais e bolhas formados durante o processo de dissolução, constituem uma falha difícil de colmatar, que será posteriormente discutida em alguns dos trabalhos apresentados.

No que diz respeito à utilização de métodos selectivos para a detecção das quantidades libertadas de princípio activo, no âmbito de um ensaio de dissolução, a potenciometria com eléctrodos selectivos a ião apresenta mais - valias inegáveis [143], se bem que as suas potencialidades não têm vindo a ser muito exploradas pela comunidade científica. Dos trabalhos existentes na literatura, destacam-se os realizados pelo grupo de

Nagels et al., por serem bastante completos, no que diz respeito aos diferentes tipos de formulações testadas [144, 145]. As sondas potenciométricas descritas são usadas para obtenção de perfis de dissolução *in situ*, apresentando vantagens relevantes relativamente às de tecnologia com detecção por fibra óptica, das quais se destacam a mínima interferência por parte de material insolúvel, colóides ou partículas em suspensão formadas durante o processo, o amplo intervalo analítico e a resposta célere durante todo o ensaio, possibilitando análise exacta e sensível mesmo para formulações farmacêuticas que se desagregam muito rapidamente. Para além disso, permitem a miniaturização do sistema de análise, reduzindo o impacto no fluxo dentro do vaso de dissolução. Por seu lado, os inconvenientes consistem principalmente na incapacidade da utilização em meios de dissolução contendo surfactantes, pois estes interferem com as membranas do sensor, e os fármacos terem de estar presentes na forma ionizada. O facto de os eléctrodos serem considerados consumíveis e não poderem ser utilizados em princípios activos com coeficiente de partição octanol/ água ( $\log P$ ) inferior a 2, também é um factor que desfavorece o seu emprego.

No entanto, o acoplamento de sensores potenciométricos selectivos de configuração tubular a sistemas de análise automatizados pode constituir uma alternativa que obvia a maioria das desvantagens associadas às sondas potenciométricas *in situ*, conforme se discute posteriormente.

A potencimetria alia as vantagens dos métodos UV (rapidez, sem necessidade de métodos de separação prévia ou complexos processos de pré tratamento de amostra, facilidade de automatização e obtenção dos perfis em tempo real), com as vantagens dos métodos separativos da cromatografia líquida de elevada eficiência, acoplada a detectores UV-Vis (detecção dos analitos de interesse em matrizes complexas, na presença de outros APIs, produtos de degradação ou excipientes), pelo que, seguramente, o futuro do desenvolvimento dos ensaios de dissolução das formulações multi-componente terá muito a ganhar com o aprofundamento desta temática.

### 3.3.1. Ensaio de Dissolução, com Detecção por Espectrofotometria de UV- Vis

Tal como já foi referido, nos trabalhos constantes na literatura que se debruçam sobre os ensaios de dissolução em formulações multi-componente, reporta-se a espectrofotometria UV-Vis como técnica de eleição. Na maioria destes, os detectores são acoplados a sistemas de fluxo automatizados, nomeadamente SIA, FIA e multicomutação

[146-149]. Os resultados obtidos são submetidos a tratamentos matemáticos pela aplicação de ferramentas quimiométricas ou, alternativamente, pelo uso de espectrofotometria derivativa, que é também uma abordagem comumente seguida na resolução de misturas. Contudo, em algumas das primeiras referências publicadas acerca desta temática, a transferência das amostras dos vasos de dissolução para o espectrofotómetro é feita manualmente [150-153]. Nestes casos, as alíquotas do meio de dissolução são recolhidas com auxílio de um injectador e, posteriormente, sujeitas pelo operador às diluições apropriadas. Para efectuar estes estudos, usaram-se maioritariamente técnicas de espectrofotometria derivativa e alternativamente análise dos dados espectrais por calibração multivariada, dos quais se destaca, como mais frequente, o método dos mínimos quadrados parciais (PLS). As vantagens mais evidentes comparativamente ao HPLC-UV resumem-se à não existência de processos complexos de pré tratamento das amostras, à diminuição drástica de tempo de análise e dos custos associados. Uma das maiores desvantagens da “não automatização” consiste na dificuldade de aplicação dos métodos descritos a formulações de libertação prolongada.

No trabalho reportado por Markopoulou et al. [150], são utilizados métodos de espectrofotometria derivativa de duplo divisor e calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS), para a execução de ensaios de uniformidade de teor e dissolução em misturas binárias ou ternárias de perfenazina combinada com cloridrato de amitriptilina e/ ou cloridrato de imipramina. É realizado um estudo comparativo de ambos os métodos, que demonstra que a técnica derivativa é equivalente e, nalguns casos, superior à calibração multivariada. Para além disso, detém vantagens adicionais, como consumir menos tempo de preparação de padrões. Isto, porque a aplicação do método de duplo divisor em rotina necessita apenas de um ou dois padrões externos de referência, de concentração aproximada às amostras, ao passo que a calibração multivariada exige a análise de um número suficiente de misturas sintéticas padrão. Os autores reforçam a ideia de que os métodos espectrofotométricos com análise quimiométrica de dados, comparativamente aos alternativamente usados por HPLC com detecção UV-Vis, são rápidos, menos dispendiosos e não requerem nem instrumentação sofisticada, nem complexos passos de separação realizados *à priori*. A aplicação foi efectuada em comprimidos contendo misturas de dois APIs (ensaios de uniformidade de teor), ou dos três APIs (ensaios de dissolução), com obtenção de resultados satisfatórios. Estes demonstram que mais de 95% dos três princípios activos se dissolvem em menos de 10 minutos.

O mesmo grupo de investigação [151] refere, num trabalho de concepção similar, a aplicação de dois métodos de espectrofotometria derivativa e um método

espectrofotométrico com análise quimiométrica dos dados, para a determinação simultânea de misturas de princípios activos em ensaios de uniformidade de teor e dissolução, sem separação prévia. Esta abordagem é utilizada com sucesso na quantificação de comprimidos comerciais contendo trimetoprim, combinado com sulfametoxazol, ou sulfametazina ou sulfurazol. Noutra proposta com conceito análogo [152], os autores descrevem um método de espectrofotometria derivativa de duplo divisor capaz de analisar simultaneamente misturas sintéticas, sem separação prévia, contendo maleato de clorfeniramina e cafeína combinados com paracetamol ou ácido acetilsalicílico, ou uma mistura de ácido acetilsalicílico combinado com paracetamol e cafeína. Através do uso da informação decorrente dos respectivos espectros de absorção, a aplicação realiza-se em misturas sintéticas dos princípios activos e em medicamentos comerciais, aquando da execução dos ensaios de uniformidade de teor e dissolução. Os resultados obtidos são precisos e reproduzíveis. De acordo com os respectivos perfis, dissolvem-se mais de 80% de cafeína e paracetamol em 20 minutos, ao passo que a dissolução do ácido acetilsalicílico ocorre bastante mais lentamente (45 a 60 minutos, para ser completa). Para efeitos de comparação, na avaliação das mesmas misturas foi aplicada uma ferramenta quimiométrica para tratamento dos dados gerados e, adicionalmente, efectuou-se uma análise por HPLC, com detecção espectrofotométrica. Os resultados obtidos com estes procedimentos mostram estar perfeitamente concordantes com o proposto [152].

No trabalho publicado em [153], três métodos quimiométricos (mínimos quadrados inversos, regressão do componente principal e mínimos quadrados parciais) são aplicados nos ensaios de uniformidade de teor e dissolução de comprimidos contendo paracetamol, propilfenazona e cafeína, com recurso a um espectrofotómetro UV-Vis de duplo feixe e sem qualquer pré separação da amostra e tratamento gráfico dos espectros sobreponíveis dos APIs. Os resultados obtidos utilizando os três procedimentos são estatisticamente comparáveis entre si, através da análise de variância (*one-way* ANOVA), com boas recuperações, quer para o doseamento, quer para as dissoluções (superiores a 95% para todas as substâncias, em menos de 15 minutos). Adicionalmente, os resultados apresentam conformidade com os obtidos com um método de HPLC anteriormente testado [154]. Os autores sugerem que qualquer um dos métodos é suficientemente robusto para ser aplicado em procedimento de rotina de um laboratório de controlo da qualidade, para análise de medicamentos comerciais contendo a mistura supracitada.

Comentam-se, em seguida, alguns dos trabalhos constantes da literatura, que fazem uso de sistemas de fluxo para a realização de ensaios de dissolução, em formulações farmacêuticas multi-componente [146-149].

Os autores Vranic et al. [146] descrevem a obtenção simultânea de três perfis de dissolução analisando a mesma formulação farmacêutica composta. Para tal, usam um sistema FIA e adaptam um método compendial. O sistema desenvolvido é acoplado a um único espectrofotômetro, possibilitando a obtenção automatizada do perfil global recomendado e de dois perfis individuais, que correspondem à cinética de libertação dos princípios activos presentes na formulação. No trabalho em causa, são seleccionadas misturas binárias das substâncias farmacêuticas amoxicilina/ bromexina e amoxicilina/ ácido clavulânico, respectivamente. Estas possuem espectros sobreponíveis e, para a resolução dos mesmos, recorre-se à espectrofotometria derivativa (espectros de 1ª ordem) e *zero-crossing*. Este método demonstra ser um meio efectivo de analisar misturas e baseia-se na medição dos valores absolutos do espectro derivado da mistura, a um valor de abcissa (comprimento de onda), no qual a intensidade de um dos componentes da mistura é zero. Ao comprimento de onda seleccionado, a intensidade é directamente proporcional ao outro composto. A aplicação analítica faz-se em duas formulações constituídas por uma combinação de amoxicilina e ácido clavulânico, e a três formulações compostas por bromexina e amoxicilina. Para possibilitar a comparação dos perfis individuais e globais obtidos, recorre-se à equação de Higuchi de três parâmetros, para ajuste dos mesmos [155].

O mesmo grupo de investigação [147] descreve a determinação simultânea dos perfis de dissolução de duas associações de APIs: trimetoprim-sulfametoxazol e captopril-hidroclorotiazida. A diferença principal relativamente ao trabalho anterior consiste na aplicação de um sistema de fluxo baseado em multicomutação para empreender a determinação. O processo de fluxo baseia-se na utilização de válvulas solenóides, controladas por computador, que actuam como comutadores independentes, o que permite facilmente o controlo das soluções de fluxo de um modo automatizado. A multicomutação apresenta diversas mais-valias relativamente aos métodos FIA clássicos, como a possibilidade de miniaturização, consumo reduzido de amostras e reagentes, facilidade de desenvolver métodos analíticos completamente automatizados e melhoria da economia e simplicidade, proporcionando sistemas altamente flexíveis e facilmente alteráveis. São obtidos três perfis para cada uma das formulações ensaiadas: o global (recomendado oficialmente pelos métodos compendiais) e os individuais, que correspondem aos perfis dos respectivos princípios activos. A resolução das misturas binárias é executada, mais uma vez, com recurso à espectrofotometria derivativa. A aplicação é realizada em cinco formulações farmacêuticas compostas pelas misturas supracitadas (três com trimetoprim-sulfametoxazol e duas com captopril-



hidroclorotiazida), e as respectivas curvas dos perfis de dissolução são ajustadas à equação de Higuchi de três parâmetros [155].

No trabalho reportado em [148], desenvolve-se um sistema SIA com o intuito de realizar a monitorização simultânea dos perfis de dissolução do ácido acetilsalicílico, fenacetina e cafeína, em comprimidos compostos de aspirina. Para este efeito procedeu-se ao varrimento espectral de alíquotas do meio de dissolução (entre 220 e 310 nm), enquanto se executa paragem de fluxo. A calibração é feita por mínimos quadrados parciais (PLS). Comparados com os sistemas FIA, o sistema aqui proposto, quando aplicado aos ensaios de dissolução, apresenta diversas vantagens das quais se destacam maior robustez, facilidade de manipulação das amostras e reagentes e simplicidade de instrumentação [148]. Devido ao uso de bombas peristálticas e seringas automáticas, e pelo facto de ser inteiramente controlado por computador, a análise por injeção sequencial confere uma precisão superior e fornece resultados mais confiáveis. Uma vez que estes sistemas podem ser comandados por computador, é possível a sua adaptação na monitorização automática dos perfis de dissolução de comprimidos de libertação prolongada por períodos de tempo muito elevados, o que seria dificilmente tangível com recurso a sistemas FIA-dissolução, sem que houvesse necessidade de intervenção contínua de um técnico. A aplicação efectua-se em três formulações comerciais com as misturas acima citadas e os resultados obtidos demonstram que a combinação da calibração quimiométrica e SIA pode ser aplicada com sucesso à monitorização de um sistema multi-componente. Os três compostos das formulações apresentam perfis de dissolução distintos, sendo que a cafeína se dissolve mais rapidamente, e a fenacetina mais lentamente. Comparativamente aos métodos descritos com fibras-ópticas *in situ* [142], este sistema apresenta vantagens que se traduzem na possibilidade de controlo do volume de amostragem, ajustando-o ao intervalo de resposta linear do detector, o que facilita a determinação de APIs com diferentes respostas à radiação UV e a capacidade de se aplicar filtros em linha, obviando o inconveniente de possíveis interferentes sólidos na dissolução, que ocorrem habitualmente com as formulações de comprimidos.

Fuerte et al. reporta em [149], um sistema automático de dissolução, equipado com um detector UV multi-componente, para análise de medicamentos genéricos combinados, com análise dos dados gerados por regressão múltipla linear. Os fármacos utilizados como modelo são o trimetoprim e o sulfametoxazol (três formulações genéricas) e os resultados obtidos são comparados com aqueles obtidos por aplicação de um método HPLC, com detecção espectrofotométrica. Neste sistema, o meio de dissolução circula pelo filtro em linha, até ao espectrofotómetro, ligado a sete células separadas. Uma

bomba multicanal promove a passagem do fluxo do líquido de dissolução até às células, onde ocorre leitura UV directa dos dois princípios activos, em modo simultâneo. Ambas as técnicas proporcionam resultados reprodutíveis e a análise estatística realizada demonstra que são comparáveis. Segundo os autores, a característica mais relevante que distingue a análise multi-componente do método HPLC é o tempo de análise. Enquanto a cromatografia líquida é descontínua e invasiva, a análise multicomponente associada a sistemas de dissolução automatizados proporciona monitorização do processo de dissolução, com obtenção de perfis completos e em simultâneo, dos vários componentes de uma formulação. No entanto, deve prestar-se especial atenção ao processo de filtração utilizado, particularmente naquelas formulações nas quais os excipientes interferem com as absorvências medidas. Isto ocorre frequentemente se a dimensão de partícula for suficientemente pequena para estes passarem através dos poros do filtro, causando efeitos de desvio no ângulo de luz incidente. Estas matérias insolúveis podem ser mais interferentes no caso de conterem cromóforos. Contudo, uma cuidadosa selecção do processo de filtração poderá obviar estes problemas. Os autores reforçam a ideia das vantagens da utilização de sistemas automatizados de análise multi-componente, particularmente quando aplicados ao mercado dos medicamentos genéricos combinados, uma vez que possibilita, para além da poupança de tempo, uma redução drástica de custos. Convém, no entanto, sublinhar que este ponto de vista é redutor, uma vez que os sistemas de análise multi-componente trazem vantagens não só à fracção dos medicamentos genéricos, mas também a todo o tipo de formulações combinadas disponíveis no mercado.

Seguidamente, serão abordados trabalhos que dizem respeito a uma outra linha de investigação, para realização de ensaios de dissolução, aplicados a formulações compostas por dois ou mais APIs. Nestes artigos, são usadas fibras ópticas, a fim de monitorizar *in situ* a dinâmica do processo de dissolução [156-158].

Os autores Gemperline et al. [156] exploram a adequabilidade da utilização de fibras ópticas UV-Vis, aplicadas na monitorização de ensaios de dissolução de produtos farmacêuticos compostos por uma associação de dois princípios activos (sulfametoxazol e trimetoprim), com espectros sobreponíveis. As medições *in situ* são comparadas com um ensaio *offline*, por HPLC, com detecção espectrofotométrica. O método reportado utiliza um sistema multicanal UV-Vis anteriormente descrito [157, 158], composto por fibras ópticas, que pode monitorizar até seis canais, para determinar simultaneamente os perfis de dissolução em seis comprimidos. São construídos modelos de calibração multivariada, com recurso a misturas padrão e aplicando regressão de componentes principais. O pós-processamento dos espectros é realizado de forma automática,

empregando o modelo de calibração em poucos segundos. O método descrito aplica-se nas seis unidades, no entanto, duas das corridas não são analisadas devido à formação de pequenas bolhas na superfície óptica das sondas, causando consideráveis variações na linha de base do espectro medido. Após cerca de 10 minutos, o trimetoprim está completamente dissolvido, ao passo que o sulfametoxazol se dissolve mais lentamente, requerendo até 60 minutos. A comparação estatística entre o método óptico e o cromatográfico é realizada nos últimos 25 minutos da análise, uma vez que na primeira meia hora estabelecem-se diferenças significativas entre os dois, sendo que os resultados do HPLC são usualmente superiores. Os autores atribuem estas discrepâncias à dissolução lenta de materiais em suspensão nas alíquotas não filtradas, enquanto não se procede à cromatografia. Uma vez que o método *in situ* permite realizar medidas de meio em meio minuto, é reforçada a ideia de que, para obter a mesma frequência de análise recorrendo ao HPLC, a determinação tornar-se-ia proibitivamente dispendiosa e demorada. Adicionalmente, o método com sondas UV-Vis possibilita obviar alterações de volume nos vasos de dissolução, que constituem frequentemente uma potencial fonte de erros. Convém no entanto, referir que o facto de não ter sido possível recolher informação em duas das tinas de dissolução, consiste numa desvantagem flagrante. A repetição de ocorrências do género certamente que inviabiliza a implementação da tecnologia fibra-óptica, na rotina dos laboratórios de análise.

A observação da realidade das indústrias farmacêuticas dá conta que as técnicas separativas, como é o caso do HPLC-UV, são geralmente empregues no que concerne à obtenção de perfis de dissolução de formulações multi-componente [2]. Por vezes, as amostras colhidas são analisadas *offline*, resultando na obtenção de perfis descontínuos. Estes métodos requerem elevadas quantidades de meio de dissolução, procedimentos demorados e fastidiosos para a preparação de amostras e o uso de fases móveis contendo, na maioria das vezes, reagentes orgânicos dispendiosos e poluentes. Para além disso, os meios de dissolução ácidos utilizados são frequentemente incompatíveis com os sistemas cromatográficos e as amostras retiradas dos vasos de dissolução têm que ser tamponadas manualmente, antes da sua introdução no sistema. Por sua vez, o estudo dos trabalhos disponíveis na literatura científica mostra que a espectrofotometria de UV-Vis complementada com métodos quimiométricos ou derivativos e associada a sistemas automáticos de fluxo, destaca-se com vantagens evidentes relativamente aos classicamente aplicados, pela poupança drástica de recursos económicos e de tempo que representa, como se encontra bem patente nas referências supra-citadas. Estes métodos possibilitam a obtenção, em simultâneo e em tempo quase real, dos perfis de dissolução individuais dos diversos princípios activos que constituem uma formulação

multi-componente, tendo por tal um potencial de aplicação fantástico, quer na rotina de controlo da qualidade, quer nos laboratórios de desenvolvimento farmacêutico. Por norma, todas as indústrias e laboratórios possuem mais do que um espectrofotómetro, o que faculta a implementação deste tipo de técnicas sem grandes sobressaltos. No entanto, uma forte desvantagem que lhes está associada consiste na formação frequente de interferentes no decorrer dos ensaios de dissolução, sendo estes resultantes de matérias insolúveis (suspensões e colóides) difíceis de eliminar que, ao criar turbidez, absorvem no ultra-violeta originando resultados erróneos. Por sua vez, as bolhas de ar que se formam no percurso óptico provocam artefactos nos perfis de dissolução, que não podem ser eliminados pelo recurso a algoritmos matemáticos (o mesmo ocorre com utilização de sondas de fibra óptica). Para além disso, o número total de amostras é limitado pelo tempo de amostragem, não sendo possível a obtenção de dados para tempos inferiores a cerca de 4 minutos, para um sistema de dissolução típico de seis amostras, o que pode ser crítico para formas farmacêuticas de dissolução rápida. Este último inconveniente não se faz sentir com o recurso a sondas de fibra - óptica.

### 3.3.2. Ensaios de Dissolução, com Detecção Potenciométrica

Tal como foi referido anteriormente, mesmo tendo em consideração as potencialidades da utilização dos eléctrodos selectivos a ião nos ensaios de dissolução de formulações farmacêuticas multi-componente, apenas se encontra uma publicação na literatura com uma aplicação deste tipo, até à presente data [159]. Contudo, existem alguns estudos referentes ao desenvolvimento de ESIs para uso nos ensaios de dissolução, em formulações uni-componente. As primeiras publicações acerca deste tópico envolvem a construção de eléctrodos de membrana líquida, cujo mecanismo se baseia na formação de complexos de par iónico entre sais e o API de interesse [160-162]. Este tipo de sensores apresenta estabilidade inferior ao longo do tempo e origina resultados de menor reprodutibilidade, uma vez que necessitam de uma solução de referência interna. Para além disso, pelo facto de os eléctrodos não terem suporte físico, encontra-se impossibilitada a sua miniaturização e inserção em sistemas de fluxo. Os eléctrodos descritos são aplicados a ensaios de dissolução *in situ*, de medicamentos com um componente, sem se verificarem interferências por parte dos excipientes presentes nas formulações testadas. As potencialidades extra de aplicação das referidas unidades

são demonstradas através da modelização dos perfis de dissolução obtidos, com determinação de parâmetros, tais como as cinéticas do processo de dissolução.

A título de exemplo, referem-se os autores Stefan et al. [160], que reportam a construção de dois eléctrodos de membrana líquida baseados em dipicrilaminato de flecainida com dipicrilamina (I) e laurilsulfato (II) de flecainida. Estes sensores mostram resposta rápida, boa reprodutibilidade e estabilidade, e os excipientes usados na compressão dos comprimidos, tais como o estearato de magnésio, a celulose microcristalina e o amido, não constituem interferência para o detector. As unidades descritas aplicam-se nos ensaios de pureza de matéria - prima, uniformidade de teor e dissolução dos comprimidos deste API. Adicionalmente, são determinados os perfis e o modelo de dissolução dos comprimidos, bem como as constantes de primeira ordem dos processos de dissolução e desagregação. O mesmo grupo de investigação publica dois trabalhos de concepção similar, que consistem no desenvolvimento de um eléctrodo de membrana líquida, baseado no par iónico disopiramida – dipicrilamina, dissolvido em nitrobenzeno, para determinação do antiarrítmico disopiramida [161], e um ESI de membrana líquida composto por amiodarona – dipicrilamina, dissolvido em nitrobenzeno, para quantificar o antiarrítmico amiodarona [162]. Ambos os sensores são aplicados a ensaios de dissolução e os dados gerados utilizados nos cálculos do mesmo tipo de cinéticas.

Em publicações posteriores, começaram a surgir os primeiros trabalhos que fazem uso de ESIs com membrana plástica, como detectores em ensaios de dissolução. Além de proporcionarem maior estabilidade e reprodutibilidade de resultados, estas unidades são passíveis de miniaturização e inserção nos vasos de dissolução, com mínimo distúrbio da hidrodinâmica do fluxo. Nestes trabalhos, procede-se à monitorização das dissoluções *in situ* [144, 145, 163, 164].

Entre estes, refere-se o trabalho publicado pelos autores García et al. [163], no qual se descreve a construção de um eléctrodo de membrana plástica selectivo a trazodona, para aplicação em ensaios de controlo da qualidade e análise de urina. O sensor baseia-se na incorporação de um sal de troca iónica composto por trazodona – tetrafenilborato, numa membrana de PVC. O eléctrodo mostra gerar dados com reprodutibilidade, repetibilidade, exactidão e selectividade relativamente a alguns compostos orgânicos e inorgânicos, incluindo o principal metabolito da trazodona. São obtidos bons resultados analíticos respeitantes à aplicação do ESI a amostras farmacêuticas e de urina dopada com o princípio activo, pelo método da adição padrão, sem necessidade de realizar procedimentos prévios de extracção. A nova unidade é também aplicada na

monitorização de ensaios de dissolução de comprimidos (reduzidos a pó e inteiros) de trazodona, em diferentes condições de pH e de dimensão de partícula. A velocidade de dissolução é mais elevada nos comprimidos reduzidos a pó do que nos inteiros para todos os meios testados, e é mais lenta em HCl, comparativamente à água ou ao tampão acetato. Convém reforçar que estes ensaios demonstram a versatilidade do sensor e a sua adequabilidade à realização de diversos estudos na fase de desenvolvimento de método analítico, para uma nova formulação. Segundo os autores [163], no que concerne a monitorização dos ensaios de dissolução, os eléctrodos selectivos reportados trazem vantagens sobre o método espectrofotométrico, uma vez que a turbidez e os colóides formados durante o processo de dissolução não constituem interferência.

A construção e as características gerais de quatro sensores potenciométricos de membrana plástica, sensíveis a cinarizina, é descrita em [164]. Estas unidades baseiam-se no uso de complexos de associações iónicas do catião de interesse, com tetrafenilborato, flavinato, reinecato e molibdofosfato, numa matriz de PVC. O par cinarizina-flavinato exhibe as melhores características de resposta. Os sensores aplicam-se nos testes de uniformidade de teor de formulações farmacêuticas e também nos ensaios de dissolução, sendo que, nestes últimos, os valores de princípio activo dissolvido são gravados continuamente, com intervalos de um minuto. Os resultados potenciométricos da dissolução comparam-se aos espectrofotométricos, com recolha manual de alíquotas, verificando-se concordância entre ambos. Contudo, o método potenciométrico detém a vantagem adicional de permitir monitorização *in situ*.

No trabalho reportado em [144] são exploradas de modo extenso e alargado, as potencialidades de um sistema com eléctrodos selectivos a ião, na realização de ensaios de dissolução *in situ* de um conjunto de formulações. Os princípios activos estudados são a dapoxetina, paliperidona, cinarizina, tetrazepam, mebeverina, loperamida, galantamina e ibuprofeno. Os autores deste trabalho reportam a construção de um eléctrodo de membrana plástica, desenhado especialmente para ensaios de dissolução. O reconhecimento do analito de interesse baseia-se no processo de complexação iónica que ocorre entre um sal de amónio quaternário e o fármaco a determinar. O sal é o tetrakis- *p*-clorofenilborato de potássio, se o API é um catião, ou cloreto de metil-tridodecil amónio, se o fármaco está na forma aniónica. Os resultados obtidos são de excelente qualidade, com elevada sensibilidade e reprodutibilidade, para fármacos com coeficiente de partição (octanol /água) - log P - superiores a 4,5, sendo perfeitamente comparáveis com aqueles que recorrem a fibras ópticas. Nesta publicação, são reforçadas as vantagens do uso de eléctrodos selectivos a ião como detectores aplicados a ensaios de dissolução. Os sensores potenciométricos são insensíveis à maioria dos excipientes e à

presença de suspensões, sistemas coloidais e compostos que absorvem no UV. Esta robustez confere-lhe mais-valias inegáveis relativamente aos métodos espectrofotométricos. Adicionalmente, o extenso intervalo de resposta dos eléctrodos proporciona resultados extremamente sensíveis e exactos, desde o início da dissolução até ao final da mesma, o que permite determinar parâmetros como o tempo de latência da dissolução. Os sensores potenciométricos detêm ainda a possibilidade de ser miniaturizados, a fim de não provocarem distúrbios nos vasos de dissolução, contrariamente ao que ocorre com as sondas de fibra - óptica. As maiores limitações destes eléctrodos são a obrigatoriedade dos fármacos estarem na forma ionizada durante o processo, o que faz com que nem todos os meios de dissolução sejam aplicados, especialmente aqueles que contêm detergentes (por exemplo Tween). Por outro lado, os princípios activos com  $\log P \leq 2$  não são passíveis de medições exactas, e a determinação da dissolução de dois fármacos em formulações multi-componente não é possível de ser realizada pelos autores, utilizando os sensores tal qual são descritos.

Na sequência do trabalho acima referido, o mesmo grupo de investigação reporta um protótipo de instrumentação constituído por sensores potenciométricos, aplicados a ensaios de dissolução utilizando o aparelho I (cesto) ou II (pá) da USP [145]. São obtidos resultados muito promissores com uma selecção de princípios activos com diferentes propriedades físico-químicas. A base de construção dos eléctrodos é semelhante à descrita anteriormente e comprova-se, mais uma vez, que a aplicabilidade do referido método está dependente do  $\log P$  das moléculas. Assim, as medições são facilmente executáveis em APIs que possuem este factor superior a 4. Verifica-se um decréscimo das características dos sensores, com a diminuição dos valores deste parâmetro, devido à diminuição da sua selectividade relativamente aos excipientes e à força iónica dos respectivos meios de dissolução. As unidades são encaradas como consumíveis, isto é, são pré condicionadas antes da sua utilização em meio de dissolução dopado a 110% com a substância a determinar e usam-se para numerosos ensaios, por cerca de 6 meses. Para os diversos APIs testados (loperamida, cinarizina, domperidona e cetoconazole), os perfis de dissolução obtidos são muito reproduzíveis e mostram pequena variabilidade comparativamente àqueles que recorrem à amostragem manual e análise por UV ou HPLC, ou por tecnologia com detecção por fibra óptica. Na Figura 7, representa-se uma resposta potenciométrica *in situ* típica, e o respectivo perfil de dissolução da formulação de loperamida. É também demonstrada a aplicabilidade do sistema na realização de medições de produtos farmacêuticos de dissolução instantânea (domperidona).

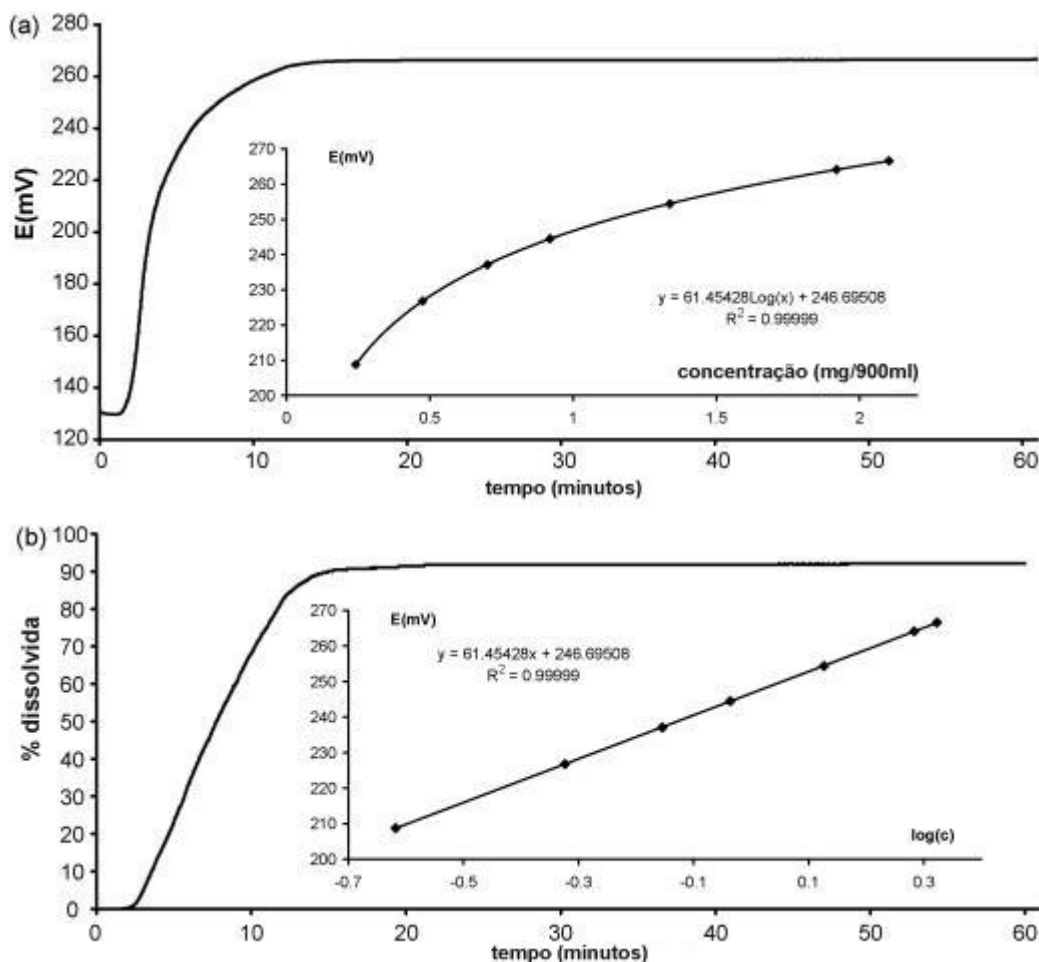


Figura 7 - a) Exemplo de uma resposta potenciométrica *in situ*, obtida com um sensor potenciométrico, para uma formulação de loperamida 2 mg, e correspondente gráfico “potencial” *versus* “concentração” de padrão loperamida, b) Perfil de dissolução, com o respectivo gráfico “potencial” *versus* “logaritmo de concentração”. Reproduzido de [138].

Neste trabalho, são reforçadas as vantagens dos sistemas *in situ* aplicados aos ensaios de dissolução, nomeadamente a possibilidade da execução de múltiplas medidas, originando perfis com maior informação. Assim sendo, observam-se efeitos como o tempo de latência dos comprimidos, ou seja, o tempo necessário para os molhar antes da dissolução e da desintegração e torna-se exequível a obtenção de perfis para os comprimidos de rápida dissolução, possibilitando a aquisição de informação preciosa para os cientistas formuladores. Como já foi referido, os sistemas de fibra óptica não são aplicáveis para todos os produtos uma vez que, aquando da desintegração das formulações farmacêuticas, liberta-se uma elevada quantidade de pó e as partículas insolúveis provocam desvios na luz ultra - violeta. Estes efeitos podem ser parcialmente corrigidos pela aplicação de algoritmos, todavia são ineficazes quando a sonda fica recoberta com material insolúvel. Enquanto as bolhas de ar se evitam pela



desgaseificação prévia dos meios de dissolução, a filtração utilizada com os métodos “em linha” e com recolhas manuais não é passível de se realizar nestes casos. As oportunidades de melhoria passam pela extensão do protótipo a outros meios de dissolução (como aqueles que contém surfactantes) e a redução do diâmetro do eléctrodo de referência, a fim de minimizar o distúrbio na dinâmica de fluxo no vaso de dissolução.

Embora a maioria dos ESIs referidos anteriormente possuam configuração convencional, aparecem também descritos na literatura trabalhos em que os eléctrodos de membrana plástica, de configuração tubular, são acoplados a sistemas automáticos de fluxo, para monitorização em linha de perfis de dissolução [157, 165, 166]. Através da análise destes trabalhos, é razoável concluir que os sistemas que integram eléctrodos associam as vantagens da detecção potenciométrica com as vantagens da gestão de fluidos proporcionada pela análise em fluxo. Efectivamente, estes sistemas podem ser explorados e adaptados à realização de ensaios com meios de dissolução contendo surfactantes, usualmente incompatíveis com os ESIs de membrana plástica. Deste modo, os analitos seriam tamponados no caminho analítico para o sensor, a fim de estarem na forma ionizada. Outro exemplo da flexibilidade conseguida com os sistemas de fluxo consiste na capacidade de efectuar diluições em linha, particularmente com os sistemas SIA, conferindo vantagens inegáveis na calibração automática do sistema, uma vez que o operador teria apenas de preparar manualmente uma ou duas soluções stock. Uma vantagem adicional diz respeito à inexistência de perturbação do equilíbrio hidrodinâmico do vaso de dissolução, que é uma questão problemática sempre que se utilizam sensores *in situ*. No entanto, os sistemas de fluxo poderão ser menos adequados aquando da análise de certo tipo de formulações, como aquelas de rápida dissolução, nomeadamente comprimidos de aplicação sublingual. Efectivamente, quando se considera um sistema de dissolução de escala industrial, usualmente com de 6 ou 12 vasos de dissolução, o tempo de recolha de alíquotas de cada uma das tinas e subsequente transporte até ao detector não permite a obtenção de medições com intervalos de tempo muito curtos.

Concretizando, em [165] é descrito um eléctrodo selectivo a ião, e sensível a diflunisal. Esta unidade é inserida como detector, num sistema automático de análise por injeção em fluxo, com o intuito de desenvolver métodos de rotina para controlo da qualidade de formulações farmacêuticas, nomeadamente na execução de ensaios de doseamento, de uniformidade de teor e de dissolução. O método automatizado aplicado aos ensaios de dissolução providencia perfis completos do princípio activo.

No trabalho reportado em [166], descreve-se a construção e avaliação das características de eléctrodos selectivos a tetraciclina, sem solução de referência interna e com membranas poliméricas. Estas unidades são preparadas recorrendo a complexos iónicos do antibiótico, com tetrakis-*p*-clorofenilborato e possuem configuração tubular. Quando inseridos num sistema FIA, revelam uma melhoria de sensibilidade relativamente às correspondentes unidades a funcionar em processo convencional. A aplicação realiza-se no doseamento deste princípio activo em formulações farmacêuticas e também na execução de ensaios de dissolução. As adequadas características dos eléctrodos constata-se após o desempenho de um ensaio de dissolução durante 60 minutos sem requerer re-calibrações e com uma amostragem de cerca de 80 alíquotas por hora. Os autores reforçam que, relativamente aos métodos espectrofotométricos manuais tradicionalmente usados, o sistema de fluxo com detecção potenciométrica proposto requer menor intervenção humana e possibilita a realização de análises em tempo quase real, sem pré-tratamento de amostra.

Um sistema automático de injeção sequencial com detecção potenciométrica recorrendo a um eléctrodo tubular de salicilato é proposto em [157], e demonstra ser adequado à determinação de ácido acetilsalicílico após a sua hidrólise, em linha, a salicilato. O método SIA - potenciometria é aplicado no doseamento de ácido acetilsalicílico em preparações farmacêuticas, incluindo formulações multi-componente e efervescentes. Adicionalmente, as suas características adequam-no à realização de ensaios de dissolução automatizados em formulações farmacêuticas de libertação normal e modificada, contendo ácido acetilsalicílico como princípio activo. Os resultados obtidos estão em conformidade com os métodos espectrofotométricos estabelecidos pela farmacopeia. No entanto, o método proposto pelos autores destaca-se pela selectividade conferida pelo sensor potenciométrico usado, o que possibilita a realização de estudos de libertação de ácido acetilsalicílico, em formulações multi-componente. Os autores destacam as vantagens do sistema utilizado, comparativamente aos métodos tradicionais, uma vez que a detecção espectrofotométrica convencional falha frequentemente na presença de outras substâncias activas interferentes e partículas insolúveis, que têm de ser cuidadosamente filtradas.

### 3.4. Métodos “*In Vitro*” para Avaliação da Biodisponibilidade de Fármacos: Ensaios de Permeabilidade

Apesar dos fabulosos avanços tecnológicos atingidos nas últimas décadas na área das vias de administração de fármacos, a via oral continua a ser a preferida, no que concerne as novas entidades químicas (NEQs) [3, 167]. As razões para este facto advém da sua conveniência superior, baixo custo e elevada adesão dos pacientes à terapêutica, comparativamente com outras alternativas. Contudo, os compostos destinados a este género de administração devem ser detentores de solubilidade e permeabilidade intestinal adequada, a fim de atingirem concentrações terapêuticas.

Com o crescimento exponencial dos últimos anos na área da genética e da química combinatorial, a par das inovações tecnológicas, a síntese de um enorme número de compostos potencialmente candidatos a medicamentos constituem uma realidade no processo de investigação e desenvolvimento de novas entidades químicas com interesse farmacêutico. Por outro lado, a árdua tarefa de varrimento de moléculas, simultaneamente pela sua actividade biológica e propriedades biofarmacêuticas (por exemplo solubilidade, permeabilidade/ absorção, estabilidade, etc), tem adquirido o estatuto de desafio superior. Este factor providencia um ímpeto na indústria farmacêutica, no sentido de implementar modelos de varrimento que detenham elevada capacidade, custos suportáveis e uma boa capacidade de predizer acerca da permeabilidade e da absorção *in vivo* [4]. Para compostos administrados oralmente, a exposição sistémica de um fármaco depende de um sem número de variáveis. Geralmente, as propriedades físico-químicas detêm um papel determinante na permeabilidade intestinal e incluem o peso molecular, pKa, lipofilia (log P, log D), carga/ ionização, solubilidade, pH gastro-intestinal e tamanho molecular [3]. A solubilidade do composto no tracto GI é um factor extremamente importante que define as características de dissolução do fármaco e, eventualmente, influencia a sua biodisponibilidade. Os métodos físico-químicos que estimam a permeabilidade intestinal são atractivos pela sua elevada capacidade de amostragem e reprodutibilidade para predizer o transporte passivo dos fármacos. Adicionalmente, fazem uso de um mínimo de recursos humanos e materiais. A utilização destes métodos, principalmente nas fases iniciais de investigação, permite uma selecção precoce de compostos em desenvolvimento, garantindo uma maior possibilidade de sucesso nas fases seguintes, nomeadamente nos ensaios clínicos.

Actualmente, realizam-se estudos de correlação *in vitro* / *in vivo* que consistem na análise da relação entre uma propriedade biológica ou parâmetro derivado desta,

produzido pela dosagem farmacêutica, e uma propriedade físico-química da mesma dosagem [3]. O estabelecimento de um modelo de correlação IVIVC (abreviatura derivada do Inglês, “*In Vivo, In Vitro Correlation*”) pode mesmo contribuir para a redução do número de ensaios de bioequivalência utilizando voluntários humanos [3, 168-170]. Para se estabelecer este modelo é necessário conhecer as características físico-químicas dos fármacos, principalmente a solubilidade em líquidos biológicos e a permeabilidade. Neste contexto, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS, abreviatura derivada do Inglês, *Biopharmaceutical Classification System*) [171-176], divide os fármacos em quatro grupos: I- altamente solúveis e altamente permeáveis (ergotamina, prometazina, etc), II- pouco solúveis e altamente permeáveis (praziquantel, ibuprofeno, etc), III- altamente solúveis e com baixa permeabilidade (ácido fólico, sulfato ferroso, etc), e IV- fármacos pouco solúveis e pouco permeáveis (doxiciclina, alopurinol, etc). Este sistema de classificação pode auxiliar na previsão da absorção *in vivo*.

Na tentativa de desenvolver métodos *in vitro* que simulem os processos *in vivo*, têm vindo a ser reportados diversos modelos que avaliam a permeabilidade de APIs, sendo os mais utilizados os que recorrem a culturas celulares (como por exemplo células Caco-2) e PAMPA [5, 177] (abreviatura derivada do Inglês, *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*). No PAMPA [178], a permeação é determinada através de um microfiltro impregnado com uma solução de fosfolípidos em dodecano, embora tenham sido referidos outros ensaios com membranas artificiais de soluções de fosfolípidos e colesterol em octanol [179], ou octanol puro [180]. PAMPA é utilizado para um varrimento inicial de compostos com permeação por difusão passiva e os ensaios Caco-2 e outros modelos celulares mais complexos empregam-se nas fases posteriores, em compostos seleccionados, com o intuito de avaliar a permeação por transporte mediado. Um dos exemplos mais recentes de aplicabilidade das membranas artificiais consiste na sua utilização em sistemas automáticos de fluxo, para avaliação das propriedades de permeação das formulações farmacêuticas semi-sólidas [181, 182]. Outro exemplo é reportado no artigo [183], no qual o grupo de investigação de Sales et al. descreve um sistema de fluxo automático baseado em multicomutação com detecção espectrofotométrica, com o intuito de estudar a difusão dos fármacos cafeína e aminofilina, através de uma membrana entérica artificial, bem como a influência de agentes tensoactivos no processo de difusão. Neste trabalho são reforçadas as vantagens que advém da automatização, possibilitando o uso deste tipo de sistemas para execução de ensaios *in vitro* em I&D, com enfoque no estudo da cinética de difusão de fármacos e da influência de excipientes nesse processo.

As células Caco-2 são geralmente aceites como modelos *in vitro* adequados para estudos de transporte de fármacos, já que mostram expressar a maioria da actividade enzimática, funcional e morfológica da mucosa intestinal, apesar de provirem de uma linha derivada do carcinoma do cólon [3]. O recurso a este tipo de células detém algumas desvantagens críticas, uma vez que restringem fortemente a utilização de meios com diferentes pHs e não podem ser sujeitas a fluxos elevados, diminuindo ritmos de amostragem em sistemas automáticos. Outros modelos publicados recentemente na literatura [184] integram sequencialmente os passos de dissolução e absorção, possibilitando testar um fármaco a partir da sua forma farmacêutica sólida. A interacção dos excipientes com os processos membranares pode conduzir a resultados completamente inesperados na fase de optimização de formulação, se estes fármacos forem administrados por via oral. Daí advém o interesse de desenvolver métodos automatizados que, de um modo expedito, sejam capazes de prever quais os compostos/ formulações farmacêuticas que exibem perfis de dissolução / permeabilidade adequados ao fim em vista, o que possibilitaria identificar se a biodisponibilidade de determinado produto farmacêutico é sensível a alterações do processo produtivo, dos constituintes da formulação ou mesmo da concentração do fármaco.

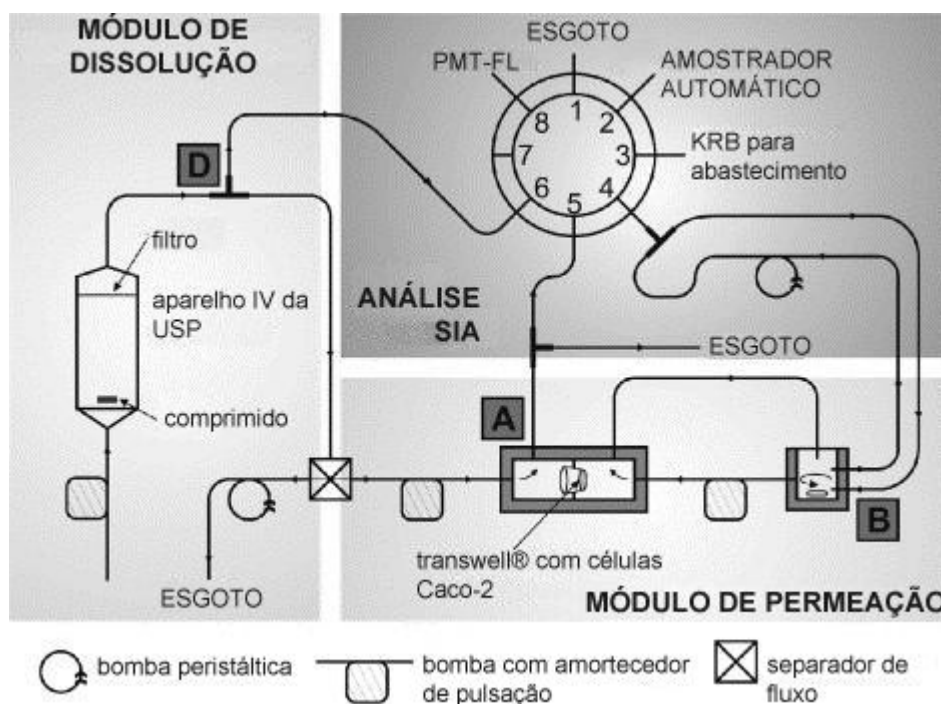
Nesta secção analisam-se os estudos publicados, que acoplam ensaios de dissolução a ensaios de permeabilidade (com membranas artificiais, linhas celulares ou tecidos), aplicados a princípios activos ou formulações farmacêuticas sólidas de administração oral, contendo um ou mais APIs. Nalguns casos, são exploradas as potencialidades de automatização deste tipo de sistemas recorrendo, por exemplo, a análise por injeção sequencial em fluxo (SIA), o que os capacita como potenciais ferramentas de varrimento de compostos nas fases iniciais do desenvolvimento farmacêutico. Apesar das inegáveis vantagens da aplicação de sensores potenciométricos a ensaios de dissolução, como ficou bem patente na secção anterior desta dissertação, ainda não foram publicados até à data, artigos empregando eléctrodos selectivos a ião, como detectores em linha nos estudos integrados D/P. Contrariamente às secções anteriores, o enfoque desta não se centra nos métodos de detecção utilizados, uma vez que são simples e não trazem novidade considerável, mas antes na interpretação dos resultados, tendo em vista a aplicação das técnicas D/P para selecção de compostos e formulações, durante o processo de investigação e desenvolvimento de novas entidades químicas.

### 3.4.1. Sistemas Integrados Dissolução/ Permeação (D/P)

No trabalho reportado por Ferreira et al. [185], desenvolve-se uma metodologia para avaliar simultaneamente a dissolução e a permeabilidade de fármacos em fluxo contínuo, com posterior determinação do teor dos analitos recorrendo a HPLC acoplado a detecção espectrofotométrica. Neste estudo, procede-se à recolha manual das amostras para análise a tempos discretos, com reposição de igual volume de tampão. Para este efeito, utiliza-se uma célula de fluxo bilateral, com membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno). Após a optimização inicial de algumas variáveis, o método mostra ser capaz de detectar a influência do pH e dos excipientes, na permeabilidade dos compostos ácido acetilsalicílico e cafeína. Para avaliar a dissolução, testa-se um ensaio da USP, com meio de dissolução a pH 4,5 e um outro alternativo a pH 7,4, uma vez que este último é compatível com células Caco-2, tendo em vista a sua utilização futura. Os ensaios realizados cumprem com as especificações compendiais. Posteriormente, procede-se ao acoplamento das duas técnicas, garantindo a circulação do líquido pela conexão do aparelho de dissolução à célula de fluxo, através de tubos de silicone, sendo o meio de dissolução propulsionado com o auxílio de uma bomba peristáltica. A aplicação faz-se numa formulação farmacêutica composta pelos dois princípios activos em estudo. Os resultados obtidos são reprodutíveis e discriminativos para ambos os APIs e nas duas condições testadas, procedendo-se ao cálculo das respectivas permeabilidades aparentes. As quantidades permeadas são bastante reduzidas, pelo que a adição de adjuvantes de solubilização no compartimento aceitador será um parâmetro que os autores pretendem avaliar em trabalhos futuros, e que poderá ser elucidativo do motivo pelo qual os excipientes afectam a permeabilidade dos compostos *in vivo*, contribuindo para aproximar o modelo proposto à realidade fisiológica. Na sequência destas conclusões, os autores perspectivam a utilização do mesmo sistema em trabalhos envolvendo culturas celulares ou tecidos (pele e intestino).

Nos trabalhos desenvolvidos por Motz et al. [186, 187], propõe-se a automatização de um sistema para amostragem e quantificação, num aparelho de dissolução/permeação com células Caco-2 previamente reportado [188], fazendo uso da análise por injeção sequencial (SIA), com detecção fluorimétrica. Para este efeito, recorre-se à fluorescência nativa do princípio activo cloridrato de propanolol em tampão Krebs Ringer (KRB). A amostragem é realizada em três localizações diferentes do sistema, com uma elevada frequência, conforme se demonstra na Figura 8. Os módulos de dissolução (aparelho IV da USP) e de permeabilidade são conectados e o fluxo é ajustado e

diminuído de modo a ser compatível com as células Caco-2, altamente sensíveis a pressões elevadas.



**Figura 8- Esquema do sistema automático Dissolução / Permeação. Os pontos de amostragem estão assinalados com letras capitais: D- Dissolução; A- Apical; B- Basolateral. A válvula multiposição estabelece as seguintes conexões: Porta 1 – Esgoto; Porta 2- Amostrador automático para aspiração das soluções padrão; Porta 3- KRB para restituição dos volumes retirados do compartimento basolateral; Porta 8- Detector de fluorescência PMT-FL; Portas 4, 5, 6 – Pontos de amostragem B, A, e D, respectivamente. Reproduzido de [180].**

A aplicação faz-se em comprimidos de diferentes dosagens de libertação imediata e retardada. Os autores reforçam a ideia que, pela primeira vez, é descrito um sistema de fluxo *in vitro*, que possibilita monitorizar o impacto de parâmetros relacionados com formulação na permeabilidade intestinal de princípios activos formulados como formas sólidas de administração oral. Para ambos os tipos de comprimidos (libertação imediata e retardada), o sistema realiza medições de dissolução concomitantemente com as de permeabilidade através das células Caco-2, com elevada precisão e reprodutibilidade. As quantidades permeadas nas formulações de libertação imediata mostram dependência linear com o aumento de dosagem. Adicionalmente, o efeito de libertação retardada faz-se sentir na permeabilidade do API, sendo que os dados D/P obtidos são conclusivos. Os autores defendem que o acoplamento dos ensaios de dissolução compendiais aos

ensaios de culturas de células para avaliação de permeabilidade, conduzem a resultados promissores e constituem a base para estudos mais avançados que permitirão detectar a influência da forma farmacêutica no processo de absorção intestinal.

Num outro trabalho [189], propõe-se o desenvolvimento de um sistema contínuo D/P para prever as relações entre a dissolução e permeabilidade de formulações de dissolução rápida e lenta dos princípios activos piroxicam, tartarato de metoprolol e ranitidina, comparando as razões dos respectivos fármacos, com aquelas que são observadas na prática clínica. Paralelamente, procura-se perceber o efeito do excipiente croscarmelose de sódio na dissolução e absorção de ranitidina e também estimar o efeito de agentes solubilizantes na dissolução e absorção de piroxicam. O sistema constrói-se a partir de um aparelho de dissolução e uma célula de difusão, de modo a que a dissolução e a permeação através da célula Caco-2 ocorram sequencial e simultaneamente. A recirculação do líquido é feita com auxílio de uma bomba peristáltica. A intervalos de tempo definidos, são recolhidas manualmente amostras de ambos os compartimentos (sendo substituídas por igual volume de líquido) e analisam-se por HPLC-UV. Este método, de um modo geral, adequa os resultados obtidos com aqueles observados nos ensaios clínicos. Por exemplo, prevê com sucesso que as absorções das formulações de dissolução lenta de ranitidina e metoprolol sejam limitadas pela permeação. Adicionalmente, estima que a formulação de dissolução lenta de piroxicam seja limitada pela dissolução e que a formulação rápida deste API seja limitada pela permeação, apesar da elevada permeabilidade e baixa solubilidade do princípio activo. O sistema mostra que o desintegrante, croscarmelose de sódio, aumenta a permeabilidade da ranitidina, e que os agentes solubilizantes não modulam a permeação de piroxicam. Estes resultados suportam a sua utilidade como uma ferramenta para estudar e antecipar os efeitos de excipientes na cinética de dissolução e permeabilidade intestinal, indicando que o método proposto poderá ter utilidade na caracterização biofarmacêutica da actuação de formas farmacêuticas de administração oral, para além da conseguida com ensaios de dissolução e permeação realizados de forma discreta. Os autores sugerem que uma avaliação aprofundada do sistema deve incluir análise adicional de princípios activos com diversas formas farmacêuticas e propriedades biofarmacêuticas. Também é proposto pelos autores o recurso a modelos membranares intestinais mais permeáveis.

O grupo de Kobayashi et al. [190] desenvolve e reporta um sistema D/P para estimar a absorção de princípios activos, que leva em consideração a dissolução destes, e as mudanças de pH no tracto gastrointestinal. Os fármacos catiónicos insolúveis em água têm solubilidades relativamente elevadas no estômago mas, por vezes, recristalizam no lúmen intestinal, advindo daí a necessidade de desenvolver um sistema



que considere não só a dissolução das formas farmacêuticas, mas também as variações de pH que ocorrem ao longo do tubo digestivo. Neste trabalho, o comprimido é adicionado ao vaso de dissolução, com pH 1,0, e a quantidade dissolvida é transferida para um vaso de ajuste, com pH 6,0. Seguidamente, a solução é novamente transferida para a superfície apical de células Caco-2, são recolhidas alíquotas a cada cinco minutos, e determina-se a cinética de permeação através destas, por HPLC, com detecção espectrofotométrica ou fluorimetria. A circulação de líquido é feita com o auxílio de uma bomba peristáltica. Os autores referem uma das limitações da utilização deste sistema que consiste no volume diminuto dos recipientes de dissolução (3 ml), impossibilitando na sua versão actual, a utilização de dosagens superiores a 30 mg. A aplicação faz-se em dez princípios activos hidrosolúveis e são estabelecidas correlações entre as quantidades permeadas e as percentagens de absorção oral após administração da forma farmacêutica em humanos. Para além disso, consegue prever-se a velocidade e a variabilidade da absorção de albendazol, um API com baixa solubilidade em água. Estes resultados sugerem que o sistema descrito poderá ter aplicabilidade no desenvolvimento de novas substâncias activas ou produto acabado.

Na sequência do trabalho previamente descrito, o mesmo grupo de investigação [191] reporta um método *in vitro* que procura simular as absorções orais de fármacos relativamente solúveis em água e do pró - fármaco pivampicilina. Este sistema inclui um vaso de dissolução (mimetiza o estômago), um vaso de ajuste de pH (mimetiza o intestino), e uma câmara de difusão contendo uma célula Caco-2 ou tecido de intestino delgado de rato, montados entre o lado dador e o receptor. Relativamente ao publicado anteriormente, possibilita a análise de mais tipos de formulações de administração oral, o estudo de interacções fármaco – fármaco e a monitorização do próprio processo de dissolução. Os vasos de dissolução, de ajuste de pH e de permeação, detêm superior capacidade de volume. São estudados oito fármacos relativamente solúveis em água, estabelecendo-se uma correlação entre as quantidades permeadas e a absorção oral em humanos, e também entre os resultados obtidos com as células Caco-2 e as do tecido de intestino de rato. Adicionalmente, é analisado um pró-fármaco lipofílico com o intuito de investigar o efeito do metabolismo intestinal no fluxo transepitelial de pivampicilina (princípio activo modelo). Os resultados são concordantes com os publicados acerca da biodisponibilidade deste pró – fármaco, embora se registem diferenças moderadas nos dados obtidos com as células Caco-2, comparativamente aos do tecido de intestino delgado. Os autores concluem que o recurso a este sistema possibilita a previsão da absorção oral de princípios activos, relativamente solúveis em água, ou ésteres pró – fármaco, baseados na permeação cumulativa através de células Caco-2 ou tecido de

intestino de rato. Adicionalmente, permite obter informação acerca do mecanismo de absorção, ou facilitação de absorção de pró - fármacos. Sugere-se a sua aplicação a diferentes tipos de preparações orais e APIs, cuja solubilidade é dependente de pH.

Seguindo a mesma linha de investigação [184], o grupo acima referido reporta o desenvolvimento de um método *in vitro* que permite comparar a absorção oral de duas bases fracas, de baixa solubilidade, incluindo preparações de libertação controlada pH – independentes. Neste sistema, é adicionado ao primeiro vaso que mimetiza o estômago um sólido de administração oral, passa para o segundo vaso de ajuste de pH (intestino) e, seguidamente, a quantidade dissolvida é transferida para o lado dador da câmara de difusão, onde se encontra instalada a célula Caco-2. O fluxo é controlado com auxílio de uma bomba peristáltica. Uma das vantagens do método apresentado consiste na possibilidade de alteração do pH no vaso onde ocorre a desintegração e dissolução das formas sólidas, possibilitando a simulação de várias condições gástricas (normal e acloridria, por exemplo). As alíquotas de meio contendo API antes e após permeação são recolhidas e analisadas por HPLC, com detecção espectrofotométrica. São preparadas dispersões sólidas de polímeros de albendazol e grânulos de libertação modificada de dipiridamol pH-independentes, para testar neste sistema, comparando os perfis de permeação obtidos com aqueles de preparações comerciais e misturas físicas dos mesmos princípios activos. Nestes últimos casos, os perfis e respectiva previsão de absorção são extremamente dependentes do pH, contrariamente aos das preparações (dispersão sólida e grânulos), que mostram não ser afectadas por modificações do mesmo. Estes resultados são concordantes com os obtidos em estudos de absorção *in vivo*, realizados em coelhos. Os autores sugerem que o sistema reportado é útil para avaliar a absorção de formulações de libertação modificada que não dependem do pH, como dispersões sólidas ou grânulos de libertação controlada. Uma das mais - valias deste método consiste na possibilidade de estudar simultaneamente alterações na absorção oral. Pode, inclusivamente, ser aplicado na avaliação do efeito temporário de mudanças de pH associadas à co – administração de fármacos ou ingestão de alimentos, e interações fármaco – fármaco que ocorram no tracto gastrointestinal.

No estudo publicado em [192], testa-se uma aproximação numérica fundada numa relação exponencial de primeira ordem, para comparar formulações de comprimidos de teofilina, num sistema dissolução / permeação. Para este efeito, o aparelho de dissolução II da USP (pá) é acoplado aos estudos de permeação, recorrendo a células Caco-2. Recolhem-se manualmente alíquotas dissolvidas e permeadas a diferentes tempos e o pH e osmolaridade são ajustados para garantir a compatibilidade com as células. Estas amostras analisam-se por HPLC, com detecção espectrofotométrica. De acordo com a

classificação biofarmacêutica de princípios activos [166], a teofilina é um API da classe I, isto é, com elevada solubilidade e permeabilidade. Neste tipo de fármacos, a velocidade de dissolução é o factor limite para a absorção, exceptuando nas formas farmacêuticas de libertação imediata que se dissolvem rapidamente e, para as quais, o esvaziamento gástrico constitui o factor limite. Para esta classe, são de esperar correlações *in vitro* / *in vivo*, se a velocidade de dissolução for mais lenta que o esvaziamento gástrico. Assim sendo, a capacidade do sistema proposto é aferida pela comparação dos perfis dissolução/ absorção de formulações farmacêuticas de libertação imediata e controlada. Os resultados obtidos demonstram uma concordância geral entre as relações fracção absorvida/ fracção dissolvida reportadas na literatura e experimentais (com o sistema proposto e baseadas no comportamento D/P). Os autores concluem que esta técnica pode constituir uma ferramenta preciosa para caracterizar a permeação intestinal de uma nova formulação de um dado API, comparando-a com a convencional.

## Referências Bibliográficas

- [1] Levin S. Review (Draft of pre-published chapter). High performance Liquid Chromatography (HPLC) in the pharmaceutical analysis. Disponível em [http://www.forumsci.co.il/HPLC/WEB\\_Pharm\\_Review/HPLC\\_pharma\\_Introduction.html](http://www.forumsci.co.il/HPLC/WEB_Pharm_Review/HPLC_pharma_Introduction.html) [acedido em 2010-10-15].
- [2] Görög S. The changing face of pharmaceutical analysis. *TrAC* 2007; 26 (1): 12-17.
- [3] Souza J, Freitas ZMF, Storpitis S. Modelos *in-vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/ absorção. *Rev Bras Cienc Farm* 2007 Dec; 43 (4): 515-527.
- [4] Clayton J, Cole P, William P. Permeability assays. *Mod Drug Discov* 2000 Oct; 3(8): 73-76.
- [5] Pharmacelsus®, Contract Research Organization. Parallel Artificial Membrane Permeation Assay. Disponível em [http://www.pharmacelsus.de/pdf/8\\_PAMPA.pdf](http://www.pharmacelsus.de/pdf/8_PAMPA.pdf). [Acedido em 2010-10-15].
- [6] Kataoka H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *TrAC* 2003 Apr; 22 (4): 232-244.
- [7] Rolli R. Automation of dissolution tests. *J Autom Meth Manage Chem* 2003 Jan; 25 (1): 7-15.
- [8] Ruzicka J, Hansen BH. Flow injection analysis. Part I: A new concept of fast continuous flow analysis. *Anal Chim Acta* 1975; 78 (1): 145-157.
- [9] Ruzicka J, Hansen EH. Sequential Injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Anal Chim Acta* 1990; 237 (2): 329-343.
- [10] Economou A. Sequential-Injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample handling and pre-treatment. *TrAC* 2005 May; 24 (5): 416-425.
- [11] Hlabangana L, Hernández-Cassou S, Saurina J. Multicomponent determination of drug using flow injection analysis. *Curr Pharm Anal May* 2006, 2 (2): 127-140.
- [12] Barnett NW, Lenehan CE, Lewis SW. Sequential injection analysis: an alternative approach to process analytical chemistry. *TrAC* 1999 May; 18 (5): 346-353.

- [13] Gómez V, Callao MP. Multicomponent analysis using flow systems. *TrAC* 2007 Sep; 26 (8): 767-774.
- [14] Legnerová Z, Sätinský D, Solich P. Using on-line solid phase extraction for simultaneous determination of ascorbic acid and rutin trihydrate by sequential injection analysis. *Anal Chim Acta* 2003 Nov; 497 (1-2): 165-174.
- [15] Llorent-Martínez EJ, Ortega-Barrales P, Molina-Díaz A. Multicommuted flow through fluorescence optosensor for determination of furosemide and triamterene. *Anal Bioanal Chem* 2005 Nov. 383 (5): 797-803.
- [16] Cápitan-Vallvey LF, Valencia MC, Nicolás EA, García-Jiménez JF. Resolution of an intense sweetener mixture by use of a flow injection sensor with on-line solid-phase extraction Application to saccharin and aspartame in sweets and drinks. *Anal Bioanal Chem* 2006 May; 385 (2): 385-31.
- [17] Llorent-Martínez EJ, García-Reyes JF, Ortega-Barrales P, Molina-Díaz A. A multicommuted fluorescence-based sensing system for simultaneous determination of Vitamins B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub>. *Anal Chim Acta* 2006 Jan; 555 (1): 128-133.
- [18] Wu H, Jin Y, Han W, Miao Q, Bi S. Non-chromatographic speciation analysis of mercury by flow injection on-line preconcentration in combination with chemical vapor generation atomic fluorescence spectrometry. *Spectrochim Acta* 2006 Jul; 61 (7): 831-840.
- [19] Erdem A, Eroglu AE. Speciation and preconcentration of inorganic antimony in waters by Duolite GT-73 microcolumn and determination by segmented flow injection-hydride generation atomic absorption spectrometry (SFI-HGAAS). *Talanta* 2005 Nov; 68 (1): 86-92.
- [20] Sätinský D, Solich P, Chocholous P, Karlíček R. Monolithic columns - A new concept of separation in the sequential injection technique. *Anal Chim Acta* 2003 Dec; 499 (1-2); 205-214.
- [21] Sätinský D, Huclova J, Solich P, Karlíček R. Reversed-phase porous silica rods, an alternative approach to high-performance liquid chromatographic separation using the sequential injection chromatography technique. *J Chromatogr A* 2003 Oct; 1015 (1-2); 239-244.

- [22] Solich P, Polášek M, Klimundová J, Ruzicka J. Sequential injection technique applied to pharmaceutical analysis. *TrAC* 2004 Feb; 23 (2): 116-126.
- [23] Sätinský D, Dos Santos LML, Sklénářova H, Solich P, Montenegro MCBSM, Araújo AN. Sequential injection chromatographic determination of ambroxol hydrochloride and doxycycline in pharmaceutical preparations. *Talanta* 68 (2): 214-218.
- [24] Sätinský D, Huclova J, Ferreira RLC, Montenegro MCBSM, Solich P. Determination of ambroxol hydrochloride, methylparaben and benzoic acid in pharmaceutical preparations based on sequential injection technique coupled with monolithic column. *J Pharm Biomed Anal* 2006 Feb; 40 (2): 287-293.
- [25] Chocholous P, Sätinský D, Solich P. Fast simultaneous spectrophotometric determination of naphazoline nitrate and methylparaben by sequential injection chromatography. *Talanta* 2006 Sep; 70 (2): 408-413.
- [26] Chocholous P, Holík P, Sätinský D, Solich P. A novel application of Onyx™ monolithic column for simultaneous determination of salicylic acid and triamcinolone acetone by sequential injection chromatography. *Talanta* 2007 Apr; 72 (2): 854-858.
- [27] Suvardhan K, Suresh Kumar K, Babu HS, Jayaraj B, Chiranjeevi P. Simultaneous flow-through determination of nitrites, nitrates and their mixtures in environmental and biological samples using spectrophotometry. *Talanta* 2005 Apr; 66 (2): 505-512.
- [28] Pérez-Ruiz T, Martínez-Lozano C, Tomás V, Fenoll J. Chemiluminescence determination of citrate and pyruvate and their mixtures by the stopped-flow mixing technique. *Anal Chim Acta* 2003 May; 485 (1): 63-72.
- [29] Da Silva JE, Pimentel MF, Da Silva VL, Montenegro MCBSM, Araújo NA. Simultaneous determination of pH, chloride and nickel in electroplating baths using sequential injection analysis. *Anal Chim Acta* 2004 Mar; 506 (2): 197-202.
- [30] Economou A, Voulgaropoulos A. On-line stripping voltammetry of trace metals at a flow-through bismuth-film electrode by means of a hybrid flow-injection/sequential-injection system. *Talanta* 2007 Feb; 71 (2): 758-765.
- [31] Ruiz-Díaz JJJ, Torriero AAJ, Salinas E, Marchevsky EJ, Sanz MI, Raba J. Enzymatic rotating biosensor for cysteine and glutathione determination in a FIA system. *Talanta* 2006 Feb; 68 (4): 1343-1352.

- [32] Solná R, Skládal P. Amperometric flow-injection determination of phenolic compounds using a biosensor with immobilized laccase, peroxidase and tyrosinase. *Electroanal* 2005 Dec; 17 (23): 2137-2146.
- [33] Fortes PR, Meneses SRP, Zaggato EAG. A novel flow-based strategy for implementing differential kinetic analysis. *Anal Chim Acta* 2006 Jul; 572 (2): 316-320.
- [34] De La Peña M, Espinosa-Mansilla A, Valenzuela MIA, Goicoechea HC, Olivieri AC. Comparative study of net analyte signal-based methods and partial least squares for the simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid by stopped-flow kinetic analysis. *Anal Chim Acta* 2002 Jul; 463 (1): 75-88.
- [35] Li B, He Y, Lv J, Zhang Z. Simultaneous determination of rifampicin and isoniazid by continuous-flow chemiluminescence with artificial neural network calibration. *Anal Bioanal Chem* 2005 Nov; 383 (5): 817-824.
- [36] Magni DM, Olivieri AC, Bonivardi AL. Artificial neural networks study of the catalytic reduction of resazurin: Stopped-flow injection kinetic-spectrophotometric determination of Cu(II) and Ni(II). *Anal Chim Acta* 2005 Jan; 528 (2): 275-284.
- [37] Pasamontes A, Callao MP. Sequential injection analysis linked to multivariate curve resolution with alternating least squares. *Anal Chim Acta* 2005 Jan; 528 (2): 275-284.
- [38] Cartas R, Mimendia A, Legin A, Del Valle M. Two analyte calibrations from the transient response of a single potentiometric sensor employed with the SIA technique. *Talanta* 2009 May; 80 (3): 1428-35.
- [39] Mimendia A, Legin A, Merkoçi A, Del Valle M. Use of sequential injection analysis to construct a potentiometric electronic tongue. Application to multidetermination of heavy metals. *Sensors actuat B Chem* 2010 Apr; 146 (2): 420-426.
- [40] Calvo D, Durán A, Del Valle M. Use of sequential injection analysis to construct a potentiometric electronic tongue. Application to multidetermination employing the transient response of a potentiometric sensor array. *Anal Chim Acta* 2007 Sep; 600 (1-2): 97-104.
- [41] Pérez-Olmos R, Soto JC, Zárate N, Araújo NA, Montenegro MCBSM. Sequential injection analysis using electrochemical detection: a review. *Anal Chim Acta* 2005 Dec; 554 (1-2): 1-16.

- [42] Tóth K, Štulík K, Kutner W, Fehér Z, Lindner E. Electrochemical detection in liquid flow analytical techniques: characterization and classification 2004; IUPAC Technical Report, Pure Appl Chem 76 (6): 1119-1138.
- [43] Skoog, Holler, Nieman, chapter 23. In "Principles of Instrumental Analysis", 5<sup>th</sup> ed., Saunders College Publishing: Philadelphia; 1998.
- [44] Kounaves SP. Voltammetric Techniques, chapter 37. In FA Settle (Ed). Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Prentice Hall PTR, Upper Saddle River NJ; 1997. P. 709-725.
- [45] Bakker E, Pretsch E. Modern Potentiometry. Angew Chem Int Edit 2007 Jul; 46 (30): 5660-5668.
- [46] Jhonson RD, Bachas LG. Ionophore-based ion selective potentiometric and optical sensors. Anal Bioanal Chem 2003 Jun; 376 (3) 328-341.
- [47] Privett BJ, Shin JH, Schoenfisch MH. Electrochemical Sensors. Anal Chem 2008 Jun; 80 (12): 4499-4517.
- [48] Nagels LC, Poels I. Solid state potentiometric detection systems for LC, CE and  $\mu$ TAS methods. TrAC 2000 Jul; 19 (10): 410-417.
- [49] Couto CMCM, Montenegro MCBSM. Detectores potenciométricos para sistemas de análise por injeção em fluxo, evolução e aplicação. Quim Nova 2000 Dec; 23 (6): 1-22.
- [50] Nagels LJ, Vissers B, Bohets H, Everaert J, Robbens J. Potentiometric sensors for organic analytes: Insights to proceed to miniaturization. Curr Pharm Anal 2009 May; 5 (2): 120-127.
- [51] Solich P, Sklenářová H, Polášek M, Karlíček R. Application of flow injection technique in Pharmaceutical Analysis. Part II.: Other spectroscopic methods and electroanalytical detection. J Flow Injection Anal 2001; 18 (2): 118-125.
- [52] Pimenta AM, Montenegro MCBSM, Araújo AN, Calatayud JM. Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis. J Pharm Biomed Anal 2006 Jan; 40 (1): 16-34.
- [53] Van Staden JF, Taaljard RE. Determination of Lead(II), Copper(II), Zinc(II), Cobalt(II), Cadmium(II), Iron(III), Mercury(II) using sequential injection extractions. Talanta 2004 Dec; 64 (5): 1203-1212.



- [54] Ghorbani-Bidkorbeh F, Shahrokhian S, Mohammadi A, Dinarvand R. Simultaneous voltammetric determination of tramadol and acetaminophen using carbon nanoparticles modified glassy carbon electrode. *Electrochim acta* 2010 Mar; 55 (8): 2752-2759.
- [55] Zhang R, Jin GD, Chan D, Hu XY. Simultaneous electrochemical determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid using poly (acid chrome blue K) modified glassy carbon electrode. *Sensor Actuat B Chem* 2009 Apr; 138 (1): 174-181.
- [56] Kalimuthu P, Jhon SA. Electropolymerized film of a functionalized thiadiazole on glassy carbon electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Bioelectroch Bioener* 2009 Nov; 77 (1): 13-18.
- [57] Ren W, Luo HQ, Li NB. Simultaneous voltammetric measurement of ascorbic acid, epinephrine and uric acid at a glassy carbon electrode modified with caffeic acid. *Biosens Bioelectron* 2006 Jan; 21 (7): 1086-92.
- [58] Liu AL, Zhang SB, Chen W, Lin XH, Xia XH. Simultaneous voltammetric determination of norepinephrine, ascorbic acid and uric acid on polycalconcarboxylic acid modified glassy carbon electrode. *Biosens Bioelectron* 2008 May; 23 (10): 1488-95.
- [59] Kalimuthu P, Jhon SA. Simultaneous determination of epinephrine, uric acid and xanthine in the presence of ascorbic acid using an ultrathin polymer film of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-thiol modified electrode. *Anal Chim Acta* 2009 Aug; 647 (1): 97-103.
- [60] Hu GZ, Zhang DP, Wu WL, Yang ZS. Selective determination of dopamine in the presence of high concentration of ascorbic acid using nano-Au self-assembly glassy carbon electrode. *Colloids Surf B* 2008 Apr; 62 (2): 199-295.
- [61] Wang Y, Chen ZZ. A novel poly(taurine) modified glassy carbon electrode for the simultaneous determination of epinephrine and dopamine. *Colloids Surf B* 2009 Nov; 74 (1): 322-327.
- [62] Uslu B, Demircigil BT, Özkan SA, Sentürk Z, Aboul-Enein HY. Simultaneous determination of melatonin and pyridoxine in tablet formulations by differential pulse voltammetry. *Pharmazie* 2001 Dec; 56 (12): 938-942.
- [63] Zhou YZ, Zhang LJ, Chen SL, Dong SY, Zheng XH. Electroanalysis and simultaneous determination of dopamine and epinephrine at poly (isonicotinic acid)-

modified carbon paste electrode in the presence of ascorbic acid. *Chin Chem Lett* 2009 Feb; 20 (2): 217-220.

[64] Mazloum-Ardakani M, Beitollahi H, Mohseni AS, Benvidi A, Naeimi H, Nejati-Barzoki M, et al. Simultaneous determination of epinephrine and acetaminophen concentrations using a novel carbon paste electrode prepared with 2,2'-[1,2-butanediylbis(nitriloethylidyne)]-bis-hydroquinone and TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Colloid Surface B* 2010 Mar; 76 (1): 82-87.

[65] Hammam E, Beltagi AM, Ghoneim MM. Voltammetric assay of rifampicin and isoniazid drugs, separately and combined in bulk, pharmaceutical formulations and human serum at a carbon paste electrode. *Microchem J* 2004 May; 77 (1): 53-62.

[66] Kotkar RM, Srivastava AK. Electrochemical behaviour of nicotinamide using carbon paste electrode. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2008; 12 (9): 1067-1075.

[67] Teixeira MFS, Segnini A, Moraes FC, Marcolino-Júnior LH, Fatibello-Filho O, ETG Cavalheiro. Determination of vitamin B6 in pharmaceutical preparations by cyclic voltammetry at a copper (II) hexacyanoferrate (III) modified carbon paste electrode. *J Braz Chem Soc* 2003 Apr; 14 (2): 316-321.

[68] Safavi A, Maleki N, Moradlou O. A selective and sensitive method for simultaneous determination of traces of paracetamol and p-aminophenol in pharmaceuticals using carbon ionic liquid electrode. *Electroanal* 2008; 20 (19): 2158-2162.

[69] Maleki N, Safavi A, Tajabadi F. High performance carbon composite electrode based on an ionic liquid as a binder. *Anal Chem* 2006 Apr; 78 (11): 3820-3826.

[70] Lourenção BC, Medeiros RA, Rocha-Filho RC, Mazo LH, Fatibello-Filho O. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. *Talanta* 2009 May; 78 (3): 748-752.

[71] Shaidarova LG, Davletshina LN, Budnikov GK. Flow injection determination of water soluble vitamins B1, B2 and B6 from the electrocatalytic response of a graphite electrode modified with a ruthenium (III) hexacyanoruthenate (II) film. *J Anal Chem* 2006 Sep; 61 (5): 502-509.

[72] Stefan RI, Van Staden JKF, Aboul-Enein HY. Simultaneous detection of S and R captopril using sequential injection analysis. *Talanta* 2000 Apr; 51 (5): 969-975.

- [73] Stefan RI, Van Staden JKF, Bala C, Aboul-Enein HY. On line assay of the S-enantiomers of enalapril, ramipril and pentopril using a sequential injection analysis/ amperometric biosensor system. *J Pharm Biomed Anal* 2004 Nov; 36 (4): 889-892.
- [74] Stefan RI, Bokretzion RG, Van Staden JF, Aboul-Enein HY. Simultaneous determination of L- and D- methotrexate using a sequential injection analysis/ amperometric biosensors system. *Biosens Bioelectron* 2003 Nov; 19 (3): 261-267.
- [75] Stefan RI, Van Staden JKF, Aboul-Enein HY. Determination of S- perindopril using a flow injection system with an amperometric biosensor. *Sensor Actuat B Chem* 1999 Mar; 54 (3): 261-265.
- [76] Stefan RI, Van Staden JKF, Mulaudzi LV, Aboul-Enein HY. On-line simultaneous determination of S and R perindopril using amperometric biosensors as detectors in flow systems. *Anal Chim Acta* 2002 Sep; 467 (1-2): 189-195.
- [77] Stefan RI, Van Staden JF, Aboul-Enein HY. Simultaneous determination of L-thyroxine (L-T<sub>4</sub>), D- thyroxine (D-T<sub>4</sub>), and L- triiodothyronine (L-T<sub>3</sub>) using a sensors/ sequential injection analysis system. *Talanta* 2004 Sep; 64 (1): 151-155.
- [78] Staden JFV, Stefan RI, Aboul-Eneim HY. Amperometric biosensor based on D-amino acid oxidase for the R-Perindopril assay. *Fresenius J Anal Chem* 2000; 367 (2): 178-180.
- [79] Staden JFV, Stefan RI, Aboul-Eneim HY. On-line assay of S-Captopril using an amperometric biosensor/ sequential injection analysis. *Anal Chim Acta* 2000 May; 411 (1-2): 51-56.
- [80] Stefan RI, Staden JFV, Aboul-Eneim HY. Amperometric biosensors / sequential injection analysis system for simultaneous determination of S and R-Captopril. *Biosens Bioelectron* 2000 Mar; 15 (1-2): 1-5.
- [81] European Pharmacopoeia, 6<sup>th</sup> Edition, 2008, Strasbourg.
- [82] Martins I, Canaes LS, Doretto KM, Rath S. Boron-Doped diamond electrode coupled to liquid chromatography: application to simultaneous determination of benzodiazepines. *Electroanal* 2010 Feb; 22 (4): 455-462.

- [83] Barroso M, Alonso RM, Jiménez RM. Simultaneous determination of the diuretics triamterene and furosemide in pharmaceutical formulations and urine by HPLC-EC. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 1996 Jan; 19 (2): 231-246.
- [84] Błażewicz A, Fijałek Z, Warowna-Grześkiewicz M, Boruta M. Simultaneous determination of rocuronium and its eight impurities in pharmaceutical preparation using high performance liquid chromatography with amperometric detection. *J Chromatogr A* 2007 May; 1149 (1): 66-72.
- [85] Błażewicz A, Fijałek Z, Samsel K. Determination of pipecuronium bromide and its impurities in pharmaceutical preparation by high performance liquid chromatography with coulometric array detection. *J Chromatogr A* 2008 Aug; 1201 (1): 191-195.
- [86] Wang J, Fang Y. Determination, purity assessment and chiral separation of levodopa methyl ester in bulk and formulation pharmaceuticals. *Biomed Chromatogr* 2006 Sep; 20 (9): 904-10.
- [87] Lau OW, Mok CS. High performance liquid chromatographic determination of active ingredients in cough-cold syrups with indirect conductometric detection. *J Chromatogr A* 1995 Feb; 693 (1): 45-54.
- [88] Marszał ML, Lebedzińska A, Czarnowski W, Szefer P. High performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection. *J Chromatogr A* 2005 Nov; 1094 (12): 91-98.
- [89] Hartman C, Massart DL, McDowall RD. An analysis of the Washington Conference Report on bioanalytical method validation. *J Pharm Biomed Anal* 1994 Nov; 12 (11): 1337-343.
- [90] Validation of compendial procedures (1225). In *US Pharmacopoeia: USP 30: The National Formulary: NF 25*. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2007.
- [91] International Conference on Harmonization, ICH Q6A. Note for Guidance Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances; 2000 May.

- [92] Błażewicz A, Fijałek Z, Samsel K. Determination of piperuconium bromide and its impurities in pharmaceutical preparation by high performance liquid chromatography with coulometric electrode array detection. *J Chromatograph A* 2008;
- [93] El-Gobashy MR, Yehia AM, Mostafa AA. Application of membrane-selective electrodes for determination of pioglitazone hydrochloride in the presence of its acid degradant or metformin hydrochloride in tablets and plasma. *Anal let* 2009 Jan; 42 (1): 123-140.
- [94] Hassan SS, Amer MM, Soheir A, El-Fatah A, Amira M, El-Kosasy. Microcoated wire sensors for the determination of anticancer drugs cyclophosphamide and ifosphamide in the presence of their degradates. *Talanta* 1998 Aug; 46 (6): 1395-1403.
- [95] Heba M, Ramadan N, El-Laithy M. Polymeric matrix membrane sensors for stability indicating potentiometric determination of oxybutynin hydrochloride and flavoxate hydrochloride urogenital system drugs. *J AOAC Int* 2008 Nov; 91 (6): 1318-1330.
- [96] Izak EL. Chiral discrimination and enantioselective analysis of drugs: an overview. *J Pharm Sci* 2007 Jul; 96 (7): 1659-1676.
- [97] Aboul-Eneim HY, Stefan RI. Enantioselective sensors and biosensors in the analysis of chiral drugs. *Crit Rev Anal Chem* 1998 Sep; 28 (3): 259-266.
- [98] Stefan RI, Staden JFV, Aboul-Eneim HY. Molecular recognition in chiral discrimination. *Crystal Eng* 2001 Jun; 4 (2-3): 113-118.
- [99] Stefan RI, Staden JFV, Aboul-Eneim HY. Design and use of electrochemical sensors in enantioselective high throughput screening of drugs. *Combinat Chem High Throughput Screening* 2000 Dec; 3 (6): 445-454.
- [100] Stefan RI, Staden JFV, Aboul-Eneim HY. Analysis of chiral drugs with enantioselective biosensors. *Electroanal* 1999 Nov; 11 (16): 1233-1235.
- [101] Aboul-Eneim HY, Stefan RI, Staden JFV. Analysis of several angiotensin converting enzyme inhibitors using potentiometric enantioselective membrane electrodes. *Anal Lett* 1999; 32 (4): 623-632.

- [102] Katakya R, Parker D, Kelly PM. Potentiometric enantioselective sensors of alkyl and aryl ammonium ions of pharmaceutical significance, based on lipophylic cyclodextrins. *Scand J Clin Lab* 1995 Aug; 55 (5): 409-419.
- [103] Varesio E, Veuthey JL. Chiral separation of amphetamines by high-performance capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 1995 Nov; 717 (1): 219-228.
- [104] Herráez-Hernández R, Campins-Falco P, Verdu-Andres J. Strategies for the enantiomeric determination of amphetamine and related compounds by liquid chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 2002 Dec; 54 (1-3): 147-167.
- [105] Leite RA, Lino ACS, Takahata Y. Inclusion compounds between  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -cyclodextrins: iron II lactate: a theoretical and experimental study using diffusion coefficients and molecular mechanics. *J Mol Struct* 2003 Jan; 644 (1-3): 49-53.
- [106] Gal JF, Stone M, Lebrilla CB. Chiral recognition of non-natural  $\alpha$ -amino acids. *Int J Mass Spectrom* 2003 Jan; 222 (1-3): 259-267.
- [107] Jover A, Budal RM, Al-Soufi W, Meijide F, Tato JV, Yunes RA. Spectra and structure of complexes formed by sodium fusidate and potassium helvolate with  $\beta$  and  $\gamma$ -cyclodextrin. *Steroids* 2003 Jan; 68 (1): 55-64.
- [108] Bressolle F, Audran M, Pham TN, Vallon JJ. Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: Basic Principles and new developments. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996 Dec; 687 (2): 303-336.
- [109] Herráez-Hernández R, Campins-Falco P. Chiral separation of ephedrines by liquid chromatography using  $\beta$ -cyclodextrins. *Anal Chim Acta* 2001 May; 434 (2): 315-324.
- [110] Chankvetadze B. Native and derivatized cyclodextrins as chiral selectors in capillary electrophoresis, chapter 4. In: Jhon Wiley & Sons Inc. *Capillary electrophoresis in chiral analysis*. New York; 1997. pp 141-228.
- [111] Stalcup A. Cyclodextrin bonded chiral stationary phases in enantiomer separations, chapter 5. In: Subramanian, G. Eds. *A practical approach to chiral separations by liquid chromatography*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany; 1994. pp 95-114.

- [112] Li W, Rossi TH. Derivatized cyclodextrins as chiral gas chromatographic stationary phases and their potential applications in the pharmaceutical industry, chapter 5. In: Aboul-Enein HY, Wainer IW. Eds. Jhon Wiley & Sons Inc. The impact of stereochemistry on drug development and use. New York; 1997.pp 415-436.
- [113] Upadhyay SK, Kumar G. NMR and molecular model studies on the interaction of fluconazole with  $\beta$ - ciclodextrin. Chem Central J 2009 Aug; 3 : 1-9.
- [114] Stefan RI, Staden JFV, Aboul-Enein HY. A new construction for a potentiometric, enantioselective membrane electrode-its utilization to the S-Captopril assay. Talanta 1999 May; 48 (5): 1139-1143.
- [115] Stefan RI, Staden JFV, Aboul-Enein HY. Detection of S-enantiomers of Cilazapril, Pentopril and Trandolapril using a potentiometric, enantioselective membrane electrode. Electroanal 1999; 11 (3): 192-194.
- [116] Aboul-Enein HY, Stefan RI, Staden JFV. Potentiometric enantioselective membrane electrode for S-Enalapril assay. Analisis 1999 Jan; 27 (1): 53-56.
- [117] Ozoemena KI, Stefan RI, Staden JFV, Aboul-Enein HY. Enantioanalysis of S-Perindopril using different cyclodextrin based potentiometric sensors. Sensor Actuat B Chem 2005 Mar; 105 (2): 425-429.
- [118] RI Stefan, Staden JFV, Aboul-Enein HY. S-Peridopril assay using a potentiometric enantioselective membrane electrode. Chirality 1999; 11 (8): 631-634.
- [119] Stefan RI, Staden JFV, Mashile TR. Enantioselective assay of S(+)-Ibuprofen using enantioselective, potentiometric membrane electrodes based on maltodextrins. Sensor Actuat B Chem 2006 Dec; 120 (1): 295-297.
- [120] Vaze VD, Srivastava AK. Determination of pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical preparations by calixarene based potentiometric sensor. J Pharm Biomed Anal 2008 May; 47 (1): 177-182.
- [121] Mostafa GAE. Potentiometric membrane sensors for the selective determination of pyridoxine hydrochloride (vitamin B6) in some pharmaceutical formulations. J Anal Chem 2003; 58 (11): 1196-1199.

[122] Lima JLFC, Montenegro MCBSM, Silva AMR. Vitamins B1 and B6 tubular electrodes as FIA detectors; their use in the analysis of pharmaceutical products. *J Pharm Biomed Anal* 1991; 9 (10-12): 1041-1046.

[123] Fernandes RN, Sales MGF, Reis BF, Zagatto EAG, Araújo AN, Montenegro MCBSM. Multi-task flow system for potentiometric analysis: its application to determination of vitamin B6 in pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal* 2001 Jul; 25 (5-6): 713-720.

[124] Pires AR, Araújo AN, Montenegro MCBSM, Chocholous P, Solich P. New ionophores for vitamin B1 and vitamin B6 potentiometric sensors for multivitaminic control. *J Pharm Biomed Anal* 2008 Mar; 46 (4): 683-691.

[125] Pires AR, Araújo AN, Lopes JA, Montenegro MCBSM. Simultaneous potentiometric determination of thiamine and pyridoxine in multivitamins using a single cyclodextrin-based thiamine selective electrode. *Anal Lett* 2009 Jan; 42 (13): 1923-1939.

[126] Ribeiro CMF, Matos CD, Sales MGF, Vaz MCVF. Citrate selective electrodes for the flow injection analysis of soft drinks, beers and pharmaceutical products. *Anal Chim Acta* 2002 Oct; 471 (1): 41-49.

[127] Vissers B, Bhoets H, Everaert J, Cool P, Vansant EF, Nagels LJ et al. Characteristics of new composite and classical potentiometric sensors for the determination of pharmaceutical drugs. *Electrochim acta* 2006 Jul; 51 (24): 5062-5069.

[128] Nagels LJ. Potentiometric detection for high performance liquid chromatography is a reality: Which classes of organic substances are targets? *IUPAC Pure Appl Chem* 2004; 76 (4): 839-845.

[129] Vissers B, Everaert J, Justyna S, Malak A, Bhoets H, Nagels LJ et al. Unique potentiometric detection systems for HPLC determination of some steroids in human urine. *J Separ Sci* 2009 Jan; 32 (2): 167-179.

[130] Bazylak G, Nagels LJ, Geise HJ. Potentiometric quasi-array employing calixarene derivatives for the high throughput similarity/ diversity screening of beta-adrenergic and beta blocking chiral drugs by HPLC. *Comb Chem High Throughput Screen* 2004 Jun; 7 (4): 345-359.



- [131] Bazylak G, Nagels LJ. Integrated acquisition of analytical and biopharmaceutical screening data for beta-adrenergic drugs employing diversified macrocycle supported potentiometric detection in HPLC systems. *Curr Med Chem* 2009 Aug; 9 (16): 1547-1566.
- [132] Nagels LJ, Everaert J, Bhoets H, Del Favero J, Goossens D, Pietraszkiewicz O et al. Response of DNA fragments to potentiometric sensors studied using HPLC. *Comb Chem High Throughput Screen* 2007 Aug; 10 (7): 555-559.
- [133] Bao Y, Everaert J, Pietraszkiewicz M, Pietraszkiewicz O, Bhoets H, Nagels LJ et al. Behaviour of nucleotides and oligonucleotides in potentiometric HPLC detection. *Anal Chim Acta* 2005 Sep; 550 (1-2): 130-136.
- [134] Bazylak G, Nagels L. Simultaneous high-throughput determination of Clenbuterol, Ambroxol and Bromhexine in pharmaceutical formulations by HPLC with potentiometric detection. *J Pharm Biomed Anal* 2003 Aug; 32 (4-5): 887-903.
- [135] Bazylak G, Nagels L, Monge ME. Macrocycle *versus* Podant-type Neutral Ionophore in Potentiometric detection of mucolytic agents following separation by various HPLC modes. *Chromatographia* 2003 Jun; 57 (11/12): 757-765.
- [136] Azarmi S, Roa W, Löbenberg R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *Int J Pharm* 2007 Jan; 328 (1): 12-21.
- [137] Wang Q, Ma D, Higgins JP. Analytical method selection for drug product dissolution testing. *Dissolut Technol* 2006 Aug; 13 (33): 6-13.
- [138] Fang ZL, Fang Q, Liu XZ, Chen HW, Liu CL. Continuous monitoring in drug dissolution testing using flow injection systems. *TrAC* 1999 Apr; 18 (4): 261-271.
- [139] Pimenta AM, Montenegro MCBSM, Araújo AN, Calatayud JM. Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal* 2006 Jan; 40 (1): 16-34.
- [140] El-Sayed AAY, El-Salem NA. Recent Developments of derivative spectrophotometry and their analytical applications. *Anal Sci* 2005 Jun; 21 (6): 595-614.
- [141] Pires AR, López DM, Calatayud JM. Obtaining simultaneous multiple dissolution profiles of solid oral dosage formulations. *Pharm Technol Eur* 2010 May; 22 (5): 56-62.
- [142] Jhoansson J, Cauchi M, Sundgren M. Multiple fiber-optic dual beam UV/Vis system with application to dissolution testing. *J Pharm Biomed Anal* 2002 Jul; 29 (3): 469-476.

- [143] Aboul-Enein HY, Stefan RI. The opportunity to use ion-selective membrane electrodes for dissolution tests. *Instrum Sci Technol* 1999 Apr; 27 (2): 89-93.
- [144] Bohets H, Vanhoutte K, Maesschalck R, Cockaerts P, Vissers B, Nagels L. Development of in situ ion selective sensors for dissolution. *Anal Chim Acta* 2007 Jan; 581 (1): 181-191.
- [145] Peeters K, Maesschalck R, Bohets H, Vanhoutte K, Nagels L. In situ dissolution testing using potentiometric sensors. *Eur J Pharm Sci* 2008 Aug; 34 (4-5): 243-249.
- [146] Vranic E, Icardo MC, Calatayud JM. Three simultaneous dissolution profiles on a solid pharmaceutical formulation by a FIA manifold provided with a single spectrophotometric detector. *J Pharm Biomed Anal* 2003 Dec; 33 (5): 1039-1048.
- [147] Tomsu D, Icardo C, Calatayud JM. Automated simultaneous triple dissolution profiles of two drugs, sulphamethoxazole-trimethoprim and hydrochlorothiazide-captopril in solid oral dosage forms by a multicommutation flow-assembly and derivative spectrophotometry. *J Pharm Biomed Anal* 2004 Nov; 36 (3): 549-557.
- [148] Liu XZ, Liu SS, Wu JF, Fang ZL. Simultaneous monitoring of aspirin, phenacetin and caffeine in compound aspirin tablets using a sequential injection drug dissolution testing system with partial least squares calibration. *Anal Chim Acta* 1999 Jun; 392 (2-3): 273-281.
- [149] Fuerte V, Maldonado M, Rees GD. The multicomponent automated dissolution system. An alternative in the development and pharmaceutical analysis of generic polydrugs. *J Pharm Biomed Anal* 1999 Nov; 21 (2): 267-272.
- [150] Markopoulou C, Malliou ET, Koundourellis JE. Application of two chemometric methods for the determination of imipramine, amitriptyline and perphenazine in content uniformity and drug dissolution studies. *J Pharm Biomed Anal* 2005 Feb; 37 (2): 249-258.
- [151] Markopoulou C, Malliou ET, Koundourellis JE. Chemometric and derivative methods as flexible spectrophotometric approaches for dissolution and assaying tests in multicomponent tablets. *Il Farmaco* 2004 Aug; 59 (8): 627-636.
- [152] Markopoulou C, Malliou ET, Koundourellis JE. Content uniformity and dissolution tests of triplicate mixtures by a double divisor-ratio spectra derivative method. *Il Farmaco* 2005 Sep; 60 (9): 755-762.

- [153] Dinç E, Serin C, Tuğcu-Demiröz F, Doğanay T. Dissolution and assaying of multicomponent tablets by chemometric methods using computer aided spectrophotometer. *Int J Pharm* 2003 Jan; 250 (2): 339-350.
- [154] Dinç E, Kökdil G, Onur F. Derivative ratio spectra-zero crossing spectrophotometry and HPLC method applied to the quantitative determination of paracetamol, propyphenazone and caffeine in ternary mixtures. *J Pharm Biomed Anal* 2001 Dec; 26 (5-6): 769-778.
- [155] Higuchi T. Mechanism of sustained action medication: theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J Pharm Sci* 1963 Dec; 52 : 1145–1149.
- [156] Gemperline PJ, Cho J, Baker B, Batchelor B, Walker DS. Determination of multicomponent dissolution profiles of pharmaceutical products by in situ fiber optic UV measurements. *Anal Chim Acta* 1997 Jun; 345 (1-3): 155-159.
- [157] Cho J, Gemperline PJ, Walker D. Wavelength calibration method for a CCD detector and multichannel fiber-optic probes. *Appl Spectrosc* 1995 Dec; 345 (12): 1841-1845.
- [158] Cho J, Gemperline PJ, Salt A, Walker D. UV/ Vis spectral dissolution monitoring by in-situ fiber optic probes. *Anal Chem* 1995 Sep; 67 (17): 2858-2863.
- [159] Paseková H, Sales MG, Montenegro MC, Araújo AN, Polášek M. Potentiometric determination of acetylsalicylic acid by sequential injection analysis (SIA) using a tubular salicylate - selective electrode. *J Pharm Biomed Anal* 2001 Mar; 24 (5-6): 1027-36.
- [160] Stefan RI, Baiulescu GE, Aboul-Enein HY. Flecainide-selective membrane electrodes. *Analisis* 1997; 25 (2): 39-42.
- [161] Stefan RI, Aboul-Enein HY. Disopyramide-selective membrane electrode. *Anal Lett* 1996; 29 (13): 2333-2346.
- [162] Stefan RI, Aboul-Enein HY, Baiulescu GE. Amiodarone-selective membrane electrode. *Sensor Actuat B-Chem* 1996 Dec; 37 (3): 141-144.
- [163] García MS, Ortuño J, Albero MI, Cuartero M. Application of trazodone-selective electrode to pharmaceutical quality control and urine analysis. *Anal Bioanal Chem* 2009 Jul; 394 (6): 1563-1567.

[164] Hassan SSM, Abdel-Aziz RM, Abbas AB. Potentiometric membrane sensors for selective determination of cinnarizine in pharmaceutical preparations. *Anal Chim Acta* 1996 Mar; 321 (1): 47-52.

[165] Solich P, Macheras PE, Koupparis MA. Construction of a diflunisal ion sensor and its use in automated flow injection methods for assay, content uniformity, and dissolution studies of formulations. *J Pharm Sci* 1995 Jul; 84 (7): 889-94.

[166] Sales MG, Montenegro MCBSM. Tetracycline Selective Electrode for content determination and dissolution studies of pharmaceuticals by flow injection analysis (FIA). *J Pharm Sci* 2001 Aug; 90 (8): 1125-33.

[167] Balimane PV, Chong S, Morrison RA. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000 Aug; 44 (1): 301-312.

[168] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry: Waiver of in vivo Bioavailability and Bioequivalence studies for Immediate Release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. 2000 Aug.

[169] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for guidance on quality of modified release products: A: oral dosage forms; B: transdermal dosage forms. Section I (quality). 1999 Jul.

[170] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for guidance on modified release oral and transdermal dosage forms: Section II (pharmacokinetic and clinical evaluation). 1999 Jul.

[171] Yu LX, Amidon GL, Polli JE, Zhao H, Mehta UM, Conner DP, et al. Biopharmaceutics Classification System: The scientific basis for biowaiver extensions. *Pharm Res* 2002 Jul; 19 (7): 921-925.

[172] Wilding IR. Evolution of the Biopharmaceutics Classification System (BCS) to oral Modified Release (MR) formulations; What do we need to consider? *Eur J Pharm Sci* 1999 Jul; 8 (3): 157-159.

[173] Dressman JB, Reppas C. In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water soluble drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000 Oct; 11 (2): 573-580.

- [174] In vitro and in vivo evaluation of dosage forms (1088). In United States Pharmacopoeia: USP 30: The National Formulary: NF 25. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2007.
- [175] Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res* 1995 Mar; 12 (3): 413-420.
- [176] Papadopoulou V, Valsami G, Dokoumetzidis A, Macheras P. Biopharmaceutics classification systems for new molecular entities (BCS-NMEs) and marketed drugs (BCS-MD): Theoretical basis and practical examples. *Int J Pharm* 2008 Sep; 361 (1-2): 70-77.
- [177] Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption process. *J Med Chem* 1998 Mar; 41 (7): 1007-1010.
- [178] Loftsson T, Konrádssdóttir F, Másson M. Development and evaluation of an artificial membrane for determination of drug availability. *Int. J. Pharm* 2006 Dec; 326 (1-2): 60-68.
- [179] Corti G, Maestrelli F, Cirri M, Furlanetto S, Mura P. Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption: I. Assessment of artificial membrane composition. *Eur J. Pharm Sci* 2006 Mar; 27 (4): 346-353.
- [180] Faller B, Grimm HP, Loeuillet-Ritzler F, Arnold S, Briand X. High-throughput lipophilicity measurement with immobilized artificial membranes. *J. Med. Chem* 2005 Apr; 48 (7): 2571-2576.
- [181] Rolland A, Demichellis JC, Shroot B. Influence of formulation, receptor fluid and occlusion, on in vitro drug release from topical dosage forms, using an automated flow through diffusion cell. *Pharm Res* 1992 Jan; 9 (1): 82-86.
- [182] Klimundová J, Mervartová K, Sklenářová H, Solich P, Polášek M. Automated sequential injection fluorimetric set-up for multiple release testing of topical formulation. *Anal Chim Acta* 2006 Jul; 573-574: 366-370.
- [183] Sales MGF, Reis BF, Montenegro MCBSM. Automatic multicommutated flow system for diffusion studies of pharmaceuticals through artificial enteric membrane. *J Pharm Biomed Anal* 2001 Aug; 26 (1): 103-109.

- [184] Sugawara M, Kadomura S, He X, Takekuma Y, Kohri N, Miyazaky K. The use of an in vitro dissolution and absorption system to evaluate oral absorption of two weak bases in pH-independent controlled release formulations. *Eur J. Pharm Sci* 2005 Sep; 26 (1): 1-8.
- [185] Ferreira P, Serra H, Pedro JM, Graça A, Simplício AL, Optimização de um método de avaliação simultânea da dissolução e permeabilidade de fármacos. *Saúde & Tecnologia* 2008 Nov; 2: 38-44.
- [186] Motz SA, Klimundová J, Schaefer UF, Balbach S, Eichinger T, Solich P, et al. Automated measurement of permeation and dissolution of propranolol HCl tablets using sequential injection analysis. *Anal. Chim. Acta* 2007 Jan; 581 (1): 174-180.
- [187] Motz SA, Schaefer UF, Balbach S, Eichinger T, Lehr CM. Permeability assessment of solid oral drug formulations based on Caco-2 monolayer in combination with a flow through dissolution cell. *Eur J Pharm Biopharm* 2007 May; 66 (2): 286-295.
- [188] Motz SA, Schaefer UF, Balbach S, Eichinger T, Lehr CM. Transactions of the 32<sup>nd</sup> Meeting of the Controlled Release Society, Miami Beach, FL, USA, 2005.
- [189] Ginski MJ, Taneja R, Polli JE. Prediction of Dissolution-Absorption Relationships from a continuous Dissolution Caco-2 System. *AAPS Pharmsci* 1999 Jun; 1 (3): 1-12.
- [190] Kobayashi M, Sada N, Sugawara M, Iseki K, Miyasaki K. Development of a new system for prediction of drug absorption that takes into account drug dissolution and pH change in the gastro-intestinal tract. *Int. J. Pharm* 2001 Jun. 221 (1-2): 87-94.
- [191] He X, Sugawara M, Kobayashi M, Takekuma Y, Miyazaki K. An in vitro system for prediction of oral absorption of relatively water-soluble drugs and ester prodrugs. *Int. J. Pharm* 2003 Sep. 263 (1): 1-8.
- [192] Nouredine N, Zerrouk N, Nicollis I, Allain P, Sfar S, Chaumeil JC. Characterization of the absorption of Theophiline from immediate and controlled-release dosage forms with a numerical approach using the in vitro dissolution permeation process using Caco-2 cells. *Drug Dev Ind Pharm* 2005 May; 31 (4-5): 397-404.

# CAPÍTULO II

## Aspectos Gerais da Parte Experimental





Desejavelmente, a realização dos ensaios de doseamento, de dissolução ou de permeabilidade dever-se-á efectivar por recurso a metodologias expeditas, robustas e pouco poluentes do ponto de vista ambiental. Para além disso, dado o carácter repetitivo com que são frequentemente utilizadas, deverão ser automatizáveis para que, quando pretendido, o ritmo analítico seja elevado sem acréscimo proporcional de custos de operação e manutenção. Neste contexto, propõe-se nesta dissertação explorar a técnica de automatização de análise por injeção sequencial (SIA), tendo como processo de detecção a potenciometria com eléctrodos selectivos a ião, de membrana plástica.

Embora nos capítulos que se seguem sejam indicadas as condições experimentais específicas usadas para efectuar cada um dos trabalhos, esta secção pretende fornecer uma descrição mais objectiva dos aspectos gerais de índole prática, porventura menos perceptíveis, aquando da realização dos mesmos trabalhos.

Encontra-se organizado de tal modo que, numa primeira fase, se expõem genericamente o tipo de reagentes utilizados e o modo de preparação das soluções, seguindo-se a descrição dos equipamentos e materiais necessários para a execução do trabalho experimental. Pela sua importância no decorrer da tese, aponta-se com algum detalhe os componentes constantes dos sistemas de análise por injeção sequencial, com destaque para as modificações estruturais necessárias consoante os objectivos pretendidos.

Posteriormente, são pormenorizados os passos executados para a construção dos corpos de eléctrodos selectivos a ião, de configuração convencional e tubular, assim como a preparação e o processo de deposição das respectivas membranas sensoras.

Segue-se a descrição dos procedimentos efectuados na avaliação das características das unidades potenciométricas de configuração convencional e tubular, bem como das expressões numéricas que definem alguns dos parâmetros estudados e dos métodos utilizados para a optimização da resposta analítica dos ESIs, em condições hidrodinâmicas de fluxo. Neste caso, consideram-se não só as calibrações com soluções contendo uma espécie (capítulos III, I e VI), como aquelas compostas por dois analitos em estudo (capítulo IV).

Por último, evidencia-se a utilidade prática das unidades potenciométricas construídas, através da descrição do modo de aplicação a amostras farmacêuticas multi-componente, referindo genericamente os procedimentos e cálculos efectuados, bem como os métodos utilizados para aferição da qualidade dos resultados obtidos.

## 1. Reagentes e Preparação de Soluções

### 1.1. Reagentes, Soluções e Meios de dissolução

Todos os procedimentos analíticos descritos nos capítulos que se seguem foram desenvolvidos com recurso a reagentes de qualidade analítica p.a ou idêntica, sem tratamento adicional de purificação. Na preparação das soluções utilizou-se água desionizada com condutividade  $\leq 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ , obtida através de um sistema de osmose inversa da marca Millipore RG.

Todas as soluções *stock* foram obtidas por pesagem rigorosa, em balança analítica ( $\pm 0,00001$  g) da massa do(s) composto(s), transferência quantitativa para balão aferido e dissolução em água, ou solução com ajuste de força iónica, ou de pH. As soluções eram armazenadas a cerca de 9 °C no frigorífico, por períodos não superiores a uma semana em frascos de vidro ou de plástico, permanecendo assim na ausência de luz e a temperatura reduzida. As soluções mais diluídas preparavam-se a partir das soluções concentradas, anteriormente descritas, por transferência de volumes rigorosamente medidos, quer usando pipetas volumétricas de classe A, quer pipetas automáticas devidamente calibradas.

Na preparação das soluções de vitaminas descritas nos capítulos III e IV utilizaram-se balões volumétricos de cor âmbar ou, alternativamente, envolvidos em papel metalizado, para ficarem convenientemente protegidas da luz.

A preparação dos meios de dissolução utilizados para a realização dos ensaios de dissolução é descrita com pormenor nos capítulos V e VI. De um modo geral, aqueciam-se as soluções tampão a cerca de 40°C, com agitação, e subsequente filtração por vácuo, utilizando um por filtro Milipore 0,45  $\mu\text{m}$ . Este procedimento assegura a degaseificação dos meios de dissolução, evitando a formação de bolhas à superfície das formulações, o que poderia ter impacto na sua dissolução, conforme especificado na USP *Pharmacopeia* [1]. Antes do início do ensaio propriamente dito, transferiam-se os meios para o vaso de dissolução, a fim de estabilizar a temperatura nos 37°C  $\pm 0,5$ .

## 1.2. Preparação de Amostras para Análise

A validade da aplicação analítica dos métodos desenvolvidos foi sempre comprovada por análise de formulações farmacêuticas disponíveis no mercado nacional. Para esse efeito, seleccionaram-se medicamentos dispensados nas farmácias portuguesas. Nos trabalhos descritos nos capítulos III e IV, as matrizes analisadas foram comprimidos e injectáveis polivitamínicos que, para além das espécies químicas de interesse (tiamina e piridoxina) eram constituídas por um conjunto de outras vitaminas e minerais, conforme detalhado nos referidos capítulos.

De um modo geral, cerca de 20 comprimidos do mesmo lote de uma dada formulação farmacêutica, eram sujeitos a pulverização inicial e homogeneização em almofariz de porcelana. Em seguida, pesava-se uma quantidade rigorosa de pó, que era quantitativamente transferido para balão volumétrico e dissolvido numa solução de ajustador de força iónica. Quando necessário, efectuavam-se os ajustes adicionais de pH e de diluição, a fim de garantir que a espécie de interesse se encontrava inserida na gama de resposta analítica do eléctrodo. No caso das amostras de injectáveis, homogeneizou-se o conteúdo de 5 ampolas e mediu-se rigorosamente um volume adequado, para diluição com ajustador de força iónica, até obtenção da concentração alvo.

Para os trabalhos descritos nos capítulos V e VI, foram seleccionados comprimidos e cápsulas de libertação modificada, disponíveis no mercado português, (medicamentos genéricos e de marca), compostos por diferentes dosagens e proporções da mistura ácido valpróico/ valproato de sódio. Nestes casos, não foi realizado qualquer processamento prévio das amostras, dado que a aplicação consistia na realização de ensaios de dissolução (capítulo V) e ensaios de dissolução acoplados a ensaios de permeabilidade (capítulo VI). Nos ensaios de dissolução, introduzia-se uma unidade da formulação a testar (comprimido ou cápsula) no interior do vaso de dissolução contendo o meio previamente filtrado e aquecido a 37°C, esperava-se que a forma unitária se afundasse no interior do vaso, iniciando-se de imediato a rotação da pá, concomitantemente com o sistema automático de análise por injeção sequencial (SIA), de acordo com as condições reportadas nos respectivos trabalhos.

No caso das formas farmacêuticas do tipo cápsula, recorreu-se a um *sinker* elaborado manualmente, segundo o procedimento descrito em [1]. Utilizou-se para este efeito um fio de aço inoxidável (material não reactivo), que foi cortado ao tamanho

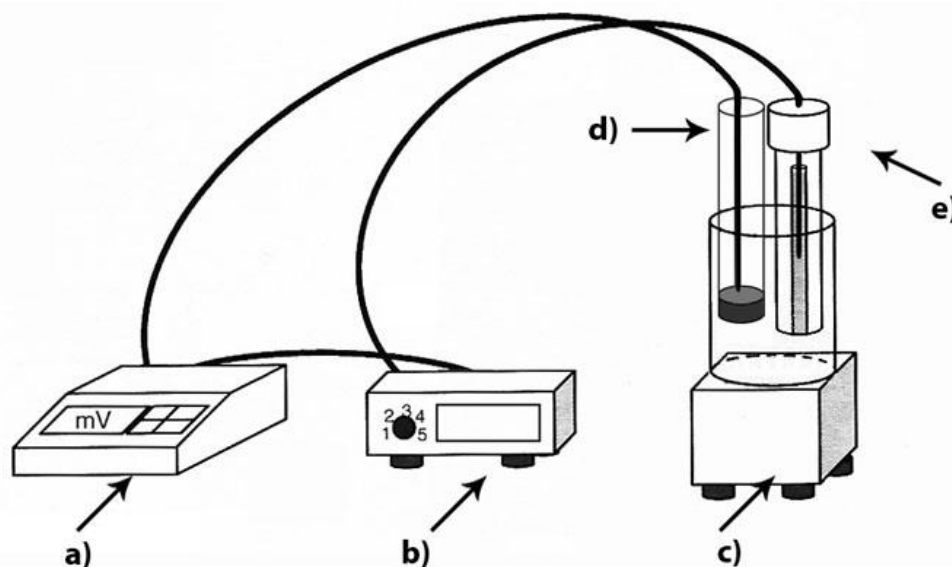
pretendido e enrolado em hélice, usando como suporte um cilindro oco de acrílico de dimensão adequada. A cápsula era introduzida no *sinker* anteriormente à realização do ensaio de dissolução, o que lhe permitia não flutuar uma vez inserida no meio de dissolução.

## **2. Equipamento e Materiais Utilizados no Decurso do Trabalho Experimental**

### *2.1. Equipamento de Uso Geral*

Todas as pesagens de reagentes ou de amostras foram realizadas com recurso a uma balança analítica da marca Mettler Toledo, modelo AG285 (precisão de  $\pm 0,00001$ ). As transferências de sólidos executaram-se por meio de funis de sólidos para balões volumétricos de vidro, de classe A. Tal como já foi referido, nos trabalhos do capítulo III e IV, utilizaram-se balões de vidro âmbar a fim de proteger as soluções da luz. Para a medição de volumes inferiores a 5 ml, recorreu-se a pipetas automáticas Gilson, modelos P20, P100, P1000 e P5000. Os volumes superiores a 5 ml mediam-se com pipetas volumétricas de vidro, classe A.

Na avaliação das características das unidades potenciométricas de configuração convencional recorreu-se a um eléctrodo de referência Orion 90-02-00 de dupla junção AgCl / Ag e um decimilivoltímetro, com entrada de elevada impedância, da marca Crison micropH 2002 (sensibilidade  $\pm 0,1$  mV) com conexão a um comutador de eléctrodos, Orion 605, de acordo com a montagem proposta em [2], conforme se exemplifica na Figura 1.



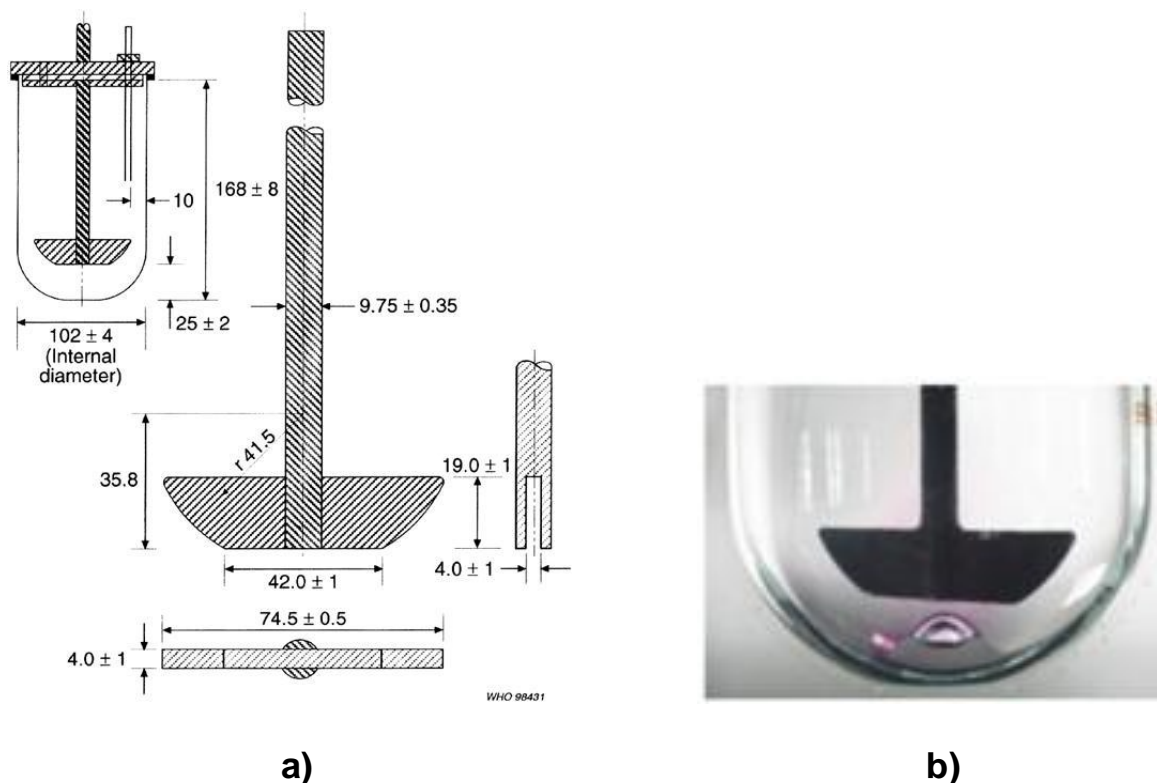
**Figura 1- Montagem para avaliação das características das unidades potenciométricas de configuração convencional. Legenda: a) Decimilivoltímetro; b) Comutador; c) Agitador magnético; d) Eléctrodo seletivo a ião; e) Eléctrodo de referência.**

Em cada trabalho, preencheu-se o compartimento externo do eléctrodo de referência com uma solução electrolítica, cuja natureza não constituísse interferência na resposta dos eléctrodos indicadores. Nos trabalhos descritos nos capítulos III e IV, essa solução era de LiCl 0,1 M. No capítulo V usou-se MES (ácido 2-morfolinoetanosulfónico) 0,01 M pH 6,8, e no capítulo VI tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5.

Para homogeneizar as soluções recorria-se a um agitador magnético da marca Crison, modelo 2038.

A fim de proceder à realização dos diagramas de Reilley, para o estudo da influência do pH na resposta das unidades potenciométricas (capítulo III), utilizou-se um eléctrodo de vidro Phillips GAH 110, o qual se ligava ao comutador de eléctrodos.

Os ensaios de dissolução (capítulos V e VI) realizavam-se no aparelho I da Farmacopeia Europeia (pá) [3], mais precisamente num aparelho de uma única unidade ErweKa DT (Germany) equipado com uma pá, e uma célula Peak Vessel (Vankel, USA). As dimensões da pá, em mm, apresentam-se na Fig.2a. O vaso utilizado não é compendial (Fig. 2b), e difere da tina de dissolução descrita na Farmacopeia, por apresentar uma ligeira elevação no fundo, ao centro, com o intuito de prevenir a ocorrência de fenómenos de *coning*, isto é, a acumulação de excipientes, susceptível de alterar o processo de dissolução da formulação.



**Figura 2- a) Dimensões da pá e do vaso de dissolução (em mm), usada no equipamento de dissolução de uma unidade. Esquema reproduzido da Farmacopeia Europeia [3]; b) Fotografia de um vaso de dissolução Peak Vessel.**

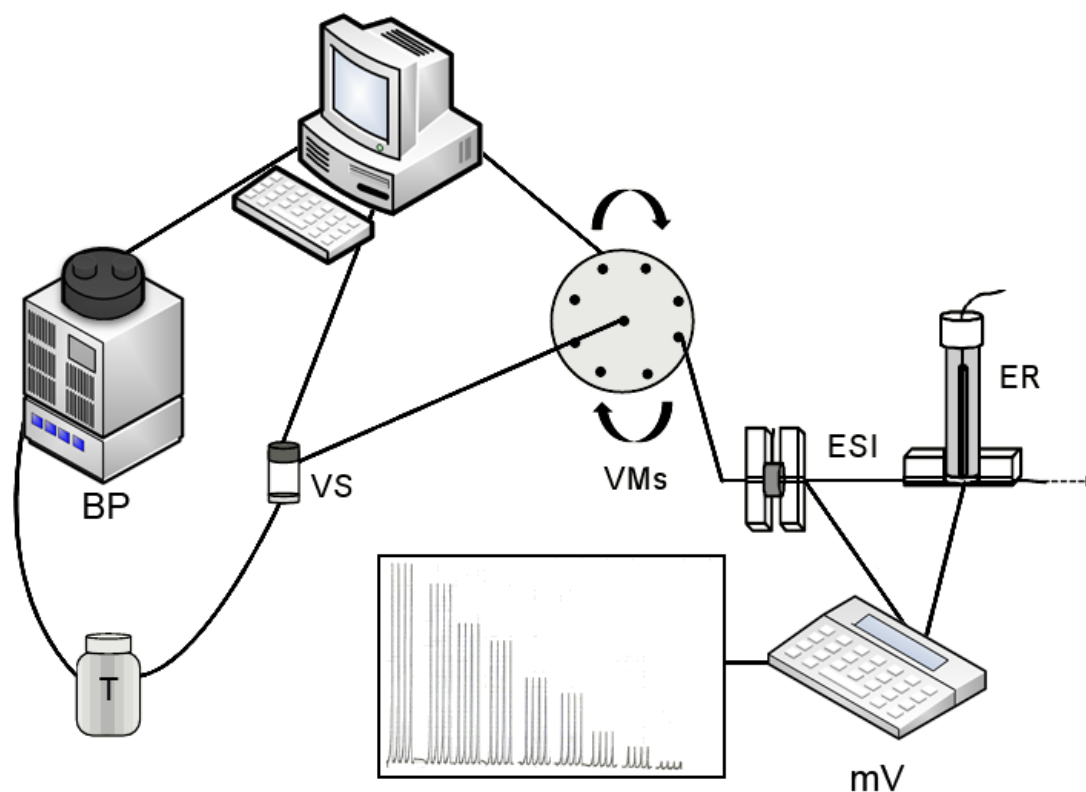
Para o estudo da permeabilidade do anião valproato (capítulo VI), usaram-se como membranas artificiais as da Sartorius, SM 16754, constituídas por um suporte de nitrato de celulose impregnado com diferentes soluções, consoante o tipo de membrana pretendida (simulação do meio gástrico ou entérico).

## 2.2. Sistemas de Fluxo de Análise por Injecção Sequencial (SIA)

Algumas das aplicações foram avaliadas quanto ao seu desempenho numa vertente automatizada (ver capítulos IV, V e VI), tendo sido desenvolvida, para o efeito, uma montagem baseada na técnica de análise por injecção sequencial. A estrutura básica da montagem foi alterada consoante os detectores utilizados e as aplicações efectuadas, isto é, se o intuito era, respectivamente, realizar ensaios de doseamento, de dissolução ou de permeabilidade. No entanto, recorreu-se sempre a detectores potenciométricos de configuração tubular, cuja construção será descrita em seguida.

De um modo geral, a avaliação em condições de fluxo das características das unidades potenciométricas de configuração tubular foi realizada com recurso a um módulo de acrílico colocado em fim de linha, que albergava um eléctrodo de referência AgCl/Ag, de dupla junção, Orion 90-02-00, tal como acontecia nos ensaios com eléctrodos convencionais. Para permitir o registo analítico, utilizou-se um registador da marca Kipp and Zonen BD 111 conectado ao decimilivoltímetro. Excepcionalmente, no capítulo V, com o intuito de efectivar a determinação simultânea dos iões sódio e valproato, substituiu-se o eléctrodo de referência pelo eléctrodo tubular de valproato, igualmente conectado à entrada de referência do decimilivoltímetro e funcionando assim como eléctrodo de referência relativamente ao primeiro.

Na montagem de fluxo implementada, o sistema de propulsão usado era composto por uma bomba peristáltica Minipuls 3 Gilson (Villiers-le-Bell, França) equipado com um tubo de propulsão em PVC ( $\varnothing=1,65$  mm) da mesma marca. Utilizou-se como dispositivo selector de fluídos uma válvula rotatória de 8 entradas seleccionáveis e uma saída, da marca Valco Instruments (Huston, USA), modelo C25-3118. De acordo Araújo et al [4], incorporou-se uma válvula solenóide de três vias (161T031 N Research) entre a bomba peristáltica e o reactor tubular de armazenamento, de modo a permitir uma maior reprodutibilidade dos volumes aspirados e bombeados (Fig.3).



**Figura 3 – Esquema geral do sistema SIA utilizado nos trabalhos dos capítulos IV, V e VI. Legenda: BP- Bomba peristáltica; T- Solução transportadora; VS- Válvula solenóide; VMs- Válvula multi-seletores de 8 portas; ESI – Eléctrodo seletivo a ião; ER – Eléctrodo de referência; mV- Milivoltímetro. Os diversos componentes apresentados não estão à escala.**

A unidade propulsora, as válvulas e os eléctrodos foram ligados entre si através de um percurso tubular construído com tubo de PTFE bem calibrado, da marca Omnifit, com 0,8 mm de diâmetro interno. Faziam também parte da sua composição suportes de acrílico maquinados em oficina especializada, para os eléctrodos de referência e tubular. As particularidades referentes a cada sistema proposto serão reportadas oportunamente, aquando da descrição mais detalhada dos trabalhos.

Para permitir o trabalho descrito no capítulo VI, usou-se adicionalmente uma segunda bomba peristáltica Minipuls 3 Gilson (Villiers-le-Bell, França), com tubos de propulsão em PVC ( $\varnothing=1,65$  mm), da mesma marca. Uma das bombas funcionava independentemente do sistema SIA e fazia a recirculação de meio de dissolução por uma das entradas da câmara de difusão. A outra bomba estava integrada no sistema SIA e conectada à válvula selectora de 8 portas acima descrita. Neste caso, não foi usado um reactor tubular de armazenamento, uma vez que o efeito de dispersão por este introduzido diminuía consideravelmente a sensibilidade do sinal. Primeiramente, ligava-se a bomba peristáltica responsável pela recirculação do meio de dissolução e, após a



introdução da forma farmacêutica no vaso de dissolução, iniciavam-se concomitantemente a agitação da pá e o sistema SIA.

A fim de garantir que as condições transientes de medida dos sinais analíticos eram reprodutíveis, tornou-se necessário, em algumas aplicações (capítulos V e VI), minorar o efeito causado pela presença espúria de pequenas bolhas de ar. Para o efeito, usaram-se dispositivos desborbulhadores (006BT Omnifit, equipados com membranas PTFE 006BTM) posicionados na linha de transmissão, a montante do (ou dos) detector (es) potenciométrico (s). Adicionalmente, para minimizar a circulação através do sistema tubular de materiais insolúveis em suspensão, resultantes do processo de dissolução das formas farmacêuticas de libertação modificada, que pudessem ocasionar bloqueio do escoamento líquido, introduziu-se na ponta do tubo colector um filtro de algodão.

Em todas as montagens, a velocidade de rotação da bomba peristáltica, a posição do rotor da válvula de 8 portas, assim como o estado da válvula solenóide eram controlados via uma interface PCL-711 Advanced, por um programa desenvolvido em linguagem Quick Basic 4.5. Este último era visualizado no monitor do computador sob a forma de uma matriz com 4 colunas correspondendo, respectivamente, ao número da porta da válvula seleccionada, ao tempo de permanência da válvula nessa porta, à velocidade de rotação da bomba e ao sentido de rotação da bomba (aspiração ou bombeamento). Para além disso, por activação de uma 5ª coluna, era permitido controlar o número de ciclos abertura/ fecho de uma válvula solenóide, bem como a percentagem de tempo que a referida válvula permanecia aberta e fechada. Esta aplicação foi utilizada no trabalho descrito no capítulo IV.

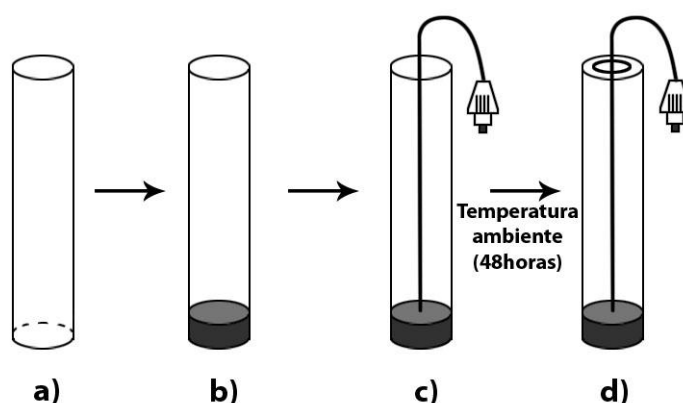
O ciclo analítico obtinha-se desta forma, pelo preenchimento da (ou das) linha (s) do quadro, podendo estas ser repetidas ou os parâmetros alterados, consoante as necessidades. Para cada um dos trabalhos desenvolvidos, as particularidades referentes à optimização do ciclo analítico são referidas com pormenor nos capítulos correspondentes.

### 3. Construção e Avaliação das Características das Unidades Potenciométricas

#### 3.1. Configuração dos Eléctrodos Desenvolvidos

Os eléctrodos construídos e utilizados para a realização do trabalho descrito no capítulo III eram de configuração convencional, bem como algumas das unidades desenvolvidas ao longo do trabalho constante do capítulo V.

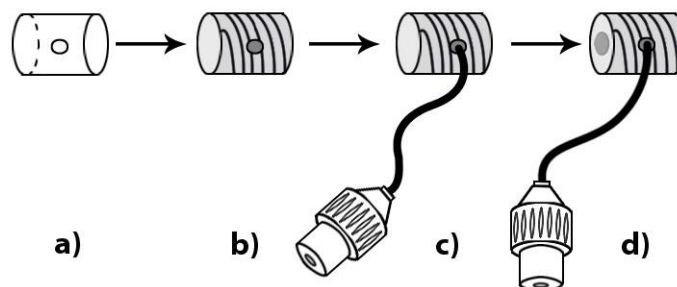
A construção envolvia a preparação de corpos de eléctrodos de acordo com a metodologia descrita por Lima et al. [5]. Foram utilizados cilindros de acrílico ocos, com dimensões de aproximadamente 120 mm de comprimento, 7 mm de diâmetro interno e 10 mm de diâmetro externo (Fig. 4a). Os cilindros eram fechados numa das extremidades por preenchimento do seu interior com uma pasta condutora (resistência inferior a  $10\Omega$ ), até a uma altura de cerca de 6 mm. Para preparar a pasta, homogeneizava-se convenientemente uma mistura composta por Araldite M, endurecedor HY 5162 e grafite em pó, misturados nas proporções relativas de 33%, 13% e 54% (p/p) respectivamente (Fig. 4b). Na extremidade oposta do cilindro introduzia-se um cabo coaxial blindado, com cerca de 25 cm de comprimento, cujo fio de cobre interno contactava directamente com o suporte condutor de grafite. O conjunto mantinha-se em repouso por 48 horas, à temperatura ambiente. Durante este período ocorria a polimerização e o endurecimento da mistura Araldite/ Endurecedor, bem como a retenção eficiente do fio de cobre interno (Fig. 4c). Os passos seguintes incluíam a fixação do cabo coaxial blindado com uma borracha na parte superior (Fig.4d) e a abrasão da superfície de grafite com uma lixa Rhynowood P240.



**Figura 4 – Etapas de construção de um electrodo selectivo a ião (ESI) de configuração convencional.**

Este procedimento era realizado com o intuito de criar uma depressão com cerca de 1mm de profundidade na pasta condutora, que permitisse posteriormente alojar a membrana sensora dos electrodos. Por último, utilizava-se papel absorvente embebido em tetrahydrofurano (THF) para a eliminação de resíduos, como poeiras, existentes na superfície condutora.

Para aplicação dos sensores nos sistemas automáticos de fluxo desenvolvidos, recorreu-se a electrodos de configuração tubular. A sua construção baseou-se na preparação de cilindros de acrílico, ocos, com aproximadamente 10 mm de comprimento, 7 mm de diâmetro interno e 10 mm de diâmetro externo, contendo um pequeno orifício na parede lateral para introdução do cabo eléctrico coaxial. (Fig.5a). Introduziu-se e compactou-se a pasta de grafite de modo a preencher a totalidade da cavidade do cilindro (Fig 5b) e, seguidamente, fixou-se o fio de cobre interno do cabo coaxial blindado com cerca de 25 cm de comprimento, a fim de estabelecer a ligação eléctrica (Fig. 5c). O processo de secagem e regularização da superfície condutora realizou-se em condições similares às descritas anteriormente para os electrodos convencionais, assim como a limpeza com auxílio de papel absorvente embebido em THF. Depois de devidamente seca, a pasta condutora era perfurada longitudinalmente, com o auxílio de uma broca de 1,5 mm (Fig. 5d), de modo a permitir o revestimento interno posterior com a membrana sensora.



**Figura 5-** Etapas de construção de um electrodo selectivo a ião (ESI) de configuração tubular.

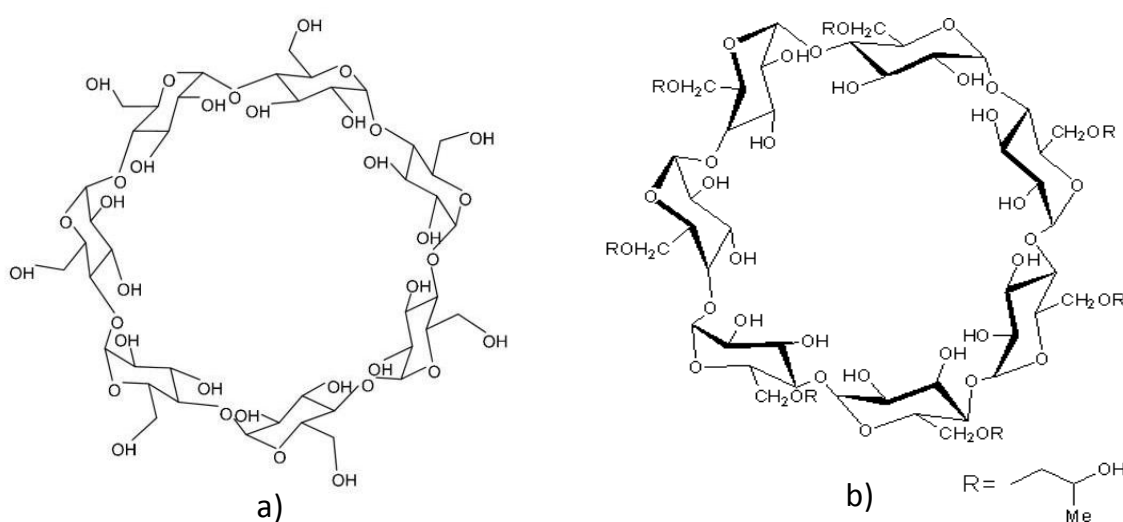
### 3.2. Preparação das Membranas Sensoras.

Na elaboração de membranas sensoras de suporte polimérico foram incorporados fisicamente diferentes componentes, consoante a(s) espécie(s) a detectar (sensor iónico, solvente mediador e aditivo, quando aplicável). Na preparação do suporte polimérico usou-se o cloreto de polivinilo carboxilado (PVC-COOH) ou o cloreto de polivinilo (PVC), previamente solubilizado em THF. Para modular as características viscoelásticas do suporte e, simultaneamente, proporcionar o meio para difusão dos compostos sob determinação, utilizou-se um solvente mediador adequado, de baixa constante dielétrica. Exemplificando, membranas baseadas no plastificante *orto*-nitrofeniloctiléter (NPOE) demonstram muito maior afinidade para catiões divalentes do que membranas com a mesma composição, mas que utilizam dioctilsebacato (DBS) como solvente mediador. As diferenças estão relacionadas com as polaridades ou constantes dielétricas dos dois solventes [6,7].

O ionóforo é o componente das membranas de electrodos selectivos a ião que possui maior relevância para a selectividade dos mesmos. De um modo geral, efectuou-se a solubilização deste constituinte no solvente mediador, segundo as proporções apresentadas em cada capítulo. Para a realização do trabalho indicado no capítulo III, construíram-se electrodos seleccionando-se como ionóforos compostos químicos de

reconhecimento molecular, nomeadamente a  $\beta$ -ciclodextrina e a 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (Fig.6 a e b). Estes oligossacarídeos têm vindo a ser extensivamente aplicados na área farmacêutica [8, 9], possuem formato toroidal e formam complexos de inclusão pela interacção entre a molécula hospedeira (neste caso o catião da respectiva vitamina B1 ou B6), e o seu interior hidrofóbico. De acordo com as constantes de formação do complexo ciclodextrina – hospedeiro obtêm-se ionóforos com um padrão de selectividade diverso. As ciclodextrinas podem ser derivatizadas e o seu exterior conter vários grupos funcionais que interagem adicionalmente, quer atraindo, quer repelindo moléculas e, através da combinação deste jogo de forças procura maximizar-se a selectividade do ionóforo integrado na membrana do eléctrodo, para com o analito, diminuindo a ligação com outros catiões e aniões metálicos, ou moléculas orgânicas interferentes.

Os ESIs referidos nos restantes capítulos foram desenvolvidos por outros autores [10, 11].



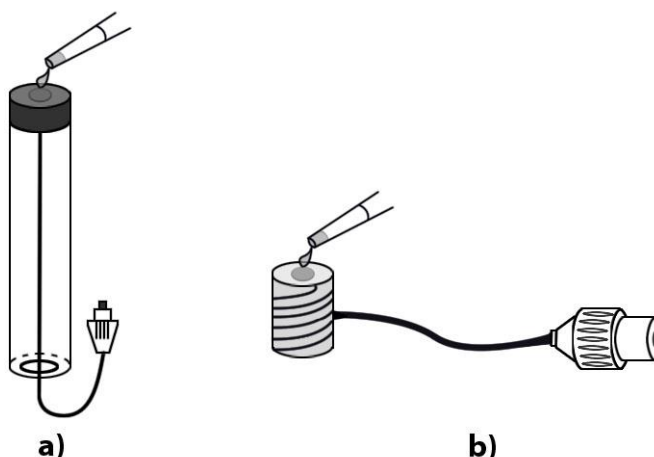
**Figura 6 – Estrutura química das moléculas: a)  $\beta$ -Ciclodextrina e b) 2-Hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina. Estas moléculas foram usadas como ionóforos nos ESIs desenvolvidos e aplicados nos trabalhos dos capítulos III e IV.**

Adicionalmente, em algumas membranas, procedeu-se à incorporação de uma pequena quantidade de aditivo, constituído por substâncias carregadas negativamente e com comportamento lipofílico (capítulos III e IV, V e VI). Este foi escolhido após optimização das características dos eléctrodos, por ensaio comparado de sensores potenciométricos que incorporavam alternativamente aditivos com carga positiva e negativa. O objectivo de se usar aditivo aniónico foi o de melhorar a selectividade das unidades construídas [12, 13]. Nos trabalhos descritos nos capítulos III e IV, onde é

descrita a utilização de um ionóforo neutro para a preparação das membranas, o aditivo empregue tinha carga oposta à do ião a medir, melhorando nestes casos a sua extracção pela membrana [14, 15].

Finalmente, procedeu-se à imobilização física da solução sensora, acondicionada em frasco de cor âmbar com capacidade de 10 ml, por adição do polímero, previamente dissolvido em solvente orgânico, originando a membrana sensora. O suporte físico era preparado por solubilização do PVC ou do PVC-COOH num volume de cerca de 6 ml de THF, em gobelé de vidro de 10 ml. A mistura dos diversos constituintes da membrana era promovida recorrendo à agitação com uma pequena vareta de vidro.

Independentemente do tipo de eléctrodo utilizado, após homogeneização da membrana sensora, procedeu-se à sua deposição na superfície condutora dos corpos dos eléctrodos, por gotejamento, com auxílio de uma pipeta pasteur de vidro. Para os ESIs convencionais, depositava-se uma quantidade de sensor suficiente para cobrir a superfície de grafite exposta e repetia-se este procedimento cerca de 10 vezes (volume na ordem dos 2 ml) (Fig. 7a). No caso dos eléctrodos tubulares, a quantidade depositada era inferior, apenas o suficiente para formar uma fina película de membrana a recobrir o orifício interno da unidade (volume na ordem dos  $\mu\text{L}$ ) (Fig. 7b). Contudo, nos ESIs de configuração tubular sensíveis a vitamina B1 e /ou vitamina B6 (capítulo IV), a aplicação do sensor era repetida pelo menos 6 vezes.



**Figura 7- a) Deposição de sensor no ESI de configuração convencional; b) Deposição de sensor no ESI de configuração tubular.**

Entre cada aplicação do sensor, esperava-se o tempo suficiente para possibilitar a evaporação do THF, evitando deste modo a formação de bolhas de ar na superfície da membrana. Posteriormente, as unidades eram deixadas ao ar para secagem completa das membranas, por um período de cerca de 12h.

O acondicionamento da membrana sensora ocorreu de forma distinta consoante os ESIs e a sua aplicação. Nos capítulos III, V e VI, consistia na simples hidratação da membrana com uma solução de ajustador de força iónica. Nos eléctrodos de configuração tubular aplicados no trabalho referido no capítulo IV, a solução transportadora / ajustador de força iónica utilizada para a hidratação continha uma pequena quantidade de uma das espécies químicas a determinar (vitamina B6  $1 \times 10^{-6}$  M em LiCl 0,1 M), pois verificou-se que contribuía para a melhor estabilização do potencial electródico na ausência do analito (menor *drift*).

### 3.3. *Calibração das Unidades Potenciométricas de Configuração Convencional e Tubular, e Optimização das Condições Hidrodinâmicas de Fluxo dos ESIs Tubulares*

A transdução potenciométrica baseia-se nas medidas da diferença de potencial de uma célula electroquímica composta pelo eléctrodo indicador, no presente caso, os ESIs construídos e avaliados, e um eléctrodo de referência, ambos em contacto com a matriz em análise, na ausência de corrente eléctrica.

O potencial do eléctrodo indicador advém da diferença de potencial químico que se estabelece quando a membrana sensora contacta com a solução do analito. Essa diferença de potencial químico resulta da variação de actividade do ião primário na interface da membrana e no seio da solução que, após equilíbrio termodinâmico, se traduz num potencial eléctrico. Na medida em que não é possível medir exclusivamente o potencial do eléctrodo indicador, impõe-se a sua associação a um eléctrodo de referência. A diferença de potencial da célula electroquímica pode ser traduzida pela equação de *Nernst-Nicolsky*, como seguidamente se representa:

$$E = E_0 + \frac{59,16}{Z_i} \log a_i; \quad T = 298,5K$$

**Equação 1- Equação de *Nernst-Nicolsky*.**

Nesta equação,  $E$  corresponde à variação de potencial entre o eléctrodo indicador e o de referência,  $E_0$  representa a soma de todas as contribuições de potenciais na célula de medida, isto é, o potencial padrão do eléctrodo selectivo, o potencial do eléctrodo de referência, e o potencial de junção líquida independentes da amostra, que corresponde à ordenada na origem da resposta linear. O valor 59,16 mV/década resulta da seguinte operação  $\frac{2,303RT}{F}$ , na qual  $R$  é a constante dos gases perfeitos e igual a 8,3144 JK<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>,  $T$  é a temperatura termodinâmica absoluta, K,  $F$  é a constante de Faraday, cujo valor é 9,64846x 10<sup>4</sup>Cmol<sup>-1</sup>,  $Z_i$  é a carga do ião primário,  $a_i$  representa a actividade do ião primário expressa em unidades de concentração, mol L<sup>-1</sup> ou mol Kg<sup>-1</sup>.

A equação de *Nernst-Nicolsky* ajusta-se a uma equação de recta, com a ordenada na origem  $E_0$  e declive igual a  $\frac{59,16}{Z_a}$ . O declive traduz a maior ou menor reversibilidade da reacção sob o ponto de vista termodinâmico.

Contudo, na presença de interferentes, a equação de Nernst traduzida anteriormente tem que ser modificada, afectando-a de um coeficiente que se designa por coeficiente de selectividade potenciométrico,  $K_{A,B}^{pot}$ , que é o factor multiplicativo da actividade do ião interferente, tal como se representa na seguinte expressão matemática:

$$E = E_0 + \left(\frac{RT}{Z_a F}\right) \ln \left( a_A + \sum_{A,B}^{pot} (a_B)^{Z_A/Z_B} \right)$$

**Equação 2- Equação de *Nicolsky-Eisenman*.  $K_{A,B}^{pot}$  - Coeficiente de selectividade potenciométrica do ião primário A, face ao ião interferente B.**

Considera-se que o ESI responde selectivamente ao ião primário quando os valores de  $K_{A,B}^{pot}$  obtidos são inferiores à unidade.

Para relacionar o potencial do eléctrodo com a concentração da, ou das, espécie(s) a determinar em solução, é necessário garantir que o coeficiente de actividade da espécie seja constante, de acordo com a equação:



$$a_i = f_i \times C_i$$

**Equação 3- Expressão utilizada para o cálculo do coeficiente de actividade de uma solução.**

$a_i$  - Actividade iónica do ião primário representada nas mesmas unidades da concentração;

$f_i$  - Coeficiente de actividade, adimensional;  $C_i$  - Concentração do ião primário.

Tal como já foi referido, procedeu-se ao ajuste de força iónica de todas as soluções, com recurso a um electrólito cujas espécies constituintes não representassem interferência química significativa nas unidades em estudo.

Por sua vez, o cálculo da força iónica efectuou-se recorrendo à seguinte equação:

$$I = \frac{1}{2} \sum (C_z^2)$$

**Equação 4- Expressão utilizada para o cálculo da Força Iónica.  $I$  - Força Iónica;  $C$  - Concentração;  $Z$  - Carga do ião.**

Nos trabalhos descritos nos capítulos III e V, a caracterização das unidades potenciométricas convencionais em estado estacionário ocorreu através da avaliação dos parâmetros gerais com recurso à respectiva curva de calibração. Os eléctrodos eram introduzidos num recipiente de vidro, conjuntamente com o eléctrodo de referência e, posteriormente eram transferidos volumes rigorosos de ajustador de força iónica e/ ou pH. Seguidamente, mantendo a agitação constante, adicionavam-se rigorosamente volumes de uma solução concentrada da espécie a determinar, registando-se de todas as vezes o valor obtido de diferença de potencial,  $\Delta E$ , quando os potenciais estabilizavam num intervalo de cerca de  $\pm 0,1$  mV.

No que diz respeito às calibrações das unidades potenciométricas de configuração tubular, estas foram realizadas em fluxo (trabalhos descritos nos capítulos IV, V e VI), após a estabilização do potencial dos eléctrodos efectuada por passagem durante alguns minutos da solução de ajuste de força iónica, ou de ajuste de força iónica e pH, através do sistema de fluxo implementado.

As calibrações foram precedidas da optimização dos parâmetros hidrodinâmicos de escoamento líquido, de modo a assegurar respostas dos sensores, maximizando a sensibilidade e o intervalo analítico.

No trabalho referido no capítulo IV, para proceder à optimização, utilizou-se um desenho experimental. Para a sua execução, recorreu-se ao software Matlab versão 6.5

(Mathworks, Natick, MA). Numa primeira fase, optimizaram-se as condições de fluxo para análise de soluções contendo apenas uma das vitaminas. Foram variados os parâmetros hidrodinâmicos do sistema SIA (tempo de aspiração/propulsão (s) e caudal de aspiração/propulsão ( $\text{ml. min}^{-1}$ )) num determinado intervalo de concentrações. De acordo com as experiências sugeridas pelo desenho experimental, injectaram-se diferentes volumes das soluções de calibração das vitaminas, com diversos caudais de fluxo em direcção aos detectores construídos. Por fim, foram seleccionadas as condições de compromisso que proporcionaram melhores declives de trabalho de tiamina e piridoxina. No que concerne a análise das misturas sintéticas das vitaminas, prepararam-se inicialmente soluções contendo diferentes proporções relativas das duas espécies a determinar, avaliando-se e optimizando-se no sinal analítico transiente obtido, as janelas temporais que melhor se correlacionavam com a concentração de cada uma das vitaminas. Com os sinais adquiridos, aplicou-se o método de resolução multivariada de curvas (MCR) [16] a fim de verificar se seria possível a desconvolução destes, possibilitando a identificação de ambas as espécies B1 e B6, em simultâneo. Com o intuito de maximizar o desempenho do algoritmo de MCR na desconvolução do sinal, o fluxo em direcção ao detector foi variado para o dobro daquele utilizado com o propósito de calibração das soluções mono-componente. Finalmente, para estimar simultaneamente as duas vitaminas nas soluções mistas, recorreu-se a um desenho experimental (Matlab versão 3.5 (MathWorks, Natick, MA)), no qual se fixava uma vitamina a baixas concentrações, variando a concentração da outra, no intervalo analítico  $1 \times 10^{-4}$ -  $1 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Este procedimento possibilitou que se estimassem dois modelos robustos utilizando mínimos quadrados parciais (PLS) para determinar cada uma das vitaminas [16], sem se efectuarem grande número de experiências. Para os modelos PLS, recorreu-se à *toolbox* de PLS versão 3.5 (Eigenvector Research, Wenatchee, WA). Para a tiamina, o sinal analítico era pré-processado entre os 8 e os 40 segundos após início da aquisição do sinal, aplicando um filtro *Savitzky-Golay* (1ª derivada) e centrando na média, ao passo que para a piridoxina não foi necessário aplicar um filtro. Neste caso, utilizaram-se os dados obtidos entre os 3 e 16 segundos, aplicando-se um logaritmo decimal e, seguidamente, centraram-se na média.

O método univariado consiste em fazer variar, num determinado intervalo, uma das variáveis a optimizar, mantendo todas as outras fixas. O processo de optimização está completo quando todas as variáveis forem optimizadas. Nos trabalhos apresentados nos capítulos V e VI, aplicou-se este método a fim de optimizar as respostas analíticas dos sensores de valproato (V e VI) e de sódio (V). Para tal, fixaram-se os caudais de aspiração, fazendo-se variar os volumes de amostra aspirados. Geralmente, para

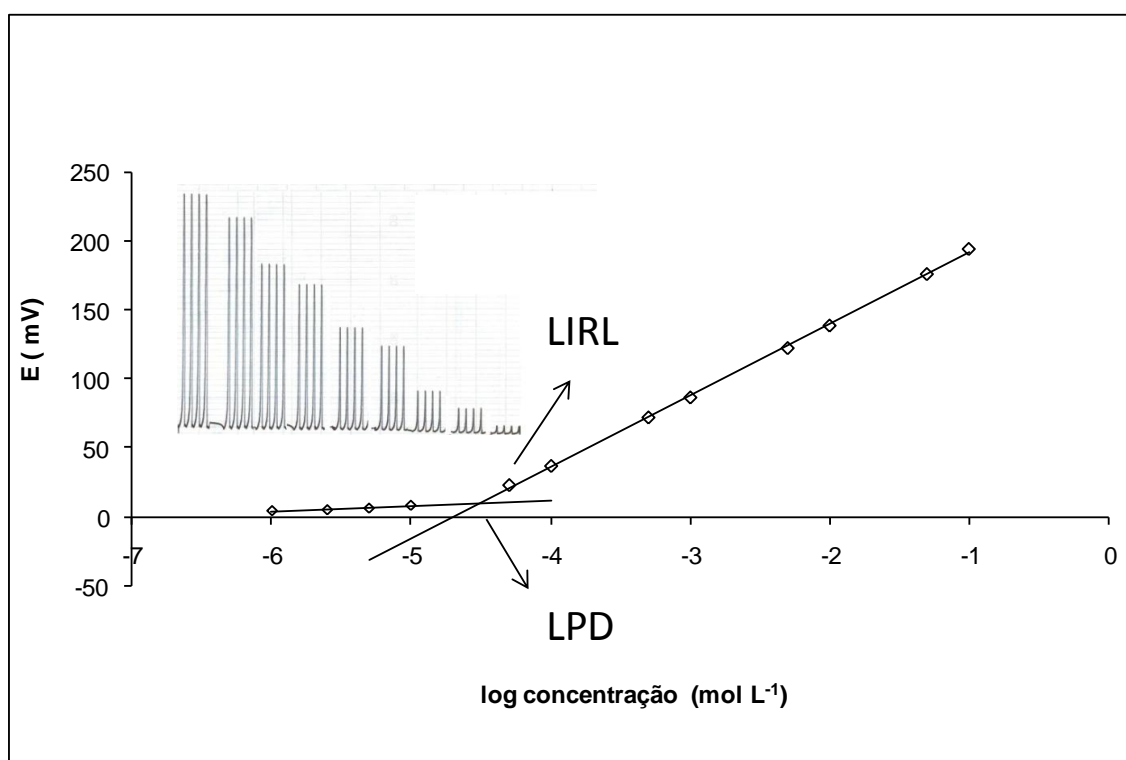
pequenos volumes de amostra, os sinais analíticos obtidos eram muito baixos e irreprodutíveis. À medida que o volume aumentava, o sinal também aumentava até um determinado limite, e depois tornava-se constante. Normalmente, optava-se pelo menor volume de amostra que pudesse originar sinais reprodutíveis, com desvio padrão relativo inferior a 5% e um declive de trabalho próximo do *Nernstiano*. Após fixação do volume de amostra, procedia-se à optimização do caudal de bombeamento, de forma a que o sinal analítico transiente regressasse o mais rapidamente possível ao potencial de base, após detecção do valor máximo, mas também para que o tempo que a amostra demorava a passar no detector fosse suficiente para maximizar o sinal analítico.

No trabalho descrito no capítulo V, quando se pretendia a determinação sequencial dos iões sódio e valproato, utilizou-se um algoritmo de optimização *Simplex* modificado (de dimensão variável), desenvolvido em linguagem Quick Basic 4.5. O *Simplex* é um polígono geométrico com  $v+1$  vértices, onde  $v$  corresponde ao número de variáveis a otimizar, que se move num processo iterativo sobre a superfície definida pelo conjunto de respostas possíveis do sistema em estudo. A função de resposta é previamente definida pelo utilizador, com base na combinação linear dos aspectos que se pretendem otimizar. O algoritmo determina as condições de cada nova experiência a efectuar, correspondentes ao reflexo geométrico das condições de experiência com pior resposta, sobre as condições médias correspondentes às melhores respostas, e o utilizador fornece o respectivo resultado. Neste caso considerou-se, como função de resposta, a melhor resolução entre os dois sinais e a maximização dos mesmos. Estabeleceram-se como variáveis a otimizar os volumes de injeção e os fluxos de aspiração e bombeamento das soluções, bem como o tamanho do reactor colocado entre os sensores de sódio e valproato. Considerou-se como critério de finalização a obtenção de condições experimentais que não se traduziam em melhoria significativa da qualidade de resposta, por diminuição da dimensão do *Simplex*. O procedimento foi duplamente repetido, mas partindo de condições iniciais diversas, para avaliar se as condições óptimas atingidas eram consistentes, nos dois processos.

Nos trabalhos descritos nos capítulos IV, V, e VI, após optimização das condições hidrodinâmicas de fluxo, prosseguiu-se com calibrações de cada uma das espécies a determinar, individualmente. Nos capítulos IV e V, também se calibraram soluções contendo as duas espécies de interesse, tal como já foi referido.

Para efectuar a calibração de soluções, aspiraram-se sucessivamente conjuntos de soluções de calibração (entre sete e dez), contendo o analito, ou analitos de interesse. O intervalo de concentrações testado era tal que possibilitava o cálculo de parâmetros como

o limite inferior de resposta linear (LIRL) e o limite prático de detecção (LPD), conforme exemplificado na Figura 8. Posteriormente, as soluções aspiradas por uma das portas laterais do módulo analítico para o tubo de armazenamento eram bombeadas por selecção da porta lateral onde se encontrava o detector por subsequente inversão da rotação da bomba peristáltica. Para cada concentração, o ciclo analítico era repetido pelo menos 5 vezes e registava-se graficamente o valor médio da altura dos sinais transientes, em função do logaritmo de concentração. A excepção consistia na calibração multivariada das soluções mistas de vitamina B1 e B6, geradas em linha, conforme explicitado no trabalho descrito no capítulo IV.



**Figura 8-** Curva de calibração de um ESI de configuração tubular para a vitamina B6, inserido num sistema SIA. Trabalho descrito no Capítulo IV. LPD- Limite prático de detecção; LIRL- Limite inferior de resposta linear.

O limite prático de detecção (LPD) [17] pode definir-se como a actividade ou concentração da espécie química que determina o potencial correspondente ao ponto de intercepção das duas rectas tangentes à curva de calibração. A partir das curvas de calibração dos eléctrodos de configuração convencional, ou dos eléctrodos tubulares, traçaram-se duas rectas, uma de declive praticamente nulo e outra no intervalo de concentração onde existia uma relação proporcional entre o sinal analítico e a concentração da espécie sob medida (Fig.8). O limite inferior de resposta linear (LIRL) foi

estabelecido como o primeiro valor para o qual o eléctrodo começava a apresentar resposta analítica linear, em função da concentração (Fig.8).

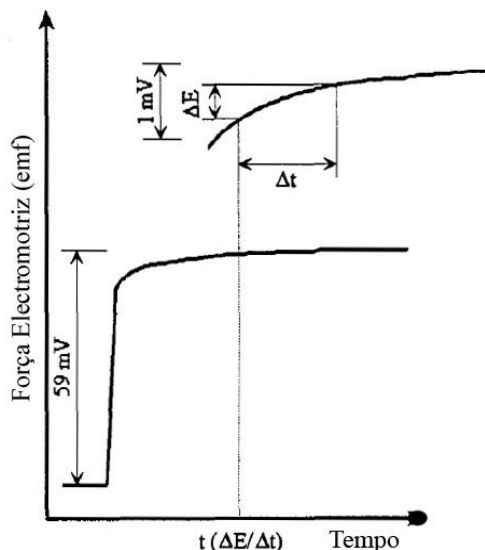
#### 3.4. *Estudo da influência do pH na resposta potenciométrica dos ESIs desenvolvidos*

No trabalho descrito no capítulo III, realizaram-se diagramas de Reilley a fim de avaliar a influência do pH na resposta potenciométrica dos sensores. Este ensaio foi efectuado em duas soluções do ião principal, que variavam entre si uma década. Para cada espécie química a estudar (vitamina B1, ou vitamina B6), as soluções foram preparadas num ajustador de força iónica, nomeadamente LiCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. O procedimento consistia em colocar num copo um volume equivalente a 200 ml da solução mais diluída, na qual se introduziam os eléctrodos em estudo, o eléctrodo de referência de dupla junção e o eléctrodo de pH, previamente calibrado com três soluções, de pH 9, 7 e 4. Através da adição de uma solução concentrada de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), fez-se variar o pH da solução para valores próximos de 2 unidades. De seguida, alterou-se o pH para valores superiores, até 12 unidades, pela adição de volumes reduzidos de hidróxido de sódio (NaOH) concentrado. Registaram-se os valores de potencial dos eléctrodos, sempre que havia uma variação de cerca de 20 mV. A utilização de um volume elevado da solução contendo a espécie a analisar e pequenos volumes de ácido e base concentrados, teve como base a necessidade de garantir uma concentração aproximadamente constante da espécie química em análise, durante o estudo. O patamar operacional para o eléctrodo indicador foi definido como o intervalo de valores de pH que não provocaram uma variação superior a  $\pm 5$  mV, na diferença de potencial da célula potenciométrica.

#### 3.5. *Determinação do tempo de resposta dos ESIs*

O tempo de resposta, de acordo com as recomendações propostas pela IUPAC para ESIs [17], corresponde à diferença de tempo que ocorre desde que o eléctrodo indicador e o eléctrodo de referência entram em contacto com a solução, ou a partir do momento em que se altera a actividade do ião a medir e o primeiro momento em que o

valor absoluto da razão  $\left(\frac{\Delta E}{\Delta t}\right)$  tende para um valor limite previamente seleccionado, de acordo com as condições experimentais (Fig. 9).



**Figura 9- Definição e determinação do tempo de resposta segundo a IUPAC [17], como o tempo que medeia entre o instante em que um electrodo selectivo a ião e um electrodo de referência entram em contacto com a solução amostra, e o primeiro instante em que o declive  $\left(\frac{\Delta E}{\Delta t}\right)$  tende para um valor limite previamente seleccionado com base nas condições experimentais ou nos requisitos que dizem respeito à exactidão pretendida (por exemplo, 0,1 mV/min).**

Sabendo, no entanto, que o tempo de resposta pode ser afectado por variados factores, entre os quais se destacam a temperatura da solução, a presença de espécies interferentes, a agitação da solução, a concentração e os efeitos de memória, com os electrodos convencionais descritos no trabalho III, optou-se por efectuar a referida medição recorrendo a um cronómetro, registando o tempo que decorria desde a adição da espécie a determinar, até as variações de potencial serem inferiores a  $\pm 0,1$  mV/min. No caso dos electrodos de configuração tubular, este parâmetro infere-se pelo número de determinações analíticas efectuadas numa hora.

### 3.6. Determinação dos Coeficientes de Selectividade Potenciométrica dos ESIs

A selectividade das unidades potenciométricas consiste na capacidade evidenciada pela membrana de reconhecer o ião primário face à presença de iões interferentes. Efectivamente, muita da investigação actual na área da potenciometria relaciona-se com a procura de membranas em que o componente de reconhecimento iónico, o ionóforo, possa formar ligações mais selectivas com o ião primário.

Na prática laboratorial, e segundo as recomendações da IUPAC [18], existem diferentes métodos que permitem a medição dos coeficientes de selectividade potenciométricos, nomeadamente o método das soluções separadas, o método da interferência fixada e o método do potencial equivalente. Muito embora o método das soluções separadas seja o mais frequentemente aplicado, sobretudo quando se pretende fazer uma despistagem dos interferentes habituais, os outros dois mimetizam com superior rigor o jogo de interacções que ocorrem, quando se aplica a determinação potenciométrica com um eléctrodo selectivo a iões, na análise de matrizes reais [18]. O primeiro método consiste, basicamente, na preparação de uma solução contendo o ião primário, com actividade  $a_A$  e na medição da correspondente diferença de potencial  $E_A$ . Em seguida, usa-se o mesmo procedimento para o ião interferente  $a_B$ , em que  $a_A = a_B$ , com registo da respectiva diferença de potencial  $E_B$ . O coeficiente de selectividade potenciométrico calcula-se pela aplicação da equação que se segue [19]:

$$K_{A,B}^{pot} = a_A \left( \frac{1 - Z_A/Z_B}{Z_B} \right) e^{(E_B - E_A) Z_A F / (RT)}$$

**Equação 5- Expressão utilizada para o cálculo do coeficiente de selectividade potenciométrica, pelo método das soluções separadas.**

Por sua vez, no que concerne ao método da interferência fixada, é vulgar fazer-se a determinação mantendo a actividade do interferente constante e variando a actividade do ião primário, utilizando-se para o cálculo do respectivo coeficiente de selectividade potenciométrico a expressão matemática representada pela equação 6.

$$K_{A,B}^{pot} = \frac{a_A}{(a_B)^{Z_A/Z_B}}$$

**Equação 6- Expressão utilizada para o cálculo do coeficiente de selectividade potenciométrica, pelo método da interferência fixada.**

Concretizando a execução laboratorial, os eléctrodos são introduzidos num copo de vidro para o qual se transfere um volume rigoroso de solução do ião interferente, com força iónica ajustada. Seguidamente, adicionam-se volumes rigorosos da espécie a determinar (ião primário), registando-se a variação de potencial resultante quando os potenciais estabilizam a  $\pm 0,1$  mV, após se efectuar cada uma das adições. Os potenciais obtidos em função do logaritmo da actividade do ião primário são representados graficamente, e o valor de  $K_{A,B}^{pot}$  estima-se com base na equação supracitada, após se ter calculado a actividade do ião primário correspondente ao ponto de intercepção resultante da extrapolação das porções lineares da curva [19].

No entanto, a aplicação das equações citadas anteriormente pressupõe a existência de uma resposta *Nernstiana* para o eléctrodo, referente não só ao ião primário, mas também ao ião interferente, o que na maioria das vezes não acontece em relação a este último, sobretudo se a sua carga difere da do ião primário.

Nesse sentido, a IUPAC passou a recomendar, em 1995, um método empírico designado por *Matched Potential Method* [18], já anteriormente referido, e designado nesta dissertação por método do potencial equivalente. Neste, o valor de  $K_{A,B}^{pot}$  é independente da equação de *Nicolsky-Eisenman*, ou de quaisquer modificações.

No método do potencial equivalente, define-se o coeficiente de selectividade potenciométrico como a razão entre as actividades do ião primário e do ião interferente que produzem as mesmas variações de potencial, sob condições similares. Para tal, mergulham-se os eléctrodos num volume rigoroso da solução de referência do ião primário  $aA$ , com força iónica ajustada. Em seguida, adiciona-se um volume rigoroso de uma outra solução do ião primário com actividade  $aA'$ , sob agitação constante, e regista-se a diferença de potencial produzida. Os mesmos eléctrodos são colocados num copo de vidro, para o qual se transfere igual volume da solução de referência do ião primário  $aA$ , com força iónica ajustada. Sob agitação constante, adiciona-se um volume rigoroso de uma solução com actividade  $aB$  de ião interferente, com a força iónica ajustada, a fim de provocar a mesma diferença de potencial obtida anteriormente. O valor do coeficiente de selectividade potenciométrico é então determinado através da aplicação da expressão matemática seguidamente apresentada [19]:



$$K_{A,B}^{pot} = \frac{(aA' - aA)}{aB}$$

**Equação 7- Expressão utilizada para o cálculo do coeficiente de selectividade potenciométrico, aplicando o método do potencial equivalente.**

Com a utilização do método do potencial equivalente, ocorre por vezes que não se consegue obter a diferença de potencial pretendida, mesmo após a adição de uma solução muito concentrada de ião interferente  $aB$ . Isto acontece devido à extensão da interferência ser consideravelmente pequena. Nestes casos, convém medir incrementos menores de ião primário, ou medir diferenças de potencial numa solução de referência mais diluída. Muitas vezes, os declives dos iões interferentes e dos iões primários não são nem *Nernstianos* nem lineares. Nestes casos, é expectável que os coeficientes de selectividade estimados por aplicação do método referido mostrem dependência de acordo com a actividade do ião primário, contido na solução de referência. Como tal, recomenda-se reportar valores de  $K_{A,B}^{pot}$  para diferentes actividades de ião primário [18].

No trabalho descrito no capítulo III, utilizaram-se três métodos para avaliar a extensão das interferências nas respostas dos ESIs construídos: o método das soluções separadas, o método da interferência fixada e o método do potencial equivalente. O método das soluções separadas aplicou-se numa fase inicial do desenvolvimento dos sensores, para verificar a interferência de iões que fazem parte integrante de muitos tampões e ajustadores de força iónica. O método da interferência fixada, uma vez que se considera fornecer resultados mais consonantes com a aplicação a amostras reais, reservou-se àquelas moléculas usualmente presentes em formulações polivitamínicas. O método do potencial equivalente foi empregue para estudar o grau de interferência da vitamina B1 no eléctrodo de vitamina B6, e vice-versa, considerando que estes eram os dois analitos que se pretendiam quantificar em amostras farmacêuticas reais, e cujas semelhanças, em termos de estrutura molecular, faziam já prever que constituíssem interferência mútua.

### 3.7. Aplicação dos ESIs a Amostras Farmacêuticas

Em todos os trabalhos desenvolvidos e apresentados nesta tese, aplicaram-se os eléctrodos na análise de produtos farmacêuticos de natureza complexa, nomeadamente ensaios de doseamento (capítulos III e IV), ensaios de dissolução (capítulo V) e ensaios

de permeabilidade (capítulo VI). No capítulo III, o doseamento das vitaminas B1 e B6 em matrizes polivitamínicas, foi efectuado recorrendo ao método de Gran [20].

Este método é aplicado quando se espera uma elevada interferência por parte da matriz, possibilitando o aumento da exactidão, precisão e limite de detecção da análise. O procedimento experimental consiste na adição sucessiva (3 a 10 vezes) de um volume fixo de padrão do composto a determinar, a um dado volume de amostra. A alteração de potencial ( $\Delta E$ ) é registada após cada adição de solução padrão. Considera-se a expressão matemática a seguir representada:

$$(V_x + V_{st})10^{\frac{\Delta E}{S}} = \left(\frac{C_{st}}{C_x}\right)V_{st} + V_x$$

**Equação 8- Expressão matemática que traduz o método de Gran.  $\Delta E$ - Variação de potencial (mV);  $C_{st}$ - Concentração da solução padrão;  $V_{st}$ - Volume total de solução padrão adicionada;  $V_x$ - Volume de amostra;  $C_x$ - Concentração da amostra;  $S$ - Declive de trabalho do eléctrodo.**

Nestas condições, verifica-se uma relação linear entre  $(V_x + V_{st})10^{\frac{\Delta E}{S}}$ , em função do volume de padrão adicionado  $V_{st}$ , e traça-se o respectivo gráfico. Seguidamente, determina-se o declive da recta obtida, e substitui-se na expressão  $C_x = \frac{C_{st}}{\text{declive}}$ , para calcular a concentração do analito na amostra -  $C_x$ .

Foram também estimadas as percentagens de recuperação para cada uma das amostras testadas, recorrendo aos valores de variação de potencial obtidos, após adição de uma determinada concentração da solução padrão. A percentagem de recuperação calculou-se de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{(C_2 - C_1)}{C_p} \times 100$$

**Equação 9- Expressão utilizada para o cálculo da percentagem de recuperação.  $C_1$ - Concentração da amostra interpolada na recta de calibração;  $C_2$ - Concentração (amostra+padrão) interpolada na recta de calibração;  $C_p$ - Concentração do padrão.**

A execução prática consistiu na preparação de duas soluções com o mesmo volume de amostra. Numa delas, adicionou-se uma quantidade rigorosamente conhecida de padrão ( $C_p$ ). Registaram-se as variações de potencial produzidas por ambas, bem

como as concentrações, por interpolação na recta de calibração do ESI. Seguidamente, calcularam-se as respectivas recuperações, por aplicação da expressão acima citada.

No capítulo IV, tal como já foi referido, procedeu-se à análise dos sinais potenciométricos resultantes da injeção de amostras de polivitamínicos, aplicando o método de mínimos quadrados parciais e resolução multivariada de curvas [16]. Os detalhes acerca deste procedimento são referenciados oportunamente, no respectivo capítulo supracitado.

Nos capítulos V e VI, o doseamento das espécies químicas em estudo foi efectivado por potenciometria directa em fluxo, por interpolação na curva de calibração realizada para o analito em análise, nas condições de pH e força iónica específicas de cada trabalho. Este procedimento envolvia a injeção de soluções padrão com concentrações conhecidas crescentes (pelo menos quatro soluções, com cinco injeções em cada patamar de concentração), de forma a estabelecer a respectiva curva de calibração, com um intervalo analítico suficientemente abrangente relativamente às concentrações espectáveis aquando da realização dos respectivos ensaios. Seguidamente, efectuavam-se as dissoluções (capítulo V), bem como as dissoluções concomitantes aos estudos de permeabilidade (capítulo VI) e, a tempos regulares, alíquotas do meio de dissolução ou da solução transportadora contendo o analito permeado, eram enviadas em direcção ao detector. A cada tempo de injeção de amostra, a variação de potencial obtida com os eléctrodos era comparada com aquelas decorrentes da respectiva curva de calibração, calculavam-se as concentrações e estimavam-se os perfis de libertação ou permeação de quantidade de analito, em função do tempo.

Para validar os resultados obtidos pelos métodos potenciométricos descritos nos capítulos que se seguem, estes foram comparados com métodos independentes, através do cálculo dos respectivos erros absolutos. A metodologia usada como referência correspondeu maioritariamente à análise por cromatografia líquida de elevada eficiência, com detecção na região do UV (capítulos II, IV e V). Estes métodos basearam-se, de modo geral, em monografias compendiais e, oportunamente, sofreram alguns ajustes. Nomeadamente, no trabalho descrito no capítulo V, a análise cromatográfica de valproato realizou-se de acordo com o método proposto em [10], no entanto a constituição da fase móvel e as condições cromatográficas foram sujeitas a alterações, devido à escassez de acetoneitrilo que se fez sentir na época. Neste mesmo trabalho, a análise comparativa das amostras para determinação do ião sódio efectuou-se por fotometria de chama.

A precisão de um resultado analítico é um parâmetro na aferição das características do procedimento aplicado, e em todos os trabalhos foi avaliada pelo estudo da repetibilidade e da reprodutibilidade dos resultados obtidos, efectuando determinações no próprio dia, e em dias diferentes.

## Referências Bibliográficas

- [1] (1092) The dissolution procedure: Development and validation. In US Pharmacopoeia: USP 30: The National Formulary: NF 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.
- [2] Barros MARP, Lima JLFC, Machado AASC. *Portugaliae Electrochimica Acta* 1983; 1: 277-281.
- [3] The European Directorate for the Quality of Medicines. The European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), 7<sup>th</sup> edition.
- [4] Araújo AN, Costa RCC, Lima JLFC, Reis BF. Sequential injection system in flame atomic absorption spectrometry for wide range determination of calcium and magnesium in mineral waters. *Anal Chim Acta* 1998 Jan; 358 (2): 111-119.
- [5] Lima JLFC, Machado AACS. Procedure for the construction of all-solid-state PVC membrane electrodes. *Analyst* 1986 Jul; 111: 799-802.
- [6] Johnson RD, Bachas LG. Ionophore-based ion selective potentiometric and optical sensors. *Anal Bioanal Chem* 2003 Jun; 376 (3): 328-341.
- [7] Bakker E, Bühlmann P, Pretsch E. Carrier based ion-selective electrodes and bulk optodes.1. General characteristics. *Chem Rev* 1997; (8): 3083-3132.
- [8] Mosinger J, Tománková V, Němcová I, Zýka J. Cyclodextrins in analytical chemistry. *Anal Lett* 2001; 34 (12): 1979-2004.
- [9] Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem* 2004 May; 39 (9): 1033-1046.
- [10] Santos EMG, Araújo AN, Couto CMCM, Montenegro MCBSM. Construction and evaluation of PVC and sol-gel sensor membranes based on Mn(III)TPP-Cl. Application to valproate determination in pharmaceutical preparations. *Anal Bioanal Chem* 2006 Feb; 384 (4): 867-875.
- [11] Kimura K, Yoshinaga M, Funaki K, Shibutani Y, Yakabe K, Shono T et al. Effects of  $\alpha$ -substituents on ion selectivity of Bis (12-crown-4-methyl) malonates as neutral carriers for sodium ion selective electrodes. *Anal Sci* 1996; 12 (1): 67-70.
- [12] Morf WE, Ammann D, Simon W. *Chimia* 1974; 28: 65-67.

- [13] Morf WE, Ammann D, Simon W. *Anal Let* 1974; 7: 9-22.
- [14] Meier PC, Morf WE, Läubli M, Simon W. Evaluation of the optimum composition of neutral carrier membrane electrodes with incorporated cation-exchanger sites. *Anal Chim Acta* 1984 Jul; 156: 1-8.
- [15] Ammann D, Pretsch E, Simon W, Lindner E, Bezegh A, Pungor E. Lipophilic salts as membrane additives and their influence on the properties of macro- and electrodes based on neutral carriers. *Anal Chim Acta* 1985 May; 171: 119-129.
- [16] Otto M. *Chemometrics: Statistics and computer application in analytical chemistry*. Glasgow, UK: Wiley-VCH; 1999.
- [17] Buck RP, Lindner E. Recommendations for nomenclature of ion selective electrodes. IUPAC, *Pure Appl Chem* 1994. 66 (12): 2527-2536.
- [18] Umezawa Y, Umezawa K, Sato H. Selectivity coefficients for ion selective electrodes: Recommended methods for reporting  $K_{A,B}^{pot}$  values. IUPAC, *Pure Appl Chem* 1995. 67 (3): 507-518.
- [19] Umezawa Y, Buhlmann P, Umezawa K, Tohda K, Amemiya S. Potentiometric selectivity coefficients of ion selective electrodes. Part I. Inorganic cations (technical report). IUPAC, *Pure Appl Chem* 2000. 72 (10): 1851-2082.
- [20] Skoog, Holler, Nieman, chapter 23. In "Principles of Instrumental Analysis", 5<sup>th</sup> ed., Saunders College Publishing: Philadelphia; 1998.

# CAPÍTULO III

Desenvolvimento de  
Eléctrodos Selectivos a  
Ião para Aplicação em  
Formulações  
Multi-Componente





**Novos Ionóforos Aplicados na Construção de Sensores Potenciométricos Sensíveis a Vitamina B1 e Vitamina B6, Adequados ao Controlo de Polivitamínicos**

Neste trabalho, descreve-se a construção, avaliação e aplicação analítica de sensores potenciométricos sensíveis a vitamina B1 e vitamina B6. Os eléctrodos de contacto sólido foram produzidos recorrendo a  $\beta$ -ciclodextrinas como ionóforos, numa matriz carboxilada de cloreto de polivinilo. Para as membranas preparadas de tiamina e piridoxina I e II, obtiveram-se declives quase Nernstianos de  $51,7 \pm 0,8$ ,  $60,6 \pm 0,6$ ,  $61,1 \pm 1,4$ , nos intervalos analíticos (M)  $1,0 \times 10^{-4}$ -  $1,0 \times 10^{-1}$ ,  $5,8 \times 10^{-5}$ -  $1,0 \times 10^{-1}$ ,  $4,3 \times 10^{-5}$ -  $1,0 \times 10^{-1}$ , respectivamente. O pH operacional para o eléctrodo de tiamina situa-se entre 6,5-8,5 e para as unidades de piridoxina está compreendido entre 2-4,5. A determinação dos coeficientes de selectividade potenciométricos mostrou que os referidos sensores possuem um bom desempenho face a um elevado número de catiões inorgânicos e orgânicos usualmente presentes nas formulações polivitamínicas. A análise das vitaminas B1 e B6 em produtos farmacêuticos de matriz polivitamínica complexa efectuou-se com obtenção de recuperações dentro do intervalo 95,1 - 99,6% para a tiamina, e 95,1 - 102% para a piridoxina. Adicionalmente, os resultados providenciados pelo método aqui descrito, são comparáveis com os obtidos por HPLC.

---



## New ionophores for vitamin B1 and vitamin B6 potentiometric sensors for multivitaminic control

Ana Rita Pires<sup>a</sup>, Alberto N. Araújo<sup>a</sup>, M. Conceição B.S.M. Montenegro<sup>a,\*</sup>,  
Petr Chocholous<sup>b</sup>, Petr Solich<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Requimte, Dep. de Química Física, Faculdade de Farmácia, (UP) Rua Aníbal Cunha 164, 4099-030 Porto, Portugal*

<sup>b</sup> *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203,  
500 05 Hradec Kralové, Czech Republic*

Received 22 June 2007; received in revised form 30 November 2007; accepted 3 December 2007

Available online 8 December 2007

### Abstract

The construction, evaluation and analytical application of potentiometric sensors sensitive to vitamin B1 and vitamin B6 are reported. The solid contact electrodes were produced using  $\beta$ -cyclodextrins as ionophores in a carboxylated poly(vinyl chloride) support matrix. Near Nernstian slopes (mV/decade) of  $51.7 \pm 0.8$ ,  $60.6 \pm 0.6$  and  $61.1 \pm 1.4$ , within the intervals (M) of  $1.0 \times 10^{-4}$  to  $1.0 \times 10^{-1}$ ,  $5.8 \times 10^{-5}$  to  $1.0 \times 10^{-1}$  and  $4.3 \times 10^{-5}$  to  $1.0 \times 10^{-1}$  were obtained, for thiamine and pyridoxine I and II prepared membranes, respectively. A pH operational range of 6.5–8.5 for thiamine and 2–4.5 for pyridoxine electrodes was found. Assessment of selectivity coefficients toward a large number of inorganic cations and organic cations usually present in multivitamin formulations revealed good performance. Analysis of vitamins B1 and B6 in complex multivitamin drugs was achieved with recoveries within the intervals of 95.1–99.6% for thiamine and 95.1–102% for pyridoxine. Furthermore, the results enabled by the proposed procedure revealed good agreement with those provided by HPLC.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Cyclodextrins; Thiamine; Pyridoxine; Multivitamin formulations; Ion-selective electrodes

### 1. Introduction

Thiamine hydrochloride (vitamin B1) and Pyridoxine hydrochloride (vitamin B6) are included in a group of hydro soluble substances generically called Complex B Vitamins and act as coenzymes involved in the production of energy [1]. Additional effects of Vitamin B1 include the improvement of blood circulation, aid in the hydrochloride acid production and blood formation at the bone marrow. Severe deficiency leads to the development of a syndrome known as beri-beri. On the other hand, vitamin B6 performs not only an important role in the decarboxylation and transamination of amino acids but also in carbohydrate and fat metabolism. Pyridoxine deficiency may lead to sideroblastic anaemia, dermatitis, cheilosis and neurological symptoms such as peripheral neuritis and convulsions.

An equilibrated human diet provides all the vitamins necessary for body complete development and equilibrium maintenance. Physiological and physiopathological conditions in children, elderly and pregnant women may however require vitamin supplements, which are often consumed without prescription due to marketing and the abundance of preparations. The reference protocols [2] enable only isolated determinations of thiamine or pyridoxine in pharmaceutical formulations. Their application to multivitamin preparations renders inaccurate results. Thus, alternative methods to assure the security and quality of this kind of products have been proposed, involving UV–vis spectrophotometry [3,4], spectrofluorimetry [5], high performance liquid chromatography with spectrophotometric detection [6–9], voltammetry [10], turbidimetry [11], and flow injection with electrochemical [12] or optical detection [13–15]. Most of them present several disadvantages such as poor selectivity, requirement of tedious sample pretreatment (purification or preconcentration steps), use of toxic reagents, or even complex chemometric treatment of the analytical results.

\* Corresponding author. Tel.: +351 222078900; fax: +351 222003977.  
E-mail address: mcbranco@ff.up.pt (M.C.B.S.M. Montenegro).

Potentiometry with ion-selective electrodes offers numerous advantages in analytical control of pharmaceutical organic species [16,17], once it enables simple and no time consuming procedures, resorts to less toxic reagents and is easily applicable to complex and turbid samples. Some potentiometric sensors for determination of vitamin B1, vitamin B6 or both have also been reported [18–21]. All of them are based on the use of classical ion exchangers, namely heteropolycyclic acids [19] or phenyl borate derivatives [18,20,21]. The limited selectivity enabled by these species is however a major drawback for samples where both vitamins are present.

Cyclodextrins are a family of cyclic oligosaccharides composed of  $\alpha$ -(1,4) linked glucopyranose subunits, possessing a cage like supramolecular structure that allows to carry out chemical reactions of “host-guest” type, with specific receptor function [22]. This property turns out these ion-receptors in an interesting class of species to be studied as electrochemical sensors for organic molecules [23].

Several authors have reported the use of  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ -cyclodextrins as ionophores in construction of potentiometric ion-selective electrodes [24–26] and some published reviews summarize their use as analytical sensors. [22,23]. Those studies proved that when cyclodextrins are dissolved in the proper mediator solvent, they yield potentiometric detectors with good characteristics for organic amines [24,26] with reduced interference relatively to alkaline and alkaline earth metal ions [25].

In this work, the use of cyclodextrins is exploited in the construction and evaluation of novel potentiometric ion-selective electrodes for vitamins B1 and B6, with enhanced analytical capability.

## 2. Experimental

### 2.1. Apparatus

All potential measurements were performed at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , with a 2002 Crison micro pH (sensitivity  $\pm 0.1$  mV) coupled to an electrode commutator of the same brand.

A double junction Orion 90-02-00 silver chloride/silver reference electrode was used in conjunction with the proposed electrodes, containing 0.1 M lithium chloride in the outer compartment.

A Crison pH meter GLP 22 coupled to a combined glass electrode Crison Ref. 52-02 was used for pH determinations.

Spectrophotometric spectra of the sensor solutions and the respective vitamin B1 or B6 solutions were collected in a Perkin Elmer  $\lambda$  45 double beam spectrophotometer.

The analysis of the samples by HPLC was carried out in a Merck Hitachi chromatographic system comprising a model 7100 pump, a Rheodyne 7725i injector (20  $\mu\text{l}$  loop) and an Alltech ODS-2 C<sub>18</sub> column (250 mm  $\times$  4.6 mm). A diode array system, model 7455 was used as detector and the data processed by means of software package of the same brand, model D7000.

### 2.2. Reagents and solutions

All solutions were prepared with distilled and double deionised water, with conductivity  $< 0.1$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Analytical grade chemicals without additional purification were used.

Stock solutions (0.1 M) of thiamine hydrochloride (Sigma), thiamine nitrate (Roche Pharmaceuticals, USA) and pyridoxine hydrochloride (Roche Pharmaceuticals, USA) were prepared by weighing and dissolving the right amount of pure powder in 0.1 M lithium chloride (Aldrich) solution, (used as an ionic strength adjuster), and stored protected from the light in the fridge. Solutions with the main ion (vitamin B1 or B6), used for the electrode characterization and analytical determinations ( $1 \times 10^{-2}$  M/1  $\times 10^{-3}$  M/1  $\times 10^{-4}$  M), were daily prepared from the stock solution, diluting the required volume with LiCl 0.1 M and using 50 ml amber volumetric flasks, carefully kept apart from light and heat between measurements.

A  $5 \times 10^{-4}$  M silicotungstic acid solution in HCl 0.5 M was used as vitamin B1 precipitant.

Whenever necessary, concentrated lithium hydroxide (Merck) was used to adjust thiamine hydrochloride solutions to pH 7.

For HPLC method, the mobile phase constituted by sodium heptanesulphonate (Sigma), methanol HPLC grade (Merck), triethylamine (Aldrich) and orthophosphoric acid (Merck) was prepared, according to Ref. [2].

### 2.3. Sample preparation

Several multivitamin pharmaceutical preparations purchased on local drug stores were tested (ampoules, sachets and tablets). First, an amount of powder or liquid volume, corresponding to 5–200 mg of the vitamin B1 or B6 was dissolved in a LiCl 0.1 M solution in a 100 ml volumetric flask. For vitamin B1 assay, a volume of 20 or 25 ml of this solution was transferred to a beaker and the pH adjusted to 7, with concentrated LiOH, and afterwards transferred to a 50 ml volumetric flask, and the volume completed with LiCl (0.1 M).

Regarding the determination of vitamin B6, 20 ml of precipitant reagent was added to an aliquot of the previously reported solution (5 or 10 ml) for samples where the content of vitamin B1 was higher than vitamin B6. All the dilutions were prepared in order to fit the final concentration of both vitamins to the analytical concentration range of the electrodes.

To proceed with potentiometric results validation, samples were prepared and analysed following the methodology indicated in [2] in which previous filtration and degassing of the solutions were necessary.

### 2.4. Sensor preparation and electrode construction

Electrode membranes were obtained using  $\beta$ -cyclodextrin (Fluka), 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (Fluka), potassium tetrakis (*p*-chlorophenyl) borate (NaTpCIPB) (Fluka), 2-fluorophenyl-2-nitrophenyl ether (FNDPE) (Fluka), carboxylated poly(vinyl chloride) (PVC-COOH) (Janssen Qhimica) and tetrahydrofuran (THF) (Merck). General preparation of sensor

Table 1  
Composition of VitB1 ISE, VitB6 ISE I and VitB6 ISE II membranes

| Component  | VitB1 ISE | VitB6 ISE I | VitB6 ISE II |
|--|-----------|-------------|--------------|
| $\beta$ -Cyclodextrin  | –         | –           | 6.35         |
| 2-Hydroxypropyl $\beta$ -cyclodextrin                          | 6.45      | 6.35        | –            |
| 2-Fluorophenyl-2-nitrophenyl ether (FNDPE)                     | 64.5      | 63.5        | 63.5         |
| Potassium tetrakis ( <i>p</i> -chlorophenyl) borate (NaTpCIPB) | –         | 1.59        | 1.59         |
| Carboxylated poly(vinylchloride) (PVC-COOH)                    | 29.05     | 28.56       | 28.56        |

Values are expressed in % (w/w).

solutions was carried out by mixing suitable amounts of the ionophore with the mediator solvent and by the addition of a previously prepared PVC-COOH solution in THF. A low percentage of a lipophilic additive was also included on Vit B6 sensor solutions.

Thus, VitB1 sensor was obtained by adding 0.04 g of the ionophore (2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin) to 0.4 g of mediator solvent (FNDPE) and 0.18 g PVC-COOH (Table 1).

Two sensor membranes were prepared for vitamin B6 electrodes, one using a more lipophilic cyclodextrin (2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin) and the other a less lipophilic one ( $\beta$ -cyclodextrin). For VitB6 ISE I an amount of 0.04 g of the ionophore (2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin) and 0.01 g of additive (NaTpCIPB) in 0.4 g of mediator solvent (FNDPE) and 0.18 g PVC-COOH were used. VitB6 ISE II was prepared with 0.04 g of the ionophore ( $\beta$ -cyclodextrin) and 0.01 g of additive (NaTpCIPB) in 0.4 g of mediator solvent (FNDPE) and 0.18 g PVC-COOH (Table 1).

The sensor solutions were afterwards dropped over the surface of the solid contact of the electrode, formed by a support of epoxy resin (Araldite) mixed with powdered graphite, according to [27]. Successive applications of these solutions were done after the solvent evaporation (THF), to achieve a homogeneous membrane of about 1 mm thickness [27].

The electrodes were left on air during approximately 12 h, in order to completely dry their membranes, and then soaked in water for about 3 h, before being used.

## 2.5. Procedures

In order to evaluate the response characteristics of the constructed electrodes, several consecutive calibrations were daily performed. They were immersed together with the reference electrode in 50 ml beakers containing 20 ml of 0.1 M LiCl, as ionic strength adjuster. Under continuous stirring, the potentials were recorded when stabilized to  $\pm 0.2$  mV, after the addition of different volumes of  $1 \times 10^{-3}$  M or  $1 \times 10^{-2}$  M standard solutions of VitB6 or VitB1. The electrodes were rinsed and stirred in distilled water between measurements and when not in use, they were left on air.

Gran's Plot method was performed on 20 ml of the pH-adjusted samples (for determination of vitamin B1), and on 25 or 30 ml of vitamin B6 samples. This method was carried out

by adding volumes equivalent to 1 ml of the respective vitamin solution ( $1 \times 10^{-2}$  M or  $1 \times 10^{-1}$  M) and the potential recorded after stabilization to  $\pm 0.2$  mV.

## 3. Results and discussion

### 3.1. General working characteristics

Cyclodextrins are torus-shaped oligosaccharides that can form inclusion complexes by taking up the guest molecule (vitamin cation) into the central hydrophobic cavity. According to their complex formation constants, they can provide electrochemical ionophores giving a different selectivity pattern from those obtained with classical ion exchangers. The action mechanism of these last compounds is based on ion-interaction between a lipophilic ion (exchanger) and the analyte through electrostatic bonds. In this case, the selectivity pattern follows the Hofmeister series which are related with the hydration energy of the main ion.

In this study, cyclodextrins with different chemical characteristics (namely  $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\gamma$  cyclodextrins), several mediator solvents with different dielectric constants (2-nitrophenyloctyl ether (o-NPOE), dibutyl phthalate (DBP), 2-fluorophenyl-2-nitrophenyl ether (FNDPE), and also different immobilization support matrices (as PVC or PVC-COOH) were tested. Some sensor membranes incorporated NaTpCIPB as an additive (see Table 1). For VitB1 ISE, the first approach consisted in using  $\beta$ -cyclodextrin as ionophore and FNDPE as mediator solvent in PVC-COOH. However, the slopes obtained were not satisfactory (40 mV/decade) and for that reason a more hydrophobic cyclodextrin was then tested. Concerning VitB6 I and VitB6 II ISEs the addition of a low percentage (1.59%, w/w) of lipophilic additive (NaTpCIPB) improved the characteristics of the electrodes, contrarily to vitB1 ISE. As known, the addition of a lipophilic species as an additive can contribute for decreasing the membrane resistance and also for improving the slope and the selectivity of the membranes. Two different types of ionophores, including a more hydrophobic one (2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin) and a more lipophilic ( $\beta$ -cyclodextrin), were used. Nevertheless, no significant difference concerning general calibration parameters was noticed from this fact (Table 2). Whatever the

Table 2  
General working characteristics of thiamine (vitamin B1) and pyridoxine (vitamin B6) selective electrodes

| Characteristics <sup>a</sup> | VitB1 ISE                                   | VitB6 ISE I                                 | VitB6 ISE II                                |
|------------------------------|---|---|---|
| Slope (mV/decade)            | 51.7 $\pm$ 0.8                              | 60.6 $\pm$ 0.6                              | 61.1 $\pm$ 1.4                              |
| LLLR (M)                     | $1.0 \times 10^{-4}$                        | $5.8 \times 10^{-5}$                        | $4.3 \times 10^{-5}$                        |
| PDL (M)                      | $2.1 \times 10^{-5}$                        | $4.2 \times 10^{-5}$                        | $3.5 \times 10^{-5}$                        |
| Linear range (M)             | $1.0 \times 10^{-4}$ – $1.0 \times 10^{-1}$ | $5.8 \times 10^{-5}$ – $1.0 \times 10^{-1}$ | $4.3 \times 10^{-5}$ – $1.0 \times 10^{-1}$ |
| pH range                     | 2–4.5/6.5–8.5                               | 2–4.5                                       | 2–4.5                                       |
| Response time (s)            | <28   | <30   | <45   |

ISE: ion-selective electrode; LLLR: lower limit of linear response; PDL: practical detection limit.

<sup>a</sup> Average of two determinations with three units of each electrode proposed.

Table 3  
Major characteristics of the electrodes referred in literature sensitive either to vitamin B1, vitamin B6 or both

| Characteristics        | Ref. [18]   |                      | Ref. [19]  |                    | Ref. [20]   |                       | Ref. [21]  |                       |
|------------------------|---|----------------------|--|--------------------|---|-----------------------|--|-----------------------|
|                        | VitB1   | VitB6                | VitB6 I  | VitB6 II           | VitB1 I   | VitB6 I               | VitB6 II   | VitB1                 |
| Electrode construction | Ion association complex; without inner reference solution |                      | Ion association complexes; with inner reference solution                           |                    | Ion association complexes; with inner reference solution                    |                       | Ion association complexes; with inner reference solution |                       |
| Membrane composition   | TCPB <sup>a</sup> +o-NPOE+PVC                             |                      | Molybdophosphate (II) <sup>a</sup> /tungstophosphate (II) <sup>a</sup> +2-NFFE+PVC |                    | DNNS (I) <sup>a</sup> /CITPB (II) <sup>a</sup> +o-NPOE+PVC                  |                       | NPOE+PVC   |                       |
| Slope                  | 32.6±0.9 <sup>b</sup>                                     | 62.6±0.3             | 54.0±0.5   | 54.5±0.4           | 28.0±0.4 <sup>c</sup>   | 27.1±0.5 <sup>c</sup> | 55.3±0.8   | 29.6±0.7 <sup>b</sup> |
| LLLR (M)               | 8.0×10 <sup>-6</sup>                                      | 2.0×10 <sup>-5</sup> | –  | –                  | 1×10 <sup>-5</sup>  | 1×10 <sup>-5</sup>    | 7.1×10 <sup>-4</sup>                                     | 1.0×10 <sup>-7</sup>  |
| PDL (M)                | 1.0×10 <sup>-6</sup>                                      | 3.9×10 <sup>-6</sup> | 4×10 <sup>-5</sup>   | 4×10 <sup>-5</sup> | 5×10 <sup>-6</sup>  | 5.6×10 <sup>-6</sup>  | 2.5×10 <sup>-4</sup>                                     | –                     |
| Response time          | ~15 s   | ~15 s                | 60 s   | 45 s               | 10–30 s in 1×10 <sup>-1</sup> to 1×10 <sup>-4</sup> M/3 min in more diluted | –                     | –  | <2 min                |
| pH                     | 2–4   | 2–4                  | 2–4  | 2–4                | 2–4.5   | 2–4                   | 2–4.5  | ±4                    |
| Analytical application | was not performed on multivitamins for VitB6              |                      | Only two samples with very simple composition                                      |                    | Only two samples whose composition was not mentioned                        |                       | Only one sample  |                       |

LLLR: lower limit of linear response; PDL: practical detection limit; TCPB: tetra(2-clorophenyl)borate; O-NPOE: 2-nitrophenyl octyl ether; PVC: poly(vinyl chloride); DNNS: dinonylnaphthalene sulphonate; TFPB: 2-tetrakis [3,5-bis(2-methoxyhexafluoro-2-propyl)phenyl]borate.

<sup>a</sup> Molecule that forms the ion complex association with the respective vitamin.

<sup>b</sup> pH 4.

<sup>c</sup> pH 3.5.

sensor prepared poor responses in terms of slope and practical detection limits were obtained with the membrane formulations using PVC, instead of PVC-COOH and also mediator solvents of lower dielectric constants (*o*-NPOE and DBP) than FNDPE, thus these membranes were not further used. Once three final sensor membrane compositions were achieved (Table 1), the performance and characteristics of the corresponding electrodes was assessed, during the ISEs useful lifetime (Table 2).

Regarding VitB1 electrode, all tests were performed using thiamine solutions in hydrochloride or mononitrate salt forms, once they constitute the main raw materials in the preparation of multivitamin pharmaceuticals. In both solutions the electrodes present similar characteristics in what concerns the upper detection limit. This parameter is a consequence of a coextraction process of the primary cation and interfering anions from the sample into the ion-selective membrane and consequently related with the lipophilicity of the counter ions, which are similar in this case. Thiamine molecule Exhibits two pKa values of 4.8 and 9. A pure solution of thiamine mononitrate in lithium chloride shows a pH 7, and the molecule is then mono positively charged. On the other hand, the solution of the corresponding hydrochloride form shows a pH 4, and thus the double cationic form of thiamine predominates. The proposed electrodes showed a reproducible near Nernstian slope of  $51.7 \pm 0.8$  mV/decade, when calibrated with solutions of thiamine mononitrate salt form, or pH adjusted thiamine hydrochloride form (pH 7). A stable response of  $31.8 \pm 1.7$  mV/decade was also obtained, when solutions of thiamine hydrochloride in LiCl 0.1 M (pH 4) without previous pH adjustment, were tested. In spite of the possibility of working in two different pH ranges, it was decided to choose the one that allows a higher slope value (pH 7), because of the higher precision of the results achieved. This difference in slope values was not reported before by other authors [18,20,21], as can be seen in Table 3, where the characteristics of VitB1 selective electrodes previously reported in literature are described. The possibility of working with a higher slope ( $51.7 \pm 0.8$  mV/decade) allows a better precision of the results, which is important mainly in the measurements where both vitamins are present in samples. Furthermore, the proposed electrodes present quicker response when compared with those reported before [20,21] and also a widened pH operational range [18,20,21].

In what concerns VitB6 electrodes, the two developed membranes, with slightly different compositions, showed similar characteristics (Table 2). As a consequence, they were both used in all the following evaluations. Comparing with those previously reported in literature (Table 3), some features were improved, namely the working slope and the response times considering those reported on [19,20], a widened pH range, and better LLLR and PDL regarding to [20].

The constructed units showed a period of useful lifetime superior to 3 months both for VitB1 and VitB6 membranes, and potential changes less than 2 mV were recorded between calibrations.

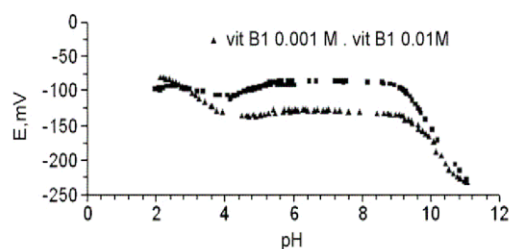


Fig. 1. Diagrams of Reilley for VitB1 ISE achieved at two concentration levels ( $10^{-3}$  M and  $10^{-2}$  M) of the main ion.

### 3.2. Effect of pH in electrodes response

The effect of pH in the electrodes response was evaluated through Reilley's diagrams. The experiments were conducted with two electrodes of each type, for two concentration levels of the primary ion evolved (thiamine or pyridoxine)- $1 \times 10^{-2}$  M and  $1 \times 10^{-3}$  M, using sodium hydroxide or sulphuric acid to increase or decrease the pH, respectively, over the pH range 2–11 (Figs. 1 and 2).

The potential changes were recorded, and the operational pH range established, whenever potentials did not change by more than 5 mV.

Reilley diagrams for vitamin B1 electrode (Fig. 1) showed that two working pH ranges, namely 2–4 (in which thiamine is double charged) and 6.5–8.5 (thiamine molecule is single positively charged) were obtained.

In what concerns vitamin B6 ISEs I and II (Fig. 2A and B), an operational pH range between 2 and 4.5 was obtained for both type of electrodes.

### 3.3. Selectivity coefficients evaluation

The selectivity of the developed electrodes against several inorganic and organic species usually present on multivitamin formulations was evaluated. For the study of the interference

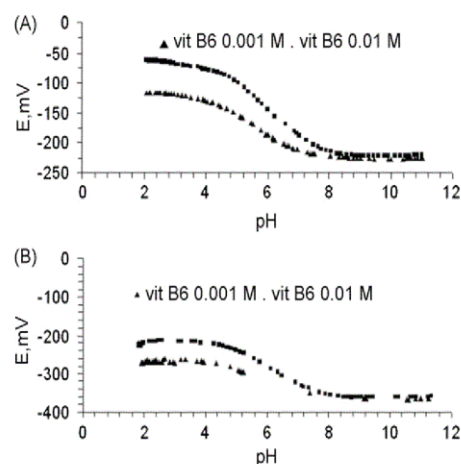


Fig. 2. Diagrams of Reilley for: (A) VitB6 ISE I and (B) VitB6 ISE II achieved at two concentration levels ( $10^{-3}$  M and  $10^{-2}$  M) of the main ion.

Table 4  
Potentiometric selectivity coefficients ( $\log K_{\text{pot}^{\text{vitB1,interferent}}}$ ) for VitB1 ISEs<sup>a</sup>

| Interferent                  | vitamin B1 ISE               |                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                              | $1.0 \times 10^{-4}$ (M)     | $9.1 \times 10^{-4}$ (M)     | $3.1 \times 10^{-3}$ (M)     |
| Na <sup>b</sup>              | $-0.64 \pm 1 \times 10^{-2}$ | $-1.54 \pm 4 \times 10^{-3}$ | $-2.11 \pm 1 \times 10^{-2}$ |
| K <sup>+b</sup>              | $-0.68 \pm 8 \times 10^{-2}$ | $-1.1 \pm 7 \times 10^{-2}$  | $-1.70 \pm 7 \times 10^{-2}$ |
| Mg <sup>2+b</sup>            | $-2.89 \pm 8 \times 10^{-2}$ | $-3.27 \pm 7 \times 10^{-2}$ | $-3.54 \pm 4 \times 10^{-2}$ |
| Fe <sup>3+b</sup>            | $-1.80 \pm 7 \times 10^{-2}$ | $-1.39 \pm 5 \times 10^{-2}$ | $-1.27 \pm 7 \times 10^{-2}$ |
| Vitamin C <sup>b</sup>       | $-0.80 \pm 6 \times 10^{-2}$ | $-0.57 \pm 3 \times 10^{-2}$ | $-0.48 \pm 8 \times 10^{-3}$ |
| Pyridoxine (B6) <sup>b</sup> | $-0.51 \pm 9 \times 10^{-3}$ | $-0.23 \pm 6 \times 10^{-3}$ | $-0.12 \pm 5 \times 10^{-3}$ |
| Pyridoxine(B6) <sup>c</sup>  | $-0.2 \pm 0$ a               | $-0.46 \pm 0$ b              | $-0.93 \pm 0$ c              |

<sup>a</sup> Mean of four results obtained with two units.

<sup>b</sup> Results obtained by separate solutions method [28].

<sup>c</sup> Results obtained by match potential method [28], for three concentration levels of vitamin B6 (M): (a)  $2.5 \times 10^{-4}$ ; (b)  $2.5 \times 10^{-3}$ ; (c)  $2.5 \times 10^{-2}$ .

Table 5  
Potentiometric selectivity coefficients ( $\log K_{\text{pot}^{\text{vitB6,interferent}}}$ ) for VitB6 ISE I and VitB6 ISE II<sup>a</sup>

| Interferent               | Vitamin B6 ISE I             |                              |                              | Vitamin B6 ISE II            |                              |                              |
|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                           | $1.0 \times 10^{-4}$ (M)     | $9.1 \times 10^{-4}$ (M)     | $3.1 \times 10^{-3}$ (M)     | $1.0 \times 10^{-4}$ (M)     | $9.1 \times 10^{-4}$ (M)     | $3.1 \times 10^{-3}$ (M)     |
| Na <sup>+b</sup>          | $-0.22 \pm 3 \times 10^{-2}$ | $-1.20 \pm 3 \times 10^{-2}$ | $-1.70 \pm 1 \times 10^{-2}$ | $-0.72 \pm 7 \times 10^{-2}$ | $-1.48 \pm 4 \times 10^{-2}$ | $-1.96 \pm 8 \times 10^{-2}$ |
| K <sup>+b</sup>           | $-0.36 \pm 2 \times 10^{-1}$ | $-1.03 \pm 1 \times 10^{-1}$ | $-1.18 \pm 8 \times 10^{-2}$ | $-0.48 \pm 1 \times 10^{-1}$ | $-1.11 \pm 8 \times 10^{-2}$ | $-1.28 \pm 1 \times 10^{-1}$ |
| Mg <sup>2+b</sup>         | $-2.41 \pm 1 \times 10^{-1}$ | $-3.0 \pm 1 \times 10^{-1}$  | $-3.17 \pm 1 \times 10^{-1}$ | $-2.66 \pm 2 \times 10^{-1}$ | $-3.05 \pm 3 \times 10^{-2}$ | $-3.40 \pm 7 \times 10^{-2}$ |
| Fe <sup>3+b</sup>         | $-2.80 \pm 7 \times 10^{-2}$ | $-3.05 \pm 2 \times 10^{-2}$ | $-3.11 \pm 5 \times 10^{-2}$ | $-2.89 \pm 9 \times 10^{-3}$ | $-3.15 \pm 2 \times 10^{-2}$ | $-3.37 \pm 2 \times 10^{-2}$ |
| Thiamine(B1) <sup>b</sup> | $1.28 \pm 7 \times 10^{-2}$  | $1.0 \pm 7 \times 10^{-2}$   | $0.78 \pm 6 \times 10^{-2}$  | $0.85 \pm 2 \times 10^{-2}$  | $0.65 \pm 2 \times 10^{-2}$  | $0.60 \pm 4 \times 10^{-2}$  |
| Thiamine(B1) <sup>c</sup> | $1.70 \pm 0$ a               | $1.52 \pm 0$ b               | $1.12 \pm 0$ c               | $1.49 \pm 0$ a               | $1.47 \pm 0$ b               | $0.86 \pm 0$ c               |

<sup>a</sup> Mean of 4 results obtained with two units.

<sup>b</sup> Results obtained by separate solution method [28].

<sup>c</sup> Results obtained by match potential method [28], for three concentration levels of vitamin B6 (M): (a)  $2.5 \times 10^{-4}$ ; (b)  $2.5 \times 10^{-3}$ ; (c)  $2.5 \times 10^{-2}$ .

caused by cations Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup>, separate solutions method was used [28], at three levels of similar concentrations of primary and interfering ion, namely  $1.0 \times 10^{-4}$ ,  $9.0 \times 10^{-4}$  and  $3.1 \times 10^{-3}$  M (Tables 4 and 5). Regarding the vitamins usually present on multivitamin complexes, as vitamin B5, inositol, vitamin C, nicotinamide, riboflavin, cyanocobalamin and biotin, the evaluation of  $K_{\text{pot}}$  was performed using fixed interference method [28], as a way to approach the results to the real analytical conditions. Different proportions of vitamin B1 or B6 and interferent were used (Table 6), taking into account the limit values of these interferences found on the pharmaceuticals analysed.

Regarding the comparison of results for the interferences with those of previously reported electrodes [18–21], an improvement on selectivity for most of the cations studied was obtained, even in mutual interference of vitamin B1 and B6. This fact is related to the buffered activity of the free main ion in the membrane due to the host guest complex equilibrium, which repels other ions of the same charge [18–21]. The molecular recognition has demonstrated to be more selective by using a macrocyclic compound, instead of that verified with classical ion exchanger type, whose action mechanism is based on electrostatic interactions [18–21].

Concerning the interference of thiamine on VitB6 electrode and of pyridoxine on VitB1 electrode, match potential method [28] was also carried out (Tables 4 and 5), at three levels

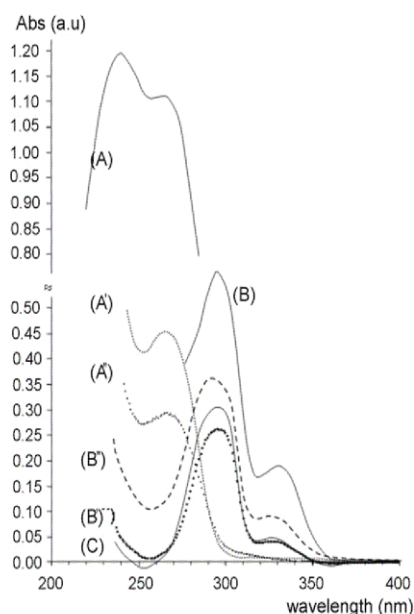


Fig. 3. UV spectra profiles obtained for two solutions with  $3 \times 10^{-4}$  molL<sup>-1</sup> in thiamine (A) and pyridoxine (B); after extraction with a similar volume of FNDPE (A' and B') or after extraction with cocktails used in the preparation VitB1 ISE and VitB6 ISE I (A'' and B'') or after extraction with cocktail used in the preparation VitB6 ISE II (C).

Table 6  
Potentiometric selectivity coefficients ( $\log K_{pot(VitB1 \text{ or VitB6, interferent})}$ ) for VitB1 ISE, VitB6 ISE I and VitB6 ISE II (fixed interference method-ref. [28])

| Interferent    | VitB1 ISE                    |                                |                              | VitB6 ISE I                  |                              |                              | VitB6 ISE II                 |                              |                              |                              |                              |                              |
|----------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                | A                            | B                              | C                            | D                            | E                            | F                            | D                            | E                            | F                            | D                            | E                            | F                            |
| Nicotinamide   | $-0.81 \pm 6 \times 10^{-3}$ | $-1.80 \pm 9 \times 10^{-3}$   | $-2.7 \pm 3 \times 10^{-3}$  | $-1.39 \pm 8 \times 10^{-2}$ | $-2.34 \pm 4 \times 10^{-3}$ | $-3.0 \pm 2 \times 10^{-2}$  | $-1.4 \pm 8 \times 10^{-2}$  | $-2.37 \pm 5 \times 10^{-3}$ | $-2.90 \pm 2 \times 10^{-2}$ | $-1.28 \pm 7 \times 10^{-2}$ | $-2.23 \pm 6 \times 10^{-3}$ | $-2.90 \pm 7 \times 10^{-2}$ |
| Riboflavin     | $-0.28 \pm 2 \times 10^{-2}$ | $-1.44 \pm 3 \times 10^{-2}$   | $-2.15 \pm 1 \times 10^{-2}$ | $-1.34 \pm 2 \times 10^{-2}$ | $-2.22 \pm 6 \times 10^{-3}$ | $-3.07 \pm 8 \times 10^{-2}$ | $-1.28 \pm 7 \times 10^{-2}$ | $-2.23 \pm 9 \times 10^{-2}$ | $-2.90 \pm 7 \times 10^{-2}$ | $0.19 \pm 4 \times 10^{-2}$  | $-2.50 \pm 0$                | $-1.64 \pm 2 \times 10^{-1}$ |
| Inositol       | $0.15 \pm 5 \times 10^{-3}$  | $-0.80 \pm 6 \times 10^{-2}$   | $-2.02 \pm 2 \times 10^{-2}$ | $-0.92 \pm 6 \times 10^{-2}$ | $-1.92 \pm 9 \times 10^{-2}$ | $-2.94 \pm 5 \times 10^{-2}$ | $0.74 \pm 9 \times 10^{-2}$  | $-2.50 \pm 0$                | $-1.64 \pm 2 \times 10^{-1}$ | $-0.94 \pm 7 \times 10^{-3}$ | $-0.37 \pm 1 \times 10^{-1}$ | $-1.33 \pm 1 \times 10^{-1}$ |
| Cyanocobalamin | $-0.62 \pm 2 \times 10^{-2}$ | $-0.0044 \pm 3 \times 10^{-2}$ | $-1.16 \pm 9 \times 10^{-2}$ | $0.73 \pm 6 \times 10^{-2}$  | $-0.35 \pm 1 \times 10^{-2}$ | $-1.25 \pm 3 \times 10^{-2}$ | $0.31 \pm 1 \times 10^{-1}$  | $-0.37 \pm 1 \times 10^{-1}$ | $-1.33 \pm 1 \times 10^{-1}$ | $0.62 \pm 2 \times 10^{-2}$  | $-1.70 \pm 2 \times 10^{-2}$ | $-1.54 \pm 2 \times 10^{-1}$ |
| Biotine        | $-0.94 \pm 7 \times 10^{-3}$ | $-0.0044 \pm 3 \times 10^{-2}$ | $-1.16 \pm 9 \times 10^{-2}$ | $0.26 \pm 4 \times 10^{-2}$  | $-0.70 \pm 5 \times 10^{-2}$ | $-1.70 \pm 2 \times 10^{-2}$ | $0.31 \pm 1 \times 10^{-1}$  | $-0.68 \pm 5 \times 10^{-2}$ | $-1.54 \pm 2 \times 10^{-1}$ | $-0.94 \pm 7 \times 10^{-3}$ | $-3.50 \pm 5 \times 10^{-3}$ | $-3.82 \pm 5 \times 10^{-2}$ |
| Vitamin B5     | $-2.19 \pm 6 \times 10^{-2}$ | $-2.59 \pm 2 \times 10^{-2}$   | $-2.95 \pm 2 \times 10^{-2}$ | $-2.81 \pm 8 \times 10^{-2}$ | $-3.42 \pm 1 \times 10^{-1}$ | $-3.50 \pm 5 \times 10^{-3}$ | $-2.85 \pm 6 \times 10^{-2}$ | $-3.4 \pm 6 \times 10^{-2}$  | $-3.82 \pm 5 \times 10^{-2}$ | $-2.19 \pm 6 \times 10^{-2}$ | $-4.45 \pm 0$                | $-4.19 \pm 2 \times 10^{-1}$ |
| Vitamin C      | $-2.19 \pm 6 \times 10^{-2}$ | $-2.59 \pm 2 \times 10^{-2}$   | $-2.95 \pm 2 \times 10^{-2}$ | $-2.52 \pm 0$                | $-4.00 \pm 4 \times 10^{-2}$ | $-4.45 \pm 0$                | $-2.46 \pm 3 \times 10^{-1}$ | $-3.37 \pm 1 \times 10^{-1}$ | $-4.19 \pm 2 \times 10^{-1}$ | $-2.19 \pm 6 \times 10^{-2}$ | $-4.45 \pm 0$                | $-4.19 \pm 2 \times 10^{-1}$ |

Relative proportions of vitamin B1 or B6 vs. respective interferent (vitamin B1 or B6; interferent): (A) 1:0.3 nicotinamide; 1:0.1 riboflavin; 1:0.2 vitamin B5; (B) 1:3 nicotinamide; 1:1 riboflavin; 3:1 inositol; 125:1 cyanocobalamin; 33:1 biotine; 1:2 vitamin B5; (C) 1:30 nicotinamide; 1:10 riboflavin; 3:10 inositol; 125:10 cyanocobalamin; 33:10 riboflavin; 1:0.3 riboflavin; 1:0.1 inositol; 125:0.1 cyanocobalamin; 11:0.1 biotine; 1:0.5 vitamin B5; 1:10 vitamin C; (D) 1:5 nicotinamide; 1:3 riboflavin; 1:1 inositol; 125:1 cyanocobalamin; 11:1 biotine; 1:5 vitamin B5; 1:100 vitamin C; (E) 1:50 nicotinamide; 1:30 riboflavin; 1:10 inositol; 125:10 cyanocobalamin; 11:10 biotine; 1:50 vitamin B5; 1:1000 vitamin C.

<sup>a</sup> No results were obtained for this concentration level.

of concentration of the main ion— $2.5 \times 10^{-4}$ ,  $2.5 \times 10^{-3}$  and  $2.5 \times 10^{-2}$  M.

The obtained results are of the same order of magnitude, besides the method used for this evaluation, and only thiamine can be considered as an interferent to VitB6 ISEs. Taking into account the three types of electrodes, a maximum of  $\log K_{pot}$  of 0.75 (Table 6) is obtained for inositol, biotine and cyanocobalamin, regarding the most unfavourable interferent proportion.

The thiamine interference is related with its more hydrophobic character. This observation could be corroborated through spectrophotometric experiments performed on aqueous solutions of both vitamins (Fig. 3). Extraction of the solutions with similar volumes of the mediator solvent lead to greater absorbance decrease in vitamin B1 spectrum compared to the obtained for vitamin B6 (Fig. 3 A-A', B-B', respectively). The presence of cyclodextrins increased the extraction yield into the organic mediator phase in both cases (Fig. 3 A'' and B'') less evident when  $\beta$ -cyclodextrin is considered as ionophore (Fig. 3C). Regarding the selectivity coefficients for VitB6 ISE I with VitB6 ISE II it was noticed that the former is generically more selective, which also can be related with better extraction observed for 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin.

### 3.4. Analytical applications

The characteristics obtained for the developed electrodes are adequate to analytical application on the determination of thiamine and pyridoxine in multivitamin pharmaceutical preparations (tablets, sachets, ampoules), where both drugs are present. The analytical usefulness of the aforementioned electrodes, whose construction, assessment and applications were described, was carried out by the analysis of complex pharmaceutical multivitamin formulations and the results are shown in Tables 7 and 8. The values reported correspond to the results obtained by Gran's plot method and also by HPLC method for the same products, in which both vitamins are present in different proportions. Mean recovery values of  $98.8 \pm 2.9$  for VitB1 ISE,  $96.5 \pm 2.0$  for VitB6 ISE I and  $98.9 \pm 2.1$  for VitB6 ISE II were obtained. The best precision registered with VitB6 ISE I

Table 7  
Vitamin B1 determination in several pharmaceuticals using the proposed electrodes, the corresponding recovery values and the results of the external reference method<sup>a</sup>

| Pharmaceutical          | Vitamin B1 content (mg) |                  |                 |               |
|-------------------------|-------------------------|------------------|-----------------|---------------|
|                         | Labelled                | Gran's plot      | Recovery (%)    | HPLC          |
| Neurobion ampoules      | 100.0                   | $105.0 \pm 15.1$ | $95.1 \pm 2.4$  | $100.5 \pm 6$ |
| Becozyme C tablets      | 15.0                    | $15.3 \pm 1.1$   | $102.0 \pm 3.3$ | $15.5 \pm 0$  |
| Dragavit B tablets      | 15.0                    | $14.7 \pm 0.8$   | $98.6 \pm 1.9$  | <sup>b</sup>  |
| Varimine stress sachets | 15.0                    | $15.0 \pm 0.4$   | $99.6 \pm 3.6$  | <sup>b</sup>  |

<sup>a</sup> Results obtained in two samples of the same product, with three electrodes and expressed in mg per dose unit (sachet, pill or ampoule).

<sup>b</sup> Separation of peaks was not achieved under the same experimental conditions.



Table 8

Vitamin B6 determination in several pharmaceuticals using the proposed electrode, the corresponding recovery values and the results of the external reference method<sup>a</sup>

| Pharmaceutical     | Vitamin B6 content (mg) |                    |                   |                     |                    |            |
|--------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|---------------------|--------------------|------------|
|                    | Labelled                | Gran's plot (vB6I) | Recovery (%) vB6I | Gran's plot (vB6II) | Recovery (%) vB6II | HPLC       |
| Neurobion tablets  | 200.0                   | 173.0 ± 0          | 95.1 ± 0.5        | 181.8 ± 11.4        | 97.4 ± 4.4         | 164.4 ± 11 |
| Neurobion ampoules | 100.0                   | 103.1 ± 0          | 99.3 ± 5.3        | 98.1 ± 10.5         | 102.0 ± 4.7        | 97.3 ± 6   |
| Becozyme C tablets | 5.0                     | 5.6 ± 0.8          | 96.4 ± 0.3        | 5.2 ± 0.7           | 98.0 ± 4.0         | 5.0 ± 0    |
| Dragavit B tablets | 5.0                     | 6.0 ± 0            | 95.0 ± 0.4        | 5.5 ± 0.6           | 98.0 ± 3.5         | 5.5 ± 0    |

<sup>a</sup> Results obtained in two samples of the same product, with three electrodes and expressed in mg per dose unit (sachet, pill or ampoule).

relatively to VitB6 ISE II is in accordance with its better selectivity, when compared with that one accomplished by VitB6 ISE II unit.

In Table 3, where the characteristics of the reported VitB1 and B6 electrodes are shown, it is possible to point out that any complex formulation was tested. In fact, for Ref. [18], no determinations were achieved for vitamin B6 on multivitamin formulations due to the interference of thiamine in pyridoxine selective membrane. This sensor proved to be able to quantify VitB6 only in pure pyridoxine tablets. In Ref. [19], analytical application was performed on two samples, with very simple composition (three active substances for both), and one of those did not include in its constitution the major VitB6 interference, which was VitB1. On references [20,21], only one or two samples were determined by using standard addition technique. However, with cyclodextrin-based electrodes it was possible to obtain good results even in samples with both vitamins, besides the enormous complexity of formulations. This fact was achieved due to the improvement on general characteristics of the electrodes, especially their selectivity performance.

#### 4. Conclusions

The use of cyclodextrins as ionophores for construction of the proposed electrodes proved the assessment of good quality ISEs when compared with classical ion exchange materials [18–21], especially in what concerns slope, reproducibility and selectivity. This ionophore allowed obtaining electrodes for vitamin B1 with slopes corresponding to monoprotonated or diprotonated species, rendering their use in samples with different pHs. The more specific ionic recognition accomplished with this type of macrocycles, gave rise to less interference from alkaline and metal alkaline ions and also vitamins often present in complex matrix pharmaceutical preparations multivitamin-type. Therefore, analysis with good results of thiamine and pyridoxine were possible to obtain in formulations in which those substances are simultaneously present, contrarily to the previously reported works [18–21]. For the first time, the developed electrodes allowed successfully analytical application to real complex matrix pharmaceuticals, with a very simple, rapid and accurate method. Concerning the disposable official methods, the potentiometric one allows the possibility of determining both vitamins (thiamine and pyridoxine) on different phar-

maeutical formulations, applying the same methodology, whatever the type of formulation analysed.

The proposed units seem to present excellent characteristics to further application into an automatic flow system.

#### Acknowledgment

Ana Rita Pires thanks FCT and FSE for a PhD grant (SFRH/BD/25995/2005).

#### References

- [1] Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, The Complete Drug Reference, 33rd edition, Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, Martindale, 2002, August 30, pp. 1384–1389.
- [2] British Pharmacopoeia Commission Secretariat, British Pharmacopoeia 2005, vol. III, British Pharmacopoeia Commission Secretariat, 2005, August 26, pp. 2762, 2763, 2832, 2833.
- [3] P.L. López-de-Alba, L.L. Martínez, V. Cerdá, I. Hernández, J. Braz. Chem. Soc. 17 (2006) 715–722.
- [4] D. Ozdemir, E. Dinc, Chem. Pharm. Bull. 52 (2004) 810–817.
- [5] F. Feng, K. Wang, Z. Cheng, Q. Cheng, J. Ling, S. Huang, Anal. Chim. Acta 527 (2004) 187–193.
- [6] A. El-Gindy, F. El-Yazib, A. Mostafa, M.M. Mayer, J. Pharm. Biomed. Anal. 35 (2004) 703–713.
- [7] K. Li, Biom. Chrom. 16 (2002) 504–507.
- [8] Z. Chen, B. Chen, S. Yao, Anal. Chim. Acta 569 (2006) 169–175.
- [9] M.L. Marzall, A. Lebidzinska, W. Czarnowski, P. Szefer, J. Chromatogr. A 1094 (2005) 91–98.
- [10] M.F.S. Teixeira, A. Segnini, F.C. Moraes, L.H. Marcolino-Júnior, O. Fatibello Filho, E.T.G. Cavalheiro, J. Braz. Chem. Soc. 14 (2003) 316–321.
- [11] C.O. Costa-Neto, A.V. Pereira, C. Aniceto, O. Fatibello-Filho, Talanta 48 (1999) 659–667.
- [12] L.G. Shairadova, L.N. Davletshina, G.K. Budnikov, Anal. Chem. 61 (2006) 502–509.
- [13] H. Zhu, Q. He, Q. Fang, H. Chen, Anal. Lett. 35 (2002) 707–720.
- [14] Z. Zhang, S. Hou, Chem. Anal. 47 (2002) 747–757.
- [15] P.O. Barrales, A.D. Vidal, M.L.F. Córdova, A.M. Díaz, J. Pharm. Biom. Anal. 25 (2001) 619–630.
- [16] K. Vytras, J. Pharm. Biom. Anal. 7 (1989) 789–812.
- [17] Z.R. Zhang, V.V. Cosofret, Select. Electr. Rev. 12 (1990) 35–135.
- [18] J.L.F.C. Lima, M.C.B.S.M. Montenegro, A.M.R. Silva, J. Pharm. Biom. Anal. 9 (1991) 1041–1046.
- [19] G.A.E. Mostafa, J. Anal. Chem. 58 (2003) 1073–1077.
- [20] Z.R. Zhang, Y.X. Li, D.Y. Mao, V.V. Cosofret, J. Pharm. Biom. Anal. 8 (1990) 385–388.
- [21] G.H. Zhang, T. Imaio, Y. Asano, T. Sonoda, H. Kobayashi, N. Ishibashi, Anal. Chem. 62 (1990) 1644–1648.

*A.R. Pires et al. / Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 46 (2008) 683–691*

- [22] E.M.M. Valle, *Process Biochem.* 39 (2004) 1033–1046.
- [23] J. Mosinger, V. Tománková, I. Němcová, J. Zýka, *Anal. Lett.* 34 (2001) 1979–2004.
- [24] K. Odashima, H. Hashimoto, Y. Umezawa, *Mickrochim. Acta* 113 (1994) 223–238.
- [25] P.S. Bates, R. Kataký, D. Parker, *Analyst* 119 (1994) 181–186.
- [26] J.L.F.C. Lima, M.C.B.S.M. Montenegro, *Mickrochim. Acta* 131 (1999) 187–190.
- [27] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Costa Lima, A.M.R. Silva, *Il Farmaco* 45 (1990) 901–913.
- [28] Y. Umezawa, K. Umezawa, H. Sato, *IUPAC, Pure Appl. Chem.* 67 (1995) 507–518.

# CAPÍTULO IV

Automatização dos  
Ensaio de Doseamento  
para Análise de  
Formulações  
Multi-Componente



**Determinação Potenciométrica Simultânea de Tiamina e Piridoxina em Polivitamínicos, Aplicando um Eléctrodo Baseado em Ciclodextrina, e Sensível a Tiamina**

Neste trabalho, um eléctrodo selectivo a ião sem referência interna é usado para a determinação simultânea de tiamina e piridoxina, em polivitamínicos. A sua composição baseia-se em 6,35% (m/m) do ionóforo  $\beta$ -ciclodextrina, 1,59% (m/m) do aditivo lipofílico *tetrakis p*-clorofenil borato de potássio, e 63,5% (m/m) do solvente mediador 2-fluorofenil-2-nitrofenil-éter. O eléctrodo responde selectivamente a tiamina, contudo apresenta uma elevada interferência inicial de piridoxina.

Este facto foi explorado em condições de fluxo, para quantificação de ambas as espécies. Para este efeito, recorreu-se a um sistema de fluxo multitarefa que diluiu apropriadamente as amostras reais e preparou em linha um conjunto de soluções de calibração. O sinal potenciométrico foi modelizado aplicando a regressão por mínimos quadrados parciais, o que possibilitou a quantificação do conteúdo de cada vitamina, no intervalo analítico  $1 \times 10^{-3}$  -  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. A comparação deste método com um cromatográfico permitiu a obtenção de erros absolutos inferiores a  $0,10 \times 10^{-4}$  e  $0,16 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> para a tiamina e para a piridoxina, respectivamente.

---

*Analytical Letters*, 42: 1923–1939, 2009  
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC  
ISSN: 0003-2719 print/1532-236X online  
DOI: 10.1080/00032710903082549



## ELECTROANALYTICAL

# Simultaneous Potentiometric Determination of Thiamine and Pyridoxine in Multivitamins Using a Single Cyclodextrin-Based Thiamine-Selective Electrode

Ana Rita Pires, Alberto N. Araújo, João A. Lopes, and  
M. Conceição B. S. M. Montenegro  
REQUIMTE, Porto, Portugal

**Abstract:** In this work, a PVC tubular ion-selective electrode without internal reference [composed of 6.35% (w/w) of  $\beta$ -cyclodextrin as ionophore, 1.59% (w/w) of potassium tetrakis (p-chlorophenyl) borate as lipophilic additive, and 63.5% (w/w) of 2-fluorophenyl-2-nitrophenyl ether as mediator solvent] was used to accomplish the simultaneous determination of thiamine and pyridoxine in multivitamin products. The electrode responds selectively to thiamine but presents high initial diffusion potential contribution from pyridoxine. This fact was exploited under flow conditions for the quantitative assessment of both species. A multitask flow system was optimized to dilute appropriately real samples and prepare in-line the set of calibrating solutions. The potentiometric signal was modeled by partial least squares regression, enabling the prediction of the content of each vitamin in the range of  $1 \times 10^{-3}$  to  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Absolute errors of prediction inferior to  $0.06 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> and  $0.16 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> for pyridoxine and thiamine respectively were obtained when compared with the chromatographic method.

**Keywords:** ISE, partial least squares regression, pyridoxine, SIA, thiamine

Received 9 March 2009; accepted 26 May 2009.

Ana R. Pires thanks Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) and Fundo Social Europeu (FSE) for the grant (SFRH/BD/25995/2005).

Address correspondence to M. Conceição B. S. M. Montenegro, REQUIMTE, Serv. Química Física, Fac. Farmácia (U. P.), Rua Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto, Portugal. E-mail: mcbranco@ff.up.pt

A. R. Pires et al.

## INTRODUCTION

Thiamine hydrochloride (THI) and pyridoxine hydrochloride (PYD), namely vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>6</sub>, are hydrosoluble complex B vitamins acting as coenzymes in different energy-production pathways of the human body (Sweetman 2002). Regular intake is achieved by ingestion of vegetables, fortified foods, or dietetic supplements. Unfortunately, during processing and storage, they might undergo leaching or chemical changes through spontaneous reactions. In this way, the interest in suitable and reliable methods to assess the amount of vitamins on complex matrices is justified. Quantification of either THI or PYD involve the use of ultraviolet (UV)–visible spectrophotometry with chemometrics processing (Dinc, Baleanu, and Onur 2001; Dinc, Kokdil, and Onur 2000; Lopez-de-Alba et al. 2006; Morelli, 1996), liquid chromatography with spectrophotometric detection (Amidzic et al. 2005; Chatzimichalakis et al. 2004), voltammetry (Teixeira et al. 2003), and flow injection with electrochemical (Fernandes et al. 2001; Lima, Montenegro, and Silva 1991; Shaidarova, Davietshina, and Budnikov 2006) or optical detection (Barrales et al. 2001; Rocha, Fatibello, and Reis 2003). Most of them present several disadvantages, such as poor signal-to-noise ratio, the use of toxic reagents, expensive instrumentation, and laborious and time-consuming procedures. Potentiometry with ion-selective electrodes (ISEs) usually enables simple analytical procedures. Nevertheless, its usefulness requires adequate selectivity characteristics formerly dependent on the composition of the resorted ISE membranes. A previous work (Pires et al. 2008) showed that ISEs were sensitive to THI and PYD and also exhibit selectivity profiles that differ significantly from others derived from electrodes chiefly based on ion-exchange principles (Lima, Montenegro, and Silva 1991; Mostafa 2003; Zhang, Li, et al. 1990; Zhang, Imato, et al. 1990). With them, use of cyclodextrins as ionophores rendered more specific ionic recognition and also helped to reduce documented interferences from sodium, potassium, magnesium, and iron as well as other vitamins (nicotinamide, riboflavin, cyanocobalamin, biotin, and vitamins B<sub>5</sub> and C) usually in multivitamin mixtures. However, PYD assessment with the described ISE requires previous addition to the samples of a selective precipitant reagent and the use of Gran's plot method to overcome the high level of interference of THI. Although not reported, preliminary work showed that the profiles of the response signals corresponding to PYD and to THI are different. Stable potential response is reached more promptly for PYD than for THI because of an important contribution of the diffusion potential (Paczosa-Bator et al. 2005) on the electrode response. Thus, the development of a procedure to screen the response of the electrode in the time

## Potentiometric Determination of Thiamine and Pyridoxine

window for both vitamins will enable a simple direct procedure to accomplish their simultaneous determination with a single ISE. In this context, the electrode membrane composition is optimized by aiming at the best potentiometric response to both species. Detection under flow conditions is adopted as an attempt to extend the contribution of diffusion potential on the electrode transient response. The analytical signals are processed by chemometric methods because of the multivariate nature of the data and the need for signal deconvolution. The potentiometric multivariate signal analysis enables the identification of relevant time windows for accurate assessment of both species simultaneously. An already-reported flow system that enables programmable and reproducible mixing ratios of two solutions (Barrales et al. 2001) is exploited in the preparation of either small volume mixtures of both vitamins directly from the respective stock solutions or in the appropriate dilution of samples. The developed analytical method was validated with complex multivitamin commercial formulations. To the best of our knowledge, it is the first time that THI and PYD were simultaneously determined by potentiometry. Moreover, in the literature on mixtures of two species, no other work using a single potentiometric detector for simultaneous determination is reported.

## EXPERIMENTAL

### Solutions

All solutions were prepared with distilled and doubly deionized water, with conductivity  $<0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$ . Analytical-grade chemicals without additional purification were used.

Stock solutions ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) of THI (Sigma) and PYD (Roche Pharmaceuticals) were prepared by weighing and dissolving the right amounts of pure powders in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  lithium chloride (Aldrich) solution (used as ionic strength adjuster) and stored in a refrigerator between uses. This last solution was also used as carrier in the flow setup, with an added PYD concentration of  $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Diluted solutions, mixtures of both vitamins, were daily prepared whenever necessary from the stock solutions, diluting the required volume with  $\text{LiCl } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ .

Multivitamin preparations purchased at local drug stores were used to validate the methodology in complex samples. Ten pills of each formulation were pulverized using a mortar and a pestle, and an amount of powder corresponding to 10 mg of THI was dissolved with  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{LiCl}$  ionic strength adjuster solution in a 50-mL volumetric flask. Using this procedure, all sample solutions were prepared in concentrations



A. R. Pires et al.

fitting the analytical concentration range of  $1 \times 10^{-4}$  to  $1 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, accordingly to the established calibration model.

The high-performance liquid-chromatographic (HPLC) method (Secretariat 2005) was selected as the reference method; the mobile phase was constituted by sodium heptanesulfonate (Sigma), methanol (HPLC grade, Merck), triethylamine (Aldrich), and orthophosphoric acid (Merck). To proceed with potentiometric results validation, all samples were prepared and analyzed following the methodology indicated in the same reference.

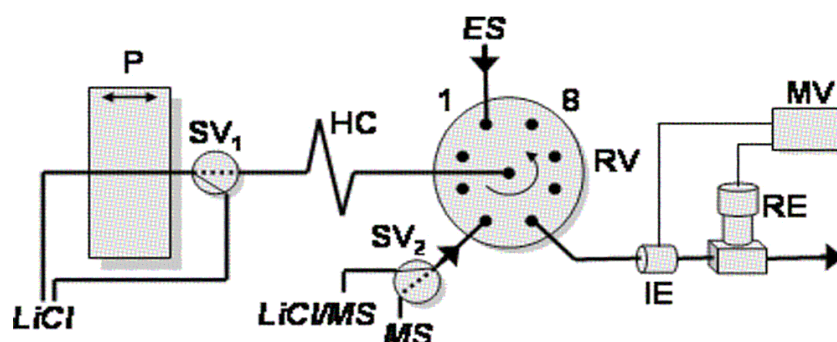
### Electrode Preparation

Tubular PVC membrane electrodes without internal reference solution were prepared with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (Fluka) (6.45% w/w, ISE I; 6.35% w/w, ISE II) or  $\beta$ -cyclodextrin (Fluka) (6.35% w/w, ISE III) as ionophores, potassium tetrakis (p-chlorophenyl) borate (Fluka) as lipophilic additive (1.59% w/w, ISE II and ISE III), 2-fluorophenyl-2-nitrophenyl ether (Fluka) as mediator solvent (64.5% w/w, ISE I; 63.5% w/w, ISE II and ISE III), and carboxylated poly(vinyl chloride) (Janssen Chimica) (29.05% w/w, ISE I; 28.56% w/w, ISE II and ISE III) dissolved in tetrahydrofuran (THF; Merck) as immobilizing agent. General preparation of the sensor solution was carried out by mixing suitable amounts of the ionophore with the mediator solvent and finally with a previously prepared mixture of PVC-COOH dissolved in about 6 mL of THF. Afterward, the sensor solutions were added dropwise over the inner wall of a central hole drilled in a graphite and epoxy resin conductive support (Santos et al. 2004). After complete drying of membranes, the electrodes were attached to the manifold and then hydrated with the carrier stream for a few minutes before being used.

### Flow System Setup

The multitask flow system is depicted in Fig. 1 and comprised a Minipuls 3 Gilson (Villiers-le-Bell, France) peristaltic pump with a PVC propulsion tube (1.65 mm i.d.) of the same brand; an eight-port rotatory valve (RV) from Valco Instruments, model C25-3118 (Huston, USA); two NResearch 161 T031 (Stow, USA) three-way solenoid valves (SVs); and a Crison MicropH-2002 potentiometer (MV) to which a 90-02-00 Orion AgCl/Ag reference electrode (RE) containing 0.1 mol L<sup>-1</sup> lithium chloride in the outer compartment and the tubular detector (TD) were

### Potentiometric Determination of Thiamine and Pyridoxine



**Figure 1.** Schematic view of the proposed flow set-up. P: peristaltic pump, HC: holding coil, SV<sub>i</sub>: solenoid valves, RV: multi-port injection valve, IE: indicator electrode (tubular detector), RE: reference electrode, MV: decimilivoltammeter, MS: stock solution of THI and PYD or sample, ES: external calibrating solution, LiCl: ionic strength adjuster solution (0.1mol.L<sup>-1</sup>).

connected. These components were interconnected with PTFE tubing of 0.8 mm i.d. and homemade devices such as joint pieces, grounding electrode, and supports for tubular and reference electrodes. The system was controlled by a microcomputer through an Advantech PCL 711B interface card. Control software and data acquisition was written in Microsoft QuickBasic 4.5. For each programmed step, it enabled selection of the SV<sub>1</sub> switch on time, pump rotation speed and mode (reversal or forward), and the number and timing of on/off switches on the SV<sub>2</sub> valve. For data treatment and modeling, Matlab version 6.5 (Mathworks, Natick, MA) and the PLS toolbox version 3.5 (Eigenvector, Wenatchee, WA) were used. The HPLC analysis were performed in a Merck Hitachi chromatographic system comprising a model 7100 pump, a Rheodyne 7725i injector (20- $\mu$ L loop), and an Alltech ODS-2 C<sub>18</sub> column (250 mm  $\times$  4.6 mm). A diode array system, model 7455, was used as detector and the data were processed by means of software package of the same brand, model D7000.

### Procedures

In the flow setup (Fig. 1), the holding coil (HC) and the transmission line between the eight-port valve (RV) and the detector was initially filled with carrier/ionic strength adjuster solution until the achievement of a detector stable signal. This was accomplished by selecting port 5 of the RV and positioning the peristaltic pump in the forward pumping mode. The steps of analytical cycles used are defined in Table 1 and were settled after optimization of potentiometric signals obtained for different

A. R. Pires et al.

**Table 1.** System control parameters

| Step <sup>a</sup> | Task        | RV   |          | SV     |                                     | Flow rate<br>(ml min <sup>-1</sup> ) | Pumping<br>direction |
|-------------------|-------------|------|----------|--------|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
|                   |             | Port | Time (s) | State  | Time (s)                            |                                      |                      |
| 1                 | Calibration | 1    | 13.5     | —      | —                                   | 1.5                                  | Reversal             |
| 2                 | Detection   | 5    | 122.5    |        |                                     | 1.8                                  | Forward              |
| 3                 | Sampling    | 4    | 13.5     | On/off | $t_{\text{on}} 2.7 - t_{\text{on}}$ | 1.5                                  | Reversal             |
| 4                 | Detection   | 5    | 122.5    |        |                                     | 1.8                                  | Forward              |
| 5                 | Detection   | 5    | 122.5    |        |                                     | 3.6                                  | Forward              |

<sup>a</sup>These parameters were used for initial potentiometric measurements of externally prepared solutions (steps 1 and 2) and after in-line mixing of solutions at variable ratios (steps 3 and 4). Steps 3 and 5 were used for preparation and measurements of synthetic mixtures and for samples analysis.

injection volumes of THI and PYD calibrating solutions and its transport flow rates through the detector, according to a Plackett–Burman design. Calibration curves were established considering peak height averages of transient signals obtained after six successive injections of each calibrating solution. Seven to nine concentration levels were assayed, and respective peak averages converted to potential differences. The analytical cycle defined by steps 1 and 2 was applied for electrodes evaluation. The analytical cycle enabling best kinetic discrimination of both vitamins is defined by steps 3 and 5. In step 3, the number and time periods of each on/off SV<sub>2</sub> cycle were varied until the achievement of signals statically similar to the ones obtained by steps 1 and 2 for externally prepared solutions of the same concentrations of PYD and THI. Fast alternate switching between on and off states of SV<sub>2</sub> enabled aspiration into the system of small volumes of one stock solution (for instance, PYD) intercalated with small volumes of carrier (if a simple dilution is aimed) or other stock solution (for example, a solution containing THI). In this way, in-line calibration solutions could be easily prepared by dilution of the respective stock solutions of both analytes (steps 3 and 4). To generate seven different calibrating solutions from each PYD or THI solution, the time interval to switch the SV<sub>2</sub> on was 5, 10, 25, 50, 75, 85, and 100% of each SV<sub>2</sub> on/off cycle period ( $t_1 = 2.7$  s). To generate artificial mixtures of THI and PYD, step 3 was performed with stock solutions of each vitamin simultaneously presented at both entries of the SV<sub>2</sub> valve. Then, step 5 was performed with a flow rate two times faster than the one normally applied (1.8 ml min<sup>-1</sup>) for the electrode characterization because of the better profile discrimination of the two vitamins achieved under these conditions. Multivitamin sample assays (steps 3 and 5) were followed, being each sample

## Potentiometric Determination of Thiamine and Pyridoxine

aspirated under *on* periods (50% of the time) in tandem with slugs of carrier (*SV<sub>2</sub> off*).

## Chemometrics Data Processing

Chemometrics processing required the acquisition of the analytical signal over time. The potentiometric signals were synchronized according to time and baseline, and the average of six replicates was taken and stored for further processing. Signal preprocessing included the application of a Savitzky–Golay filter (with first derivative) and mean centering. Logarithmic transformation was also applied to vitamin concentrations, whenever adequate. Multivariate curve resolution (MCR) and partial least squares (PLS) regression methods were selected to model the data once they are generally suited when linear relationships are expected (Otto 1999). Two independent PLS regression models were calibrated for THI and PYD estimation. Bias of the PLS regression models were assessed by internal cross-validation root mean squares error (RMSECV) obtained using the leave-one-out strategy. The optimization of the best number of latent variables for each PLS model was based on the minimum error of cross-validation profiles. The variance of model predictions was estimated using a numeric resampling strategy (bootstrapping) (Wehrens, Putter, and Buydens 2000).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Electrode Evaluation

To optimize the flow conditions enabling optimal detector response profiles, namely the highest potential variation in the shortest sample assay time, a D-optimal experimental design was created that varied the manifold parameters time and flow rate (Table 2). Sample injection volumes in the range of 70 to 800  $\mu\text{L}$  and forward flow rates throughout the detector between 0.6 and 3.0  $\text{mL min}^{-1}$  were tried using each of the three tubular detectors developed, shown only for ISE III on Table 2. For the best subroutine conditions (Table 1, steps 1 and 2) a compromise between working slopes attained for both vitamins and peak resolution was achieved. All the other hydrodynamic conditions tested provided unsatisfactory working slopes (for instance, between 13 and 40  $\text{mV dec}^{-1}$  for ISE III, Table 2). Considering the responses obtained for THI solutions, the slopes of  $19.5 \pm 3.5$ ,  $26.1 \pm 2.0$ , and  $30.6 \pm 1.4 \text{ mV dec}^{-1}$  for ISE I to ISE III were respectively achieved (three calibrations

A. R. Pires et al.

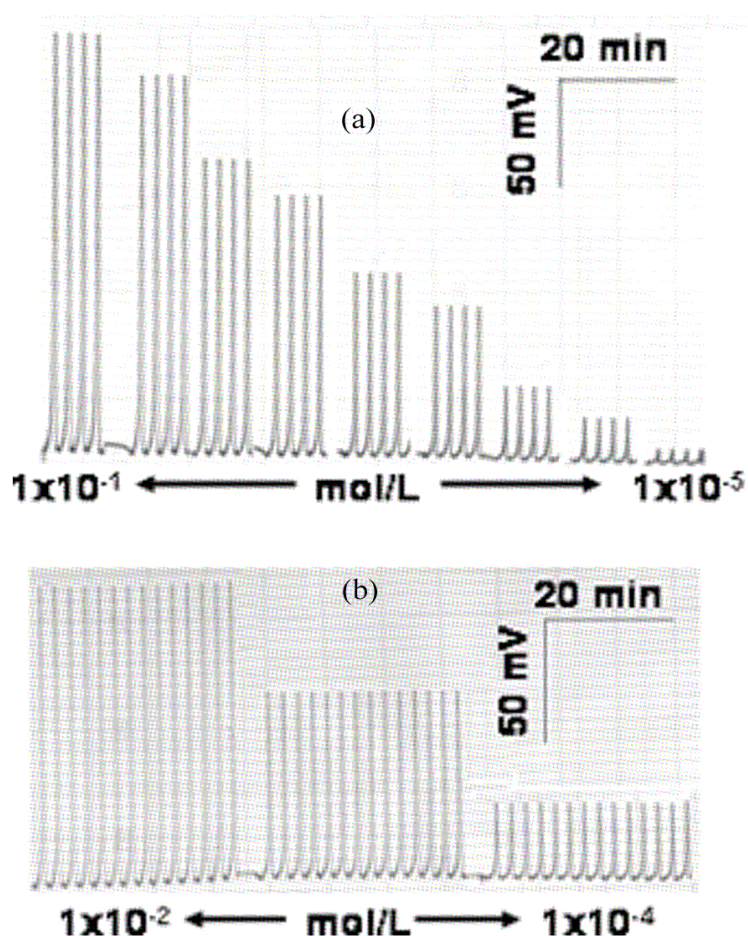
**Table 2.** Experimental design used to optimize the hydrodynamic flow conditions with externally prepared solutions of THI or PYD in four concentration ranges:  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  and  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>

| Experiment order | Manifold parameters |         |                                   |         | ISE III slope (mV dec <sup>-1</sup> ) |                |
|------------------|---------------------|---------|-----------------------------------|---------|---------------------------------------|----------------|
|                  | Time (s)            |         | Flow rate (mL min <sup>-1</sup> ) |         | THY                                   | PYD            |
|                  | Reverse             | Forward | Reverse                           | Forward |                                       |                |
| 1                | 7                   | 45      | 0.6                               | 0.6     | — <sup>a</sup>                        | — <sup>a</sup> |
| 2                | 13.5                | 122.5   | 1.5                               | 1.8     | 31.9                                  | 52.5           |
| 3                | 20                  | 200     | 2.4                               | 0.6     | 19.5                                  | 45.4           |
| 4                | 20                  | 45      | 0.6                               | 3.0     | 19.9                                  | 29.8           |
| 5                | 13.5                | 122.5   | 1.5                               | 1.8     | 29.6                                  | 53.7           |
| 6                | 7                   | 200     | 0.6                               | 3.0     | 13.4                                  | 19.7           |
| 7                | 7                   | 45      | 2.4                               | 0.6     | — <sup>a</sup>                        | — <sup>a</sup> |
| 8                | 7                   | 200     | 2.4                               | 3.0     | 35.3                                  | 48.4           |
| 9                | 13.5                | 122.5   | 1.5                               | 1.8     | 29.9                                  | 50.8           |
| 10               | 20                  | 200     | 0.6                               | 0.6     | 15.9                                  | 49.9           |
| 11               | 20                  | 45      | 2.4                               | 3.0     | 24.3                                  | 36.2           |

<sup>a</sup>No peaks were achieved under these conditions.

at six concentration levels). Also in the same sequence, the slopes of  $30.8 \pm 2.8$ ,  $52.0 \pm 1.3$ , and  $51.1 \pm 1.6$  mV dec<sup>-1</sup> were calculated from calibrations with PYD solutions. ISE III offered close to Nernstian response to the bivalent THI cation. This behavior is related to the greater THI selective extraction provided by the  $\beta$ -cyclodextrin ionophore relative to 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as evidenced throughout spectrophotometric experiments performed on aqueous solutions of this vitamin (Pires et al. 2008). The presence of the additive as ion excluder in the membranes ISE II and ISE III allowed greater slope and signal reproducibility, better than 5% RSD. As described for other ISEs (Paczosa-Bator et al. 2005), the selective recognition achieved in the presence of ionophore guarantees minute but constant activity of the free analyte in the bulk membrane that electrostatically excludes other ions with same signal charge. Consequently, ionophore-based ISEs generally exhibit lower and sub-Nernstian responses to interfering ions eventually present in samples, as those found either with ISE II or ISE III when mono-PYD cation solutions were assayed. In Fig. 2a, a typical recording obtained for a set of calibrating solutions of PYD is presented. Albeit not statistically significant, to the greater nominal slope value found for ISE II calibration with PYD solutions corresponded the slightly lesser slope calculated for THI, due to the less selective

## Potentiometric Determination of Thiamine and Pyridoxine



**Figure 2.** Typical recording of ISE III responses (a) external prepared solutions of PYD were injected into the manifold and extended from  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> to  $1 \times 10^{-1}$  mol·L<sup>-1</sup> with half a decade increments. (b) repeatability study for solutions of pyridine  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  mol·L<sup>-1</sup>.

ionophore used. Hence, the more selective ISE III was used in the remaining studies.

Cumbersome preparation of solutions could be circumvented using a fast commutating three-way solenoid valve positioned in a lateral port of the flow system ( $SV_2$  in Fig. 1). Meanwhile the reverse pumping mode was selected; small volumes of a stock solution at one entrance of the solenoid valve were aspirated into the flow path but intercalated with small volumes of carrier solution presented at the second entrance of the same valve if a sequence of switching on/off cycles were applied. The flow reversal taking place between the solutions that aspirate and carry forward toward the detector (steps 3 and 4, Table 1) promoted mutual dispersion and hence a final uniform concentration. Fourteen to four on/off cycles, lasting each from 0.9 to 3.4 s, were assayed, and

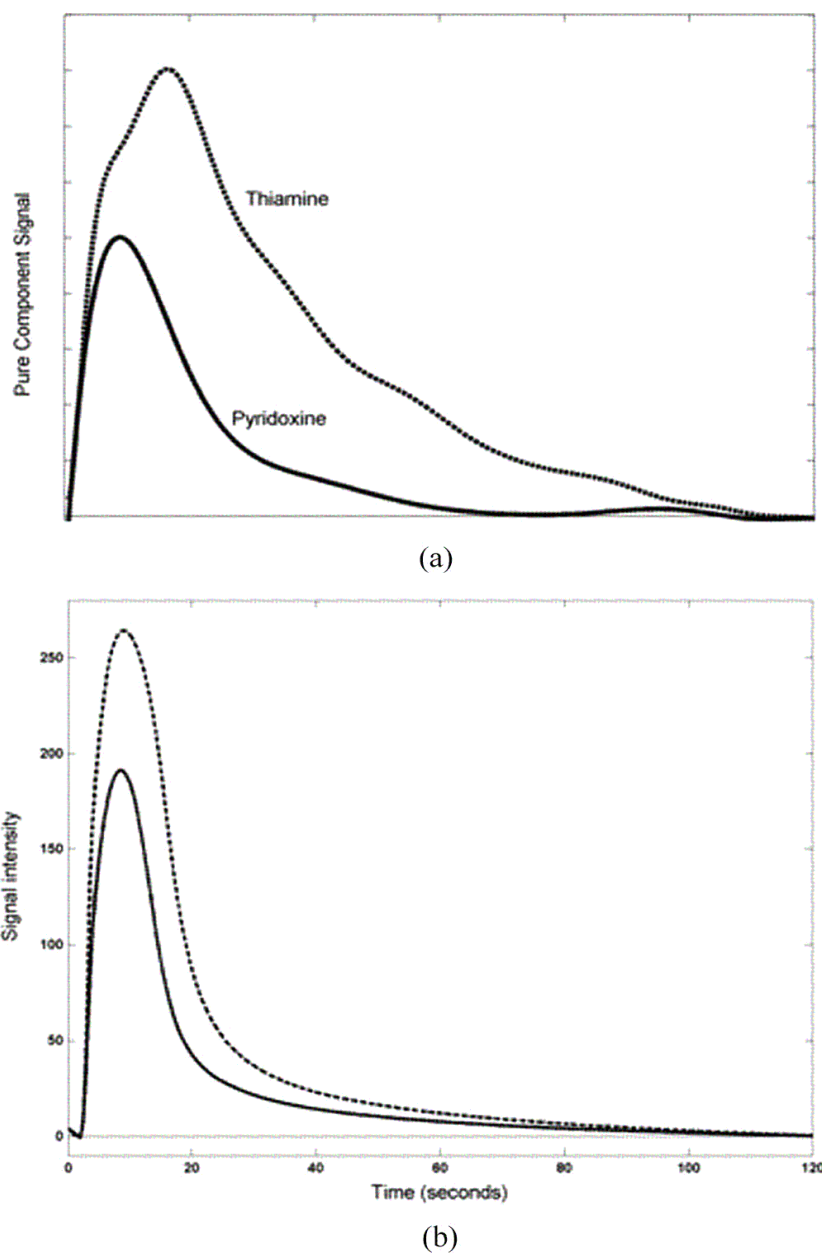
A. R. Pires et al.

the resulting ISE responses were compared with the ones furnished by injection of calibrating solutions prepared in the conventional way. The RSDs inferior to 2% and relative errors (RE) less than 3% ( $n=4$ ) to the corresponding solutions ( $5 \times 10^{-3}$  to  $5 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>) revealed the best SV<sub>2</sub> on/off period was  $t_x=2.7$  s (Table 3). Longer periods corresponded to oscillating analytical signals due to a lack of homogeneous dispersion, and very short periods promoted analytical signals with a negative tendency when compared with the ones obtained from conventionally prepared solutions. Calibration of ISE III with the in-line prepared solutions provided slopes of  $28.2 \pm 1.6$  and  $53.1 \pm 2.9$  mV dec for THI and PYD, respectively, with corresponding practical detection limits of  $9 \times 10^{-5}$  and  $4 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Repeatability of the potential readings assessed by the standard deviations of the signals produced by performing 15 analytical signals at concentration levels ranging from  $10^{-2}$  to  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> for both vitamins was better than 1.3 mV dec<sup>-1</sup> (Fig. 2b). Moreover, the total volume of stock solution inserted to generate solutions at six different concentration levels was approximately two times lower than the total volume of externally prepared solutions used to provide the same calibration curve.

### Synthetic Mixtures Analysis

Based on a simple visual inspection, it was clear that there was a high degree of signal overlapping when mixtures of THI and PYD were analyzed, following the relative proportions 9:1 ( $\times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) to 1:9 ( $\times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). Multivariate curve resolution (MCR) (Otto 1999) was applied to the acquired signals to evaluate if signal resolution allowed the identification of the THI and PYD contributions. The algorithm was run by mean-centering the profiles and setting nonnegativity constraints for the signal and concentrations (Fig. 3a). The profiles revealed an initial peak evolution correlated with THI and PYD while both the maximum peak intensity and signal slope decrease were more influenced by the THI content. Additionally, PYD and THI achieve maximum peak intensities at slightly different times. In a much smaller time scale (i.e., after direct immersion of the ISE in a mixed solution of main and interfering ions), this behavior was already observed by other authors for biological membranes as diffusion potential or “overshoot” potential response (Paczosa-Bator et al. 2005). On the basis of the diffusion layer model, the authors justified it by the higher hydration energy of the analyte (main ion) giving the slowest response. Its limited diffusion determines a momentary excess in the vicinity of membrane when a local amount variation of an interfering ion with a faster

### Potentiometric Determination of Thiamine and Pyridoxine



**Figure 3.** (a) pure component signals estimated by MCR from a set of synthetic mixtures of THI (---) and PYD (—) using  $1 \times (1.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1})$  flow-rate. (b) analytical signal obtained for a sample containing different proportions of THI and PYD using  $2 \times (3.6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1})$  flow-rate (THI= $8 \times 10^{-4}$ /PYR= $1 \times 10^{-4}$  mol · L<sup>-1</sup> (---) and THI= $1 \times 10^{-4}$ /PYR= $8 \times 10^{-4}$  mol · L<sup>-1</sup> (—)).

membrane transport is sensed. Other authors reported the use of chronopotentiometry and the initial slope or short time-fixed potential measures to provide quantitative determinations of the heparin interference in an ion-exchanger-based PVC chloride selective electrode



A. R. Pires et al.

(Langmaier, Samcova, and Samec 2007). In the present study, gradual change of PYD concentration imposed by sample dispersion enabled the extension in time of the diffusion potential contribution on the acquired signal. In an attempt to widen the differences between THI and PYD, the flow rate toward the detector was varied between 0.25 to 4 times the one applied for calibration purposes ( $1.8 \text{ ml min}^{-1}$ ). A set of 25 mixed solutions of THI and PYD both in the intervals of  $1 \times 10^{-3}$  to  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  as well as a set of four calibrating solutions containing only one vitamin were assayed to evaluate the isolated profiles of both analytes. No significant discrimination was sensed above twice the flow rate normally used.

### Multivariate Calibration Model

To evaluate if a PLS calibration model was capable of simultaneously determining THI and PYD in multivitamin samples, artificial mixtures (synthetic solutions) were first used. The purpose of this first calibration with synthetic samples was to optimize the structure of the PLS models for THI and PYD. The model structure comprises factors such as the number of latent variables, the inputs (e.g., what signal sections to use) and the outputs (e.g., need for nonlinear transformation). A set of 16 experiences considering THI and PYD in the intervals between  $1 \times 10^{-4}$  and  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  was produced according to a D-optimal experimental design (Table 1, steps 2 and 5). This procedure was necessary to allow

**Table 3.** Optimization of flow conditions with ISE III tubular detector

| $T_x$ | IS (x = 50%) |     | IS (x = 10%) |     | IS (x = 5%) |     |
|-------|--------------|-----|--------------|-----|-------------|-----|
|       | RSD          | RE  | RSD          | RE  | RSD         | RE  |
| 4.5   | 0.6          | 1.1 | 0.9          | 1.7 | 1.2         | 3.8 |
| 2.7   | 1.1          | 3.2 | 1.6          | 1.2 | 0.0         | 1.6 |
| 1.9   | 1.1          | 2.1 | 0.8          | 0.0 | 1.2         | 3.5 |
| 1.4   | 0.6          | 1.7 | 0.8          | 0.0 | 1.2         | 2.4 |
| 1.1   | 0.0          | 0.5 | 0.9          | 1.4 | 1.1         | 0.0 |
| 0.9   | 0.0          | 1.1 | 0.9          | 0.5 | 1.3         | 8.7 |
| ES    | 0.0          | —   | 0.0          | —   | 1.9         | —   |

In-line solutions (IS) were prepared throughout dilution of a  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  PYD (MS) solution in LiCl carrier solution.  $T_x$ : on/off cycle period (s); x: SV switch on time for each  $T_x$  (in %); RSD: relative standard deviation (in %,  $n=4$ ); RE: relative error toward the externally prepared solutions (in %); ES:  $5 \times 10^{-2}$ , and  $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  externally prepared solutions.

### Potentiometric Determination of Thiamine and Pyridoxine

the robust estimation of PLS models without the need of too many experiments. Moreover, trials were performed considering one vitamin fixed at low concentration and varying the concentration of the other. From Fig. 3b, it is clear that different proportions of both analytes were reflected in the maximum signal intensity and signal shape (different decreasing slopes). This observation is in accordance to what was previously observed when the flow rate was set to  $1 \times (1.8 \text{ ml min}^{-1})$ . Because the flow rate was increased to two times ( $3.6 \text{ ml min}^{-1}$ ), the peak widths decreased.

Instead of using the same PLS model to estimate both vitamins simultaneously, the use of two different PLS models (one for THI and another for PYD) is known to be a more convenient approach (Otto 1999). The PLS models were calibrated using electrostatically signals acquired over time in mV (model inputs) and vitamin concentrations in  $\text{mol L}^{-1}$  (model outputs). Different signal time regions were tested as model inputs to identify the best time region to estimate each vitamin. The best models in terms of RMSECV are depicted in Table 4. For the THI modelling, the analytical signal was preprocessed with a Savitzky–Golay filter (first derivative) and mean-centered as well as the concentrations. Based on the leave-one-out cross-validation strategy, the best number of components was eight, considering the time window of 8 to 40 s. A RMSECV equal to  $4.6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  was obtained for this model (equivalent to an  $r^2$  equal to 0.98). For the PYD model, the use of the Savitzky–Golay filter was not necessary. Data from 3 to 16 s were used, and decimal logarithm was applied to PYD concentrations followed by mean-centering. The best number of components was six, and the RMSECV was  $5.7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  (equivalent to an  $r^2$  equal to 0.96). The modeling results were consistent with those of MCR, but it is important to notice that the model for THI is more exact (less biased)

**Table 4.** Summary of PLS models structures, optimized to model THI and PYD in synthetic samples

| Parameter | Time window (s) | Signal preprocessing       | Concentration preprocessing | LV | RMSECV ( $\text{mol L}^{-1}$ ) | $r^2$ |
|-----------|-----------------|----------------------------|-----------------------------|----|--------------------------------|-------|
| THI       | 8–40            | SG (1st derivative) + MNCN | MNCN                        | 8  | $4.6 \times 10^{-4}$           | 0.981 |
| PYD       | 3–16            | MNCN                       | LOG + MNCN                  | 6  | $5.7 \times 10^{-4}$           | 0.957 |

*Notes.* SG, Savitzky–Golay filter; MNCN, mean centering; LOG, decimal logarithm; LV, latent variables; RMSECV, root mean square error of cross validation.

A. R. Pires et al.

than the one for PYD. This is because the maximum peak intensity is more related to THI concentration, which masks some PYD influence that cannot be fully resolved by the PLS model. Nevertheless, the logarithmic transformation and the use of the initial part of the profile (before 20 s) was enough to model the PYD with an  $r^2$  of 0.96.

### Method Validation

Two commercial multivitamin formulations purchased from local stores (formulations A and B), containing THI and PYD, besides numerous vitamins and excipients, were analyzed by the proposed method and also by the standard HPLC method (Table 5). Before inserting the multivitamin formulations, PLS models for THI and PYD were calibrated using 20 mixed THI and PYD synthetic solutions with concentration intervals comprising the declared amount of vitamins in the commercial formulations (between 1 and  $8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ). The synthetic samples were designed using a D-optimal experimental design, and the PLS models were calibrated using the previously optimized structure. After calibrating the models for THI and PYD, the data obtained for the multivitamin formulations were projected onto each model to estimate the corresponding THI and PYD concentrations. To estimate the

**Table 5.** Model validation results obtained for the two commercial multivitamin products (units are  $\text{mol L}^{-1}$ )

| Parameter   | Labeled concentration ( $\times 10^{-4}$ ) | Reference method ( $\times 10^{-4}$ ) | Proposed method ( $\times 10^{-4}$ ) | Absolute error ( $\times 10^{-4}$ ) | STD  | $\text{CL}_{95\%}$ ( $\times 10^{-4}$ ) |
|---|--|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|------|---|
| Formulation A: ascorbic acid + coлекаlipherol + dexpanthenol + nicotinamide + pyridoxine chlorhydrate + retinol + riboflavin + thiamine chlorhydrate  |  |                                       |                                      |                                     |      |   |
| THI   | 2.98                                       | 3.08                                  | 3.02                                 | 0.06                                | 0.29 | $\pm 0.58$                              |
| PYD   | 1.63                                       | 1.70                                  | 1.55                                 | 0.15                                | 0.18 | $\pm 0.36$                              |
| Formulation B: ascorbic acid + ergocalciferol + biotine + calcium pantothenate + cyanocobalamine + folic acid + nicotinamide + pyridoxine chlorhydrate + retinol acetate + riboflavin + thiamine nitrate + calcium hydrogenphosphate + copper sulfate + sodium molibdate + magnesium sulfate + zinc sulfate |  |                                       |                                      |                                     |      |   |
| THI   | 2.93                                       | 2.96                                  | 3.06                                 | 0.10                                | 0.54 | $\pm 1.09$                              |
| PYD   | 1.60                                       | 1.94                                  | 2.10                                 | 0.16                                | 0.26 | $\pm 0.53$                              |

STD, standard deviation of model predictions;  $\text{CL}_{95\%}$ , 95% confidence limits for model predictions. .

### Potentiometric Determination of Thiamine and Pyridoxine

standard deviation of the vitamin predictions, a bootstrap strategy was carried out using the 20 calibration experiments (1000 bootstraps) (Wehrens, Putter, and Buydens 2000). By comparing the model predictions and concentrations derived from assays using the reference chromatographic method, it can be concluded that THI concentration was best predicted for both multivitamin formulations. It was previously observed that the model for THI yielded best results in terms of bias when considering only synthetic samples. The determination errors were comparable for both samples. The percentage errors obtained for THI and PYD (approximately 2–3% and 7–8%, respectively) in the multivitamin formulations were comparable with the average percentage errors obtained for the synthetic calibration experiments (2% and 6% on average respectively). This indicates that the predictions for the commercial products were in agreement with the model predictions for the synthetic mixtures. The analytical method and calibration was insensitive to the presence of other compounds in the complex matrix multivitamin samples and also exhibited good reproducibility.

### CONCLUSIONS

The resort to ISEs based on  $\beta$ -cyclodextrin as ionophore enables high selectivity to thiamine and pyridoxine when the set of complex B vitamins plus common ionic species is considered. Under flow conditions, this electrode presents profile responses for THI and PYD that enables robust assessment of the respective amounts. The use of chemometric tools for multivariate analysis enabled simultaneous determination of the concentration of both vitamins in synthetic samples. The method was validated with complex-matrix commercial multivitamin formulations with high accuracy and precision. The use of a multitask flow system to afford suitable experimental work for the adjustment of the calibration models revealed appropriate versatility regarding reagents saving and expeditious preparation of solutions. It is our conviction that the combined approach used in this work could be extended to other drug formulations. In the present case, one can foresee immediate application to stability, dissolution, or permeation tests for the pharmaceutical industry and quality control in fortified foods.

### REFERENCES

- Amidzic, R., J. Brboric, O. Cudina, and S. Vladimirov. 2005. RP-HPLC determination of vitamins B-1, B-3, B-6, folic acid, and B-12 in multivitamin tablets. *J. Serb. Chem. Soc.* 70: 1229–1235.

A. R. Pires et al.

- Barrales, P. O., A. D. Vidal, M. L. F. de Cordova, and A. M. Diaz. 2001. Simultaneous determination of thiamine and pyridoxine in pharmaceuticals by using a single flow-through biparameter sensor. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25: 619–630.
- Chatzimichalakis, P. F., V. F. Samanidou, R. Verpoorte, and I. N. Papadoyannis. 2004. Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction. *J. Sep. Sci.* 27: 1181–1188.
- Dinc, E., D. Baleanu, and F. Onur. 2001. Chemometric quantitative analysis of pyridoxine HCl and thiamine HCl in a vitamin combination by principal component analysis, classical least squares, and inverse least squares techniques. *Spectrosc. Lett.* 34: 279–288.
- Dinc, E., G. Kokdil, and F. Onur. 2000. A comparison of matrix resolution method, ratio spectra derivative spectrophotometry, and HPLC method for the determination of thiamine HCl and pyridoxine HCl in pharmaceutical preparation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22: 915–923.
- Fernandes, R. N., M. G. F. Sales, B. F. Reis, E. A. G. Zagatto, A. N. Araujo, and M. Montenegro. 2001. Multi-task flow system for potentiometric analysis: Its application to the determination of vitamin B-6 in pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25: 713–720.
- Langmaier, J., E. Samcova, and Z. Samec. 2007. Potentiometric sensor for heparin polyion: Transient behavior and response mechanism. *Anal. Chem.* 79: 2892–2900.
- Lima, J. L. F. C., M. C. B. S. M. Montenegro, and A. M. R. Silva. 1991. Vitamins B1 and B6 tubular electrodes as FIA detectors; their use in the analysis of pharmaceutical products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9: 1041–1046.
- Lopez-de-Alba, P. L., L. Lopez-Martinez, V. Cerda, and J. Amador-Hernandez. 2006. Simultaneous determination and classification of riboflavin, thiamine, nicotinamide, and pyridoxine in pharmaceutical formulations, by UV-visible spectrophotometry and multivariate analysis. *J. Brazil. Chem. Soc.* 17: 715–722.
- Morelli, B. 1996. High-resolution higher-order derivative spectrophotometry for determination of ternary mixtures of B-complex vitamins in pharmaceuticals. *Fresenius J. Anal. Chem.* 354: 97–102.
- Mostafa, G. A. E. 2003. Potentiometric membrane sensors for the selective determination of pyridoxine hydrochloride (vitamin B6) in some pharmaceutical formulations. *J. Anal. Chem.* 58: 1073–1077.
- Otto, M., ed. 1999. *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. Glasgow, UK: Wiley-VCH.
- Paczosa-Bator, B., T. Blaz, J. Migdalski, and A. Lewenstam. 2005. Conducting polymers in modelling transient potential of biological membranes. *Bioelectrochemistry*, 71: 66–74.
- Paczosa-Bator, B., T. Blaz, J. Migdalski, and A. Lewenstam. 2007. Conducting polymers in modelling transient potential of biological membranes. *Bioelectrochemistry*, 71: 66–74.
- Pires, A. R., A. N. Araujo, M. Montenegro, P. Chocholous, and P. Solich. 2008. New ionophores for vitamin B1 and vitamin B6 potentiometric sensors for multivitaminic control. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46: 683–691.

### Potentiometric Determination of Thiamine and Pyridoxine

- Rocha, F. R. P., O. Fatibello, and B. F. Reis. 2003. A multicommuted flow system for sequential spectrophotometric determination of hydrosoluble vitamins in pharmaceutical preparations. *Talanta* 59: 191–200.
- Santos, E., M. Montenegro, C. Couto, A. N. Araujo, M. F. Pimentel, and V. L. da Silva. 2004. Sequential injection analysis of chloride and nitrate in waters with improved accuracy using potentiometric detection. *Talanta* 63: 721–727.
- Secretariat, B. P. C., ed. 2005. *British Pharmacopoeia*. London: HRM Stationery Office.
- Shaidarova, L. G., L. N. Davietshina, and G. K. Budnikov. 2006. Flow-injection determination of water-soluble vitamins B1, B2, and B6 from the electrocatalytic response of a graphite electrode modified with a ruthenium(III) hexacyanoruthenate(II) film. *J. Anal. Chem.* 61: 502–509.
- Sweetman, S., ed. 2002. *Martindale: The Complete Drug Reference*, 33rd ed. London, Great Britain: Pharmaceutical Press.
- Teixeira, M. F. S., A. Segnini, F. C. Moraes, L. H. Marcolino, O. Fatibello, and E. T. G. Cavalheiro. 2003. Determination of vitamin B-6 (pyridoxine) in pharmaceutical preparations by cyclic voltammetry at a copper(II) hexacyanoferrate(III) modified carbon paste electrode. *J. Brazil. Chem. Soc.* 14: 316–321.
- Wehrens, R., H. Putter, and L. M. C. Buydens. 2000. The bootstrap: A tutorial. *Chemomet. Intell. Lab. Syst.* 54: 35–52.
- Zhang, G. H., T. Imato, Y. Asano, T. Sonoda, H. Kobayashi, and N. Ishibashi. 1990. Vitamin B1 sensitive poly(vinyl chloride) membrane-electrode based on hydrophobic tetraphenylborate derivatives and their application. *Anal. Chem.* 62: 1644–1648.
- Zhang, Z. R., Y. X. Li, D. Y. Mao, and V. V. Cosofret. 1990. Sensitive membrane electrodes for determination of vitamin B1 and vitamin B6. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8: 385–388.

# CAPÍTULO V

Automatização dos  
Ensaaios de Dissolução  
para Análise de  
Formulações  
Multi-Componente





**Determinação dos Perfis de Dissolução de Formulações de Marca e Genéricas de Ácido Valpróico, com Recurso a um Sistema Automatizado Ambientalmente Limpo**

Neste trabalho, foram analisadas diversas marcas genéricas e comerciais, contendo Valproato de Sódio (NaVA) ou combinações deste com Ácido Valpróico (VAac), por recurso a um sistema automatizado ambientalmente limpo. Para tal, explorou-se um sistema de análise por injeção sequencial acoplado a detectores potenciométricos. Os ensaios de dissolução realizaram-se a pH 6,8, no qual todo o ácido valpróico é convertido quantitativamente na sua forma aniónica. Como detectores, integraram-se no sistema um eléctrodo selectivo a ião, sensível a valproato (VA-ESI), conjuntamente com o eléctrodo de referência ou, alternativamente, VA-ESI e um eléctrodo selectivo a sódio ( $\text{Na}^+$ -ESI). Desta forma, foi possível obter respectivamente perfis globais correspondentes à dissolução do Valproato ( $\text{VA}^-$ ), ou perfis de dissolução simultâneos dos iões  $\text{Na}^+$  e  $\text{VA}^-$ . O sistema recolhia 300  $\mu\text{L}$  do meio de dissolução e as medições eram processadas com janelas temporais de aproximadamente 2 minutos, nos intervalos analíticos de  $1-8 \times 10^{-3}$  mol/L relativamente ao VA, e  $3-8 \times 10^{-3}$  mol/L, no que concerne ao ião  $\text{Na}^+$ . O sistema aqui proposto mostrou discriminar eficientemente perfis de dissolução de formulações de marca e genéricas, e também aqueles decorrentes de formas farmacêuticas contendo diferentes proporções relativas de VAac/ NaVA, apenas com gasto de ajustador de força iónica e de pH, usado como transportador.

---

*A. N. Araújo\* et al /International Journal Of Pharmacy & Technology*



ISSN: 0975-766X  
*Research Article*

Available Online through  
[www.ijptonline.com](http://www.ijptonline.com)

**ASSESSMENT OF DISSOLUTION PROFILES OF BRAND AND GENERIC VALPROIC ACID FORMULATIONS BASED ON AN EXPERIMENTAL CLEAN AUTOMATIC APPROACH**

**A. R. Pires<sup>1</sup>, A. N. Araújo<sup>1\*</sup>, C. M. Barbosa<sup>2</sup>, M. C. B. S. M. Montenegro<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>REQUIMTE, Serv. Química-Física, Fac. Farmácia (U.P).

Rua Aníbal Cunha 164, 4099-030 Porto, Portugal.

<sup>2</sup>CTMUP- Serv. Tecnologia Farmacêutica, Fac. Farmácia (U.P).

*Email: [anaraujo@ff.up.pt](mailto:anaraujo@ff.up.pt)*

*Received on 08-10-2010*

*Accepted on 25-10-2010*

**ABSTRACT**

Several commercial brand and generic formulations containing sodium valproate (NaVA) alone or in different combinations of this with valproic acid (VAac) were assayed using a clean automatic approach. To accomplish it, a sequential injection analysis based system coupled to potentiometric detection was exploited. The dissolution tests were performed at pH 6.8 where valproic acid (VAac) is quantitatively converted to its anionic form. Valproate ion selective electrode (VA-ISE) plus reference electrode or the VA-ISE plus a sodium ion selective electrode (Na<sup>+</sup>-ISE) were integrated as detectors in the system, to respectively obtain single global dissolution profiles of valproate (VA<sup>-</sup>) or simultaneous dissolution profiles of Na<sup>+</sup> and VA<sup>-</sup> ions. The system harvested 300 µL of the dissolution medium to process measurements within a time window of approximately 2 min in the intervals of 1-8.0x10<sup>-3</sup> mol/L concerning VA<sup>-</sup>, and 3-8x10<sup>-3</sup> mol/L in Na<sup>+</sup> ion. The proposed flow setup was able to efficiently discriminate profiles of generics and brand formulations, and also between forms containing different VAac/NaVA relative proportions, only with the spent of a pH/ionic strength adjusting buffer solution used as carrier in the system.

**Keywords:** Brand, generics, dissolution profiles, potentiometry, SIA, sodium valproate.

## Introduction

Drug absorption depends on the release profile from its solid dosage form, dissolution under physiological conditions, and from its permeability across the gastrointestinal tract. Due to the critical nature of the first two steps, *in vitro* dissolution tests are used as significant and simple procedures to forecast *in vivo* response to the active substance<sup>1</sup>. During the development of a medicinal product, dissolution tests are of overwhelm importance in identifying factors that can affect the intended bioavailability of the drug, such as the granulation process (wet or dry), the tablet compression force, the formulation composition, and the physicochemical properties of both active and inactive ingredients. As sooner the composition and manufacturing process are defined, the same tests keep still useful to ensure both batch-to-batch consistency of scale-up and production, and to demonstrate similarity to those of pivotal clinical trial batches. For immediate release formulations, single-point dissolution tests complemented with several specifications have been employed<sup>2,3</sup>. However, additional sampling times are required for these forms approval and at least data corresponding to three test times if characterization of modified release formulations is aimed. Regarding the last, an increased awareness of the potential relevance of dissolution tests can be deduced from recent FDA guidances<sup>4,5</sup>. What was formerly a test to differentiate a good batch product is now looked as bioavailability predicting tool even replacing clinical studies to determine bioequivalence. Therefore, scientists are challenged to design appropriate tests based on the objectives to be accomplished, e.g., quality control, *in vivo-in vitro* correlations, bioequivalence between modified release forms, etc<sup>6</sup>.

Recent guidelines<sup>7</sup> suggest that manual sampling studies should be avoided due to sensitivity lack to establish differences between generics and brand medicines. Thus, the alternative adoption of automatic procedures should be designed in order to fulfill two objectives: to provide real time information about the dissolution process and to deal with a dramatic increase of samples to be analyzed in a robust and environmental clean fashion. Presently, determination of drugs concentration in the dissolution medium is routinely performed with UV spectroscopy or HPLC-UV<sup>8-12</sup>. Most often, harmful reagents are needed and also severe problems emerge from turbidity caused by suspensions and colloids formed in the dissolution medium. The presence of air

*A. N. Araújo\* et al /International Journal Of Pharmacy & Technology*

bubbles in the light path lead to large artifacts in the dissolution profiles enabled by both on- and off-line UV-HPLC systems which yield discontinuous profiles and requires sample redrawn and preparation. Also UV active excipients, the limited sensitivity for lower strength active principles and the narrow dynamic range can be additional cumbersome issues. Alternatively, potentiometric transduction are less prone to be disturbed by colloidal systems and suspensions, almost dispense prior sample treatment, is inexpensive to implement and can be modulated concerning selectivity to the target drug<sup>13</sup>. Previous studies resort to the use of potentiometric detectors for dissolution tests and with its robust coupling to automatic sample handling instruments<sup>14-16</sup>. More recently, *in situ* dissolution testing with potentiometric detection has shown to enable results in good agreement with other currently used techniques<sup>17</sup>. Potentiometric sensors performance can be enhanced when attached to continuous flow systems and among those, the outstanding merits of using sequential injection (SI) technique in drug dissolution monitoring systems have been referred into reviews<sup>18,19</sup>.

Valproic acid (2- propylpentanoic acid) is an anticonvulsivant drug used in the treatment of bipolar disorder. In terms of its biopharmaceutics classification<sup>1</sup>, valproic acid is a class II drug characterized by low solubility and high intestinal permeability. On contrary its sodium salt presents the high solubility of 50 mg/ml<sup>20</sup>. Hence, it is clinically available in several forms, namely: sodium valproate (NaVA) alone, valproic acid (VAac) alone, and combinations of both in different dosages and respective proportions (2:1 and 1:1), either as brand or as generic formulations. Consequently, distinct dissolution profiles should be expected considering the dosage form under test. In this work, a sequential injection (SI) system is exploited to allow in full automatic fashion the dissolution profiles of solid modified release dosage forms available in the Portuguese market. Its flexibility allows simple change between the one or two detectors use and can be easily programmed to harvest samples from dissolution medium in specific time intervals, accordingly to the objective of dissolution studies. The system was exploited to obtain either the single global dissolution profiles of valproate or the simultaneous dissolution profiles of sodium and valproate ions, in brand and generic commercial tablets and capsules.

## **Experimental**

### ***Reagents and solutions***

All solutions were prepared with distilled and double deionised water, with conductivity  $< 0.1\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Analytical grade chemicals without additional purification were used.

Response characteristics of valproate tubular electrodes were assessed using either phosphate buffer solution ( $0.1\text{ mol L}^{-1}$ ) or a MES buffer solution ( $0.01\text{ mol L}^{-1}$ ), both with pH settled to 6.8. Phosphate buffer solution was prepared using the potassium dihydrogen orthophosphate (Fluka) and potassium hydrogen orthophosphate (Fluka). A solution  $0.01\text{ mol L}^{-1}$  of MES (2-morpholinoethanesulphonic acid) (Sigma) was prepared by simple dissolution in water and adjusting the final pH by means of a concentrated KOH solution.

A stock solution containing  $0.1\text{ mol L}^{-1}$  of sodium valproate (Merck) were obtained by weighting and dissolving the amount of pure powder in phosphate buffer or MES, accordingly to the carrier used in the SI-system. Whenever necessary, these solutions were appropriately diluted with the respective buffer. To evaluate the quality of the results provided by the automatic procedure, HPLC chromatographic analysis was chosen as reference procedure (BP, 1999). A methanol (Merck) /phosphate buffer solution (pH 3) in the proportions 70:30 (v/v) was used as eluent. The buffer was prepared with a 0.32 % w/v solution of potassium dihydrogen orthophosphate (Fluka). After methanol addition, the mixture was adjusted to pH 3 with orthophosphoric acid (Merck).

### ***Valproate dosage forms***

The dissolution profiles of nine modified-release solid dosage forms (tablets and capsules) containing NaVA either isolated or in association with VAac were examined (Table 1). Studied products correspond to reference brands and generics commercially available in the Portuguese market. Their contents were labeled in terms of NaVA (500 mg or 300 mg), except for one product (Diplexil<sup>®</sup>-R) in which the content was expressed in VAac (500 mg). Brand product A denoted Diplexil<sup>®</sup> 500 mg film-coated gastro-resistant tablets (Tecnifar SA, Lisbon, Portugal, batch n<sup>o</sup> 08EQ151). Brand B was Depakine<sup>®</sup> Chrono 500 film-coated tablets (Sanofi-Aventis SA, Porto Salvo, Portugal, batch n<sup>o</sup> 04326). Generic B1 referred to Ácido Valpróico Ratiopharm 500 mg film-coated

*A. N. Araújo\* et al /International Journal Of Pharmacy & Technology*

tablets (Ratiopharm Lda, Carnaxide, Portugal, batch n° H40958). Generic B2 was *Ácido Valpróico Sandoz*<sup>®</sup> 500 mg film-coated tablets (Sandoz Farmacêutica Lda, Sintra, Portugal, batch n° 8A5060). Brand C was *Diplexil*<sup>®</sup> - R 500 mg film-coated tablets (Tecnifar SA, Lisbon, Portugal, batch n° 08LQ133). Brand D denoted *Diplexil*<sup>®</sup> 300 capsules containing prolonged-release pellets (Tecnifar SA, Lisbon, Portugal, batch n° 06005961). Brand E was *Depakine*<sup>®</sup> Chrono 300 film-coated tablets (Sanofi-Aventis SA, Porto Salvo, Portugal, batch n° CH355). Generics E1 and E2 were respectively *Ácido Valpróico Ratiopharm 300* (Ratiopharm Lda, Carnaxide, Portugal, batch n° H33611) and *Ácido Valpróico Sandoz*<sup>®</sup> 300 mg film-coated tablets (Sandoz Farmacêutica Lda, Sintra, Portugal, batch n° 8M9588).

**Table 1.** Studied products organized into groups, according to the formulation type, content and nature of the active ingredient (only sodium valproate or association sodium valproate/ valproic acid). NaVA – sodium valproate; VAac – valproic acid.

| Group | Formulation type                              | Content<br>(in mg of NaVA) | VAac : NaVA<br>relative proportion | NaVA<br>(mg) | VAac<br>(mg) | Brand / Generic |
|-------|---|----------------------------|------------------------------------|--------------|--------------|-----------------|
| A     | delayed-release tablets<br>(gastro-resistant) | 500                        | 0:1                                | 500          | –            | Brand A         |
| B     | prolonged-release tablets                     | 500                        | 2:1                                | 333          | 145          | Brand B         |
|       | prolonged-release tablets                     | 500                        | 2:1                                | 333          | 145          | Generic B1      |
|       | prolonged-release tablets                     | 500                        | 2:1                                | 333          | 145          | Generic B2      |
| C     | prolonged-release tablets                     | 570 <sup>a</sup>           | 1:1                                | 285          | 250          | Brand C         |
| D     | prolonged-release capsules                    | 300                        | 0:1                                | 300          | –            | Brand D         |
| E     | prolonged-release tablets                     | 300                        | 2:1                                | 200          | 87           | Brand E         |
|       | prolonged-release tablets                     | 300                        | 2:1                                | 200          | 87           | Generic E1      |
|       | prolonged-release tablets                     | 300                        | 2:1                                | 200          | 87           | Generic E2      |

<sup>a</sup> The active substance is sodium divalproate (532.8 mg), which is an association of NaVA and VAac (1:1)

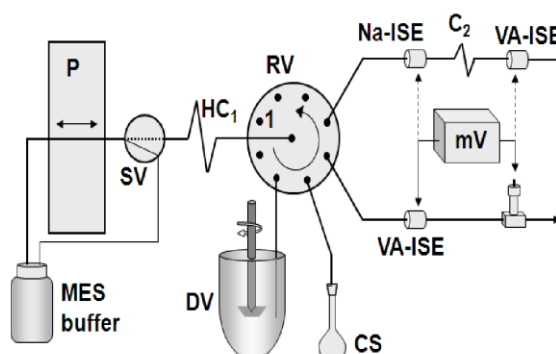
<sup>a</sup> The active substance is sodium divalproate (532.8 mg), which is an association of NaVA and VAac (1:1)

#### *Apparatus*

The SI-system proposed is depicted in Fig.1, having two transmission lines for the determination of VA<sup>-</sup> alone and for the sequential determinations of Na<sup>+</sup> and VA<sup>-</sup>, respectively. It comprised a Minipuls 3 Gilson (Villiers-

*A. N. Araújo\* et al /International Journal Of Pharmacy & Technology*

le-Bell, France) peristaltic pump equipped with a PVC propulsion tube (1.65 mm i.d.) of the same brand, an eight-port rotary valve (RV) from Valco Instruments, model C25-3118, (Huston, USA), a NResearch 161 T031 (Stow, USA) three-way solenoid valve, (SV), and a Crison MicropH-2002 potentiometer (mV). A 90-02-00 Orion AgCl/Ag reference electrode (RE) containing the MES buffer solution in the outer compartment was also connected in the transmission line containing only the detector for VA<sup>-</sup>. The potentiometer reference entrance was connected to the detector of VA<sup>-</sup>, when dissolution profiles of both ions were aimed. All components of the manifold were interconnected with PTFE tubing of 0.8 mm i.d. and home-made devices such as acrylic supports for tubular and reference electrodes. Two 006BT Omnifit<sup>®</sup> bubble trap devices equipped with 006BTM PTFE membranes were also placed in transmission lines before the detectors.



**Fig.1.** Schematic view of the flow system used. P: peristaltic pump, SV: solenoid valve, HC<sub>1</sub>: 400 cm long (0.8 mm i.d.) holding coil 1, RV: multi-port injection valve, DV: dissolution vessel, SP: 15 cm PTFE (0.5 mm i.d.) sampling probe, CS- calibration solution, BT – bubble traps, VA-ISE : valproate ion selective electrode, Na-ISE: sodium ion selective electrode, RE: reference electrode, mV: potentiometer and C<sub>2</sub>: 200 cm PTFE coil. 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. For data treatment, Origin version 6.1 was used.

The Ph. Eur. paddle apparatus was adopted for carrying out the dissolution tests. For this purpose a single unit apparatus Erweka DT (Germany) equipped with a paddle and a peak vessel (Vankel, USA) was used. The

*A. N. Araújo\* et al /International Journal Of Pharmacy & Technology*

paddle rotational speed and the temperature of the dissolution medium were kept at 50 rpm and  $37.0 \pm 0.5$  °C, respectively. The dissolution tests were performed in triplicate using the MES buffer solution (pH 6.8) as the dissolution medium.

HPLC measurements were performed in a JASCO LC- Net II /Adc system comprising a model JASCO PV-2080 Plus pump, a Rheodyne 7725i injector (50 $\mu$ L loop) and a 5  $\mu$ m C18 Kromasil column (250 mm x 4.6 mm). A diode array system, model JASCO MD- 2015 Plus was used as detector and the data processed by means of software package brand ChromNav. In the determinations of sodium concentration a Jenway (East Norwalk, USA) flame emission photometer was used for the reference procedure.

#### ***Electrodes preparation***

Ion selective electrodes without internal reference solution and of tubular configuration were constructed and used as potentiometric detectors. A polymeric membrane with the composition described in (Santos et al. 2006), was prepared concerning valproate electrode (VA-ISE). It was the final mixture containing 1% (w/w) of the ionophore manganese(III) tetraphenylporphirine (Merck) with 10% relatively to the ionophore amount of anionic additive sodium tetraphenylborate (NaTPB- Fluka), 66% (w/w) of the plasticizer *o*-nitrophenyloctyl ether (*o*-NFOE- Fluka), and 33% (w/w) of poly(vinyl chloride) (Fluka) previously dissolved in 6 mL of tetrahydrofuran (Merck). Sodium ion selective electrodes (Na-ISE) were prepared accordingly to (Kimura et al. 1996), by using a mixture of 3% (w/v) of sodium ionophore VIII (Fluka), 0.6% (w/v) of sodium tetrakis [3, 5-bis (trifluoromethyl) phenyl]borate (Fluka) as additive, in 69% of *o*-nitrophenyloctyl ether and 27.4% (w/v) of poly(vinyl chloride) previously dissolved in tetrahydrofuran (Merck). The electrodes were obtained by dropwising previous mixtures over the inner wall of a central hole (1mm i.d.) drilled along a tubular shaped graphite/epoxy resin working as conductive support<sup>21</sup>. Conventionally shaped electrodes for sodium, without internal reference solution were also prepared as in<sup>22</sup>. After complete drying of membranes, the tubular electrodes were attached to the manifold and then hydrated with the carrier stream for a few minutes before being used.



**Procedures**

The automatic procedure started by filling the holding coil (HC<sub>1</sub>) and transmission lines connected to the rotary valve (RV) with carrier solution until the achievement of detector stable signals (Fig.1). This was accomplished by selecting ports 5 or 6 of the RV and positioning the peristaltic pump in the forward pumping mode. The protocols required to carry out the analytical procedures are defined in Table 2. Steps 1-3 or 2-3 were applied when using transmission line 5 to respectively sample dissolution medium aliquots or NaVA standard solutions and propelling them through the VA-ISE and RE electrodes. Calibration curves were established considering peak height averages of transient signals obtained after the successive injections of the calibrating solutions. The hydrodynamic conditions to accomplish the determinations were settled after noticing invariant calibration slopes for injection volumes in the range 100-400 µl aspirated through port 4, at flow-rates between 0.7 and 2.0 ml/min and propelled through transmission lines at flow-rates from 0.3 to 2.9 ml/min. The steps 4 to 6 were used when sequential determinations of VA<sup>-</sup> and Na<sup>+</sup> were intended. They resulted of the application of a simplex optimization algorithm to the injection volumes, aspiration and propelling flow rates and C<sub>2</sub> coil length. A response function considering minimum analytical signals carryover and VA-ISE signals maximization was considered for this ending.

**Table 2. System control parameters.**

| Step | Task                     | RV   |         | flow rate<br>(mL/min) | flow direction |
|------|--------------------------|------|---------|-----------------------|----------------|
|      |                          | port | time(s) |                       |                |
| 1    | sampling <sup>a</sup>    | 3    | 10      | 2                     | reversal       |
| 2    | calibration <sup>a</sup> | 4    | 10      | 2                     | reversal       |
| 3    | detection <sup>a</sup>   | 5    | 7.5     | 2                     | forward        |
| 4    | sampling <sup>b</sup>    | 3    | 7.5     | 2.9                   | reversal       |
| 5    | calibration <sup>b</sup> | 4    | 7.5     | 2                     | reversal       |
| 6    | detection <sup>b</sup>   | 6    | 75      | 2.3                   | forward        |
| 7    | purging                  | 3    | 30      | 1.3                   | forward        |

<sup>a</sup>System using VA ISE; <sup>b</sup>System using VA and NA ISEs.

*A. N. Araújo\* et al /International Journal Of Pharmacy & Technology*

Dissolution tests with the immersion of one tablet or capsule in 900 ml of MES at  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ , the rotation paddle set at 50 rpm, and steps 1 and 3 or 4 and 6 (table 2) followed. Approximately 300  $\mu\text{L}$  of dissolution medium were aspirated into  $\text{HC}_1$  and complete processing lasted less than 2 minutes. Signals were acquire over time and computer stored for further process. The dissolution end was considered when at least a 30 minutes stable plateau was reached. Finally, a calibration was performed, using four NaVA standard solutions that cover the overall range of VA concentrations released from the medicine. Using this calibration curve, molar concentrations at dissolution time points were determined and converted to the corresponding released drug percentages *versus* time. For all formulations three dissolution tests, with three different tablets of the same lot were performed. An additional step (7, table 2) was included before and after the dissolution tests performance, to purge the sampling tube, ensuring aspiration of a new portion of the dissolution liquid or standard solution and cleaning the remaining of standard solutions or dissolution medium.

In order assess the accuracy of results an HPLC external comparison method was selected (BP 1999). However, the mobile phase composition (70:30 (v/v) methanol and phosphate buffer (pH3)) and chromatographic conditions were slightly changed due to acetonitrille worldwide scarceness. During the dissolution tests, 5 ml aliquots were manually drawn from the dissolution vessel at predetermined periods of time (5, 10, 15, 20, 45 60 and 90 minutes) and injected respectively in the SI-system and in the HPLC equipment after filtration, the last with the eluent flow rate of 1 ml per minute and a detection wavelength of 220 nm. In HPLC measurements, a five point calibration was performed using NaVA standards ranging from  $7 \times 10^{-5}$  to  $1.5 \times 10^{-3}$  mol.  $\text{L}^{-1}$  and the respective dissolution medium samples diluted whenever necessary to fit the linear interval.

Flame photometry was considered to determine  $\text{Na}^+$  in samples drawn from the dissolution medium. For that reason, dissolution tests were done in solvent MES pH 6.8 adjusted with concentrated ammonia solution, instead of KOH. In this way, interference of potassium ion in flame photometer measurements was avoided. During the dissolution tests, 20 ml aliquots were manually drawn from the dissolution vessel (at 10, 30, 60, 120 and 150 minutes) and introduced in the SI-system and in the flame photometer. Due to large sampled volumes,

*A. N. Araújo\* et al /International Journal Of Pharmacy & Technology*

the total volume of dissolution liquid was every time reestablished with fresh MES solution. The flame photometer was previously calibrated using five NaVA standard solutions ranging from  $4.3 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> to  $3 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>. Whenever necessary, dissolution medium samples were diluted in order to fit the linear interval.

## **Results and discussion**

### *Optimization and electrodes evaluation*

The selected valproate sensor mixture was preferred above others previously reported (Santos et al. 2006) due to the favourable slopes and pH working range which allow determinations at the recommended pH of 6.8. However, the calibration slopes obtained for this valproate sensor solution when using phosphate buffer (0.01 mol l<sup>-1</sup>) both as pH and ionic strength adjuster were slightly inferior compared with the ones described in literature (Santos et al. 2006), and for that reason the more hydrophilic MES buffer (0.01 mol l<sup>-1</sup>) was tested, aiming to achieve the reported values. Calibrations performed with valproic acid standard solutions from  $5 \times 10^{-5}$  to  $1 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup> (with half a decade increments, (n=189)) enabled slopes of -44.5 and -66.5 mV. decade<sup>-1</sup>, in phosphate and MES buffers, respectively, with similar relative standard deviations (3.3 and 3.7 %) and linear responses ranging from  $5.0 \times 10^{-5}$  to  $1.0 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup>. Additionally, an amount corresponding to approximately 50 mg of VA of a pulverised random sample tablets was dissolved either with phosphate or MES buffers and tested. The respective average relative error (n=16) to the declared amount content was lower for MES (3.5%) relatively to phosphate (6.5%) due to the observed electrode sensitivity difference.

Concerning Na-ISE, the membrane composition was selected as in (Kimura et al. 1996) due to both its appropriate analytical response range and to the relatively low interference of K<sup>+</sup>, the counter anion used in MES buffer pH adjustment. This electrode was firstly evaluated in batch conditions, using NaVA solutions ranging from  $5 \times 10^{-4}$  to  $3 \times 10^{-3}$  mol. L<sup>-1</sup>, in MES buffer. The calibration slope value of 49.7 mV.dec<sup>-1</sup> with a relative standard deviation of 5% was obtained. Then, electrodes with tubular shaped configuration were assayed in the system using the hydrodynamic conditions stated before for VA-ISE. An average slope of  $49.3 \pm 4$  mV.dec<sup>-1</sup> (n=40) with the lower limit of detection of  $3 \times 10^{-4}$  mol. L<sup>-1</sup> was achieved, underlying a response

*A. N. Araújo\* et al /International Journal Of Pharmacy & Technology*

behaviour independent of the electrode shape and of the adopted procedure (i.e. batch or flow) However, the electrode response of Na<sup>+</sup> electrode was much faster than that observed for the VA-ISE electrode. Thus simultaneous determination of both substances required the placement of the Na-ISE upstream relatively to VA-ISE in order to avoid overlapping response. Both hydrodynamic conditions as well the coil C<sub>2</sub> length were optimised by means of a simplex optimisation algorithm. The outcome is stated in Table 2, steps 4 and 6, for a minimum coil length of 2m. In these conditions independent analytical signals were obtained in the time windows of 5-30 and 32-75 seconds for Na<sup>+</sup> and VA<sup>-</sup>, respectively. When used together, these sensors showed appropriate linear results in the analytical ranges of 1x10<sup>-4</sup> - 8x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> for valproate and 3x10<sup>-3</sup> - 8x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> for sodium. With the proposed system ISEs were used in consecutive days (six to eight hours per day) to perform dissolution tests over a period of two months without loss of response characteristics. When compared to reference methods a spent of approximately 3.5 mL of MES buffer per assay was necessary.

#### ***Assessment of dissolution profiles using VA-ISE***

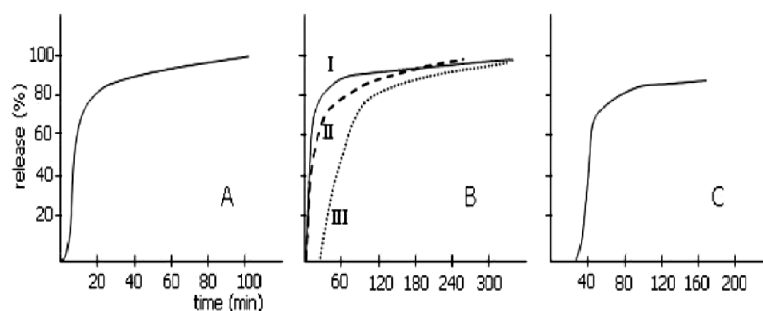
The dissolution profiles of medicines commercially available in the Portuguese market (Table 1) were first evaluated on a VA<sup>-</sup> determinations basis. The mean dissolution profiles of tested products obtained are illustrated in Figure 2 (A to E). In Figure 2.E, a typical record obtained with the automatic SI-system is also presented. Table 3 shows for every group (A to E) several dissolved percentages of valproate ion in the dissolution medium (Q<sub>x%</sub>) relatively to the labelled amounts, the respective times in minutes, and the coefficients of variation (CV). The dissolved VA drug percentages include various representative points along the entire average dissolution profile, as for example Q<sub>30%</sub>, Q<sub>50%</sub>, Q<sub>80%</sub>, Q<sub>95%</sub>. Accordingly to the guidelines “The dissolution procedure: Development and Validation”, a properly designed dissolution test should result in data that is not highly variable<sup>2</sup>. Dissolution results may be considered highly variable if the coefficient of variation (CV) is greater than 20% at time points of ten minutes or less, and greater than 10% CV at later time points. From the analysis of this table it is possible to verify that the method is reproducible, since all CV values are much lower than 20% in the first ten minutes after starting the system, and almost all values a lot less than 10% CV, at later time points. Exception is in generic E1, at Q<sub>30%</sub> that presents a small deviation from this value

*A. N. Araújo\* et al /International Journal Of Pharmacy & Technology*

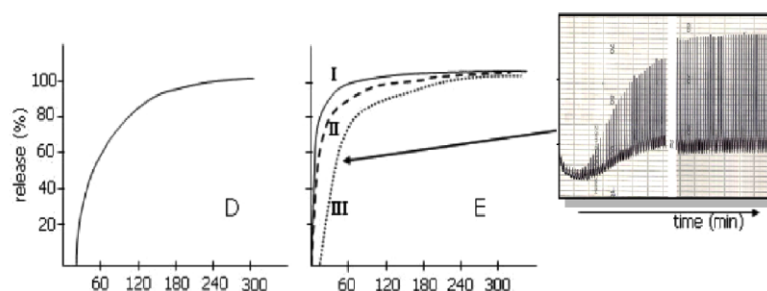
(CV of 12%), at minute 28. In the presented profiles, it can be generally noticed that the first CV value is the highest and a decrement tendency occurs. When reaching 95% of VA release, all CV are lower than 6%. One hour after the initiation of the system, all tablets and capsules except generic 1 in groups B and C, and the formulation of group D, release at least 80% of the declared content of VA ion. When comparing the results obtained by the proposed system with HPLC for valproate determination in aliquots drawn at different dissolution times, the resulting errors are inferior to 5%, which corroborates the accuracy of the proposed method.

**Table-3:** Mean dissolution profiles of tablets groups (n=3) obtained with valproate detector. Q<sub>%</sub> - percentage relatively to the labelled amount of valproate ion dissolved, in time (min) at which it occurs; CV – coefficient of variation (%).

| Group | Q <sub>%</sub> released (min); CV(%) |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|-------|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|       | Q <sub>15</sub>                      | Q <sub>30</sub> | Q <sub>50</sub> | Q <sub>60</sub> | Q <sub>80</sub> | Q <sub>85</sub> | Q <sub>95</sub> |
| A     | --                                   | 7; 12.0         | 9; 7.3          | --              | 20; 6.2         | --              | 78; 4.4         |
| B     | --                                   | 4; 10.2         | 7; 10.8         | --              | 30; 3.2         | --              | 270; 1.5        |
| B1    | --                                   | 45; 2.0         | 60; 3.5         | --              | 115; 1.5        | --              | 310; 0.3        |
| B2    | --                                   | 5; 9.6          | 14; 3.0         | --              | 60; 5.4         | --              | 205; 4.4        |
| C     | --                                   | --              | --              | 43; 2.4         | 75; 9.5         | 75; 9.5         | --              |
| D     | 22; 8.7                              | 29; 4.9         | 46; 7.9         | --              | 102; 6.6        | --              | 179; 5.6        |
| E     | 2; 10.1                              | 4; 1.9          | 7; 2.7          | --              | 16; 2.3         | --              | 52; 1.1         |
| E1    | 20; 9.2                              | 28; 12.2        | 37; 7.3         | --              | 72; 3.3         | --              | 170; 0.02       |
| E2    | 2; 14.9                              | 4; 9.4          | 9; 12.6         | --              | 31; 3.6         | --              | 84; 3.1         |



A. N. Araújo\* et al /International Journal Of Pharmacy & Technology



**Fig.2.** Average dissolution profiles (n=3) obtained with valproate tubular detector (A to E). Charts divided in A, B, C, D, E, accordingly to groups in table 1. I: brand formulation; II: generic 2 and III: generic 1. Figure E shows a typical SI-system record of the dissolution profile for Generic E1.

#### *Assessment of dissolution profiles using both ISEs*

Some combination formulations containing NaVA and VAac (group B) were selected to test the system integrating two detectors, one selective to valproate and other to sodium ions. In this system, simultaneously to VA determination, the amount of Na dissolved at different times was also estimated. The results obtained are presented in Table 4, showing percentages of dissolved  $VA^-$  or  $Na^+$  substances ( $Q\%$ ) relatively to the labelled amounts, the respective times at which the dissolution occurred in minutes, and the coefficients of variation (CV). The dissolved VA and Na drug percentages include various representative points along the entire average dissolution profile, for example  $Q_{15\%}$ ,  $Q_{60\%}$ ,  $Q_{80\%}$ ,  $Q_{95\%}$ . Figure 3 (A to C) shows the average sodium and valproate profiles obtained with three dissolution tests for brand and generic 1 and 2 respectively, using valproate and sodium tubular detectors. In fig 3.C, a typical SI-system record obtained from the dissolution of a generic tablet can be observed. The results depicted in Table 4 using the two detectors are as reproducible as those obtained with VA-ISE only, since CV values found for both ions dissolution accomplish the limits established<sup>2</sup>. However, for sodium, a CV of 14.6% is found in brand formulation at 15 minutes after starting the system. This is not considered so important once the first sodium dissolution values occur approximately at minute 13, as can be observed in fig. 3 A. In fig. 3 B, it is possible to notice that no sodium dissolved values are depicted until 60 minutes after test start-up, for generic 1. Results enabled by flame photometry were determined for aliquots manually drawn at 10 and 30 minutes and compared with potentiometric ones. At ten

*A. N. Araújo\* et al /International Journal Of Pharmacy & Technology*

minutes, no sodium release occurred, and at 30 minutes, the percentage of sodium dissolved in the dissolution medium was below the practical limit of detection of Na tubular detector. It is furthermore possible to observe for formulations in group B (fig. 3), that dissolution profiles of sodium ions follows nearly the same evolution than valproate ones.

**Table-4:** Mean dissolution profiles of group B (n=3) obtained with sodium and valproate tubular detectors, Na-ISE and VA-ISE respectively. Q% - percentage relatively to the labelled amount of valproate ion dissolved, in time (min) at which it occurs; CV – coefficient of variation (%).

| Group B | Detector | Q% released (min); CV(%) |                 |                 |                 |                 |                 |
|---------|----------|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|         |          | Q <sub>15</sub>          | Q <sub>35</sub> | Q <sub>50</sub> | Q <sub>60</sub> | Q <sub>80</sub> | Q <sub>95</sub> |
| Brand   | Na-ISE   | 15; 14.6                 | --              | --              | 24; 0.3         | 48; 6.2         | --              |
|         | VA-ISE   | --                       | 5; 9.9          | 7; 16.8         | --              | 30; 5.2         | 70; 4.9         |
| B1      | Na-ISE   | --                       | --              | --              | 115; 6.1        | 164; 1.4        | --              |
|         | VA-ISE   | --                       | 30; 8.5         | 40; 1.5         | --              | 72; 1.9         | 150; 5.6        |
| B2      | Na-ISE   | --                       | --              | --              | 26; 8.3         | 61; 3.4         | 97; 5.1         |
|         | VA-ISE   | --                       | 7; 6.4          | 10; 4.2         | --              | 58; 2.1         | 190; 4.5        |

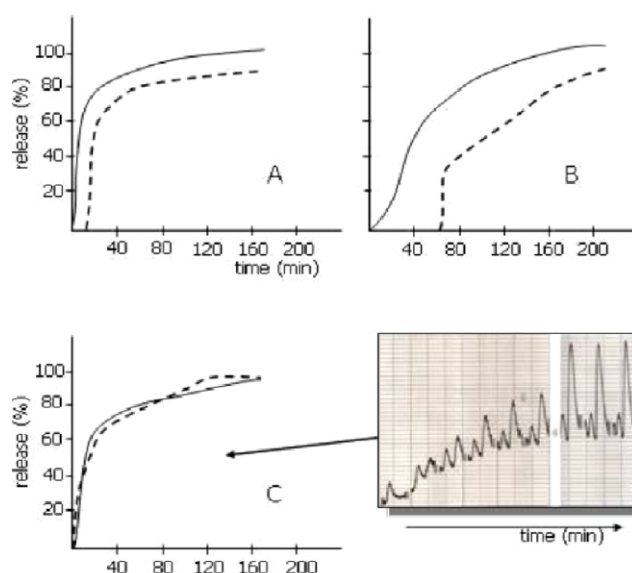
#### **Comparison of brand and generic formulations**

Groups B and E are constituted by brand and generic formulations, equivalent to 500 and 300 mg in NaVA, respectively (table 1). For both groups, obvious differences are noticed between the brand formulation and generics 1 and 2, particularly in the first 60 minutes and with respect to generic 1. In fact, despite of the dosage strength, this generic presents a similar dissolution profile with a considerable lag time without releasing VA ion (figs. 2.B, 2.E and 3.B), while brand formulation releases drug in the first two minutes. Differences in profiles of brand relatively to generic 2 are less dramatic. In spite of that, after 150 minutes, the three profiles inside the respective groups are practically identical.

In groups B and E, VAac/ NaVA proportion is the same (2:1), in spite of the different dosage (500 versus 300 mg). The drug proportion seems to greatly influence the respective profiles (figures 2.B and 2.E), once they are very similar. On the other hand, different proportions of VAac/ NaVA (2:1 versus 1:1), showed accentuated

*A. N. Araújo\* et al /International Journal Of Pharmacy & Technology*

differences in profiles (figures 2.B and 2.C), in spite of the similar dosage (equivalent to 500 and 570 mg in NaVA, respectively). This is probably due to formulation differences and also the proportion itself, as the two forms (valproic acid and valproate sodium salt), have very distinct intrinsic solubilities. In determinations using valproate and sodium detectors, the comparison of the brand formulation with generics (group B), show distinct release profiles, not only for valproate, but also for sodium ions (figure 3). These differences are once more accentuated in generic 1 relatively to generic 2. Several quantitative methods are described for comparison of dissolution profiles and among those similarity factor ( $f_2$ ) plays a main role<sup>23</sup>, being officialised both by FDA and EMEA as:  $f_2 = 50 \times \log \{ [1 + (1/n) \sum |R_j - T_j|^2]^{-0.5} \times 100 \}$ , where  $R_j$  e  $T_j$  are the percent dissolved of the reference and test products, respectively, at each time point  $j$ . This factor can assume values between 0 and 100, and the profiles are considered similar when  $f_2$  falls into the interval 50-100. The obtained results for valproate profiles of group B are:  $f_2$  (Brand and Generic B1) = 28 and  $f_2$  (Brand and Generic B2) = 51. For formulations of group C are:  $f_2$  (Brand and Generic C1) = 25 and  $f_2$  (Brand and Generic C2) = 57. For sodium profiles are:  $f_2$  (Brand and Generic B1) = 27 and  $f_2$  (Brand and Generic B2) = 62. For the calculations, at least four time points representative of the entire dissolution range were used. Corroborating visual observations of the profiles, brand and generic 2 are similar and brand and generic 1 are not.





*A. N. Araújo\* et al /International Journal Of Pharmacy & Technology*

**Fig.3.** Average sodium (dashed line) and valproate (full line) dissolution profiles (n=3) obtained for formulations of group B with sodium and valproate tubular detectors. A- Brand; B- Generic B1; C- Generic B2. Figure C shows a typical SI-system record of the dissolution profile for generic B2.

### Conclusions

A sequential injection system was exploited concerning automatic testing of dissolution characteristics of valproic acid solid forms. The proposed procedure evidenced adequate robustness concerning the hydrodynamic conditions adopted, use of potentiometric detection and large scale analysis ability. Several modified release tablets and capsules were analysed including single and combination formulations. In this last ones, valproic acid and its sodium salt are present in different proportions and dosages. At pH 6.8, all valproic acid is converted to anionic form, so it was possible to follow the global release profile of the active principle. When two detectors were used, it was also feasible the simultaneous accomplishment of sodium ion dissolution (that arises from valproic acid sodium salt solubilisation) and global valproate dissolution. The proposed system proved to automatically generate reproducible, accurate and sensible dissolution profiles using either one or the two detectors, in a large range of concentrations since the first minutes of the dissolution test. A lot of dynamic processes take place prior to disintegration and dissolution initiation as the capacity of tablets to wet, and this system shows phenomena as lag times of tablets, rendering profiles much more informative for comparison purposes. Its flexibility allows changing easily from one to two detectors, accordingly to the goals of the operator and the kind of dissolution studies demanded. Moreover, the proposed sequential injection setup shows the capability of adequately discriminating differences between brand and generics drugs, demonstrated either for valproate, as for sodium profiles. This analytical procedure can be adapted to studies on development of new formulations incorporating sodium valproate alone or mixtures of valproic acid and its sodium salt, to identify active principles mixtures proportions and formulation characteristics that might influence or have a crucial effect on the bioavailability of the drug. It is our conviction that the approach used in this work can easily be extended to other combined drugs formulations. In the present case, we can foresee immediate application in formulation development research, at industrial laboratories.

**Acknowledgments**

Ana Rita Pires thanks FCT and FCE for a PhD grant (25995/2005).

**REFERENCES**

1. US Department of Health and Human Services, Guidance for Industry, Dissolution testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. CDER, FDA, Office of Training and Communications, Rockville MD20855 1997.
2. United States Pharmacopeial Convention, The United States Pharmacopoeia (USP) 30th ed. The National Formulary (NF) 25<sup>th</sup> ed., Rockville MD20855 2007.
3. British Pharmacopoeia Commission, British Pharmacopoeia (BP). The Stationery Office on behalf of the Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA), London 1999.
4. CDER, Div. Of Bioequivalence, Guidance, Oral Extended (Controlled) Release Dosage Forms, In vivo Bioequivalence and In vitro Dissolution Testing. ODG, Rockville MD20855 1996.
5. CDER, Div. Of Bioequivalence, Guidance for Industry, SUPAC-MR: Modified Release Solid Oral Dosage Forms. ODG, Rockville MD20855 1997.
6. Crison, J. R., *Diss Technol* 1999; 6: 6-11.
7. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), Guideline on the Investigation of Bioequivalence. European Medicines Agency, London 2008.
8. Johansson, J., Cauchi, M., Sundgren, M., *J Pharm Biomed Anal* 2002; 29: 469-472.
9. Nir, I., Johansson, J., Johnson B.D., Schatz, C., *Pharm Technol* 2001; 25: 33-40.
10. Tomsu, D., Icardo, M. C., Calatayud, J. M., *J Pharm Biomed Anal* 2004; 36: 549-557.
11. Vranic, E., Icardo, M. C., Calatayud J. M., *J Pharm Biomed Anal* 2003; 33:1039-1048.
12. Wang, Q. M. D., Higgins, J., *Diss Technol* 2006; 13:16-19.
13. Pires, A.R., Araújo, A.N., Lopes, J.A., Montenegro, M.C.B.S.M., *Anal Lett* 2009; 42:1923-1939.
14. Bohets, H., Vanhoutte, K., Maeschalck, R., Cockaerts, P., Vissers, B., Nagels, L., *Anal Chim Acta* 2007; 581: 181-191.

*A. N. Araújo\* et al /International Journal Of Pharmacy & Technology*

15. Paseková, H., Sales, M.G., Montenegro, M.C.B.S.M., Araújo, A.N., Polásek, M., J Pharm Biomed Anal 2001; 24:1027-1036.
16. Sales, M.G., Montenegro, M.C.B.S.M., J Pharm Sci 2001; 90:1125-1133.
17. Peeters, K., Maesschalck, R., Bohets, H., Vanhoutte, K., Nagels, L., Eur J Pharm Sci 2008; 34:243-249.
18. Fang, Z., Fang, Q., Liu, X., Chen, H., Liu, C., TrAC -Trends Anal Chem 1999; 18:261-271.
19. Pimenta, A., Montenegro, M.C.B.S.M., Araújo, A.N., Calatayud, J.M., J Pharm Biomed Anal 2006; 40:16-34.
20. Merck & Co., The Merck Index: An encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 14<sup>th</sup> ed. Whitehouse Station, N.J., USA 2006.
21. Lima, J.L.F.C., Montenegro, M.C.B.S.M., Roque da Silva, A.M., J Flow Injection Anal 1990; 7:19-33.
22. Lapa, R.A.S, Costa Lima, J.L.F.C., Silva, A.M.R., Il Farmaco 1990; 45:901-913.
23. Moore J.W., Flanner H.H., Pharm Tecnol 1996; 20: 64-74.

**Corresponding Author:**

**A. N. Araújo<sup>1\*</sup>,**

REQUIMTE, Serv. Química-Física, Fac. Farmácia (U.P).

Rua Aníbal Cunha 164, 4099-030 Porto, Portugal.

**Email:** [anaraujo@ff.up.pt](mailto:anaraujo@ff.up.pt)



# CAPÍTULO VI

Automatização dos  
Ensaio de Dissolução/  
Permeabilidade para  
Análise de Formulações  
Multi-Componente



### **Demonstração da Utilidade de um Sistema Acoplado de Dissolução / Permeabilidade para Comparação de Comprimidos de Libertação Modificada de Valproato**

Neste trabalho, descreve-se um sistema acoplado de Dissolução/ Permeabilidade, para comparação e avaliação do valproato em formulações de libertação modificada.

O princípio activo permeado era quantificado com recurso à análise por injeção sequencial, com detecção potenciométrica, usando para tal um eléctrodo selectivo a ião sensível a valproato. Selecionou-se uma membrana lipídica artificial constituída por *n*-octanol para exercer a função de barreira de permeabilidade e estabeleceu-se o contacto permanente da solução simuladora do meio entérico (tampão fosfato pH 6,8), através de um circuito fechado que incluía o vaso de dissolução onde era colocado o comprimido. A quantidade permeada era amostrada a cada dez minutos, durante um período de 7 horas. Foram notadas diferenças particulares entre os perfis de permeabilidade, de acordo com as formulações, dosagens e proporções relativas do princípio activo, que se correlacionam com os perfis de dissolução obtidos para os mesmos comprimidos. O sistema mostra a capacidade de gerar automaticamente perfis de permeabilidade sensíveis e reprodutíveis e identifica diferenças que se poderão reflectir na biodisponibilidade.

---

Artigo submetido ao *International Journal of Pharmaceutics*, em 2011-03-29

## Usefulness of a tandem dissolution-permeation system for comparison of modified release tablets of valproate.

Ana Rita Pires <sup>a</sup>, A.N. Araújo <sup>a\*</sup>, C.M. Barbosa <sup>b</sup>, M.C.B.S.M. Montenegro <sup>a</sup>

<sup>a</sup>REQUIMTE, Departamento de Química, F. Farmácia, Universidade do Porto. Rua Aníbal Cunha 164, 4099-030 Porto, Portugal.

<sup>b</sup>CTMUP- Serviço de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto. Rua Aníbal Cunha 164, 4099-030 Porto, Portugal.

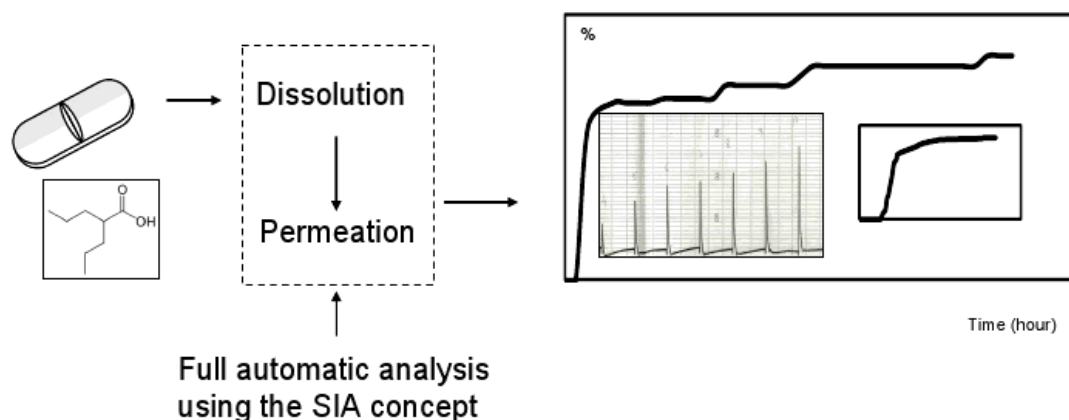
\*e-mail adress: [anaraujo@ff.up.pt](mailto:anaraujo@ff.up.pt); tel: +351222078921; fax: +351222078961

### Abstract

It is described a tandem dissolution-permeation system for comparative evaluation of valproate in modified release formulations. The permeated active principle is quantified using a sequential-injection system with potentiometric detection by means of a valproate selective electrode. An *n*-octanol artificial lipidic membrane was selected as permeation barrier and the permanent contact of the simulated enteric phase solution (phosphate buffer pH 6.8) kept by a closed-circuit that included the tablet dissolution vessel. The permeated amount was sampled at every 10 minutes for a 7 hours period. Particular dissimilarities between formulations, dosages and relative active principles proportions were noticed in permeation profiles and correlate well with the dissolution ones for the same tablets. The system showed the ability of automatically generating sensitive and reproducible permeation profiles and identified differences that might reflect in bioavailability.

Keywords: PAMPA assays, sequential injection analysis, valproate, modified release formulations.





## 1. Introduction

The dissolution rate of a drug from immediate release formulations in gastrointestinal fluids and its transport through the lipid bi-layer of epithelial cells lining the intestinal wall are the most important factors governing the overall oral absorption (Lobenberg and Amidon, 2000). Accordingly, drug substances are categorized into four classes in the Biopharmaceutical Classification System (BCS) considering solubility and permeability across bio-membranes (Amidon et al., 1995; FDA, 2000<sub>a</sub>). This system became a benchmark to establish bioequivalence of oral drug products on an *in-vitro* dissolution tests basis (FDA, 1997; FDA, 2000<sub>b</sub>). The BCS system also serves as guiding tool for devising strategies to improve drugs efficiency, in proper selection of solid dosage forms, and to lay the effect of the excipients on drug permeability (Dressman et al., 2001). Between the drug release and the absorption processes, the rate-limiting step is of primary relevance, and bioavailability will be affected only if dissolution/drug release is relatively slow. In contrast, as long as the permeation through bio-membranes is a rate-limiting process, bioavailability and bioequivalence are not so dependent upon the drug release from dosage form (FDA, 1997). The development of prolonged release dosage forms is a challenging task due to several factors governing the drug absorption from the gastrointestinal tract (Khan, 2001; Sachan and Singh, 2006). The chemical modification of the drug, thus changing its solubility, in order to slow down its release in the gastrointestinal tract may cause a reduction in the overall payload of the formulation (Sachan et al., 2009). However, in this case, dissolution tests are of limited value on information data about permeability of modified drug. The influences of both the dosage form and excipients are also missing when permeability assays are accomplished with

pure or completely dissolved compounds and can lead to unexpected results in subsequent human or animal studies (Motz et al., 2007). Thus, trial and error or even the use of supervised protocols to assess multivariable influence and achieve the correct compromise of dosage form, always implies a carefully planned and tedious experimental counterpart and justifies the need for fast and low cost screening approaches. Several apparatuses were proposed to enable simultaneously both dissolution and permeation (D/P) profiles of drugs (Buch et al., 2009; Kataoka et al., 2003; Kataoka et al., 2006; Motz et al., 2007). In general, they comprise two compartments, one containing an aqueous solution simulating gastro intestinal medium, and the other filled with an aqueous solution simulating plasmatic medium. A cell monolayer, e.g. Caco-2 is then placed between both. Motz et al. (Motz et al., 2006; Motz et al., 2007) proposed the sequential injection analysis concept for the automatic handling of involved solutions. Some other works refer to the application of artificial membrane assays (PAMPA) for determination of permeability properties of pharmaceuticals as a means to reduce costs and increase robustness (Barbosa et al., 1996; Kmetec et al., 1999; Legen et al., 2003; Motz et al., 2006; Mura et al., 1995; Olivella et al., 2006; Ruell et al., 2007; Sales et al., 2001). However, the systems exhibit some major drawbacks, e.g. they are primarily designed to measure dissolution and permeation of plain powders or solutions (Kataoka et al., 2003; Kataoka et al., 2006; Legen et al., 2003; Motz et al., 2007; Ruell et al., 2007; Sales et al., 2001) and data are generated after aliquots collection by an operator for off-line analysis, at predetermined periods of time (Barbosa et al., 1996; Buch et al., 2009; Kataoka et al., 2003; Kataoka et al., 2006; Kmetec et al., 1999; Legen et al., 2003; Motz et al., 2007; Mura et al., 1995). Recently, the sequential injection analysis concept (Pires et al., 2010) was used to compare brand and generic dissolution profiles of modified release oral solid dosage forms of valproic acid combination formulations integrated either one or two potentiometric detectors sensitive to valproate only or valproate and sodium ions. In these tablets, valproic acid and its sodium salt are present in different dosages and percentages. The system showed the capability of adequately compare brand and generic drugs, demonstrated either for valproate, as for sodium profiles. Typical dissolution profiles were obtained accordingly not only to respective formulations, but also to relative proportions of valproic acid and its sodium salt, arising from their different intrinsic solubilities. In this work, it is evidenced that the approach used can be extended to enable permeation profiles. Therefore, a permeation module is coupled to the system in order to assess if the dissolution profiles reflect in the same way on the permeation profiles. Two artificial lipid membranes, impregnated respectively in *n*-octanol and a mixture of 1-dodecanol and sodium dioctylsulfosuccinate, were preliminarily studied. The setup feasibility was ascertained by monitoring the influence of formulations, dosages and

proportions on combination valproic acid (VAac) /sodium valproate (NaVA) modified release tablets in the permeation process, and the results compared to the previously obtained dissolution profiles.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and solutions

All solutions were prepared with distilled and double deionised water, with conductivity  $< 0.1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Analytical grade chemicals without additional purification were used.

The plasmatic phase (PP), was simulated by means of a phosphate buffer solution, with  $\text{pH}=7.5$  and with an ionic strength (I) of 0.1 M. This solution was prepared by adding approximately 15 mL of a  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Fluka) solution to 60 mL of a  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma-Aldrich) solutions, both in the concentration of 0.5 M, and completing the volume up to 1 L.

The enteric phase (EP), corresponding to a phosphate buffer solution  $\text{pH} 6.8$ ,  $I= 0.1$  M, was prepared by adding approximately 68 mL of the 0.5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  solution to 44 mL of 0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  solution and completing the volume to 1 L. All dissolution tests were performed using this medium, as recommended in (Sales et al., 2001).

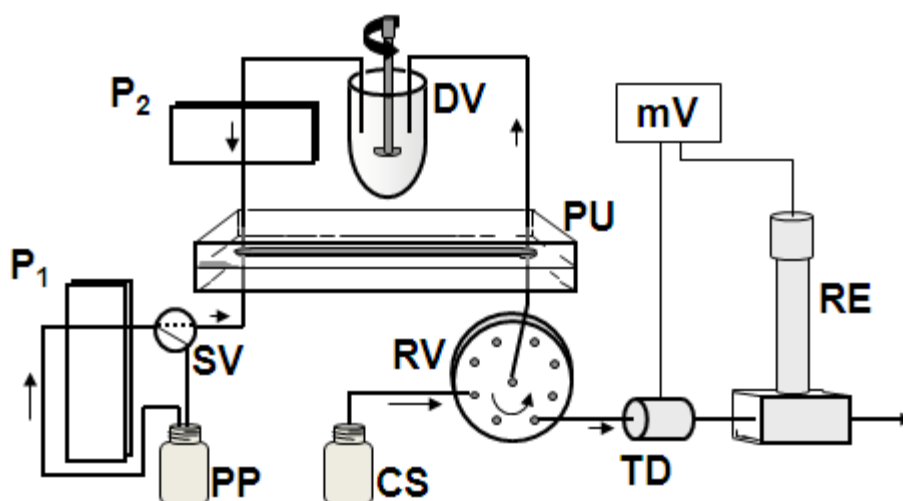
Solutions of 2-propylpentanoic acid sodium salt (Merck) (NaVA) used as the enteric phase were obtained by weighting and dissolving the amount of pure reagent in the phosphate buffer solution to be used in the ion selective electrode calibration.

Pieces (3x2 cm) of cellulose nitrate membrane (Sartorius, SM 16754) were impregnated in 1-octanol for one day at room temperature (Berginc et al., 2007), or for 30 minutes in a mixture of N (1-dodecanol) and S1 (sodium dioctylsulfosuccinate) in the volume ratio of 4.20: 0.1, melted at  $30^\circ\text{C}$  (Barbosa et al., 1996). Afterwards, the membrane pieces were pressed between two sheets of blotting paper to remove the excess of solvents, and incorporated in the acrylic device used as diffusion chamber (Fig.1). Before and after the impregnation process, the membrane pieces were measured to determine the percentage of weight gain (about 200%, for both).

The permeation profiles resulting from diffusion of seven modified-release solid dosage forms (tablets) containing NaVA in association with VAac were assessed. Its content was expressed in mg of NaVA (500 mg or 300 mg), excepting one product (Diplexil®-R) in which the content was expressed in VAac (500 mg). Brand A was Depakine® Chrono 500 film-coated tablets (Sanofi-Aventis SA, Porto Salvo, Portugal, batch n° 04326). Generic A1 was Ácido Valpróico Ratiopharm 500 mg film-coated tablets (Ratiopharm Lda, Carnaxide, Portugal, batch n° H40958). Generic A2 was Ácido Valpróico Sandoz® 500 mg film-coated tablets (Sandoz Farmacêutica Lda, Sintra, Portugal, batch n° 8A5060). Brand B was Depakine® Chrono 300 film-coated tablets (Sanofi-Aventis SA, Porto Salvo, Portugal, batch n° CH355). Generic B1 was Ácido Valpróico Ratiopharm 300 (Ratiopharm Lda, Carnaxide, Portugal, batch n° H33611). Generic B2 was Ácido Valpróico Sandoz® 300 mg film-coated tablets (Sandoz Farmacêutica Lda, Sintra, Portugal, batch n° 8M9588). Brand C was Diplexil® - R 500 mg film-coated tablets (Tecnifar SA, Lisbon, Portugal, batch n° 08LQ133).

## 2.2. Apparatus

The flow system is depicted in Fig.1. It comprised two Minipuls 3 Gilson (Villiers-le-Bell, France) peristaltic pumps ( $P_1$  and  $P_2$ ) with PVC propulsion tubes (1.65 mm i. d.) of the same brand, an eight-port stream selecting valve (RV) from Valco Instruments, model C25-3118, (Huston, USA), one NResearch 161 T031 (Stow, USA) three-way solenoid valve (SV), a home-made acrylic permeation unit (PU) with the diffusion area of 3 cm<sup>2</sup> and a Crison MicropH-2002 potentiometer (mV) to which a 90-02-00 Orion AgCl/Ag reference electrode (RE) (containing phosphate buffer pH 7.5, I= 0.1 M in the outer compartment), and the valproate tubular detector (TD) were connected. All components of the manifold were interconnected with PTFE tubing of 0.8 mm i.d. and home-made devices such as joint pieces, grounding electrode, supports for tubular and reference electrodes were also used. The system was controlled by a microcomputer through an Advantech PCL 711B interface card. Software to control the system and data acquisition was written in Microsoft QuickBasic 4.5 language.



**Figure 1: Schematic view of the proposed flow set-up:  $P_i$  - peristaltic pumps 1 and 2, SV - solenoid valve, DV - dissolution vessel containing a phosphate buffer solution (pH 6.8) as the enteric phase, PU – permeation unit, PP- phosphate buffer solution (pH 7.5) as plasmatic phase, RV- stream selecting valve, CS<sub>i</sub> – valproate calibrating solutions, TD - valproate tubular detector, RE - reference electrode, mV - decimilivoltammeter.**

The Ph. Eur. paddle apparatus was adopted for carrying out the tablets dissolution. For this purpose a single unit apparatus Erweka DT (Germany) equipped with a paddle and a peak vessel (Vankel, USA) was used. The paddle rotational speed and the temperature of the dissolution medium were kept at 50 rpm and  $37.0 \pm 0.5$  °C, respectively.

Valproate selective electrodes without internal reference solution were constructed in a tubular configuration accordingly to (Santos et al., 2006), by using membranes composed of 1% (w/w) of manganese(III) tetraphenyl porphyrine (Merck) as ionophore, 10% relatively to the ionophore amount of sodium tetraphenylborate (Fluka) anionic additive, 66% (w/w) of *o*-nitrophenyloctyl ether (Fluka), and 33% (w/w) of poly(vinyl chloride) (Fluka), dissolved, as immobilizing agent. The membrane cocktail, previously dissolved in tetrahydrofuran (Merck), was dropwised over the inner wall of a central hole drilled in a graphite and epoxy resin conductive support. After complete drying of membranes, the electrodes were attached to the manifold and then hydrated with the carrier stream for a few minutes before being used.

### 2.3. Procedures

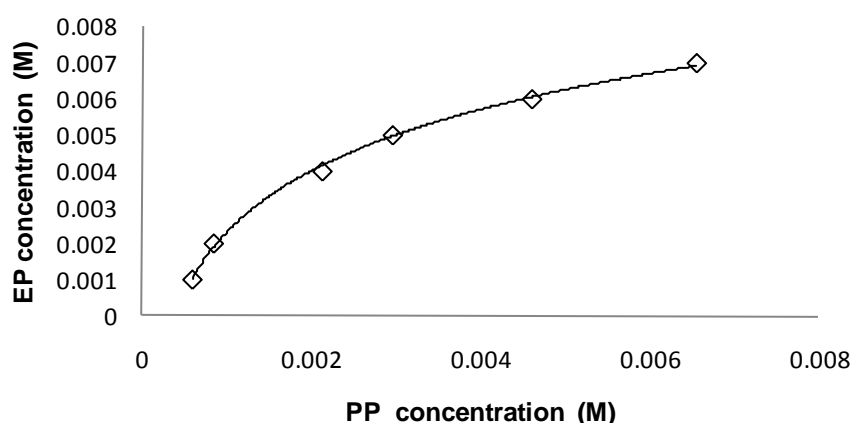
Tablets dissolutions were conducted in phosphate buffer solution pH 6.8, I= 0.1 M, as the simulated enteric phase dissolution medium. During an assay (~7 hours), this solution was constantly conveyed through a tubular path (inner volume of about 1 mL) toward the permeation unit and back into the dissolution vessel, at the fixed flow-rate of 1.2 mL.min<sup>-1</sup>. After each 10 minutes interval the buffer solution (PP) inside the permeation unit, containing permeated valproate was propelled for 100 s towards the detector at 1.2 mL.min<sup>-1</sup> flow rate. At the end of each assay, a calibration was performed, using NaVA standard solutions (CS) prepared in PP buffer and positioned at successive lateral ports of the valve (RV). For this, each solution was aspirated for 10 s, at the same flow-rate and afterwards sent to the detector during 100s. Accordingly to the slopes obtained, percentages of permeated amounts were estimated. Signals were acquired over time and computer stored for further treatment. All assays were run in triplicate, using three tablets of the same batch.

## 3. Results and discussion

### 3.1. System performance and optimization

Lipophilicity and permeability are two related physicochemical properties of new compounds both determined during early stages of drug discovery, once the most common pathway for drug absorption is transcellular passive diffusion (Kerns and Di, 2004). Traditionally lipophilicity, is expressed as the logarithm of the partition coefficient of a compound between *n*-octanol and water, or between *n*-octanol and an aqueous buffer solution (Log K<sub>OW</sub>). In turn, parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) is used for early screening of passive diffusion, by means of a microfilter that has been previously impregnated with a solution of phospholipids and cholesterol or pure octanol (Loftsson et al., 2006). Two different kinds of membrane were tested in the permeation unit, namely one that has been impregnated with a mixture of N (1-dodecanol) and S1 (sodium dioctylsulfosuccinate), and another impregnated with 1-octanol in order to mimic gastric (Barbosa et al., 1996) and enteric walls (Panchagnula et al., 2000), respectively. A

solution of  $5 \times 10^{-3}$  M of NaVA in dissolution medium (EP) was prepared and used as the donor phase. Concentrations of 13% and 35% to the prepared solution were respectively found in the permeated phase, when donor phase was recirculated during long periods of time (30 min). The results obtained evidence lower gastric permeability and are in accordance with literature, referring valproic acid as a BCS class II compound, characterized by low solubility and high intestinal permeability (Loscher et al. 1999; Qiu et al., 2009). When extending the study to donor solutions with concentrations in NaVA down to  $1 \times 10^{-4}$  M, it was noticed that the recirculation period through the permeation unit, before assessment of the permeated concentration was a hydrodynamic variable requiring optimization. Mainly, for periods inferior to 10 min, besides permeability factor, the detected concentration was also influenced by the gradient concentration across the membrane, aspect which determined sub-nernstian calibration slopes especially for concentrations of NaVA below  $1 \times 10^{-3}$  M. For this reason the lowest period between two consecutive assessments of permeated concentration was fixed in 10 min, thus ensuring both sensitive and detailed quantitative information about the tandem dissolution-permeation process. Obtained analytical signals were independent for flow rates up to the  $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Since flow rates are not physiologically relevant in what concerns permeation processes (Motz et al., 2007), that value was fixed. Finally, in order to obtain accurate concentration data, the conditions for detector calibration were firstly searched by aspiration for different times (5, 7 and 10 s), different volumes of NaVA standard solutions assessed from lateral ports of the stream selecting valve, then sent towards to the tubular valproate-selective electrode. The results obtained for 7 and 10 s allowed linear potential vs. logarithmic NaVA concentrations in the analytical range between  $1 \times 10^{-4}$  and  $1 \times 10^{-1}$  M, with nernstian slopes ( $-59.0$  and  $-61.6 \text{ mV} \cdot \text{dec}^{-1}$ , respectively). Afterwards, six NaVA calibrating solutions ( $7 \times 10^{-3}$ ;  $6 \times 10^{-3}$ ;  $5 \times 10^{-3}$ ;  $4 \times 10^{-3}$ ;  $2 \times 10^{-3}$ ;  $1 \times 10^{-3}$  M) were set on closed circuit through the membrane and every 10 minutes, permeated solution sent towards the detector. The logarithmic relationship  $PP=0.0025 \ln(EP) + 0.0193$ ;  $R^2=0.9982$  was found for the NaVA concentration in the EP and PP phases, respectively (Fig. 2).



**Figure 2: Permeated valproate amounts (expressed in M) obtained with six donor solutions of sodium valproate  $7 \times 10^{-3}$ ;  $6 \times 10^{-3}$ ;  $5 \times 10^{-3}$ ;  $4 \times 10^{-3}$ ;  $2 \times 10^{-3}$ ;  $1 \times 10^{-3}$  M in phosphate buffer pH 6.8. Aliquots of permeated valproate amounts were collected in 10 minutes intervals. PP: plasmatic phase; EP: enteric phase.**

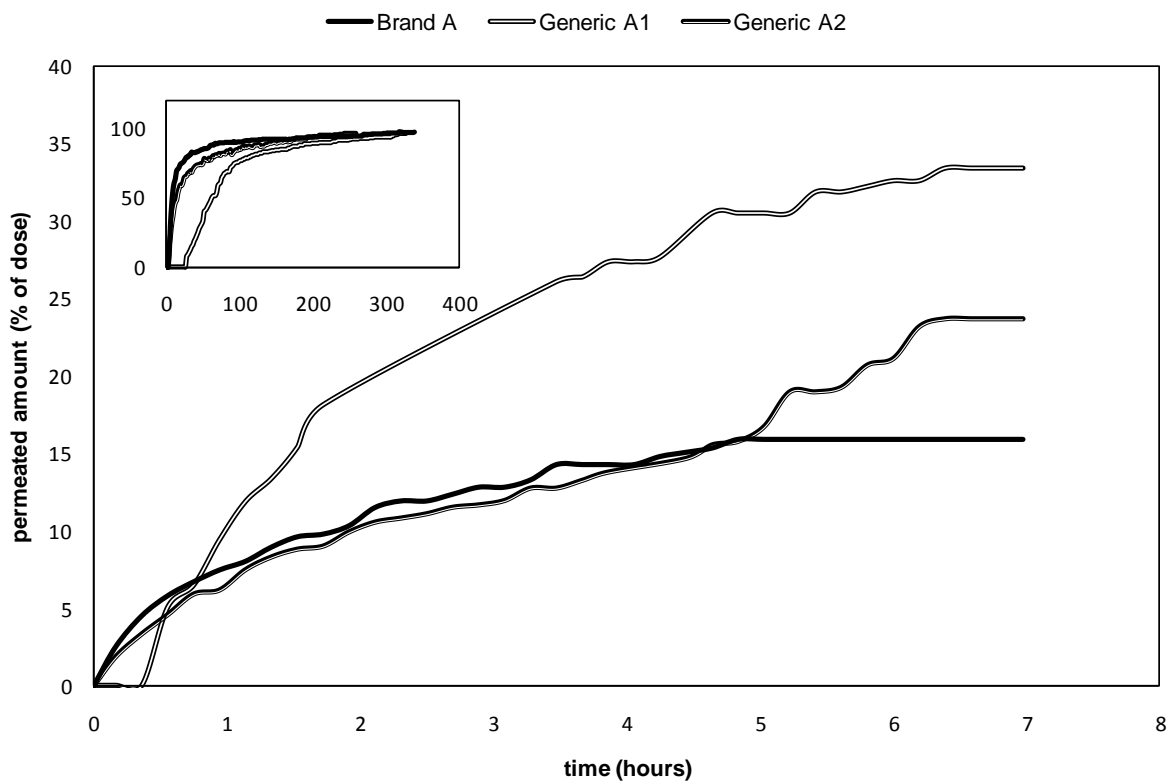
### 3.2. Analytical application

Brand and generic commercial associations of NaVA/ VAac (2:1 molar relationship) were assayed in 500 mg and 300 mg dosage forms, and the respective permeation profiles averages (permeated valproate amount expressed in % relatively to labeled amount per tablet) plotted versus time in hours, for each dosage form. Figure 3A represents Brand A and Generics A1 and A2 equivalent to 500 mg in NaVA and figure 3B shows Brand B and Generics B1 and B2 equivalent to 300 mg in NaVA. A NaVA/ VAac formulation (1:1 molar relationship) equivalent to 500 mg in VAac was also tested (fig. 3C, Brand C). Inside the plots, a smaller chart depicts the respective dissolution profiles (Pires et al., 2010) for each of the formulations tested (time in minutes vs. the percentage of released valproate relatively to the labeled amount).

Fig. 3A shows that similar permeation profiles are obtained either for Brand and Generics. Generic A1 presents a higher permeated amount percentage relatively to Generic A2 and Brand A (about 10% more than Brand formulation). Also, a lag time without permeated amount (30 minutes) is noticed in this last formulation. When comparing this profile versus the dissolution one (smaller chart presented on the upper left), it is possible to observe that a lag time of about 20 minutes without releasing VA is noticed in Generic A1, corroborating the results herein presented. Moreover, dissolution

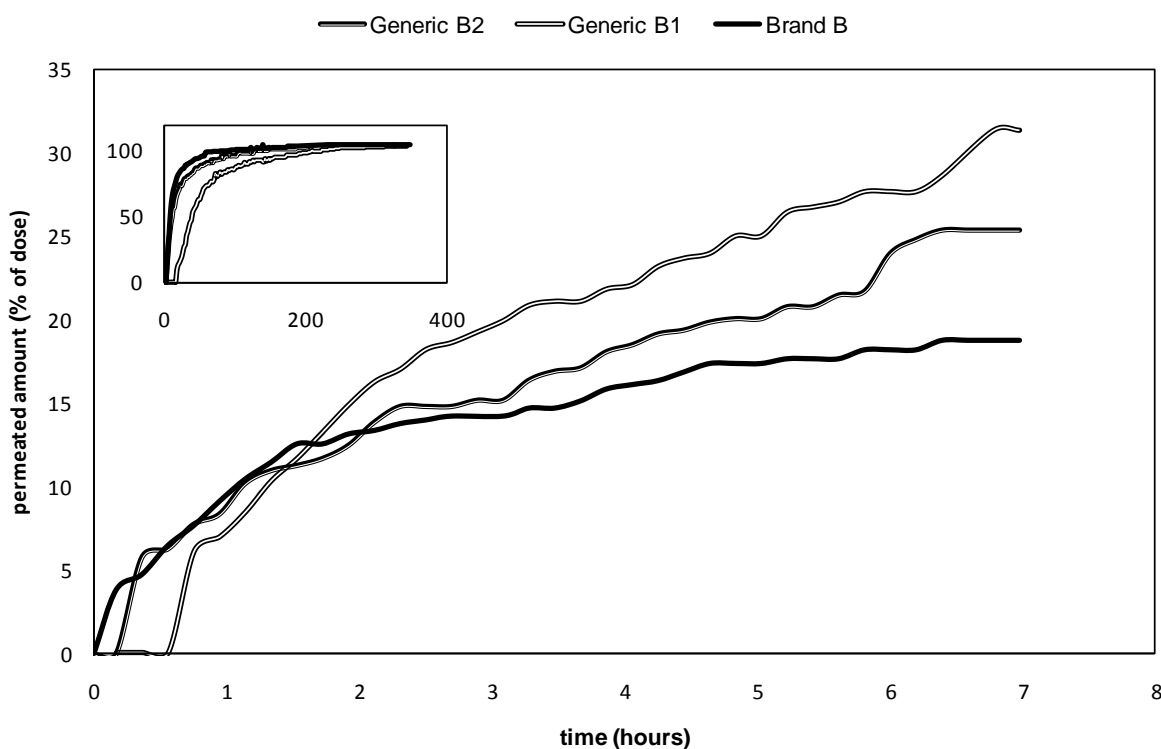


profiles characteristics can be related to permeation profiles in all formulations. In both kinds of profiles, Generic A1 presents major differences than Generic A2, when compared to brand.



**Figure 3A: Averaged permeation profile obtained after the assay of three tablets of the same lot. Permeated valproate amounts are expressed in percentage relatively to labeled dose amount per tablet versus time, in hours. The smaller charts show the respective dissolution profiles. A: Brand A, Generic A1 and Generic A2 formulations, with a 2:1 molar relationship in sodium valproate/ valproic acid, equivalent to 500 mg in sodium valproate.**

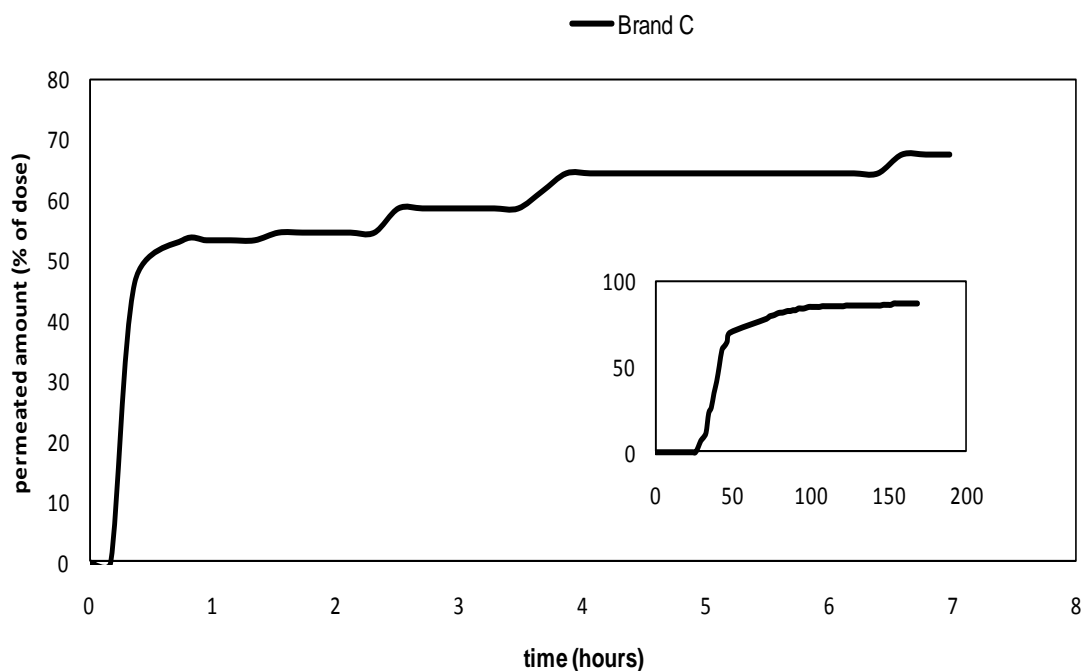
When analyzing fig. 3B, the same profiles development can be observed for 300 mg Brand B, Generic B1 and B2. In fact, for each formulation, permeation percentages are similar to 500 mg ones, strengthening the obtained results. Once more, differences relatively to Brand B formulation are accentuated in Generic B1 that presents a lag time without permeated VA amounts (30 minutes). These results are also comparable to dissolution ones (smaller chart on the upper left of the board).



**Figure 3B: Brand B, Generic B1 and Generic B2 formulations, with a 2:1 molar relationship in sodium valproate/ valproic acid, equivalent to 300 mg in sodium valproate.**

Figure 3C shows the profile of permeated VA amounts with time, of another modified release formulation (equivalent to 500 mg of VAac). Major differences are noticed between this and the previously referred ones, in what concerns profile development and permeated percentages obtained (approximately two times higher). These differences are probably due both to formulation type, and to VAac / NaVA proportions that are in a one to one molar relationship. In fact, the relative quantity of these two forms might favor the conversion of valproate acid to salt that occurs at pH 6.8, and thus the rapid dissolution and absorption of the compound. Therefore, the increase pressure applied on the artificial membrane causes accelerated and higher permeation amounts relatively to the other formulations. Although it was not possible to find evidence in literature showing distinct absorption rates corresponding to different relative proportions between VAac/ NaVA, and the advantages of using a 1:1 molar association are not yet fully clarified (Fisher and Broderick, 2003), some manufactures reported slight changes in pharmacokinetic parameters regarding this particular formulation, such as maximum plasma concentration, time to maximum concentration, and half-life (Fisher and Broderick, 2003). Hence, the permeability profiles herein presented using both type of

VAac/ NaVA molar associations (Fig. 3 A, B and C), can probably help to explain the reported pharmacokinetic differences concerning 1:1 proportion (Fisher and Broderick, 2003). In fig. 3C, a lag time without permeated VA amounts is shown. This is perfectly comparable with the dissolution profiles of the same formulation (smaller chart on the down left of the board), in which a lag time of about 25 minutes occurs.



**Figure 3C: Brand C formulation, with a 1:1 molar relationship in sodium valproate/ valproic acid, equivalent to 500 mg in valproic acid.**

Coefficient variations averages were calculated for the groups of tested formulations. The obtained values are inferior to 15% in all formulations, proving the reproducibility of the procedure. During the entire assays period, the tubular detector performance was not altered due to possible leaching of organic solvent from the membrane, and potential drift was negligible.

#### 4. Conclusions

With the increase of the demands referring to bioequivalence, new practical and inexpensive in vitro analytical methods to forecast bioavailability are required. At early

stages of drug development, in vitro dissolution testing and permeation studies are useful tools to select compounds for drug discovery, to initial formulation approaches and to provide guidance on optimizing drug release from formulations, by identifying characteristics that might influence or have a critical effect on bioavailability. They are also an excellent contribution to support the assumption of similarity between alternative formulations of the same active substance, dosage and form, and for the regulation of bioequivalence of the drug product during scale-up and post approval.

In this work, a previously reported SIA system is adapted to perform sequentially dissolution/permeation (D/P) tests, with potentiometric detection. Several commercial samples were analyzed and the permeation profiles are concordant with the previously obtained dissolution ones. The results showed characteristic and reproducible profiles depending on the generic, dosage form, formulation type and relative proportions between VAac and its sodium salt. Valproate tubular detector showed appropriate characteristics to this kind of studies, once the active principle amounts are determined in a broad concentration range, without requiring further sample pre-treatment. The proposed tandem D/P system shows potential adaptation to high throughput screening of permeability capacity of new molecules, which is nowadays a demand to keep in pace with the drug discovery pipeline.

#### **Acknowledgments:**

Ana Rita Pires acknowledges FCT and FCE for a PhD grant (SFRH/BD/25995/2005).

#### **5. References**

Amidon, G.L., Lennerlas, H., Shah, V.P., Crison, J.R., 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 12, 413-420.

Barbosa, C. M., Pinho, A. A., Prista, L. N., 1996. In vitro study on the gastrointestinal absorption of streptomycin: The influence of pH and surfactant agents, *Rev Port Farm.* 14, 1015-1023.

Berginc, K., Zakelj, S., Levstik, L., Ursic, D., Kristl, A., 2007. Fluorescein transport properties across artificial lipid membranes, Caco-2 cell monolayer and rat jejunum. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 281-285.

Buch, P., Langguth, P., Kataoka, M., Yamashita, S., 2009. IVIVC in Oral Absorption for Fenofibrate Immediate Release Tablets using a Dissolution/ Permeation System. *J Pharm. Sci.* 98, 2001-2009.

Dressman, J., Butler J., Hempenstall, J., Reppas, C., 2001. The BCS: Where Do We Go from Here, *Pharm. Technol.* 7, 68-76.

FDA, 1997. Guidance for Industry on Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage forms, Center for drug evaluation (CDER).

FDA <sub>a</sub>, 2000. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) Guidance, US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).

FDA <sub>b</sub>, 2000. Guidance for Industry on the Waiver of in vivo Bioavailability and Bioequivalence for Immediate Release Solid Oral Dosage forms based on Biopharmaceutical Classification System, Center for drug evaluation (CDER).

Fisher, C., Broderick W., 2003. Sodium valproate or valproate semisodium: is there a difference in the treatment of bipolar disorder? *Psychiatric Bulletin*, 27, 446-448.

Kataoka, M., Masaoka, Y., Yamazaki, Y., Sakane, T., Sezaki, H., and Yamashita, S., 2003. In Vitro System to Evaluate Oral Absorption of Poorly Water-Soluble Drugs: Simultaneous Analysis on Dissolution and Permeation of Drugs. *Pharm. Res.* 20, 1674-1680.

Kataoka, M., Masaoka, Y., Sakuma, S., and Yamashita, S., 2006. Effect of Food Intake on the Oral Absorption of Poorly Water-Soluble Drugs: In Vitro Assessment of Drug Dissolution and Permeation Assay System. *J. Pharm. Sci.* 95, 2051-2061.

Khan, G.M., 2001. Controlled release oral dosage forms: Some recent advances in matrix type drug delivery systems, *J. Medical Sci.* 1, 350-54.

Kerns, E.H., Di, L., 2004. Physicochemical profiling: overview of the screens, *Drug Discov. Today: Technologies.* 1, 343-348.

Kmetec, V., kozjek, F., Veber, M., 1999. Chromatographic and permeation analysis of ciprofloxacin metal complexes. *Int. J. Pharm.* 176, 225-230.

Legen, I., Zakelj, S., Kristl, A., 2003. Polarized transport of monocarboxylic acid type drugs across rat jejunum in vitro: the effect of mucolysis and ATP- depletion, *Int. J. Pharm.* 256, 161-166.

Lobenberg, R., Amidon, G.L., 2000. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur. J. Pharm. Sci.* 50, 3–12.

Loftsson, T., Konrádsdóttir, F., Másson, M., 2006. Development and evaluation of an artificial membrane for determination of drug availability. *Int. J. Pharm.* 326, 60-68.

Loscher, W., Parnham, M. J., Bruinvels, J., 1999. Valproate, Milestones in Drug Therapy. Birkhauser Verlag P.O. Box 133, CH 4010, Basel, Switzerland.

Motz, A., Klimundová, J., Scafer, U. F., Balbach, S., Eichinger, T., Solich, P., Lehr, C., 2006. Automated measurement of permeation and dissolution of propranolol HCl tablets using sequential injection analysis. *Anal Chim Acta* 581, 174-180.

Motz, S. A., Schaefer, U. F., Balbach, S., Eichinger, T., Lehr, C., 2007. Permeability assessment for solid oral drug formulations based on Caco-2 monolayer in combination with a flow through dissolution cell. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 286-295.

Mura, P., Nassini, C., Proietti, D., Manderioli, A., Corti, P., 1995. Effect of presence and type of lipophilic compound on the in vitro diffusion of clonazepam from hydrophilic ointment bases. *Pharm. Acta. Helv.* 70, 175-180.

Olivella, M., Debattista, N. B., Pappano, N. B., 2006. Salicylic acid permeation: a comparative study with different vehicles and membranes, *Biocell* 30, 321-324.

Panchagnula, R., Thomas, N. S., 2000. Biopharmaceutics and Pharmacokinetics in drug research. *Int. J. Pharm.* 201, 31-135.

Pires, A. R., Araújo, A.N., Barbosa, C.M., Montenegro, M.C.B.S.M., 2010. Assessment of dissolution profiles of brand and generic valproic acid formulations based on an experimental clean automatic approach. *Int. J. Pharm. Technol.* 2, 1037-1054.

Qiu, Y., Chen, Y., Zhang, G.G.Z., 2009. Developing Solid Oral Dosage Forms, Pharmaceutical Theory & Practice. Academic Press, Elsevier Inc.

Ruell, J. A., Tsinman, K. L., Avdeef, A., 2003. PAMPA – a drug absorption in vitro model. 5. Unstirred water layer in iso-pH mapping assays and  $pK_a^{\text{flux}}$  –optimized design (p OD- PAMPA). *Eur. J. Pharm. Sci.* 20, 393-402.

Sachan, N.K., Singh, D., 2006. Evaluation of dried pulp from *Carica papaya* fruits as disintegrating agents in the formulation of metformin hydrochloride dispersible tablets. *J. Assam. Sci. Soc.* 46, 20-22.

Sachan, N.K., Bhattacharya, A., Pushkar, S., Mishra, A., 2009. Biopharmaceutical classification system: A strategic tool for oral drug delivery technology. *Asian J. Pharm.* 3, 76-8.

Sales, M. G. F., Reis, B. F., Montenegro, M. C. B. S. M., 2001. Automatic multicommutated flow system for diffusion studies of pharmaceuticals through artificial enteric membrane. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26, 103-109.

Santos, E. M. G., Araújo, A.N., Couto, C.M.C.M., Montenegro, M.C.B.S.M., 2006. Construction and evaluation of PVC and sol-gel sensor membranes based on Mn(III)TPP-Cl. Application to valproate determination in pharmaceutical preparations. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 867-875.





# CAPÍTULO

## VII

### Conclusão



O trabalho desenvolvido e exposto ao longo desta dissertação permitiu concluir que a demanda analítica e o aumento do número de amostras para análise, impostas pelas autoridades reguladoras do medicamento, fazem com que a indústria farmacêutica recorra cada vez mais a métodos analíticos robustos, simples e convenientemente validados. Estes aplicam-se em todas as fases do ciclo de vida do medicamento, nomeadamente na análise de matérias-primas, do produto a granel, do produto final e das impurezas, nos estudos de estabilidade, na fase de caracterização de biodisponibilidade e bioequivalência, e na pesquisa de novas entidades químicas com interesse farmacêutico. Os métodos desenvolvidos baseados na análise por injeção sequencial com detecção potenciométrica enquadram-se nas pretensões da indústria farmacêutica e possuem características que os capacitam para a análise de matrizes farmacêuticas de elevada complexidade. Nestas, incluem-se aquelas derivadas de medicamentos constituídos por combinações de princípios activos. Relativamente aos métodos tradicionais utilizados na indústria, cujo líder indiscutível é a cromatografia líquida de elevada eficiência, com detectores do tipo *diode array*, ou espectrometria de massas, os métodos SIA - potenciometria possibilitam uma elevada rapidez de análise, facilidade de tratamento de amostra, flexibilidade, selectividade para discernir entre diferentes princípios activos e os seus produtos de degradação, amplo intervalo de resposta linear, baixo custo, e reduzido consumo de amostra e reagentes, bem como geração diminuída de efluentes.

O emprego de ciclodextrinas traduziu-se na obtenção de eléctrodos com selectividade melhorada relativamente ao uso de sais lipofílicos, cujo funcionamento se baseava no mecanismo de troca iónica. Este facto deve-se, sobretudo, à possibilidade de complexação da estrutura macrocíclica da ciclodextrina com a molécula-alvo, tornando a resposta mais selectiva. A utilidade dos sensores desenvolvidos foi comprovada pela sua aplicação em ensaios de doseamento em polivitamínicos, que constituem matrizes de elevada complexidade evidenciada pela presença de quantidade apreciável de princípios activos com estrutura molecular semelhante à dos analitos alvo.

A associação da potenciometria a técnicas de fluxo facilitou a discriminação analítica do sinal transiente obtido. Com o sistema SIA - potenciometria foi possível quantificar dois princípios activos em simultâneo, em soluções padrão e em medicamentos polivitamínicos, através da aplicação de ferramentas quimiométricas para tratamento dos dados obtidos, e recorrendo apenas a um detector tubular de membrana plástica baseado em  $\beta$ - ciclodextrina, de fácil construção e de baixo custo. A versatilidade do sistema permitia ainda a geração automatizada de um elevado número de soluções de

calibração em linha, conferindo uma poupança drástica no tempo de um operador e também nos reagentes químicos empregues na análise.

Através do uso de detectores potenciométricos tubulares colocados em série, foi possível a determinação, em simultâneo e de uma forma automatizada, dos perfis de dissolução individuais de dois componentes, em formulações farmacêuticas de libertação modificada. Com o emprego deste tipo de sistemas SIA – potenciometria foram obviados os problemas mais críticos associados aos métodos espectrofotométricos correntemente utilizados nos ensaios de dissolução multi-componente, nomeadamente a interferência de bolhas e de artefactos nos caminhos ópticos, bem como a resposta de excipientes e de outros princípios activos que absorvem no ultra-violeta e que geralmente implicam o recurso a métodos derivativos ou a calibração multivariada. Também aqui a versatilidade do sistema SIA-potenciometria se traduzia na possibilidade de gerar perfis em tempo real, contrariamente ao que acontece quando se usa para o mesmo efeito um sistema de HPLC-UV associado a um aparelho de dissolução, para além da elevada resolução que proporcionava. Isto facilitava a comparação entre as formulações genéricas e o medicamento de referência, bem como o estudo de fenómenos relacionados com a formulação e com as proporções relativas das formas salinas e ácidas do API, evidenciando grande utilidade, sobretudo nas fases iniciais do desenvolvimento galénico.

O acoplamento dos ensaios de dissolução a ensaios de permeabilidade foi efectivado com base neste tipo de sistemas de fluxo SIA-potenciometria, não havendo necessidade de os reconfigurar fisicamente. Deste modo, foi possível relacionar as cinéticas de dissolução dos componentes da formulação de libertação modificada, com as taxas de permeabilidade em tempo real, através de membranas lipídicas artificiais. O sistema descrito mostrou ser uma ferramenta útil para os estudos de formulação, possibilitando a opção imediata pelas formas farmacêuticas cujas cinéticas de dissolução e permeabilidade mais se aproximavam das do medicamento de referência, o que reflectia uma influência similar dos excipientes usados na sua preparação. Esta possibilidade é vantajosa no caso da preparação de um produto genérico, para o qual os resultados obtidos nos ensaios de biodisponibilidade/bioequivalência deverão aproximar-se, tanto quanto possível, daqueles apresentados pelo seu congénere de referência.

Dentro do âmbito desta tese foi possível concluir que futuros esforços deverão ser feitos no sentido de modificar a composição das membranas sensoras dos detectores potenciométricos, tornando a sua resposta menos afectada pela presença de tensoactivos. Este aspecto permitiria a sua aplicação em meios de dissolução contendo surfactantes, ou meios que simulem a condição pré e pós prandial, de forma a mimetizar

mais fielmente as condições *in vivo*. A interface deste tipo de sistemas com células do tipo Caco II, ou com tecido do intestino delgado de rato, constituiria uma abordagem interessante para desenvolver estudos posteriores que reflectissem o comportamento de moléculas ou formulações seleccionadas, face a fenómenos de transporte mediado.

Também o desenvolvimento de *arrays* de sensores potenciométricos, ou “línguas electrónicas”, seria uma outra área de interesse para o futuro, já que, inseridos em sistemas de fluxo com elevado grau de automatização, poderiam ser aplicados ao doseamento concomitante de mais do que um princípio activo e impurezas, aspecto que é útil sobretudo na análise de formulações multi-componente. Esta linha de investigação nunca poderia dissociar-se dos estudos de desenvolvimento de membranas sensoras potenciométricas, com selectividade adequada para as espécies a medir.

A busca por metodologias ambientalmente limpas tem vindo a constituir uma preocupação global cada vez mais premente, de acordo com as directrizes ecológicas implementadas pelos países líderes do mundo ocidental. Neste âmbito, os detectores potenciométricos acoplados à análise por injeção sequencial mostram reduzir drasticamente quer a produção, quer o consumo de solventes orgânicos, danosos para os frágeis ecossistemas terrestres. Uma das mais-valias que se destaca nesta linha de investigação consiste na sua facilidade de implementação e no custo reduzido, o que os torna extremamente atractivos para os laboratórios de análise e para as indústrias farmacêuticas de países em vias de desenvolvimento, contribuindo para a criação de riqueza e para o desenvolvimento sustentável. Os métodos SIA – potenciometria são aliados potenciais da produção de medicamentos genéricos e, de uma maneira geral, podem conduzir à redução dos gastos associados com os processos de investigação e desenvolvimento, o que se reflecte não só nas empresas, mas também no consumidor final. De acordo com este ponto de vista, os sistemas SIA-potenciometria poderão representar uma alternativa sustentável e um ponto de partida para o desenvolvimento de métodos robustos, económicos e amigos do ambiente, contribuindo para a democratização no acesso aos cuidados básicos de saúde.